รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชาญวิทย์ โคธีรานุรักษ์. สรีรวิทยาของต่อมธัยรอยด์. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2529

ประพันธ์ ภานุภาค. วิทยาภูมิคุ้มกัน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2522

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. อิมมูโนวิทยา. โรงพิมพ์อักษรสมัย, 2529 : 51-55

ภาษาอังกฤษ

Abraham,G.E. J. Clin. Endocr. 29 (1969) : 866

Beiser,S.M.,Erlanger,BB.F., Agate,F.J. and Lieberman,S. Antigenicity of steroid-protein conjugates. Scince 129 (1959) :564-565

Berson,S.A. and Yalow,R.S. Radioimmunoassay : Astatus report. In Immunology : Current Knowledge of Basic Concepts in Immunology and Their Clinical Application, 1971

Boud, A.W., and W.S. Peart, Lancet 2 (1968) : 129

Braveman,L.E., Utiger,R.D., The thyroid: A Fundamental and Clinical Text. 6th ed. J.B. Lippincott Company, 1991 : 51-63 , 144-167, 190-225

Brown,P.S., R.P.Ekins, S.M.Ellis and W.S.Reith. J. Endocr. 46 (1970) : i (Abstract)

Bulter, V.P, and J.P. Chen. Proc. Nat. Acad. Sci : 57(1967) : 71-78

Burke,C.W., Shakespear,R.A. Rapid purification of triiodothyronine and thyroxine proteins conjugates for antibody production. Endocr.J. 65 (1975) : 133-138

Byfield,P.G.H., Clingan,D., and Himsworth, R.L. Exposure of thyroxine residue in human thyroglobulin. Biochem.J. 219 (1984) : 405-410

Carpenter,P.L. Immunology and Serology. 2nd ed. W.B. Saunders Company 1989

Chard,T. ; An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 1981 :301-325

Chopra,I.J., Nelson,J.C., Solomon,D.H., Beall,G.N. Production of antibodies specifically binding triiodothyronine and thyroxine. Clin.Endocr.J. 32 (1971) : 299-308

Churchill,W.H. and Tapley,D.E. Antibodies specific for thyroxine and its analogues. Nature 202 (1964) : 29-31

Clutton,R.F., Harington,C.R., Yuill,M.E. Preparation of antigenic properties of thyroxyl derivatives of proteins and physiological effects of their antisera. Biochem.J. 3 (1938): 1119-1123

Cruickshank,R. and Weir,D.M. Modern trends in immunology. 1967 : 28-48

Deodhar,S.D., and S.M.Genuth. Clin. Lab. Sci. 1 (1970) : 119

Doleschall,G. and Lampert,K. On the mechanism of carboxyl condensation by carbodiimides. Tetrahedron Lett. 18 (1963) : 1195-1199

Edelman,G.M. Cellular selection and regulation in the immune response. Raven Press, 1974 : 265-266

Erlanger,B.F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. Pharmalogical Rev. 25 (1973) : 271-278

_____ ., Borex,F., Beiser,S.M., Lieberman,S. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. Biol.Chem.J. 228 (1957) : 713

Ferrua,B., Genetet,F., Savaron,M.L., Moulin,C., Salard,J.L., and Masseyeff,R. A novel enzyme immunoassay for total thyroxine using immobilized antibodies and hydrophobic chromatography purified thyroxine-peroxidase conjugate. J.of Immune.methods. 87 (1986) : 137-143

Furuyama,S., D.M.Mayes, and C.A.Nugent. Steroid 16 (1970) : 415

Gharib,H., Ryan,R.J., Mayberry,W.E. and Hockert,T. Radioimmnunoassay for triiodothyronine. Clin.Endocr.J. 33 (1971) : 509-516

Goodfriend,T.L., Fasman,G.D. A use of carbodiimides in immunology. Science. 144 (1964) : 1344-1346

Granath,K.A., Koist,B.E. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography on sephadex. J.Chromatogr. 28 (1967) : 69-81

