วิธีวัดปริมาณซัยรอยด์ฮอร์โมนและการวัดความสามารถในการจับซัยรอกซินของโปรตีน อินเตอร์แอลฟาโกลบูลินของคนไทย

โดย

นางสาว จารุวัฒน์ วิศาลเวชกิจ

000345

วิทยานิพนธ์นี้

เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนกวิชาชีวเคมี

พ.ศ. 2515

Development of a Sensitive Method for Serum Thyroxine Assay and Study of Inter-Alpha Globulin for Thyroxine Binding Capacity in Thai Subjects.

Miss Charuwat Wisanvejkit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1972

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนประกอบการศึกษาตามระเบียบปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ ..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย : นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : วิธีวัดปริมาณชัยรอยด์ฮอร์โมนและการวัดความสามารถในการจับชัยรอกซินของโปรตีนอินเตอร์แอลฟาโกลบูลินของไทย

ชื่อ : นางสาว จารุวัฒน์ วิศาลเวชกิจ

แผนก : ชีวเคมี

ปีการศึกษา : 2515

บทคัดย่อ

การศึกษาความผิดปกติของร่างกายที่เนื่องมาจากการใช้ชัยรอยด์ฮอร์โมนต้องศึกษาปริมาณของชัยรอยด์ฮอร์โมนในร่างกายอย่างแน่นอน ซึ่งมีวิธีศึกษาหลายวิธี มีการวัด protein-bound-iodine, PBI, (Somogyi, 1930) หรือ butanol-extractable - iodine, BEI, (Trevorrow, 1939) หรือไอโอโดโปรตีน จากวิธี magnesium precipitation (Sterling และ Brunner, 1966) แต่วิธีที่เหมาะสมและใช้ได้ดีที่สุด, รวดเร็ว, เที่ยงตรงที่สุดและนิยมใช้ในการวินิจฉัยทางการแพทย์ในปัจจุบันนี้ คือ วิธีที่ใช้หลัก saturation analysis ของ Ekins (1963)

การศึกษาวิธีวัดปริมาณฮอร์โมนได้ดำเนินตามหลักการของ Ekins โดยทดลองปรับปรุงวิธีการวัดเพื่อให้ความไวในการวัดสูง และมีค่าเบี่ยงเบนทางสถิติน้อยด้วย จุดประสงค์ใหญ่อยู่ที่การหาข้อมูลต่าง ๆ ที่เป็นปัจจัยสำคัญให้ผลของการวัดเปลี่ยนแปลงไป เพื่อเป็นประโยชน์ต่อห้องปฏิบัติการที่ต้องการสร้างวิธีวัดปริมาณชัยรอกซินให้ได้ผลดีที่สุด ได้ทำการทดลองหา sensitivity ของการวัดฮอร์โมนชัยรอกซิน ด้วยเทคนิคของ saturation analysis โดยอาศัยการคำนวณเพื่อหาปริมาณโปรตีนและ tracer ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการปฏิบัติ ปรากฏว่าทฤษฎีการคำนวณของ Ekins (1969) ให้ผลตรงกับการทดลองและวัดค่า sensitivity ได้ต่ำสุดถึง 62 พิโคกรัมต่อ มล. กับได้ทดลองหาการแปรค่าของแต่ละแฟคเตอร์ที่มีผลต่อการวัดปริมาณชัยรอกซินโดยวิธี saturation analysis ด้วยจากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นว่าการวัดปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีนี้จำเป็นจะต้องระวังในเรื่องอุณหภูมิมาก ต้องต่ำและสม่ำเสมอตลอดการทดลอง ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมคือระหว่าง 0-4 °ซ. เวลาในการอินคิวเบทสารผสมเพื่อให้ถึง

