การวัดลูทีไนซิงฮอร์โมนในซีรัมด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์และการวัดปริมาณความเข้มข้นของลูทีไนซิงฮอร์โมนในรอบเดือนของสตรีที่ปกติ

นางสาวรัตนา สินธุภัค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2516

002586
i 17109802

Serum Human Luteinizing Hormone Assay by Radioimmunoassay Technique and Luteinizing Hormone Level in Normal Menstrual Cycle.

Miss Ratana Sindhuphak

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1973

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ ..... ประธานกรรมการ
.... กรรมการ
..... กรรมการ
..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดลูทีไนซิงฮอร์โมนในซีรัมด้วยวิธีเรดิโออิมมูโน-แอสเสย์ และการวัดปริมาณความเข้มข้นของลูทีไนซิง-ฮอร์โมนในรอบเดือนของสตรีที่ปกติ
ชื่อ	นางสาวรัตนา สินธุภัค
แผนกวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2516

บทคัดย่อ

วิธีวัดปริมาณ LH ที่ทำกันในตอนแรกก่อนปี 1965 ใช้วิธี Bioassay หาปริมาณ LH ที่สกัดจากปัสสาวะ โดยใช้วิธีที่มีความจำเพาะต่อ LH เท่านั้น ปริมาณ LH วัดได้โดยเปรียบเทียบน้ำหนักของต่อมพรอสเตทของหนูตัวผู้ที่ยังไม่เจริญเต็มที่และได้ตัดต่อมใต้สมองออกไปแล้ว(Greep และคณะ,1941) ตั้งแต่ปี 1958 เป็นต้นมา วิธี ovarian ascorbic acid depletion ซึ่งเสนอโดย Parlow (1958) ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง วิธี Immunoassay ในระยะแรกๆ ได้แก่วิธี Haemagglutination inhibition test (Wide และคณะ,1961) วิธี complement fixation test (Trenkle และคณะ,1961) และ วิธี precipitin test (McKean ,1960)นั้น มีการใช้เพื่อวัดปริมาณ LH เช่นกันสำหรับวัดแบบ qualitative ในปัจจุบันวิธีวัด LH ซึ่งใช้ได้ผลดี มีความแม่นยำ ความถูกต้อง ความจำเพาะ และความไวในการวัดสูงคือวิธี Radioimmunoassay (Wilde และคณะ, 1965 , 1967 ; Bagshawe และคณะ, 1966 ; Midgley , 1966 ; Aono และคณะ, 1967 ; Neill และคณะ, 1967 และ Sand และ Torjesen , 1973)

วิธีวัดปริมาณ LH ในซีรัมที่ได้ศึกษาในรายงานนี้มี 2 วิธีคือ วิธีแยกด้วยแอนติบอดีชนิดที่สอง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Aono และคณะ(1967) และวิธีแยกด้วยผงถ่าน ดัดแปลงจากวิธีของ Sand และ Torjesen (1973)

วิธีที่ดัดแปลงแล้วและเสนอในรายงานนี้มีความไวของการวัดปริมาณ LH ดังนี้ วิธีแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง = 0.16 นาโนกรัม/มล.(LER 907) และวิธีแยกด้วยผงถ่าน = 0.24 นาโนกรัม/มล.(LER 907) ซึ่งสูงกว่าวิธีของ Aono และคณะ(1967) และ Sand และ Torjesen (1973)ตามลำดับ percentage recovery ที่ศึกษาโดยวิธีเติม LH มาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในซีรัมได้ผล 106.78 $\pm$ 4.09 % สำหรับวิธีที่แยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง ส่วนวิธีที่แยกด้วยผงถ่านได้ผล 98.3 $\pm$ 2.19 %