Greenstein,J.P. and Winitz,M. Chemistry of the Amino Acids. vol. II, Newyork, John Wiley & Son (1961)

Haber,E., Page,L.B., Jacoby,G.A. Synthesis of antigenic branch-chain copolymers of angiotensin and poly-D-lysine. Biochemistry. 4 (1965) : 693-698

Harington, C.R. Chemistry of thyroxine. XXXIX. Isolation of thyroxine from the thyroid gland. Biochem.J. XX (1926) : 293-299

Heidelberg,M., Sia,R.H.P., and Kendall,F.E. Specific precipitation and mouse protection in type I antipneumococcus sera. J.Exper.Med. 52 (1930) : 477-483

Hesch,R.D. and Hufner,M. Highly specific antibodies to triiodothyronine. Acta biological et medica germanica. 28 (1972) : 861-864

Holub,M. The lymphocyte and the immnune response. Modern trends in immunology. 1967 : 119-150

Jaffe,B.M., Smith,J.W., Newton,W.T. and Parker,C.W. Radioimmunoassay for prostaglandins. Science. 171 (1971) : 494-496

Jiang,N.S., and R.J.Ryan. Proc. Mayo Clin. 44 (1969) : 461

Jonsson, J.A.F., Nature (London) 212 (1966) : 417

Jogensen,E.C. Mayo Clin. Proc. 39 (1964) : 560

Kabat,E.A. Experimental Immunochemistry 2nd ed. 1961

_____ Structural concepts in immunology and immunochemistry. Holt, Rinehart and Winston, Inc. 1968 : 82-90

Karol,M.H. and Tanenbaum,S.W. Antibodies to hapten-conjugated proteins which cross-react with RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57 (1967) : 713-720

Kendall,E.C. Thyroxine. N.Y.: THE CHEMICAL CATALOG COMPANY, Inc. 1954

Klingenberg,M. and Pfaff,E. Regulation of metabolic process in mitochondria. Elsevier, Amsterdam. 1966

Laemmli, U.K. Nature, 227 (1970) : 680-685

Landsteiner,K. The specificity of serological reactions, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass, 1946

_____ Uber heterogenetics antigen and hapten. Biochem.J. 119 (1971) 294-306

Larsen,P.R. Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. J. of Clin. Invest. 51 (1972) :1939-1949

Lieberman,S., B.F.Erlanger, S.M.Reiser and F.J.Agate, Jr. Rec. Prog. Hormone Res. 15 (1959) : 165

Louit,J.F. Biocycles in the reticuloendothelial system. Ann.N.Y. Acad Sc. 88 (1960) : 122-123

Maanen, J.V., G.Pogoriler, and E.A. Sellens. Fed. Proc. 28 (1970) : 782 (Abstract)

Margherita, S.S., and B.N. Prechamandra. J.Immun. 102 (1969) : 1511

Mayes,D., S.Furuyama,D.C.Ken, and C.A.Nugent. J Clin. Metab. 30 (1970) :682

McKenzie, J.M., and H.Haibach. Endocrinology. 80 (1967) : 1097

Midgley,A.R., Jr., and G.D.Niswender. Radioimmunoassay of steroid. Acta. Endocr. 1970 : 320-328

Mitsuma,T., Gershengorn,M., Colucci,J. and Hollander,C.S. Radioimmunoassay of triiodothyronine in unextracted human serum. J. of Clin. Endocr. and Met. 33 (1971) :364-367

Myroik,Q.N., Weiser,R.S. Fundamentals of immunology 2nd ed. 1984 : 4-10

Oliver,G.C., Jr.,B.M., Parker, D.L.Brasfield. J. Clin. Invest. 47 (1968) : 1035-1042

Prechamandra, B.N., A.K. Ray, Y. Hirata, and H.T. Blumental. Endocrinology. 73 (1963) 135

Porath,J., Flodin,P. A method for desalting and group separation. Nature. 183 (1959) : 1657-1659