สมดุลย์ คือ 60 นาที, เวลาในการเขย่า เมื่อเติมเรซินลงไปแยกส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (free) และส่วนที่ทำปฏิกริยา (bound) คือ 45 นาที โปรตีนที่เลือกใช้ในการจับฮอร์โมนชัยรอกซิน (binding protein) ควรใช้โปรตีนจากซีรัมของคนมีครรภ์ เพราะมีปริมาณอินเตอร์แอลฟาโกลบูลินสูง เมื่อเจือจางจนได้ความเข้มข้นพอเหมาะสำหรับการวัดปริมาณฮอร์โมนน้อย ๆ พบว่าใช้การเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:5 (ซีรัม:buffer) ซึ่งเจือจางมากกว่าวิธีของ Ekins (1963) การเจือจางมากนี้จะเป็นประโยชน์ช่วยให้มีค่า K (equilibrium constant) สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณโปรตีนอื่นซึ่งมี non-specific binding site ลดน้อยลง นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนโปรตีนที่ใช้จับฮอร์โมนใหม่ จำเป็นจะต้องทดลองหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมทุกครั้ง เพื่อรักษาระดับความไวในการวัดให้คงอยู่ในระดับสูงที่สุดตลอดเวลา

เปอร์เซ็นต์ extraction recovery ได้ 74.33 ± 2.31% โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์สกัดฮอร์โมนจากซีรัมในอัตราส่วน 1:5 (ซีรัม:เอธิลแอลกอฮอล์) และหาเปอร์เซ็นต์ recovery โดยวิธีเติมชัยรอกซินที่ทราบปริมาณแน่นอนลงในซีรัมได้ผล 104.68 ± 4.69%

ส่วนในการศึกษา thyroxine binding globulin capacity ได้ใช้วิธีของ Robbins (1956) โดยวิธี reverse flow electrophoresis พบว่าคนปกติมีปริมาณชัยรอกซินจับกับโปรตีนอินเตอร์แอลฟาโกลบูลิน =0.45 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (มล.) ซึ่งได้ผลสูงกว่าคนปกติของรายงานของ Robbins (1956) ซึ่งได้ผล 0.19 ไมโครกรัมต่อ มล. ผลลัพธ์นี้อาจจะเนื่องมาจากความสามารถในการจับชัยรอกซินของโปรตีนอินเตอร์แอลฟาโกลบูลินในคนไทยสูงเอง หรือเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทำให้การแยกอัลบูมินและอินเตอร์แอลฟาโกลบูลินไม่ชัดเจน ในที่นี้ไม่สามารถจะฟันธงได้เนื่องจากไม่มีเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพดีกว่านี้สำหรับการทดลอง

Thesis Title : Development of a Sensitive Method for Serum Thyroxine and Study of Inter-Alpha Globulin for Thyroxine Binding Capacity of Thai Subjects.

Name : Miss Charuwat Wisanvejkit.

Department : Biochemistry.

Academic year : 1972

Abstract

In studying the abnormalities of thyroid hormones consumption, it is essential to precisely quantitate the thyroid hormone in the body. Many approaches have been proposed in the past, for example, the measurement of the protein-bound-iodine, PBI, (Somogyi, 1930) or of the butanol-extractable-iodine, BEI, (Trevorrow, 1939) or of the iodoprotein from magnesium precipitation (Sterling and Brunner, 1966). At present, the most practical and precised assay method seems to be the thyroxine assay which is based on saturation analysis technique (Ekins, 1963).

The procedure of the study reported in this thesis was carried out as described by Ekins (1963). Development of the method was performed in order to increase the sensitivity and precision thus decrease the standard deviation of the hormone measurement. The purpose of this study is to elucidate the principle factors which introduce variation into the assay method in order that this assay method can be properly set up with maximum efficiency and accuracy. Experiments to determine the sensitivity of the thyroxine measurements by the saturation analysis technique as predicted by mathematical process were also

