การวัดระดับเอสตราไดออล-17เบตา ใน ซีรัมของคนด้วย วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้สารไอโอดีน-125ติดฉลาก

นายวิทูร ชัยชาญวัฒนากุล

004710

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2521

I 17562645

DETERMINATION OF OESTRADIOL-17β IN HUMAN SERUM BY RADIOIMMUNOASSAY USING ^{125}I-LABELLED LIGAND

Mr. Vitoon Chaichanwattanakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดระดับเอสตราไดออล-17เบตา ใน ธีรัมของคน ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้สารไอโอดีน-125 ติดฉลาก
โดย	นายวิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล
แผนกวิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธำจัด มงคลกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวัดระดับเอสตราไดออล-17เบตา ใน ซีรัมของคน ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยใช้สารไอโอดีน-125 ติดฉลาก
ชื่อนิสิต	นายวิฑูร ชัยชาญวัฒนากุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพรรณ ด่านอุตรา
แผนกวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2520

สถาบัน

บทคัดย่อ

วิธีหาปริมาณเอสตราไดออลที่เสนอในรายงานนี้เป็นวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ซึ่งใช้แอนติบอดีที่เตรียมจากการฉีดกระต่ายทดลองด้วย เอสตราไดออลที่เกาะติดกับ bovine serum albumin ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 6 สารติดฉลากที่ใช้ คือ oestradiol-6-oxime/^{125}I-histamine ซึ่งเตรียมขึ้นเองจากการติดฉลากฮีสตามีนด้วย โซเดียมไอโอไดด์-125 (Na ^{125}I) โดยวิธีคลอรามีน-ที แล้วนำมาเชื่อมกับ oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime และทำให้บริสุทธิ์ด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี โดยใช้ alumina precoated sheet และในส่วนผสมเบนซีน:เอทานอล (3:1 V/V) สารติดฉลากนี้จะใช้ได้ดี เมื่อความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีเป็น 1:420,000 แต่เมื่อทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง โดยการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดีจะดีขึ้น และสามารถจะลดความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีลงเป็น 1:840,000 ปฏิกริยาเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ทำโดยอินคิวเบทสารติดฉลากกับแอนติบอดีใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4° ซ. เป็นเวลา 16 - 24 ชม. การแยกสารติดฉลากรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดีทำได้โดยเติมผงถ่านเคลือบด้วยเดกซ์แทรนซึ่งอยู่ในแอสเสย์บัฟเฟอร์

10 มิลลิกรัม/หลอดทดลอง

จากการเปรียบเทียบความเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณเอสตราไดออล ที่สกัดจากซีรัมด้วยอีเทอร์โดยวิธีที่ผ่านและไม่ผ่านซีไลท์โครมาโตกราฟฟี พบว่า ความแม่นยำของทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน และค่าสัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปร มีค่าอยู่ระหว่าง 3.6 - 19.8% ทั้งในการทดลองเดียวกันและระหว่างการทดลอง ความถูกต้องของวิธีผ่านโครมาโตกราฟฟีเมื่อเติมสารมาตรฐานระหว่าง 150 - 8,000 พิโกกรัม/ซม^3 ลงในซีรัมบุรุษจะดีกว่าวิธีที่ไม่ผ่านโครมาโต-กราฟฟี กล่าวคือ ความถูกต้องของวิธีทั้งสองมีค่าอยู่ระหว่าง 91 ± 6-112 ± 9% และ 86± 5-140 ± 21, ตามลำดับความจำเพาะของวิธีทดลองอยู่ในระดับสูง กล่าวคือ แอนติบอดีเกิด cross reaction กับสเตอรอยด์เพียงบางตัว คือ เอสโตรน เอสตริออลและ 16-อีพิเอสตริออลเพียงร้อยละ 0.36 1.72 และ 5.0 ตามลำดับ ความไวของการทดลองเมื่อคำนวณจากจุดที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป็นศูนย์ บวกด้วย 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าเป็น 10.2 พิโกกรัม/ซม^3

ผลการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมในรอบเดือนของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย ปรากฏว่า ในช่วงกลางรอบเดือนระดับเอสตราไดออลสูงสุดมีค่าระหว่าง 487 - 1154 พิโกกรัม/ซม^3 (ค่าเฉลี่ย 770 พิโกกรัม/ซม^3) และในช่วง mid luteal phase มีค่าระหว่าง 232 - 608 พิโกกรัม/ซม^3 (ค่าเฉลี่ย 380 พิโกกรัม/ซม^3) รูปแบบและระดับความเข้มข้นของเอสตรา-ไดออลที่ได้จากการทดลองนี้ มีความสัมพันธ์กับระดับของลูทีไนซิงฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมน และ โปรเจสเตอโรน

Thesis Title	Determination of Oestradiol-17β in Human Serum by Radioimmunoassay Using ^{125}I-Labelled Ligand
Name	Mr. Vitoon Chaichanwattanakul
Thesis Advisor	Dr. Varapan Danutra
Department	Biochemistry
Academic Year	1977

Abstract

The assay of oestradiol described in this study is a radioimmunoassay using a specific antibody produced in rabbits against oestradiol-6-BSA. The radioactive ligand, oestradiol-6-oxime/^{125}I-histamine, was prepared by preliminary iodination of histamine followed by its coupling to the oestradiol-6-(O-carboxymethyl) oxime and then purified by thin layer chromatography using alumina precoated sheet developing in the solvent system benzene: ethanol (3:1 V/V). Although the radioligand could be utilized with the antibody at a final dilution of 1:420,000, its immunoreactivity was considerably improved after a second purification step using a sephadex LH-20 column and the antibody final dilution could be increased to 1:840,000. The reaction mixture was incubated in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 at 4°C for 16 - 24 hour and the separation of bound and free form was performed by the addition of 10 mg of dextran-coated charcoal in assay buffer per tube.

A comparative study on the effect of celite chromatography on the reliability of the method in determining serum oestradiol extracted with ether showed that the precision of the two methods were not significantly different. The coefficient of variation varied from 3.6 - 19.8% both for within and between assay and the accuracy of the chromatographic method was higher than the method without. The percentage recovery ranging from 91 ± 6 - 112 ± 9% to 86 ± 5 - 140 ± 21% were obtained when the standard oestradiol was added to the male serum at a concentration of 150 - 8,000 pg/cm^3 respectively. The antibody was considered to be highly specific having cross reaction with only few steroids. The percentage of cross reaction with oestrone, oestriol and 16-epiestriol were 0.36, 1.72 and 5.0 respectively. The sensitivity of the method calculating from the percentage bound at zero concentration minus two standard deviation was found to be 10.2 pg/cm^3

The determination of serum oestradiol during menstrual cycle of four women showed that the level of oestradiol was highest at mid cycle period ranging from 487 - 1194 pg/cm^3 with a mean of 770 pg/cm^3 and the concentration at mid luteal phase varied from 232 - 608 pg/cm^3 with a mean of 380 pg/cm^3. The pattern of oestradiol concentration was highly related to the concentration of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and progesterone.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา

รองศาสตราจารย์ ดร.กำจัด มงคลกุล

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ประมวล วีรุตมเสน

ดร.สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ

คุณสมัย ลิพิพัฒน์ไพบูลย์

คุณกัลยา มุขวิมล

คุณอัจฉรา ธวัชสิน

คุณเครือวัลย์ รัตนอุบลชัย

คุณมยุนา ศรีสุภนันต์

คุณจรินทร์ เต็มรัก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายเวชศาสตรประชากรสถาบันวิจัยวิทยาศาสตรการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฎ

รายการตารางประกอบ ..... ฏ

รายการรูปประกอบ ..... ฑ

คำย่อ ..... ณ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วัสดุและเครื่องมือ 10

2.1 วัสดุ 10

2.2 เครื่องมือและเครื่องแก้ว 12

3. วิธีทดลอง 14

3.1 การเก็บสารตัวอย่าง 14

3.2 การเตรียมน้ำยา 15

3.3 การเตรียม charcoaled serum 18

3.4 การเตรียมซีไลท์ไมโครคอลัมน์ (celite microcolumn) 19

3.5 การทดสอบปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ... 19

3.6 วิธีติดฉลากอนุพันธ์เอสตราไดออล (E_2-6-oxime) ด้วย โซเดียมไอโอไดด์-125 20

3.7 วิธีเตรียมสารติดฉลาก (E_2-6-^{125}I)ให้บริสุทธิ์ ... 23

3.8 วิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัม 25

3.9 วิธีวัดปริมาณโปรเจสเตอโรน ลูทีไนซิงฮอร์โมน และ ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน 28