Roitt,I. Essential immunology. 5th ed. PG ASIAN ECONOMY. 1984 : 153-158

Sakata,S., Nakamura,S., Komaki,T. and Miura,K. Production of anti-human thyroglobulin and anti-thyroid hormone antibodies in rabbit immunized with human thyroglobulin. Endocr.Japon. 32 (1985) : 65-72

Sela,M., Arnon,R. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. Biochem.J. 75 (1960) : 91-93

_____., Fuchs,S., Aronon,R. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. Biochem.J. 85 (1962) : 223-235

_____., Ungar-Waron, H., and Schechter,Y. Uridine-specific antibodies obtained with synthetic antigens. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52 (1964) : 285-292

Shands,J.K. The immunity role of the macrophage. Modern trends in immunilogy. LONDON BUTTERWORTHS. 1967 : 86-118

Sheehan,J.C., Cruickshank,P.A., Boshart,G.L. A convenient synthesis of water-soluble carbodiimides. J.Org.Chem. 26 (1961) : 2525-2526

_____., Hlavka,J.J. The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptides synthesis. J.Am.Chem.Soc. 1956 : 439-441

Stasilli, N.R., Kroc, R.L., Meltzer, R.I. Antigoitrogenic and calorigenic activities of thyroxine analoques in rats. Warner-Lambert Research Insitute. 64 (1959) : 61-82

Stasom,W.B., Vallotton,M., Harber,E. Synthesis of an antigenic copolymer of angiotensin and succinylated poly-L-lysine. Biochim. Biophys.Acta. 133 (1967) : 582-584

Steiner,A.L., D.M.Kipins, R.D.Utiger, and C.W.Parker. J. Lab. Clin. Med. 74 (1969) :1016

Vaughan,J.R.Jr. and Osato,R.L. Preparation of peptides using mixed carbonic-carboxylic acid and anhydrides. J. Amer. Chem. Soc. 74 (1952) : 676-678

Vignais,P.M. and Vignais,P.V. Biochim.Biophys.Acta. 325 (1973)

Visscher,M.D. The thyroid gland. Raven Press,N.Y. 1980 : 39-42

Webb,T., Goodman,H.C. The structure and function of immunology. Modern trends in immunology. 1967 : 151-187

Weir,D.M. Immunochemistry Vol.1. 4th ed. 1986 : 1.1-1.4

ภาคผนวก

วิธีเตรียม 0.05 M PB (Phosphate Buffer)

เตรียม 0.5 M PB

1. ชั่ง Na_2HPO_4 57.1 กรัม
2. ชั่ง $Na_2HPO_4 - H_2O$ 13.5 กรัม

นำ สารละลาย 1 และ 2 ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 900 มล. ปรับให้ได้พีเอช 7.4 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล.

นำสารละลายข้างต้นมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นจะได้ 0.05 M PB

วิธีเตรียม HFS (Hormone Free Serum)

1. นำซีรัม 500 มล. กวนด้วยเครื่องกวนสารละลายในเรซิน [AGI - X8 200-400 mesh (Cl^-)] 150 กรัม ที่อุณหภูมิ 37 ^{o} ซ เป็นเวลา 3 ชม. ทำซ้ำ 2 ครั้ง
2. กรองซีรัมที่กวนแล้ว
3. เติม 1 : 100 ของ' 10 % โซเดียมเอไซด์ (NaN_3)
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 ^{o} ซ

การล้างเรซิน

1. หลังจากกวนในซีรัมแล้ว กรอง ล้างด้วยน้ำกรองจนไม่มีฟอง
2. กวนในสารละลาย 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1ลิตร ต่อ เรซิน 300 กรัม) 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง กรองแล้วล้างจนพีเอชเป็น 7.0
3. กวนในสารละลาย 1 M ไฮโดรคลอริก (1 ลิตร ต่อ เรซิน 300 กรัม) 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง กรองแล้วล้างจนพีเอชเป็น 7.0
4. เก็บไว้สำหรับใช้ครั้งต่อไป

