สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การวัดปริมาณสารพวกแอนติเจน (antigen) ปริมาณน้อยๆ ให้ได้ผลถูกต้องแม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว สามารถทำได้โดยการติดฉลากสารแอนติเจนด้วยสารรังสี และใช้สารแอนติเจนที่ติดฉลากแล้วเป็นตัวศึกษาปฏิกริยาของสารแอนติเจนและแอนติบอดี (antibody) ซึ่ง Yalow และ Berson (1960) ได้ทำการทดลองเป็นครั้งแรกเป็นวิธีที่รู้จักกันดีในชื่อของเรดิโออิมมิวโนเอสเส (Radioimmunoassay, RIA) สำหรับสารรังสีที่ใช้ติดฉลากสารพวกโปรตีนที่นิยมกันอย่างแพร่หลายคือ ไอโอดีน- 125 (I-125) ทั้งนี้เพราะสามารถวัดปริมาณรังสีได้โดยสะดวกและค่าใช้จ่ายถูก ส่วนวิธีติดฉลากสารไอโอดีนโดยตรงนั้นมีวิธีทำ 4 วิธีด้วยกัน คือ

1. วิธีไอโอดีน โมโนคลอไรด์ (Iodine monochloride method) เป็นวิธีการใช้ไอโอดีน โมโนคลอไรด์ (ICl) ร่วมกับสารรังสีของไอโอดีนทำปฏิกริยากับสารโปรตีน วิธีนี้ใช้กันน้อย เช่น Samoles และ Williums (1961) ใช้ติดฉลากสารไอโอดีนกับสารอินซูลิน (insulin) และ Hallaba และคณะ (1973) ใช้ติดฉลากสารไอโอดีนกับฮิวแมนซีรัมแอลบูมิน (Human serum albumin)

2. วิธีอีเลคโตรไลติค (Electrolytic method) วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับห้องทดลองที่จะเตรียมขึ้นใช้เองในปริมาณน้อยๆ Rosa และคณะ (1964) ใช้วิธีนี้ติดฉลากสารไฟบริโนเจน (fibrinogen) ด้วยไอโอดีน-131

3. วิธีเอนไซมิคไอโอดิเนชั่น (Enzymic iodination method) เป็นวิธีที่ใช้แลคโตเปอร์รอกซิเดส (lactoperoxidase) โดยเฉพาะวิธีนี้ทำโดยไม่ต้องอาศัยสารออกซิไดซิ่ง (oxidizing agent) หรือสารรีดิวซิ่ง (reducing agent) เลย

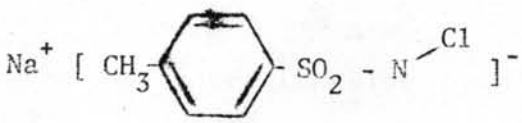
Thorell (1972) ทำได้สำเร็จเมื่อไม่นานมานี้โดยใช้สารที่มีความแรงรังสีจำเพาะสูง ถึงแม้ว่าการทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนของสารติดฉลากที่ได้จะไม่ดีเท่าที่ควร

4. วิธีคลอรามีน-ที (Chloramine-T method) เป็นวิธีที่ใช้คลอรามีน-ที เป็นสารออกซิไดซิ่ง วิธีนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมาก Hunter และ Greenwood (1962) และ Greenwood, Hunter และ Glover, (1963) ได้ติดฉลากฮิวแมนโกรธ ฮอร์โมน (Human growth hormone) ด้วยไอโอดีน-131 ที่มีความแรงรังสีจำเพาะสูง

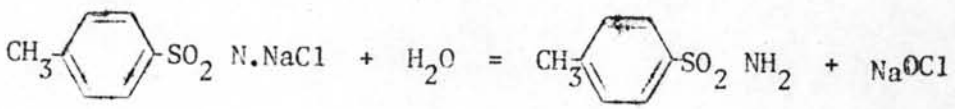
ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีคลอรามีน-ทีเป็นแนวทางในการปฏิบัติตามสภาพความเหมาะสมของการทดลอง

