

การเตรียมธัญธรรมาสารเพื่อเป็นอาหารสัตว์ในการผลิตแอนติบอดี
สำหรับชุดทดสอบธรรมาสาร



นางสาว ศิริพรรณ ฉันทวุฒิเศรษฐี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี

พ.ศ. 2537

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISBN 974-584-365-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 15285583

PREPARATION OF THYROXINE CONJUGATES AS
IMMUNOGEN FOR ANTISERUM PRODUCTION
OF THYROXINE DIAGNOSTIC KIT

MISS Siriphan Shuntawuttisetee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of science
Department of Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1994

ISBN 974-584-365-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเตรียมอัยรอกซินคอนจูเกตเพื่อเป็นอิมมูโนเจนในการ

ผลิตแอนติซีรัมสำหรับชุดทดสอบอัยรอกซิน

โดย

นางสาวศิริพรรณ ฉันทวุฒิเศรษฐี

ภาควิชา

เคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

นางสาววิยะดา เจริญศิริวัฒน์



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

Thavon Vojasthaya

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรภักย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธีเนียนัน)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เรืองพิพัฒน์)

กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปรีชา ใจวิวัฒน์ชัย)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นางสาว วิยะดา เจริญศิริวัฒน์)



ศิริพรรณ ฉันทวุฒิเศรษฐี : การเตรียมร็วอกซินคอนจูเกตเพื่อเป็นอิมมูโนเจนในการผลิตแอนติ
ซีรัมสำหรับชุดทดสอบร็วอกซิน (PREPARATION OF THYROXINE CONJUGATES
AS IMMUNOGEN FOR ANTISERUM PRODUCTION OF THYROXINE
DIAGNOSTIC KIT) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อมร เพชรสม, อ.ที่ปรึกษาร่วม : วิยะดา
เจริญศิริวัฒน์, 75 หน้า. ISBN 974-584-365-2

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเตรียมอิมมูโนเจนร็วอกซิน-โปรตีน คอนจูเกตโดยให้แฮปเทนร็วอกซิน
ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลโปรตีน เช่น โบวไนน์ ซีรัม อัลบูมิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน และ โพลี-ดี-ไลซีน
การสังเคราะห์ร็วอกซิน-โบวไนน์ ซีรัม อัลบูมินให้ได้ค่าอัตราส่วนโมลร็วอกซินต่อโบวไนน์ ซีรัม อัลบูมิน
สูงสุดโดยที่ 25° ซ มีค่า 22 : 1 และที่ 4° ซ มีค่า 18 : 1 ด้วยการใช้ร็วอกซิน 10.00 มก. (1.29×10^{-5} โมล) คาร์โบไดอิมิด 4.00 มก. (2.09×10^{-5} โมล) และ โบวไนน์ ซีรัม อัลบูมิน 0.80 มก. (0.12×10^{-7} โมล) ที่พีเอช 9-10 ส่วนในกรณีของร็วอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินใช้ร็วอกซิน 20.00 มก. (2.57×10^{-5} โมล) คาร์โบไดอิมิด 5.00 มก. (2.61×10^{-5} โมล) และฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน 0.50 มก. (0.07×10^{-7} โมล)
ในช่วงพีเอชเดียวกันซึ่งให้ค่าอัตราส่วนโมลร็วอกซินต่อฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน 20 : 1 ที่ 4° ซ และ 16 : 1
ที่ 25° ซ