carried out. The suitable amount of tracer and of binding protein obtained from this work was found to be the same as calculated from Ekins' theory (1969), and the sensitivity in this thesis was 62 picogram per millilitre. Critical study of various factors affecting the measurements of thyroxine by the saturation analysis technique were determined too. Results obtained from this work revealed that the temperature was a very critical factors in the hormone determinations. It must be low and constant throughout the experiment. The optimal range of the temperature was between 0 and 4 degrees centrigrade. The optimal incubation time (to reach equilibrium) was sixty minutes. Forty five minutes was recommended for shaking when the ion-exchange resin was added for the separation of the unreacted hormone. Protein from the pregnancy serum was the suitable source of protein for reacting with the hormone since it contained high level of inter-alpha-globulin. In order to get high value of the equilibrium constant, the optimal concentration of the protein was essential and must be controlled so as to get a high sensitivity for the hormones measurements. The optimal dilution of pregnancy serum was 1:5 (serum:buffer). This dilution is much greater than Ekins' report(1969), this greater dilution introduced a higher equilibrium constant as it reduced the concentration of the other proteins which have non-specific binding site. Whenever a new batch of the binding protein was used, the optimal dilution should be experimentally determined.

The percent extraction recovery by absolute ethanol was $74.33 \pm 2.31\%$ (1:5; serum:ethanol) and the percent recovery from

adding a known amount of thyroxine into serum was 104.68 ± 4.69%

Reverse flow electrophoresis developed by Robbins (1956) was adopted as a method for the studies of thyroxine binding globulin capacity. It was found that in the normal Thai subjects the amount of thyroxine bound inter-alpha globulin was 0.45 microgram per millilitre. It was higher than Robbins' report (0.19 microgram per millilitre). It might be the result of either a higher binding capacity of the protein in Thai subjects or the technical error from incomplete protein separation. This problem can not be clarified as better equipment is not available in the laboratory.

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี

อาจารย์ นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กำจัด มงคลกุล

อาจารย์ แพทย์หญิง มาคุ้มกรอง โปษยะจินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง คุณหญิง ดร.ศรีจิตรา บุนนาค

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

จารุวัฒน์ วิศาลเวชกิจ

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ..... ง
คำขอบคุณ..... ฌ
รายการตารางประกอบ..... ฎ
รายการรูปประกอบ..... ฑ
บทนำ..... 1
วัสดุและวิธีดำเนินการ..... 25
- เครื่องมือเครื่องใช้..... 25
- การเตรียมสาร..... 26
- วิธีวัดปริมาณเธียรอกซินในซีรัม..... 28
- วิธีทดลองเพื่อหา thyroxine binding globulin capacity.... 31
ผลการทดลอง..... 34
- ผลการทดลองหาความเข้มข้นของสารที่จะใช้ทดลองให้เหมาะสมเพื่อหาความไวและความถูกต้องในการวัดมีค่าสูง..... 34
- ผลการปรับปรุงวิธีวัดปริมาณฮอร์โมนโดยการแปรค่าแฟคเตอร์ต่าง ๆ... 43
- Reproducibility ของวิธีการทดลอง..... 73
- ผลการหาค่า percentage recovery..... 75
- ผลการศึกษา thyroxine binding capacity..... 77
วิจารณ์ผลการทดลอง..... 81
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 88
บรรณานุกรม..... 91
ประวัติการศึกษา..... 100

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b กับปริมาณฮอร์โมนที่ถูกจับไว้โดยโปรตีนของชัยรอกซินมาตรฐาน เพื่อทำ 'scatchard plot'	36
2	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b และปริมาณชัยรอกซินที่ถูกจับโดยโปรตีนเพื่อทำ 'scatchard plot' เมื่อทำที่ความเข้มข้นของ reagent ที่ผอเหมาะตามที่คำนวณได้	40
3 ก	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 150 มก.,statistical error และ sensitivity	44
3 ข	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 120 มก.,statistical error และ sensitivity	45
3 ค	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 100 มก.,statistical error และ sensitivity	46
3 ง	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 80 มก. statistical error และ sensitivity	47
3 จ	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 50 มก. statistical error และ sensitivity	48
4 ก	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบท 60 นาที, statistical error และ sensitivity	51
4 ข	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบท 45 นาที, statistical error และ sensitivity	52
4 ค	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบท 30 นาที, statistical error และ sensitivity	53
4 ง	แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบท 15 นาที, statistical error และ sensitivity	54

ตารางที่ หน้า

5 ก แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการอินคิวเบท 4 °ซ. statistical error และ sensitivity..... 57