ได้ศึกษาถึงแฟคเตอร์ต่างๆที่มีผลต่อปฏิกริยาของโปรตีน และได้แสดงรายละเอียดไว้แล้ว เพื่อเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการอื่นๆที่มีความสนใจในการจะใช้วิธีหาปริมาณ LH โดยวิธีนี้ อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดซึ่งอาจทำให้ค่าที่วัดได้เปลี่ยนไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ เพื่อสะดวกในการให้ปฏิกริยาของโปรตีนถึงสมดุลย์ควรอินคิวเบทไว้คงที่ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 3–4 วัน

ได้ใช้วิธีแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สองศึกษาปริมาณ LH ในรอบเดือนของสตรีปกติจำนวน 19 ราย อายุต่างๆกันตั้งแต่ 18–35 ปี รวม 87 รอบประจำเดือน ปรากฏผลว่า ปริมาณ LH ใน follicular phase มีค่าอยู่ระหว่าง 7–86 นาโนกรัม/มล. LH peak มีค่าระหว่าง 113–868 นาโนกรัม/มล. และปริมาณ LH ใน luteal phase มีค่าระหว่าง 5–53 นาโนกรัม/มล.

Thesis Title	Serum Human Luteinizing Hormone Assay by Radioimmunoassay Technique and Luteinizing Hormone Level in Normal Menstrual Cycle.
Name	Miss Ratana Sindhuphak
Department	Biochemistry
Academic year	1973

Abstract

Before the year 1965 bioassay method was the first technique introduced for human LH determination. LH extracted from urinary specimen were measured using ventral prostate weight of hypophysectomized immature male rat as end point (Greep et al, 1941). Since 1958, ovarian ascorbic acid depletion test (Parlow, 1958) was widely used. In subsequent years where immunologic techniques were newly introduced, haemagglutination inhibition test (Wide et al, 1961), complement fixation test (Trenkle et al, 1961) and precipitin test (McKean, 1960) have been used to measure LH qualitatively. At present radioimmunoassay of LH reported by many investigators are the most acceptable technique because of its high precision, accuracy, specificity and sensitivity(Wilde et al, 1965 ,1967 ; Bagshawe et al, 1966 ; Midgley, 1966 ; Aono et al, 1967 ; Neill et al, 1967 and Sand and Torjesen, 1973).

Two serum LH radioimmunoassay methods were studied, one applied the double antibody separation the other applied charcoal separation techniques. These two methods were modified from those reported by Aono et al, 1967 and Sand and Torjesen, 1973 respectively. The sensitivity of the modified methods were 0.16 ng/ml LER 907 for the double antibody technique and 0.24 ng/ml LER 907 for the charcoal technique. Both methods were definitely superior to the original. Recovery studies performed by adding standard LH to pool serum yield results of 106.78 ± 4.09% and 98.3 ± 2.19% for double antibody and charcoal techniques respectively.

Factors effecting the protein reaction were studied and presented in detail for the benefit of other laboratory interested in setting up the LH assay. Temperature during each assay process should be kept constant and is one of the critical factor which can introduce variability in value determined. To attain equilibrium of the protein reaction, incubation at 4° c for 3-4 days were most suitable.

LH level was determined in 19 normal subjects, age range 18-35 years, for 87 menstrual cycles by double antibody separation technique. The results showed that LH level during follicular phase, LH peak and luteal phase are 7-86, 113-868 and 5-53 ng/ml respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ และขอขอบคุณ ท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์วิชัย โปษยะจินดา

รองศาสตราจารย์ นพ. กำจัด มงคลกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์นิกร ดุสิตสิน

อาจารย์แพทย์หญิง นพ. พัชรา วิสุทกุล

อาจารย์ นพ. วราพรรณ ด่านอุตรา

อาจารย์ นายแพทย์ประมวล วิรุตมเสน

อาจารย์ทรรศนีย์ สินธุภัค

คุณสมัย ลีพิพัฒนไพบูลย์

คุณวิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล

เจ้าหน้าที่โครงการร่วมระหว่างภูมิภาคเกี่ยวกับอุปกรณ์การคุมกำเนิดขององค์การอนามัยโลก แผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ตึกนวมินทราชินี แผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบาญ ..... ฌ

