การติดสลากกลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนนี้ในซีรัมของควายปลัก โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายศักดา เจริญ

004964

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2523

I17432017

LABELLING OF LUTEINIZING HORMONE BY IODINE-125 FOR RADIOIMMUNOASSAY OF SERUM LUTEINIZING HORMONE LEVELS IN SWAMP BUFFALO

Mr. Sakda Charoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering

Department of Nuclear Technology

Graduate School

Chulalongkorn University

1980

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การติดฉลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนนี้ในซีรัมของควายปลัก โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส
โดย	นายศักดา เจริญ
ภาควิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์สุวรรณ แสงเพ็ชร์)

..... กรรมการ
(อาจารย์สุธี สุนทรธรรม)

..... กรรมการ
(อาจารย์ชยากริต ศิริอุปถัมภ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การติดสลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนนี้ในซีรัมของควายปลักโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส
ชื่อนิสิต	นายศักดา เจริญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ
ภาควิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี
ปีการศึกษา	2522

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การติดสลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 ในการทดลองนี้ใช้วิธีคลอรามีน-ที ปฏิกริยาทำภายใต้ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นด่างอ่อน (พีเอช 7.5) และความเข้มข้นของสารที่ใช้ต่ำมากแล้วทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งด้วยเซฟาเดกซ์ จี- 50 คอลัมน์ และเซลลูโลสคอลัมน์ ได้ผลผลิตของการติดสลาก 50-70 เปอร์เซนต์และความบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายประมาณ 90-95 เปอร์เซนต์

วิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส นั้นปฏิกริยาทำในปริมาตรทั้งหมด 0.6 มิลลิลิตร ประกอบด้วยพลาสมา 0.2 มิลลิลิตร แอนติบอดีชนิดแรก AS-LH 901 และซีรัมกระต่ายปกติ (ความเข้มข้น 1 : 70,000 และ 1 : 300 ตามลำดับ) ปริมาตรรวมกัน 0.1 มิลลิลิตร ซีรัมควาย (ความเข้มข้น 1 : 4) 0.1 มิลลิลิตร สารลูทีไนซิ่งฮอร์โมนติดสลาก 0.1 มิลลิลิตรและแอนติบอดีชนิดที่สองในรูปของแกมมาโกลบูลินจากแกะของแอนติบอดีชนิดแรก (ความเข้มข้น 1 : 21) อีก 0.1 มิลลิลิตร อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและแยกสารติดสลากรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีด้วยวิธีดับเบิ้ลแอนติบอดี

จากการเปรียบเทียบความถูกต้องและเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนพบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ค่าที่ใกล้เคียงได้ค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปรของการทดลองครั้งเดียวกันและต่างครั้งกันมีค่าอยู่ระหว่าง 5.34 - 11.76 เปอร์เซนต์ และ 4.58 - 18.60 เปอร์เซนต์ตามลำดับและทดลองหาค่าเปอร์เซนต์รีคอเวอรี่ได้เท่ากับ 85.14 ± 4.38 เปอร์เซนต์

ผลการวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย 4 ตัวที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดินปรากฏว่าระดับของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนจะสูงขึ้นภายหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดินแล้วในระหว่าง 57.00 ± 7.35 ชั่วโมงและระดับลูทีไนซิ่งฮอร์โมนสูงสุดที่วัดได้มีค่า 5.82 ± 6.21 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

Thesis title	Labelling of Luteinizing Hormone by Iodine-125 for Radioimmunoassay of Serum Luteinizing Hormone Levels in Swamp Buffalo
Name	Mr. Sakda Charoen
Thesis advisor	Mrs. Maneewan Kamonpatana
Department	Nuclear Technology
Academic year	1979

ABSTRACT

Method use for labelling luteinizing hormone by iodine-125 in this study is a chloramine-T method. The reaction is carried out under very mild alkaline conditions (pH 7.5) and only very low concentration of the reagent is required. Separation of the iodinated hormone from unreacted iodide and other low molecular weight reactants can be rapidly achieved by using sephadex-G-50 column and cellulose column. Percentage yield of the iodinated luteinizing hormone is 50-70% and the purity is about 90-95%

Radioimmunoassay, the assay was performed in a total volume of 0.6 ml incubation. It was composed of 0.2 ml plasma, 0.1 ml AS-LH 901 antiserum (dilution 1 : 70,000) and normal rabbit serum (dilution 1 : 300), 0.1 ml buffalo serum (dilution 1 : 4), 0.1 ml labelling LH and 0.1 ml second antiserum of anti-rabbit γ-globulin

from sheep (dilution 1 : 21). The reaction mixture was incubated at 4° C for 48 hours and the separation of bound and free form was performed by double antibody method.