วิธีเตรียม STD T4 (ค่ามาตรฐานธัยรอกซิน)

1. ชั่งธัยรอกซิน (L-thyroxine free acid , sigma) 2.223 มก. ละลายด้วยแอมโมนิคัล (2 นอร์มอล) เอทานอล (ไม่ควรเกิน 0.5 มล.)
2. เจือจางด้วย 50 % โพรพิลีน ไกลคอล (propylene glycol aq.) จนครบ 10 มล. ในขวดวัดปริมาตร
3. นำสารละลายข้างต้นมาเจือจางลง 1 : 10 ด้วย 50 % โพรพิลีน ไกลคอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 326 นาโนเมตร ความเข้มข้นธัยรอกซินมีค่าเท่ากับ ค่าการดูดกลืนหารด้วย 6210 หน่วยไมโครโมลาร์

4. นำมาเจือจางด้วย ฮอร์โมนฟรีซีรัม ให้มีความเข้มข้น 10 , 50 , 100 , 150 และ 300 นาโนโมลาร์

วิธีเตรียมสารที่ใช้ทำเจลอิเล็กโตรฟอเรซีส (SDS PAGE)

สารตัวอย่าง

นำบัฟเฟอร์ (sample buffer) 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตร (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

โปรตีนมาตรฐาน

นำบัฟเฟอร์ (sample buffer) 20 ไมโครลิตร ผสมกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2 มก.ต่อมล.) (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

บัฟเฟอร์ (sample buffer)

ผสมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกัน เมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) 5 ไมโครลิตร 1 % เอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate, SDS) 10 ไมโครลิตร 40 % ซูโครส (sucrose) 10 ไมโครลิตร 0.1 % บรอมฟีนอล บลู (bromphenol blue, B.P.B.) 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ 4 ^{o} ซ

สีย้อม (staining solution)

เติม สีคูมาซีบลู (coomasie brilliant blue, CBB) 0.5 กรัม เมทานอล 115 มล. กรดอะซิติก 20 มล. และน้ำกลั่น 115 มล. ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การล้างสี (destaining solution)

เติม . เมทานอล 200 มล . กรดอะซิติก 70 มล เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีคำนวณอัตราส่วนโมลธัยรอกซินต่อโปรตีน

<u>เริ่มต้น</u>

ธัยรอกซิน	=	A	กรัม
โปรตีน	=	B	กรัม
ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125	=	H	cpm

หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125	=	K	cpm
ธัยรอกซินในคอนจูเกต	=	A x K / H x ค่าคงที่	กรัม
	=	X	โมล
โปรตีน	=	B / น้ำหนักโมเลกุล	
	=	Y	โมล
อัตรส่วนโมล ธัยรอกซิน ต่อ โปรตีน=		X : Y	

ตารางที่ 19 แสดงน้ำหนักโมเลกุลสารที่ใช้ในการเตรียมคอนจูเกต

สาร	น.น.โมเลกุล
ธัยรอกซิน	776.9
โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน	68,500
ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน	68,500
โพลี-ดี-ไลซีน	239,300

ตารางที่ 20 แสดงค่าคงที่แก้ไขค่าอัตรานับวัด

เวลา (วัน)	ค่าคงที่
2	0.977
3	0.966
4	0.955
5	0.944

วิธีคำนวณค่าคงที่สัมพรรคภาพ

ธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 (T4*) ที่ใช้มีค่ากัมมันตภาพจำเพาะ (specific activity)