หน้า

3.10 การคำนวณ 30

4. ผลการทดลอง 34

4.1 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติแอนติบอดี 34

4.2 การหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมสำหรับแยกฮอร์โมนรูปอิสระออกจากรูปที่จับกับแอนติบอดี 37

4.3 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารสกัดฉลาก... 39

4.4 การหาปริมาณสารสกัดฉลากที่เหมาะสมสำหรับปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ 42

4.5 การทดสอบปฏิกริยาทางอิมมิวโนของสารสกัดฉลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเดกซ์ LH-20 46

4.6 การศึกษาคุณสมบัติของผงถ่านที่มีผลต่อการดูดซับสารสกัดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเดกซ์ LH-20. 48

4.7 การศึกษา antibody dilution curve โดยใช้สารสกัดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง 48

4.8 การเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้สารสกัดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ครั้งเดียว และสารสกัดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเดกซ์ LH-20 51

4.9 การศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาต่อกราฟมาตรฐาน 52

4.10 การศึกษาอิทธิพลของอีเทอร์ และ 40% เอทิลอะซิเตท ใน ไอโซออกเทน ต่อกราฟมาตรฐาน 52

4.11 การศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดฉลากภายหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเดกซ์ LH-20 56

หน้า

4.12 การเปรียบเทียบการวัดปริมาณเอสตราไดออล
ในซีรัมก่อนและหลังการผ่านโครมาโตกราฟฟี 56
4.13 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลอง 58
4.14 ผลการวัดปริมาณเอสตราไดออลในซีรัมสตรีไทย .. 64
5. วิจารณ์ผลการทดลอง 69
เอกสารอ้างอิง 80
ประวัติการศึกษา 92

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	รายละเอียดการทำเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์	20
2.	การวัดปริมาณเอสตราไดออลด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์	28
3.	การวัดปริมาณโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโน-แอสเสย์	29
4.	การวัดปริมาณ ลูทีไนซิงฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสทิมูเลทิงฮอร์โมน ด้วย วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์	30
5.	ผลเปรียบเทียบคุณสมบัติในการรวมตัวกับสารติดฉลากของแอนติบอดีจากสัตว์ทดลอง	37
6.	ผลเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารติดฉลากในการทำปฏิกริยากับแอนติบอดี R3 f.b.	39
7.	ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b. กับสารติดฉลากปริมาณต่างกัน	45
8.	ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวจากการคำนวณที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดี R3 f.b. ต่าง ๆ กัน	46
9.	ความแตกต่างสูงสุดของการรวมตัวระหว่างสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งกับแอนติบอดี R3 f.b. ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	51
10.	คุณสมบัติของสารติดฉลากในการรวมตัวกับแอนติบอดี R3f.b. และปริมาณเอสตราไดออลที่วัดจาก control serum เมื่อใช้สารติดฉลากในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ภายหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20	57
11.	ผลเปรียบเทียบอิทธิพลของการใช้ซีไลท์โครมาโตกราฟีต่อปริมาณเอสตราไดออล	59

หน้า

12. ความจำเพาะของ anti E_2-6-BSA (R3 f.b.)..... 61
13.ก ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลก่อนการผ่านฮีไลท์โครมาโตกราฟฟี 63
13.ข ความแม่นยำของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออลหลังการผ่านฮีไลท์โครมาโตกราฟฟี 63
14. ความถูกต้องของวิธีวัดปริมาณเอสตราไดออล 64

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่ หน้า

1. วิธีการติดฉลากอนุพันธ์เอสตราไดออลด้วยโซเดียมไอโอไดด์-125.. 22
2. การชะสารติดฉลากออกจากโครมาโตแกรม 24
3. การสกัดฮีรัมและแยกเอสตราไดออลด้วยคอลัมน์ซีไฮด์ โครมาโตกราฟี 26
4. วิธีหา cross reaction ของสเตอรอยด์ที่ต้องการทดสอบ ....., 32
5.ก Antibody dilution curve ของ anti-E_2-6-BSA 35
5.ข Antibody dilution curve ของ anti-E_2-6-BSA 36
6. อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการดูดซับสารติดฉลากที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี 38
7.ก ภาพถ่ายฟิล์มเอกซเรย์หลังจากวางทินเลเยอร์โครมาโตแกรม ของสารติดฉลาก 40
7.ข ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b.กับสารติดฉลากส่วน ก. และส่วน ข. 41
8.ก ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b.กับสารติดฉลาก ปริมาณต่างกัน 43
8.ข ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b.กับสารติดฉลาก ปริมาณต่างกัน 44
9. รูปแบบที่ได้จากการชะสารติดฉลากออกจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 และปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดี R3 f.b.ของสารติดฉลาก แต่ละส่วน 47
10. อิทธิพลของปริมาณผงถ่านต่อการดูดซับสารติดฉลากที่ผ่าน คอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 49
11. ปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดี R3 f.b.กับสารติดฉลาก ที่ทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้ง 50

หน้า

12. อิทธิพลของการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ LH-20 ต่อกราฟมาตรฐานของเอสตราไดออล 53
13. อิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาต่อกราฟมาตรฐาน 54
14. อิทธิพลของน้ำยาสกัด และน้ำยาชะคอลัมน์ต่อกราฟมาตรฐาน 55
15. ความจำเพาะของ anti-E_2-6-BSA (rabbit 3 final bleed) 60
16. ระดับฮูมีโนโกนาโดโทรปินของฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออลในปัสสาวะของอาสาสมัคร รายที่ 1 65
17. ระดับฮูมีโนโกนาโดโทรปินของฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออลในปัสสาวะของอาสาสมัคร รายที่ 2 66
18. ระดับฮูมีโนโกนาโดโทรปินของฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออลในปัสสาวะของอาสาสมัคร รายที่ 3 67
19. ระดับฮูมีโนโกนาโดโทรปินของฮอร์โมน ฟอลลิเคิลสติมูเลทิงฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน และเอสตราไดออลในปัสสาวะของอาสาสมัคร รายที่ 4..... 68

คำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
LH	Luteinizing hormone
FSH	Follicle stimulating hormone
Oestradiol-17β (E_2)	1,3,5(10)-Estratrien-3, 17β-diol
Oestrone (E_1)	1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one
Oestriol (E_3)	1,3,5(10)-Estratrien-3, 16α, 17β-triol
16-Epiestriol	1,3,5(10)-Estratrien-3, 16β, 17β-triol
17-Epiestriol	1,3,5(10)-Estratrien-3, 16α,17α-triol
16,17-Epiestriol	1,3,5(10)-Estratrien-3, 16β,17α-triol
Androsterone	5α-Androstan-3α-ol-17-one
Androstene 3, 17-diol	5-Androsten-3β,17β diol
Testosterone	4-Androsten-17β-ol-3-one
Dehydroepiandrosterone	5-Androsten-3β-ol-17-one
Progesterone (P)	4-Pregnen-3, 20-dione
17α-Hydroxyprogesterone	4-Pregnen-17α-ol-3, 20-dione
Cortisol	4-Pregnen-11β,17α, 21-triol-3,20-dione

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ	คำเต็ม
Cholesterol	5-Colesten-3β-ol
E_2-6-oxime	Oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime
E_2-6-BSA	Oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime-bovine serum albumin
E_2-6-RSA	Oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime-rabbit serum albumin
E_2-3-BSA	Oestradiol-3-hemisuccinate-bovine serum albumin
E_2-17-BSA	Oestradiol-17-hemisuccinate-bovine serum albumin
^{125}I-HGH	^{125}I-Human growth hormone
^{125}I-HCG	^{125}I-Human chorionic gonadotropin
^{125}I-FSH	^{125}I-Follicle stimulating hormone
E_2-6-^{125}I	Oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime/^{125}I-histamine
^{3}H-E_2	Oestradiol-6,7-^{3}H(N)
Anti-E_2-6-BSA	Antibody of oestradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime-bovine serum albumin