รายการตารางประกอบ ..... ฎ

รายการรูปประกอบ ..... ฑ

บทนำ 1

วัสดุและวิธีดำเนินการ 7

- เครื่องมือที่ใช้ 8
- การเตรียมสาร 9
- วิธีวัดปริมาณความเข้มข้นของ LH 17
- การคำนวณ 20

ผลการทดลอง 24

- ผล Iodination LH ด้วย ^{125}I และการทำ ^{125}I-LH ให้บริสุทธิ์ครั้งที่หนึ่ง 24
- ผลการทำ ^{125}I-LH ให้บริสุทธิ์ครั้งที่สอง 24
- ผลการทดลอง buffer สามชนิดที่ pH ต่างๆ 27
- ผลการทดลอง antibody titration 31
- ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนค่าเวลาและอุณหภูมิในการอินคิวเบท 34
- ผลการทดลองเมื่อใช้ผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรนขนาดต่างๆ 41
- ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 และผงถ่าน 44

หน้า

- ผลการทดลองเปรียบเทียบการใช้ผงถ่านเคลือบด้วย
เดกซ์แตรน T150 และ BSA 48
- ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของผงถ่านที่ใช้
ในการแยก F ออกจาก B โดยไม่มีเดกซ์แตรน 51
- ผลการทดลองเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานเมื่อใส่
และไม่ใส่ HFS 55
- ผลการทดลองเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานเมื่อแยกด้วย
ผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรน และแยกด้วยผงถ่าน
อย่างเดียว 59
- ผลการทดลองเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานโดยใช้
เทคนิคการแยกด้วยผงถ่านและแอนติบอดีชนิดที่สอง 63
- ผลการทดลองหาปริมาณ LH ในรอบเดือนของสตรีที่ปกติ .. 69
- Reliability ของวิธีทดลอง 89

วิจารณ์ผลการทดลอง 99

สรุปผลการทดลอง 106

บรรณานุกรม 109

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1 ก	(B-C)% เมื่อเปลี่ยนค่า pH ของ phosphate buffer ...	28
1 ข	(B-C)% เมื่อเปลี่ยนค่า pH ของ borate buffer	29
1 ค	(B-C)% เมื่อเปลี่ยนค่า pH ของ barbitone sodium buffer	29
2	(B-C)% เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลอง	32
3 ก	(B-C)% เมื่อใช้เวลาต่างๆกันในการอินคิวเบทที่ 4°ซ	35
3 ข	(B-C)% เมื่อใช้เวลาต่างๆกันในการอินคิวเบทที่ 18°ซ	37
3 ค	(B-C)% เมื่อใช้เวลาต่างๆกันในการอินคิวเบทที่ 37°ซ	39
4	(B-C)% เมื่อใช้ผงถ่าน 5% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน T110, 150 และ 250 5%	42
5 ก	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 รวมกับผงถ่าน 2%	45
5 ข	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 รวมกับผงถ่าน 3%	45
5 ค	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 รวมกับผงถ่าน 4%	46
5 ง	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 รวมกับผงถ่าน 5%.....	46
6 ก	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของเดกซ์แตรน T150 รวมกับผงถ่าน 8%	49
6 ข	B% และค่าเฉลี่ยเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ BSA รวมกับผงถ่าน 8%	49

ตารางที่ หน้า

7 (B-C)% เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของผงถ่าน 52

8 ก (B-C)% และอัตราส่วน F/B เมื่อใส่ HFS ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 56

8 ข (B-C)% และอัตราส่วน F/B เมื่อไม่ได้ใส่ HFS , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 57

9 ก (B-C)% และอัตราส่วน F/B เมื่อแยกด้วยผงถ่าน 3% เคลือบด้วยเดกซ์แตรน T150 0.03% ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 60

9 ข (B-C)%และอัตราส่วน F/B เมื่อแยกด้วยผงถ่าน 3% , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 61