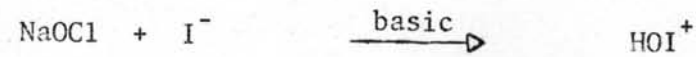
วิธีคลอรามีน-ที

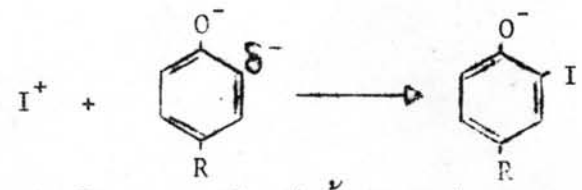
คลอรามีน-ที เป็นเกลือโซเดียมของ N-monochloro-derivative of p-toluene sulphonamide



ในสารละลายที่มีน้ำจะเกิดเป็นกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorus acid) อย่างช้าๆ (Vogel, 1966) ซึ่งจะเป็นสารออกซิไดซิ่งอย่างอ่อน ถ้าเติมคลอรามีน-ทีลงในสารละลายของโปรตีนและไอโอดีนในสภาพสารละลายที่เป็นด่างอ่อนๆ กระบวนการที่เกิดขึ้นพอจะสันนิฐานได้ว่าเกิดประจุบวกของไอโอดีน (I^+) (Goldschmidt และคณะ, 1925) จากนั้นไอโอดีนประจุบวกนี้จะเข้าทำปฏิกริยากับไทโรซีนกรุ๊ฟ (Tyrosine group) ของพวกเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone)



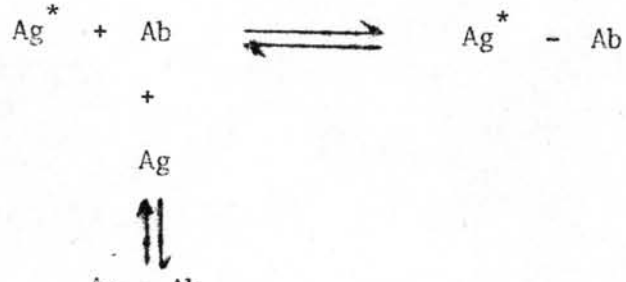




ปฏิกริยาการติดสลากสารโปรตีนด้วยไอโอดีนจะเกิดได้สูงสุดในสภาพของสารละลายที่ **เป็นด่างอ่อน (พีเอช 7.5) และความเข้มข้นของสารที่จะใช้จะต้องต่ำมากนอกจากนั้น** ผลของปฏิกริยาจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารโปรตีนที่ใช้ ในการหยุดปฏิกริยาทำได้โดยการเติมสารโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (sodium metabisulphite) ซึ่งจะเป็นตัวขจัดคลอรามีน-ที่ส่วนที่เกินของปฏิกริยาแต่ก็จะเป็นตัวที่จะทำลายสารโปรตีนที่เพิ่งติดสลากได้เช่นกัน ดังนั้นหลังจากเกิดปฏิกริยาแล้วจึงจำเป็นต้องแยกสารโปรตีนที่ติดสลากไอออกจากไอโอไดด์ (iodide) ที่ไม่ได้ทำปฏิกริยารวมทั้งสารทำปฏิกริยาที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ตัวอื่นด้วย การแยกจะต้องกระทำอย่างรวดเร็วโดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชั่น (Gel filtration)