การสร้างแอนติซีรัมจากสัตว์ทดลอง (กระต่าย) พบว่าปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ในการฉีดครั้งแรก
และครั้งต่อ ๆ มาควรแตกต่างกันคือ 1.0 และ 0.2 มก. ตามลำดับ เพื่อป้องกันสภาวะการหยุดสร้างแอนติ
บอดีชั่วคราวซึ่งอาจมีผลจากทั้งที- และ บี-เซลล์ ช่วงเวลาการกระตุ้นก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยพบว่ากระต่าย
ที่ได้รับการกระตุ้นทุก ๆ 1 เดือนยังสามารถให้แอนติซีรัมได้ แต่กระต่ายที่ได้รับการกระตุ้นทุก ๆ 2 สัปดาห์
ไม่สามารถให้ได้ ในการเปรียบเทียบการตอบสนองของอิมมูโนเจนแต่ละชนิดพบว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย
ร็วอกซิน-โบวไนน์ ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมลร็วอกซินต่อโบวไนน์ ซีรัม อัลบูมินสูงสุด ($> 20:1$)
ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดที่ 1:400 กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยค่าอัตราส่วนโมล $> 10 < 20:1$ ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดที่
1:130 ส่วนกลุ่มที่กระตุ้นด้วยร็วอกซิน ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินที่มีค่าอัตราส่วนโมล $> 10 < 20:1$
ให้ค่าไตเตอร์สูงสุดที่ 1 : 150 ในกรณีของการฉีดกระตุ้นด้วยร็วอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีนไม่พบการตอบ
สนองจากสัตว์ทดลองถึงแม้ว่ามีค่าอัตราส่วนโมลร็วอกซินต่อโปรตีนสูงสุด (200 : 1) การพิสูจน์
เอกลักษณ์ในรูปแบบค่าคงที่สัมพรรคภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง $10^8 - 10^9$ ต่อโมลาร์

ภาควิชา เคมี
สาขาวิชา เคมีอินทรีย์
ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อนิติ ศิริพรรณ ฉันทวุฒิเศรษฐี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อ.อมร เพชรสม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิยะดา

C325184 : MAJOR CHEMISTRY
KEY WORD: THYROXINE / THYROXINE CONJUGATE / RADIOIMMUNOASSAY



SIRIPHAN SHUNTAWUTTISEETEE : PREPARATION OF THYROXINE CONJUGATES AS IMMUNOGEN FOR ANTISERUM PRODUCTION OF THYROXINE DIAGNOSTIC KIT. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR WIYADA CHAROENSIRIWATTANA, 75 pp. ISBN 974-584-365-2

In this study, thyroxine-protein conjugates were prepared by using hapten thyroxine reacted with various kind of protein molecules such as : bovine serum albumin, human serum albumin and poly-D-lysine. Synthesis of thyroxine-bovine serum albumin yielded the highest molar ratio of thyroxine per bovine serum albumin i.e. 22:1 at 25°C and 18:1 at 4°C by using thyroxine 10.00 mg (1.29×10^{-5} mole), carbodiimide 4.00 mg (2.09×10^{-5} mole) and bovine serum albumin 0.80 mg (0.12×10^{-7} mole) at pH 9-10. In case of thyroxine-human serum albumin at the same pH by using thyroxine 20.00 mg (2.57×10^{-5} mole), carbodiimide 5.00 mg (2.61×10^{-5} mole) and human serum albumin 0.50 mg (0.07×10^{-7} mole) gave molar ratio of thyroxine per human serum albumin 20:1 at 4°C and 16:1 at 25°C.

To raise antisera from the animals (rabbits) it was found that the dosages of immunogens used for primary injection and for boosters should be differed i.e. 1.0 and 0.2 mg respectively in order to prevent the temporarily of non-produced antibody condition. This may be mediated by both a T- and a B-cell effect. The time intervals of immunization were important too. It was found that the rabbits immunized every month could produce the antisera whereas the 2 week boost up interval could not yield the satisfactory antisera. Comparisons of responses to each immunogen showed that the group immunized with highest molar ratio of thyroxine-bovine serum albumin (> 20:1) gave the highest titer at 1:400 whereas the group immunized with molar ratio of thyroxine per bovine serum albumin > 10 < 20:1 yielded the highest titer at 1:130. For thyroxine-human serum albumin, the group immunized with the molar ratio of > 10 < 20:1 gave the highest titer at 1:150. In case of the thyroxine-poly-D-lysine, there was no response from the animals although the molar ratio of thyroxine per protein was the highest (200:1). Characterization of the affinity constants for these antisera showed the values of about 10^8 to 10^9 M⁻¹.

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต..... สิริพิภพ ชัยทองศิริสวัสดิ์
สาขาวิชา.....เคมีอนาทรย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.ว. นพ.
ปีการศึกษา..... 2536..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ส.ค. - ส.ค.



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ โดยเริ่มจากการหาทุนในการวิจัย คำแนะนำ กำลังใจ และแนวคิดต่าง ๆ จนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคุณวิยะดา เจริญศิริวัฒน์ หัวหน้าฝ่ายปฏิบัติการด้านกัมมันตภาพรังสีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นนทบุรี ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ทุน ตลอดจนอุปกรณ์, สารเคมี และ ความพร้อมในการทำวิจัยต่าง ๆ ทั้งยังให้คำแนะนำ คำสั่งสอน อันจะเป็นประโยชน์ในการทำงานต่อไป

ขอขอบคุณสมาชิกฝ่ายปฏิบัติการด้านกัมมันตภาพรังสีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นนทบุรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และ ความเป็นกันเองตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และข้าราชการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ และ คุณพ่อตลอดจนสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และคำแนะนำในการนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์



สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ญ
คำย่อ	ฎ
บทที่	
1. บทนำและทฤษฎี	1
2. อุปกรณ์และการวิจัย	23
3. ผลการวิจัย	34
4. บทสรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	53
รายการอ้างอิง	60
ภาคผนวก	64
ประวัติผู้เขียน	75

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะทางกายวิภาคของต่อมธัยรอยด์	1
2	แสดงวัฏจักรไอโอดีนในร่างกาย	3
3	แสดงโครงสร้างคาร์โบไดอิมิดทั้ง 2 รูปแบบ	11
4	แสดงกลไกการรวมกันของธัยรอกซินกับโมเลกุลโปรตีน	11
5	แสดง Scatchard plot	18
6	แสดงกราฟไตเตอร์ของแอนติบอดี	19
7	แสดงอัตราส่วนแอนติเจนต่อแอนติบอดีต่อการเกิดตะกอน	20
8	แสดงวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์แบบแข่งขัน	21
9	แสดงเส้นโค้งมาตรฐานในการตรวจหาแอนติเจน	22
10	แสดงยูวีสเปกตรัมของธัยรอกซิน	34
11	แสดงยูวีสเปกตรัมของอัลบูมิน	35
12	แสดงยูวีสเปกตรัมของโพลี-ดี-ไลซีน	35
13	แสดงการเปรียบเทียบพีคการแยกจากค่าอัตรานับวัดและค่าการดูดกลืน	36
14	แสดงยูวีสเปกตรัมพีคแรกจากการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอลจูเกต	37
15	แสดงยูวีสเปกตรัมพีคที่ 2 จากการแยกธัยรอกซิน-อัลบูมิน คอลจูเกต	37
16	แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	38
17	แสดงยูวีสเปกตรัมของธัยรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน	40
18	แสดงผลการใช้ปริมาณอิมมูโนเจนที่ต่างกัน	41
19	แสดงกราฟไตเตอร์แอนติซีรัมที่ใช้ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน	43
20	แสดงการลดลงของการตอบสนองต่อธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน	44
21	แสดงการเปรียบเทียบการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่มีระยะการฉีดกระตุ้นต่างกัน	45
22	แสดงกราฟไตเตอร์แอนติซีรัมจากการใช้ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน	46
23	แสดงการเปรียบเทียบการลดลงของการตอบสนองที่ใช้ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน และธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน	47
24	แสดง Scatchard plot ใช้คำนวณค่าคงที่สัมพรรคภาพ.....	49
25	แสดงกราฟปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ได้จากการใช้ธัยรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน	51
26	แสดงกราฟปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ได้จากการใช้ธัยรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน ...	52
27	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน- โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1).....	69
28	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 1 จากการใช้อิมมูโนเจนธัยรอกซิน- โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1).....	70

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
29	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 2 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1).....70
30	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 3 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 20 : 1).....71
31	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1).....71
32	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 1 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1).....72
33	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 2 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1).....72
34	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 3 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1).....73
35	แสดง Scatchard plot แอนติซีรัม กระต่ายเลขที่ 4 จากการใช้โอมิครอนเจนนัยรอกซิน- ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (อัตราส่วนโมล > 10 < 20 : 1).....73

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงสารอินทรีย์และแหล่งแอนติเจนที่พบได้.....13
2	แสดงคุณสมบัติอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่าง ๆ15-16
3	แสดงปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ฉีดในสัตว์ทดลอง28
4	แสดงการแบ่งกลุ่มกระต่ายที่ใช้อิมมูโนเจนค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน.....29
5	แสดงสารประกอบที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาข้ามของแอนติซีรัมที่ผลิตได้33
6	แสดงผลของพีเอชต่อค่าอัตราส่วนโมลอีรอกซิน-อัลบูมินคอนจูเกต.....38
7	แสดงผลของปริมาณโบไวน์ ซีรัม อัลบูมินและอุณหภูมิที่ใช้ต่อค่าอัตราส่วนโมล อีรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน.....39
8	แสดงผลของปริมาณฮิวแมน ซีรัม อัลบูมินและอุณหภูมิที่ใช้ต่อค่าอัตราส่วน โมลอีรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน.....39
9	แสดงผลของปริมาณอิมมูโนเจนต่อการตอบสนองในสัตว์ทดลอง.....41
10	แสดงผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนอีรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน ที่มี ค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน.....42
11	แสดงค่าไตเตอร์แอนติซีรัม ที่มี % B/T > 50 %.....42
12	แสดงผลการติดตามการตอบสนองในสัตว์ทดลองที่มีระยะการฉีดกระตุ้นต่างกัน...44
13	แสดงผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนอีรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน ที่มี ค่าอัตราส่วนโมลต่าง ๆ กัน.....46
14	แสดงผลการติดตามการตอบสนองในสัตว์ทดลองที่เคยมีการตอบสนองต่อ..... อิมมูโนเจนอีรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน47
15	แสดงผลการตอบสนองต่ออิมมูโนเจนอีรอกซิน-โพลี-ดี-ไลซีน48
16	แสดงค่าคงที่สัมพรรคภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ (ต่อโมลาร์).....48
17	แสดงผลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงอีรอกซินกับแอนติซีรัมที่ได้จาก..... อิมมูโนเจนอีรอกซิน-โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน(เปอร์เซนต์).....50
18	แสดงผลของสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงอีรอกซินกับแอนติซีรัมที่ได้จาก..... อิมมูโนเจนอีรอกซิน-ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน(เปอร์เซนต์).....51
19	แสดงน้ำหนักโมเลกุลสารที่ใช้ในการเตรียมคอนจูเกต67
20	แสดงค่าคงที่แก้ไขค่าอัตรานับวัด67
21	แสดงการคำนวณผลของปฏิกิริยาข้ามแอนติซีรัมที่ผลิตได้74



คำย่อ

Ag	=	แอนติเจน
Ab	=	แอนติบอดี
BSA	=	โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน
cpm	=	count per minute
dl	=	เดซิลิตร
DMF	=	ไดเมทิลฟอร์มาไมด์
dpm	=	disintegration per minute
dps	=	disintegration per second
HFS	=	ฮอร์โมน ฟรี ซีรัม
HSA	=	ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน
M	=	ความเข้มข้นเป็นโมลาร์
mCi	=	มิลลิวรี่
N	=	ความเข้มข้นเป็นนอร์มอล
ng	=	นาโนกรัม
nM	=	ความเข้มข้นเป็นนาโนโมลาร์
NSB	=	Non Specific Binding
PB	=	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
pH	=	พีเอช
PL	=	โพลี-ดี-ไลซีน
s	=	วินาที
STD ₀	=	ความเข้มข้นอัยรอกซินมาตรฐานเป็นศูนย์
STD _{max}	=	ความเข้มข้นอัยรอกซินมาตรฐานสูงสุด
T4	=	แอล-อัยรอกซิน
Tc	=	ค่าอัตรานับวัดกัมมันตภาพรังสีทั้งหมด
μg	=	ไมโครกรัม
o ซ	=	องศาเซลเซียส
มม.	=	มิลลิเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
ชม.	=	ชั่วโมง