10 ก (B-C)% และอัตราส่วน F/B โดยเทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน ในสภาวะสมดุลย์ , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 64

10 ข (B-C)% และอัตราส่วน F/B โดยเทคนิคการแยกด้วยผงถ่าน ในสภาวะไม่สมดุลย์ , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 65

10 ค (B-C)% และอัตราส่วน F/B โดยเทคนิคการแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง ในสภาวะสมดุลย์ , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 66

10 ง (B-C)% และอัตราส่วน F/B โดยเทคนิคการแยกด้วยแอนตีบอดีชนิดที่สอง ในสภาวะไม่สมดุลย์ , ความคลาดเคลื่อนทางสถิติ และความไวในการวัด 67

11 ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 1 70

12 ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 2 71

ตารางที่		หน้า
13	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 3.....	72
14	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 4.....	73
15	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 5.....	74
16	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 6.....	75
17	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 7.....	76
18	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 8.....	77
19	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 9.....	78
20	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 10.....	79
21	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 11.....	80
22	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 12.....	81
23	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 13.....	82
24	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 14.....	83
25	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 15.....	84
26	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 16.....	85
27	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 17.....	86
28	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 18.....	87
29	ปริมาณ LH ในซีรัม ใน 5 รอบเดือนของรายที่ 19.....	88

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงวิธีหาความชันจากกราฟมาตรฐานของ LH	22
2	ผลการทำ ^{125}I-LH ให้บริสุทธิ์ครั้งที่หนึ่งด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75	25
3	ผลการทำ ^{125}I-LH ให้บริสุทธิ์ครั้งที่สองด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75	26
4	ผลของการใช้ buffer ต่างชนิดกันที่ pH ต่าง ๆ	30
5	กราฟแสดง antibody titration	33
6	ผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกริยา	40
7	ผลของผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรนขนาดต่าง ๆ	43
8	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเดกซ์แตรนและความเข้มข้นของถ่าน	47
9	เปรียบเทียบปริมาณของเดกซ์แตรน T150 และ BSA รวมกับผงถ่าน 8%	50
10	ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของถ่าน	54
11	กราฟมาตรฐานเมื่อใส่และไม่ใส่ HFS	58
12	กราฟมาตรฐานเมื่อแยกโดยใช้ผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แตรนและผงถ่านอย่างเดียว	62
13	เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานเมื่อใช้เทคนิคการแยกด้วยผงถ่านและแอนติบอดีชนิดที่สอง	68
14	ระดับ LH ในซีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 1	70
15	ระดับ LH ในซีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 2	71
16	ระดับ LH ในซีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 3	72
17	ระดับ LH ในซีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 4	73
18	ระดับ LH ในซีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 5	74
19	ระดับ LH ในซีรัม ใน 2 รอบเดือนของรายที่ 6	75

รูปที่		หน้า
20	ระดับ LH ในชีรัม ใน 2 รอบเดือนของรายที่ 7	76
21	ระดับ LH ในชีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 8	77
22	ระดับ LH ในชีรัม ใน 4 รอบเดือนของรายที่ 9	78
23	ระดับ LH ในชีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 10	79
24	ระดับ LH ในชีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 11	80
25	ระดับ LH ในชีรัม ใน 3 รอบเดือนของรายที่ 12	81
26	ระดับ LH ในชีรัม ใน 2 รอบเดือนของรายที่ 13	82
27	ระดับ LH ในชีรัม ใน 2 รอบเดือนของรายที่ 14	83
28	ระดับ LH ในชีรัม ใน 2 รอบเดือนของรายที่ 15	84
29	ระดับ LH ในชีรัม ใน 1 รอบเดือนของรายที่ 16	85
30	ระดับ LH ในชีรัม ใน 1 รอบเดือนของรายที่ 17	86
31	ระดับ LH ในชีรัม ใน 1 รอบเดือนของรายที่ 18	87