5 ข แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการอินคิวเบท 23 °ซ. statistical error และ sensitivity..... 58

6 ก แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 60 นาที, statistical error และ sensitivity..... 61

6 ข แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 45 นาที, statistical error และ sensitivity..... 62

6 ค แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 30 นาที, statistical error และ sensitivity..... 63

6 ง แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 15 นาที, statistical error และ sensitivity..... 64

7 ก แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 4 °ซ. statistical error และ sensitivity..... 67

7 ข แสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 23 °ซ. 68

8 ก ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อแยก supernatant ออกจากเรซินใช้เวลาต่างกัน และใช้อุณหภูมิ 4 °ซ. ตลอดการแยก แต่ทำกับชัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้น 6.25 นาโนกรัม/0.5 มล. เท่านั้น..... 71

8 ข ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อแยก supernatant ออกจากเรซินใช้เวลาต่างกัน และใช้อุณหภูมิ 23 °ซ. ตลอดการแยก แต่ทำกับชัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้น 6.25 นาโนกรัม/0.5 มล. เท่านั้น..... 72

9 precision ของวิธีวัดปริมาณชัยรอกซินใน pooled serum 4 ตัวอย่างในเวลาเดียวกัน..... 73

ตารางที่ หน้า

10 precision ของวิธีวัดปริมาณฮอร์โมนไทรอกซินใน pooled serum ต่างกัน 4 วัน 74

11 percentage recovery ที่ได้จากการเติมฮอร์โมนไทรอกซินมาตรฐานลงใน pooled serum ที่ทราบปริมาณฮอร์โมนแล้ว..... 75

12 percentage extraction recovery ที่สามารถจะวัดได้ 76

13 แสดง capacity ของ TBG โดยใช้ radioimmunoelectrophoresis.79

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แบบต่าง ๆ ของ 'saturation analysis' และการใช้.....	12
2	แสดงหลักการของ'saturation analysis'.....	13
3	แสดงหลักการ 'saturation analysis' ของฮัยรอกซิน.....	16
4	คอมพิวเตอร์พล็อตหาค่า optimum reagent concentration เพื่อให้มีความไวในการวัดสูง.....	21
5ก	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮัยรอกซินและอัตราส่วน f ต่อ b เพื่อใช้สำหรับวัดระดับปริมาณฮัยรอกซิน.....	37
5ข	'scatchard plot' แสดงค่า equilibrium constant และปริมาณความสามารถในการจับฮอร์โมนของโปรตีน.....	38
6ก	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮัยรอกซินและอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นที่เหมาะตามที่คำนวณได้.....	41
6ข	'scatchard plot' แสดงค่า equilibrium constant และปริมาณความสามารถในการจับฮอร์โมนของโปรตีน เมื่อใช้optimum reagent concentration.	42
7	แสดงถึงความแตกต่างของอัตราส่วน f ต่อ b ที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆ กัน เมื่อใช้น้ำหนักเรซินหนัก 150,120,100,80,50 มก.ในการแยก free ออกจาก bound.....	49
8	แสดงถึงความแตกต่างของอัตราส่วน f ต่อ b ที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆกัน เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบทสารผสม 60,45,30,15 นาที.....	55
9	แสดงถึงความแตกต่างของอัตราส่วน f ต่อ b ที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนต่าง ๆ กัน เมื่อใช้อุณหภูมิในการอินคิวเบทสารผสมที่ 4 °ซ.และ 23 °ซ.....	59
10	แสดงถึงความแตกต่างของอัตราส่วน f ต่อ b ที่ความเข้มข้นฮอร์โมนต่าง ๆ กัน เมื่อใช้เวลาการเขย่าหลังจากเติมเรซิน 60,45,30,15 นาที.....	65

รูป หน้า

11 แสดงถึงการแปรค่าของอัตราส่วน f ต่อ b ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเมื่อใช้อุณหภูมิการเขย่า 4 °ซ..... 69

12 แสดงตัวอย่างการแยกโปรตีนในซีรัมโดยวิธีreverse flow electrophoresis. 78

13 แสดงการจับของซับรอกซินกับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน..... 80