หลักการของเรดิโออิมมิวโน **เอสเส**

วิธีเรดิโออิมมิวโน **เอสเส** มีหลักการทั่วไปดังนี้



เมื่อ Ag เป็นสารแอนติเจนที่ต้องการวัดปริมาณ หรือ สารมาตรฐาน

Ag^* เป็นสารแอนติเจนที่ติดสลากรังสี

Ab เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในการรวมตัวกับ Ag

Ag^*-Ab เป็นสารประกอบของแอนติเจนที่ติดสลากรังสีกับแอนติบอดี

Ag -Ab เป็นสารประกอบของแอนติเจนกับแอนติบอดี

Ag และ Ag^* ควรจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติในทางอิมมิวโนเหมือนกัน ถ้า Ag^* และ Ab มีปริมาณคงที่ทั้ง Ag และ Ag^* จะเข้าทำปฏิกริยากับ Ab การเกิด Ag-Ab และ Ag^*-Ab จะแปรตามปริมาณ Ag มาตรฐานหรือปริมาณ Ag ในสารตัวอย่าง ดังนั้น การหาปริมาณของ Ag ในสารตัวอย่างทำได้โดยการเปรียบเทียบ Ag^*-Ab ที่เกิดในสภาวะที่มีสารตัวอย่างกับ Ag^*-Ab ที่เกิดในสภาวะที่มีสารมาตรฐาน

การแยก Ag^*-Ab ออกจาก Ag^* ทำได้หลายวิธี เช่น

1. วิธีโครมาโตกราฟฟี่ (Chromatography method) เช่น แยกโดยใช้เปเปอร์โครมาโตกราฟฟี่ (paper chromatography) เซลลูโลสคอลัมน์ (cellulose column) เซฟาเดกซ์คอลัมน์ (sephadex column)

2. การตกตะกอนของ Ag^*-Ab โดยใช้พวกเกลือหรือสารอินทรีย์พวกอัลกอฮอล์ ไดออกเซน (dioxan) เช่น การทดลองของ Wilson และ Hunter (1966), Tomada และ Hreshchyshyn (1968), Thomas และ Ferin (1968) และ Kazeto และคณะ (1971) นอกจากนี้ยังมีการตกตะกอนโดยใช้ดับเบิ้ล แอนติบอดี (double antibody) ซึ่งมีการทดลองของ Midgley (1966), Midgley และ Jaffee (1966), Odell และคณะ (1966), Faiman และ Ryan (1967) Odell และคณะ (1967) และ Aono และคณะ (1967)

3. การตกตะกอนของ Ag^* โดยใช้ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง Neill และคณะ (1967), Bionoux และ Odell (1973) และ Sand และ Torjesen (1973) ทำการทดลองตกตะกอนของ Ag^* โดยใช้ถ่านเคลือบด้วยเด็กซแทรน (dextran-coated charcoal) Lazarus และ Young (1965) ใช้ตกตะกอนด้วยไอออน-เอ็กซเชนจ์เรซิน (ion-exchange resin) นอกจากนี้ Wide และ Porath (1966) และ Said และ Wide (1973) ทำการทดลองตกตะกอนด้วยเซฟาเดกซ์ (Sephadex)

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้วิธีแยก Ag^*-Ab ออกจาก Ag^* โดยใช้วิธีดับเบิ้ล-แอนติบอดี จากวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส นั้นสารประกอบตัวแรกที่เกิดปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นจะอยู่ในสภาพที่ไม่ตกตะกอนแต่ถ้าเติมแอนติบอดีชนิดที่สองก็จะทำให้ไปจับกับแอนติเจนที่เกาะกับแอนติบอดีชนิดแรกทำให้มีขนาดโตขึ้นสามารถตกตะกอนลงมาได้โดยการปั่นแยกซึ่งแอนติบอดีชนิดที่สองนั้นก็สร้างขึ้นมาจากภูมิต้านทานของแอนติบอดีชนิดแรกในรูปของแกมมาโกลบูลิน (γ-globulin)

จุดประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาและหาวิธีการติดฉลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนตัวหนึ่งด้วยไอโอดีน-125 และหาเทคนิคในการทำสารติดฉลากที่ได้ให้มีความบริสุทธิ์สูงตลอดจนศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของฮอร์โมนดังนี้ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส ในซีรัมของควายปลัก ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้ระดับฮอร์โมนในรอบเดือนของควายปลักในสภาพที่ฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน (prostraglandin) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมเทียม