

การศึกษาลากูทีในเชิงฮอโมนด้วยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์หา
ระดับฮอโมนนี้ในซีรัมของควายปลัก โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส



นายศักดิ์ เจริญ

004964

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคสียร์เทคโนโลยี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2523

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

การศึกษาลากูทีไนริงส์ออร์โมนควัยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์หา
ระดับออร์โมนนี้ในซีรัมของควายปลัก โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส

โดย

นายศักดิ์ดา เจริญ

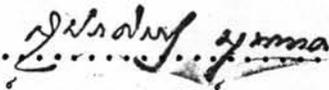
ภาควิชา

นิวเคลียร์เทคโนโลยี

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ

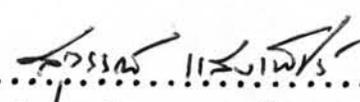
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

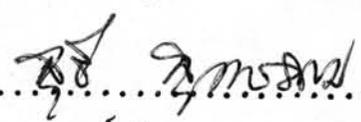
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประคิษฐ์ บุณนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์สุวรรณ์ แสงเพชร)



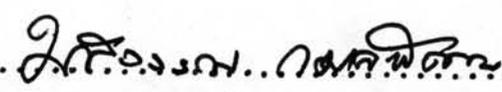
กรรมการ

(อาจารย์สุชี สุนทรธรรม)



กรรมการ

(อาจารย์ชยากริต ศิริอุปถัมภ์)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาลากูทีในซิงฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 เพื่อวิเคราะห์
หาระดับฮอร์โมนนี้ในซีรัมของควายปลักโดยวิธี
เรดิโออิมมูโนแอสเส

ชื่อนิติ นายศักดา เจริญ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ฉวีวรรณ กมลพัฒนา

ภาควิชา นิวเคลียร์เทคโนโลยี

ปีการศึกษา 2522



บทคัดย่อ

การศึกษาลากูทีในซิงฮอร์โมนด้วยไอโอดีน-125 ในการทดลองนี้ใช้วิธี
คลอรามีน-ที ปฏิบัติภายใต้ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นค่าอ่อน (พีเอช 7.5)
และความเข้มข้นของสารที่ใส่ต่ำมากแล้วทำให้บริสุทธิ์ 2 ครั้งด้วยเซฟาเซกซ์ จี-50
คอลัมน์ และเซลลูโลสคอลัมน์ ได้ผลผลิตของการศึกษาลากูที 50-70 เปอร์เซ็นต์และ
ความบริสุทธิ์ในขั้นสุดท้ายประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์

วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส นั้นปฏิบัติทำในปริมาตรทั้งหมด 0.6 มิลลิลิตร
ประกอบด้วยพลาสมา 0.2 มิลลิลิตร แอนติบอดีชนิดแรก AS-LH 901 และซีรัมกระต่าย
ปกติ (ความเข้มข้น 1 : 70,000 และ 1 : 300 ตามลำดับ) ปริมาตรรวมกัน
0.1 มิลลิลิตร ซีรัมควาย (ความเข้มข้น 1 : 4) 0.1 มิลลิลิตร สารลูทีในซิงฮอร์โมน
ศึกษาลากูที 0.1 มิลลิลิตรและแอนติบอดีชนิดที่สองในรูปของแกมมาโกลบูลินจากแกะของ
แอนติบอดีชนิดแรก (ความเข้มข้น 1 : 21) อีก 0.1 มิลลิลิตร อินคิวเบทที่ 4 องศา
เซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและแยกสารศึกษาลากูทีอิสระออกจากรูปที่จับกับ
แอนติบอดีด้วยวิธีคัมเบิลแอนติบอดี

จากการเปรียบเทียบความถูกต้องและเชื่อถือได้ของการวัดปริมาณลูทีนในซิง
 ออร์โมนพบว่าสามารถวิเคราะห์โคคาทีไกลเคียมโคคาสมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลง
 ของการทดลองครั้งเดียวกันและต่างครั้งกันมีค่าอยู่ระหว่าง 5.34 - 11.76 เปอร์เซ็นต์
 และ 4.58 - 18.60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและทดลองหาค่าเปอร์เซ็นต์รีกอร์
 ได้เท่ากับ 85.14 ± 4.38 เปอร์เซ็นต์

ผลการวัดปริมาณลูทีนในซิงออร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย 4 ตัวที่ได้
 รับการฉีดโปรสตาแกลนดินปรากฏว่าระดับของลูทีนในซิงออร์โมนจะสูงขึ้นภายหลังจาก
 ฉีดโปรสตาแกลนดินแล้วในระหว่าง 57.00 ± 7.35 ชั่วโมงและระดับลูทีนในซิงออร์โมน
 สูงสุดที่วัดได้มีค่า 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 $85.14 \pm 4.38\%$.

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

กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณารับเป็น
ผู้ควบคุมการวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในคานวิชาการและ
การทดลองจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จโดยยติ

รองศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนา

Dr. D. Schams

ศาสตราจารย์สุวรรณี แสงเพชร

อาจารย์ชยากริต ศิริอุปถัมภ์

อาจารย์สุธี สุนทรธรรม

อาจารย์สังเวียน วงศ์มังกร

อาจารย์สุรศักดิ์ ทองแสง



ขอขอบคุณข้าราชการและเจ้าหน้าที่กองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณู
เพื่อสันติ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ
ในคานการทดลองมาโดยตลอดและขอขอบคุณคุณชอทิพย์ สิ้นสูงสุตที่ได้ช่วยเหลือ
ในคานการพิมพ์และจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเป็นผลสำเร็จ

สารบัญ

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.	การติดฉลากลูกถ้วยในเชิงฮอว์โมนด้วยไอโอดีน-125	11
3.1	วิธีการติดฉลาก	11
3.2	การทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1.....	12

3.3 การทำสารสกัดจากใบบริสุทธิ์ครั้งที่ 2 15

3.4 การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ได้ 18

4. การจัดทำมาตรฐานการวัดด้วยวิธีเรคิโอมิมิวโน เอสเส 22

4.1 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดแรก.. 22

4.2 การทดลองหาปริมาณสารสกัดจากที่เหมาะสมสำหรับ
ปฏิกิริยาทางเรคิโอมิมิวโน เอสเส 27

4.3 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดที่สอง. 27

4.4 การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต . 30

5. การวัดปริมาณลูทีนในรังฮอร์โมนด้วยวิธีเรคิโอมิมิวโน เอสเส 32

5.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของลูทีนในรังฮอร์โมน 32

5.2 วิธีเรคิโอมิมิวโน เอสเส 34

5.3 การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมน 41

5.4 วิธีเรคิโอมิมิวโน เอสเส อย่างเร็ว 41

6. การศึกษาเสถียรภาพของสารสกัดจาก 43

7. การทดสอบความเชื่อถือได้และความแม่นยำของวิธีทดลอง.....

7.1 ความแม่นยำของวิธีทดลอง 46

7.2 การหาค่าเปอร์เซ็นต์รีคอปเวอรี่ 49

8. ผลการวัดปริมาณลูทีนในรังฮอร์โมนในซีรัมของควายปลัก	50
4. สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	61
ประวัติการศึกษา	66

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1	ผลการทำสารคดีคลากใหญ่ครั้งที่ 1	13
2	ผลการทำสารคดีคลากใหญ่ครั้งที่ 2	16
3	การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารคดีคลาก	19
4	สถิติของผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารคดีคลากที่ คำนวณได้จากการทดลอง	21
5 ก.	ปริมาณรังสีทั้งหมดในหลอดทดลอง (ก่อนแยก)	36
5 ข.	ปริมาณรังสีในหลอดทดลองหลังจากแยกเอาส่วนที่ ไม่ตกตะกอนออกแล้ว	37
6	แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน	47
7	แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดต่างครั้งกัน	48
8	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์รีคเอนแอร์จากการทดลอง	49
9	แสดงเวลาและระดับสูงสุดของลูซิเฟอโรซิวิตีในซิงเจอร์โมนที่ เกิดขึ้นภายหลังจากการฉีดโปรสตาแกลนติน	55

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1	กราฟแสดงผลของการทำสารศึกษาลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1	14
2	กราฟแสดงผลของการทำสารศึกษาลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2	17
3	ก. กราฟแสดงปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารศึกษาลาก ปริมาณ 5,000 เคาท์/นาที	23
3	ข. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารศึกษาลาก ปริมาณ 10,000 เคาท์/นาที	24
3	ค. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารศึกษาลาก ปริมาณ 15,000 เคาท์/นาที	25
3	ง. กราฟแสดงปริมาณการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารศึกษาลาก ปริมาณ 20,000 เคาท์/นาที	26
4	กราฟแสดงปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดที่สองที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน	29
5	กราฟแสดงอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท	31
6	ก. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิงฮอร์โมนระหว่าง เปอร์เซ็นต์เกาะเกี่ยวกับปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมน.....	39
6	ข. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิงฮอร์โมนระหว่างปริมาณรังสี กับปริมาณลูทีไนซิงฮอร์โมนมาตรฐาน	40

รูปที่ 7	แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีนในซิงฮอร์โมน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์อย่างรวดเร็ว	42
8 ก.	แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีนในซิงฮอร์โมนที่ได้จากการใช้ สารสกัดจากที่เก็บไว้ในช่วงระยะเวลาต่างกัน	44
8 ข.	แสดงปฏิกิริยาการรวมตัวของสารสกัดจากที่เก็บไว้ ในระยะเวลาต่างกัน	45
9 ก.	แสดงระดับปริมาณลูทีนในซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 11)	51
9 ข.	แสดงระดับปริมาณลูทีนในซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 14)	52
9 ค.	แสดงระดับปริมาณลูทีนในซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 16)	53
9 ง.	แสดงระดับปริมาณลูทีนในซิงฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมีย ที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน (ควายปลักเบอร์ 19)	54