The validation of the method was evaluated by determining of precision, percentage recovery. The precision of within assay and between assay was expressed in the coefficient of variation which ranged from 5.34 - 11.76% and 4.58 - 18.60% respectively. The percentage recovery was 85.14 ± 4.38%.

The determination of luteinizing hormone was carried out in serum of four female swamp buffaloes with intramuscularly injection of $PGF_{2\alpha}$. The luteinizing hormone peaks occured after $PGF_{2\alpha}$ treatment within a duration of 57.00 ± 7.35 hours and the levels of the peaks were 5.82 ± 6.21 ng/ml.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านวิชาการและการทดลองจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ

Dr. D. Schams

ศาสตราจารย์สุวรรณ์ แสงเพ็ชร์

อาจารย์ชยากริต ศิริอุปถัมภ์

อาจารย์สุธี สุนทรธรรม

อาจารย์สังเวียน วงศ์มังกร

อาจารย์สุรดี ทองแสง

ขอขอบคุณข้าราชการและเจ้าหน้าที่กองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านการทดลองมาโดยตลอดและขอขอบคุณคุณชอทิพย์ สินสูงสุดที่ได้ช่วยเหลือในด้านการพิมพ์และจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเป็นผลสำเร็จ

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

รายการตารางประกอบ ..... ฎ

รายการรูปประกอบ ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ 1

2 วัสดุ เครื่องมือและเครื่องแก้ว 6

1. วัสดุ 6

2. เครื่องมือและเครื่องแก้ว 7

3 วิธีทดลองและผลของการทดลอง 9

1. **การเก็บสารตัวอย่าง** 9

2. การเตรียมน้ำยาและอุปกรณ์ในการทดลอง 9

3. การติดสลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 11

3.1 วิธีการติดสลาก 11

3.2 การทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 12

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

3.3 การทำสารตัดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 15

3.4 การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารตัดสลากที่ได้ 18

4. การจัดมาตรฐานการวัดด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส 22

4.1 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดแรก.. 22

4.2 การทดลองหาปริมาณสารตัดสลากที่เหมาะสมสำหรับ
ปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส 27

4.3 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดที่สอง. 27

4.4 การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท . 30

5. การวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส 32

5.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน 32

5.2 วิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส 34

5.3 การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมน 41

5.4 วิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสอย่างเร็ว 41

6. การศึกษาเสถียรภาพของสารตัดสลาก 43

7. การทดสอบความเชื่อถือได้และความแม่นยำของวิธีทดลอง.....

7.1 ความแม่นยำของวิธีทดลอง 46

7.2 การหาค่าเปอร์เซนต์รีคอเวอรี 49

หน้า

8. ผลการวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลัก 50

4. สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 56

เอกสารอ้างอิง 61

ประวัติการศึกษา 66

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 13

2 ผลการทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 16

3 การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลาก 19

4 สถิติของผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากที่
คำนวณได้จากการทดลอง 21

5 ก. ปริมาณรังสีทั้งหมดในหลอดทดลอง (ก่อนแยก) 36

5 ข. ปริมาณรังสีในหลอดทดลองหลังจากแยกเอาส่วนที่
ไม่ตกตะกอนออกแล้ว 37

6 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน 47

7 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดต่างครั้งกัน 48

8 แสดงค่าเปอร์เซนต์รีคอเวอรีจากการทดลอง 49

9 แสดงเวลาและระดับสูงสุดของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่เกิดขึ้นภายหลังจาก
การฉีดโปรสตาแกลนดิน 55

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 กราฟแสดงผลของการทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 14

2 กราฟแสดงผลของการทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 17

3 ก. กราฟแสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลาก ปริมาณ 5,000 เคาท์/นาที 23

3 ข. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลาก ปริมาณ 10,000 เคาท์/นาที 24

3 ค. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลาก ปริมาณ 15,000 เคาท์/นาที 25

3 ง. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลาก ปริมาณ 20,000 เคาท์/นาที 26

4 กราฟแสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดที่สองที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน 29

5 กราฟแสดงอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท 31

6 ก. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนระหว่าง เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวกับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมน..... 39

6 ข. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนระหว่างปริมาณรังสี กับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนมาตรฐาน 40

หน้า

รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน
โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสอย่างเร็ว 42

8 ก. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ได้จากการใช้
สารติดฉลากที่เก็บไว้ในช่วงระยะเวลาต่างกัน 44

8 ข. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของสารติดฉลากที่เก็บไว้
ในระยะเวลาต่างกัน 45

9 ก. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย
ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 11) 51

9 ข. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย
ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 14) 52

9 ค. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย
ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 16) 53

9 ง. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย
ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 19) 54