= 1,000 mCi/mg

= $1,000 \times 3.7 \times 10^{10} \times 10^{-3}$ dps

= $1,000 \times 3.7 \times 10^{10} \times 10^{-3} \times 60$ s dpm

= 2.22×10^{12} x ประสิทธิภาพเครื่องวัด dpm

= $2.22 \times 10^{12} \times 63.78/100$ dpm

= 1.4159×10^{12} cpm/mg

Tc = 26,238.9 cpm

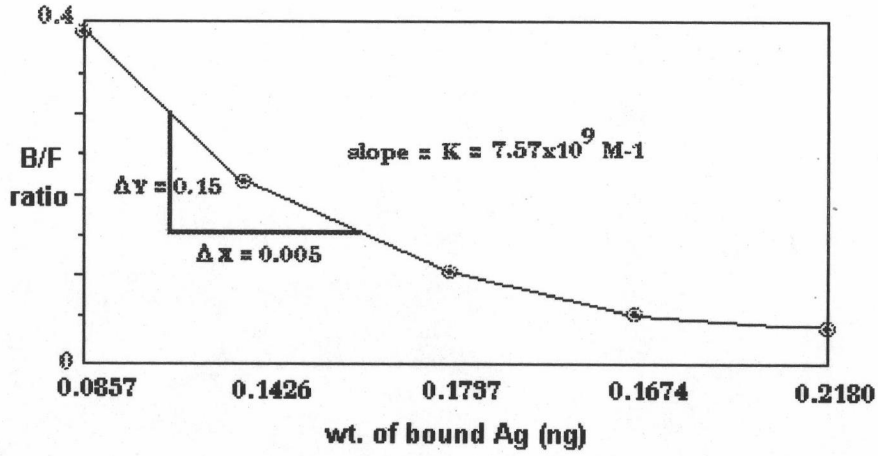
Tc มีธัยรอกซิน-ไอโอดีน-125 = $26,238.9 \times 10^{6}/1.4159 \times 10^{12}$ ng

= 0.0185 ng

B-NSB	(bound fr.) B-NSB/Tc	Std (µg/dl)	Std (25 µl)	[Std(25µl)xbound fr.] bound nonlabeled Ag
7349.7	0.2800	1.15	0.2875	0.0850
4806.3	0.1832	3.04	0.7600	0.1392
2808.8	0.1070	6.42	1.6050	0.1717
1686.4	0.0643	10.34	2.5850	0.1662
1305.8	0.0498	17.44	4.3600	0.2171

(T4* x bound fr.) bound labeled Ag	แกน X [bound Ag=bound labeled and nonlabeled Ag (ng)]	แกน Y bound/free ratio
0.0052	0.0857	0.3891
0.0034	0.1426	0.2243
0.0020	0.1737	0.1199
0.0012	0.1674	0.0687
0.0009	0.2180	0.0527

แสดงกราฟ Scatchard plot ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1)

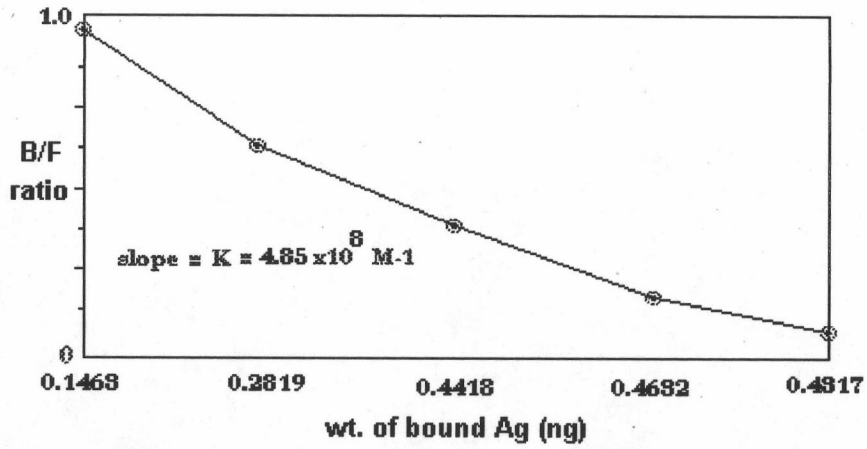
ความชัน = $\Delta Y / \Delta X$

= 0.15 / 0.005

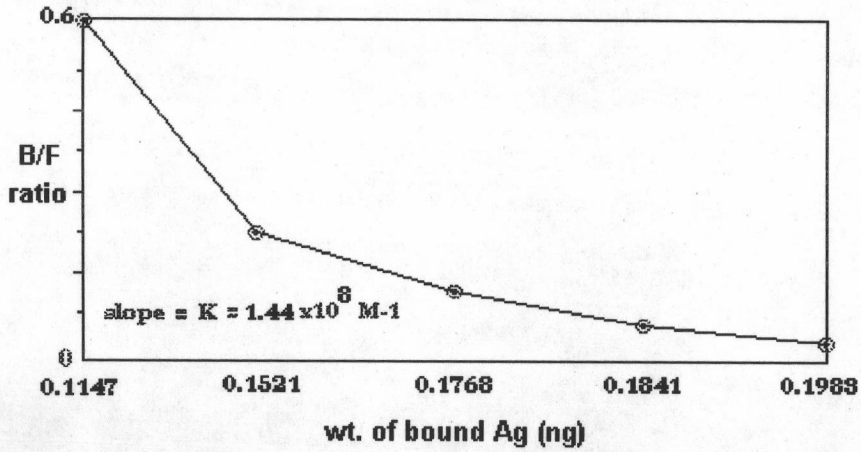
= 30 x ปริมาตรทั้งหมด x น.น.โมเลกุลธัยรอกซิน

= $30 \times 325 \times 10^{-6} \times 776.9 \times 10^{-9}$

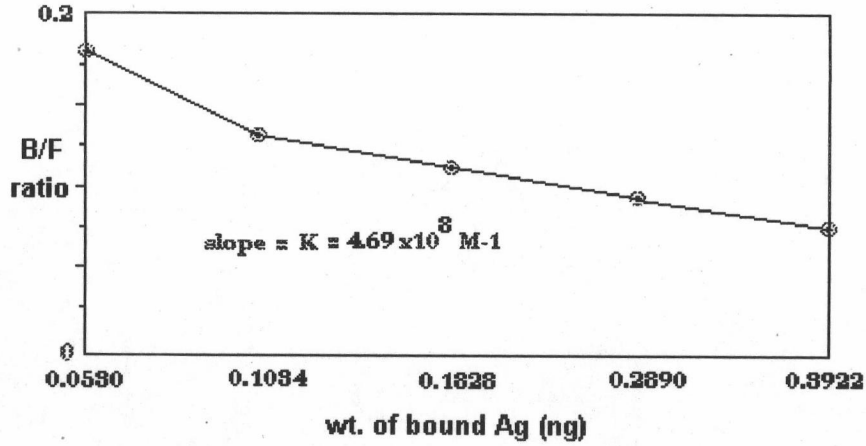
= 7.57×10^{9} ต่อโมลาร์



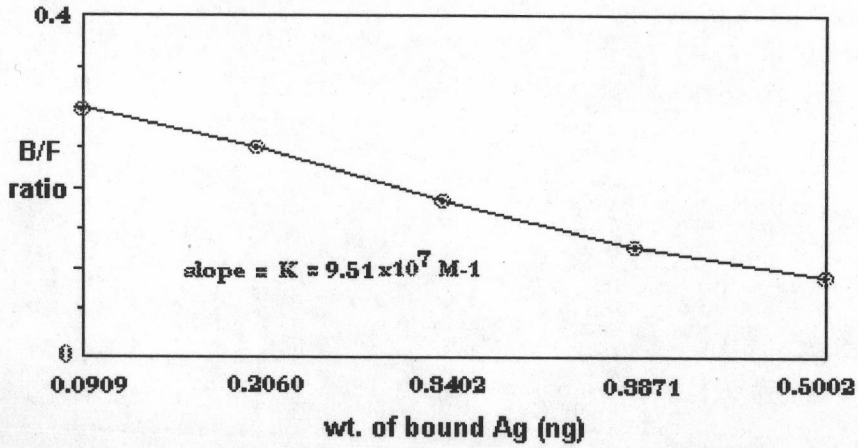
รูปที่ 28 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 1 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1)



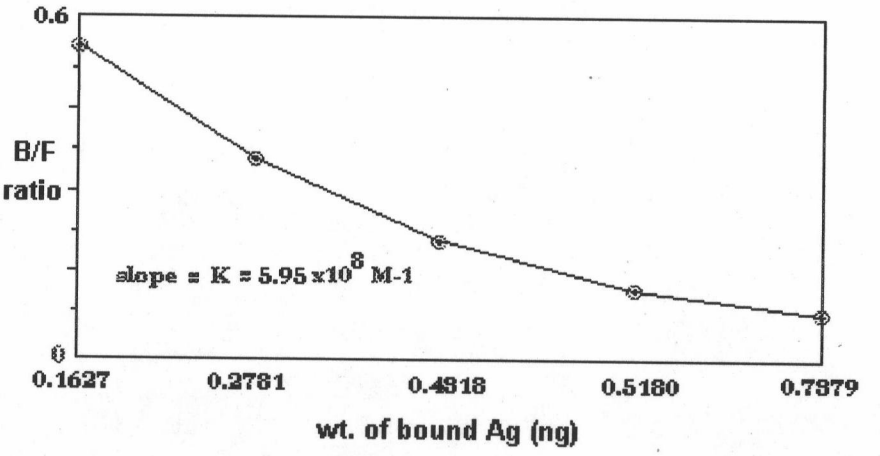
รูปที่ 29 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 2 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1)



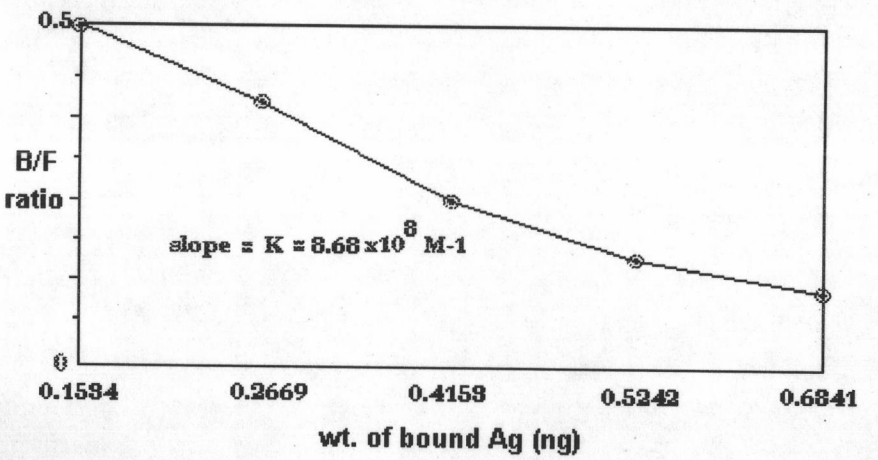
รูปที่ 30 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 3 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1)



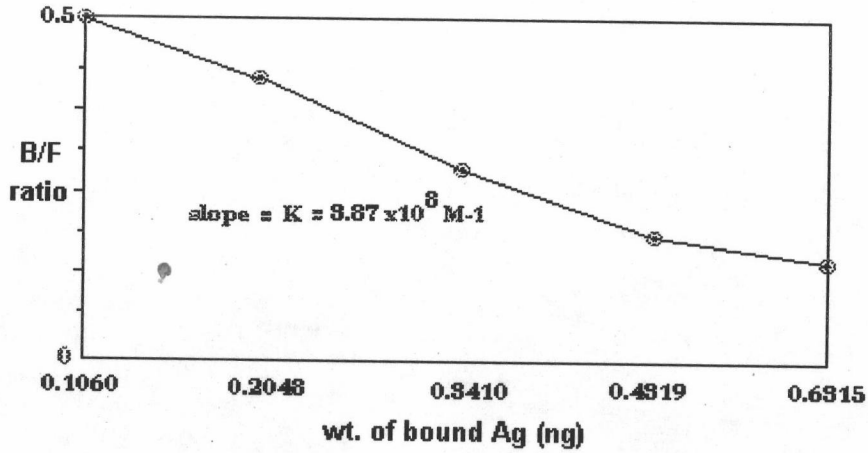
รูปที่ 31 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1)



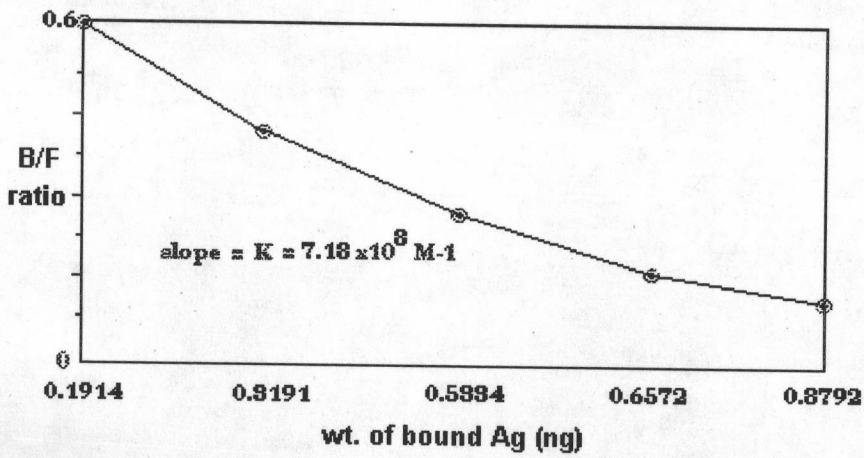
รูปที่ 32 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 1 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1)



รูปที่ 33 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 2 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1)



รูปที่ 34 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 3 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1)



รูปที่ 35 แสดง Scatchard plot ของแอนติซีรัมกระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้อิมมูโนเจน ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1)

วิธีคำนวณผลปฏิกริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

เมื่อนำปริมาณสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับแอล-ธัยรอกซินที่ 50 % B/T มาคำนวณจำนวนโมลและนำมาเปรียบเทียบกันแสดงได้ดังคารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงการคำนวณผลของปฏิกริยาข้ามแอนติซีรัมที่ผลิตได้

สาร	น.น. โมเลกุล	ปริมาณที่ 50% B/T	จำนวนโมล	%เมื่อเทียบกับแอล-ธัยรอกซิน
D-thyroxine	776.9	2.98	3.84×10^{-9}	99.37
L-triiodothyronine	651	3.00×10^{-4}	4.61×10^{-13}	0.01
D-triiodothyronine	651	3.50×10^{-4}	5.37×10^{-13}	0.01
Triiodothyroacetic acid	621.9	2.80×10^{-4}	4.50×10^{-13}	0.01
Triiodothyropropionic acid	636	1.70×10^{-4}	2.67×10^{-13}	0.0069
Diiodothyronine	525	1.10×10^{-4}	2.09×10^{-13}	0.0054
Diiodotyrosine	433	1.00×10^{-4}	2.31×10^{-13}	0.0059
monoiodotyrosine	307.1	0.80×10^{-4}	2.61×10^{-13}	0.0067
Tyrosine	181.2	0.50×10^{-4}	2.76×10^{-13}	0.0071

โดยที่ 50 % B/T มีแอล-ธัยรอกซิน 3.86×10^{-9} โมล

ประวัติผู้เขียน

ผู้เขียนเกิดวันที่ 8 มิถุนายน พ.ศ. 2509 เป็นธิดาของนายวาณิช และ นางสุณี ฉันทวุฒิเศรษฐี ภูมิลำเนาเดิมเป็นคนกรุงเทพ ฯ โดยกำเนิด จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปี พ.ศ. 2532 เข้าศึกษาในระดับปริญญาโทที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี พ.ศ. 2533