

การตรวจหาปริมาณของโปรแลคตินในซีรัมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเส



นายกล้าหาญ คณิตราษฎร์

006762

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมเทคโนโลยี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2523

THE DETERMINATION OF SERUM PROLACTIN BY RADIOIMMUNOASSAY

Mr.Klaharn Tantirasdr

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 การตรวจหาปริมาณของโปรแลคตินในซีรัมโดยวิธีเรคิโออิมมูโนแอสเส

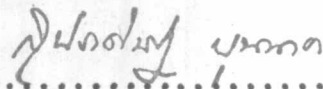
โดย นายกล้าหาญ คันติราษฎร์

ภาควิชา นิวเคลียร์เทคโนโลยี

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัดณะกุ่มพะ

คณาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง มณฑิรา คัมพ์เกตุร


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต




.....อธิบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประสิทธิ์ บุนนาค)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์สุวรรณ์ แสงเพชร)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. สุวิทย์ อารีกุล)

  
.....กรรมการ  
(อาจารย์สุธี สุนทรธรรม)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงมณฑิรา คัมพ์เกตุร)

  
.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. สุกัญญา วีรวัดณะกุ่มพะ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสส  
 ชื่อ นิสิต                      นายกล้าหาญ      ศันติราษฎร์  
 อาจารย์ที่ปรึกษา              อาจารย์ ดร.สุกัญญา      วีรวิชนี กุมพะ  
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม      รองศาสตราจารย์ พ.ญ.มณฑิรา      ศันตเกตุ  
 ภาควิชา                              นิวเคลียร์เทคโนโลยี  
 ปีการศึกษา                      2522



บทคัดย่อ

จากการศึกษาลากโปรแลคติน ด้วยไอโอดีน-125 ที่อุณหภูมิ 4°C โดยวิธี  
 คลอรามิน-ที จะได้ <sup>125</sup>I-hPRL มี immunoreactivity ที่สามารถนำมาใช้ตรวจ  
 หาปริมาณโปรแลคติน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสสได้ วิธีแอสเสสได้ใช้ <sup>125</sup>I-hPRL  
 ความเข้มข้น 5,000 cpm /หลอด สามารถรวมตัวกับแอนติบอดี เมื่อความเข้มข้นสุดท้าย  
 ของ anti-hPRL เป็น 1 : 400,000 เมื่ออินคิวเบชัน 24 ชม. ที่ 25°C หลัง  
 จากอินคิวเบชันแล้ว ใช้น้ำยาแขวนตะกอนผงถ่านความเข้มข้น 1 % เคลือบด้วยเค้กแตรน  
 ปริมาตร 0.5 มล. ในการแยก free และ bound form ออกจากกัน.

ได้ทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจหาปริมาณโปรแลคติน โดยการเติมโปร-  
 แลคตินมาตรฐาน (6-50 เอนโนกรัม/มล.) ลงใน charcoaled serum พบว่าได้  
 recovery 97.3-120.8 % และ ทดสอบความแม่นยำ ได้สัมประสิทธิ์ของความแปร  
 เปลี่ยนเป็น 7.7-15.8 % สำหรับ within assay และ 13.1-24.0 % สำหรับ  
 between assay นอกจากนี้พบว่า anti-hPRL มีความจำเพาะสูงคือมี cross  
 reaction น้อยกับ LH, FSH, hCG, hGH และ hPL พบว่าความไวของการวัด  
 ปริมาณโปรแลคตินเท่ากับ 1.90 เอนโนกรัม/มล.

จากการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัมของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย ตลอด  
 ระยะเวลาหนึ่งรอบเดือน พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรแลคตินเท่ากับ  $15.9 \pm 5.6$  , .

21.2 ± 12.7 และ 16.4 ± 6.2 นาโนกรัม/มล. ในระหว่าง follicular phase, mid-cycle และ luteal phase ตามลำดับ.

Thesis Title           The Determination of Serum Prolactin by  
                          Radioimmunoassay  
Name                    Mr.Klaharn Tantirasdr  
Thesis Advisor         Dr.Sukanya Werawatgoompa  
Thesis Co-Advisor     Associated Professor Monthira Tankeyoon, M.D.  
Department            Nuclear Technology  
Academic year         1979

#### Abstract

The iodination of hPRL with  $^{125}\text{I}$ -utilizing chloramine-T technique at temperature  $4^\circ\text{C}$  gave  $^{125}\text{I}$ -hPRL having immunoreactivity.  $^{125}\text{I}$ -hPRL could be used as a labelled compound for determination of human prolactin by radioimmunoassay. The assay was performed using  $^{125}\text{I}$ -hPRL 5,000 cpm/tube and anti-hPRL 1 : 400,000 dilution (final) incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 24 hr. One percent dextran-coated charcoal suspension (0.5 ml) was used for separation of free from bound form.

The criteria of reliability of the method was evaluated in terms of accuracy, precision, specificity and sensitivity. Under the condition of the assay, the addition of known amount of hPRL (6-50 ng/ml) to charcoaled serum, the recovery of the added hPRL was found to be 97.3-120.8 %. The within and between assay variation were evaluated from replicate measurements of the same samples in the same assay and in three different assays.

The percentage coefficients of variation was found to be 7.7-15.8 % and 13.1-24.0 % for within and between assays respectively.

Cross-reactivities of tested several protein hormones indicated that the anti-hPRL was very specific. The sensitivity was found to be 1.90 ng/ml.

The method was applied to measure serum prolactin for one cycle of 4 volunteers Thai women having normal menstrual cycle. The mean  $\pm$  SD of serum prolactin was found to be  $15.9 \pm 5.6$ ,  $21.2 \pm 12.7$ , and  $16.4 \pm 6.2$  ng/ml at follicular phase, mid-cycle and luteal phase respectively.



## กิติกรรมประกาศ

ผู้เสนาวิธานิพนธ์ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์สุวรรณ แสงเพชร  
รองศาสตราจารย์ น.พ.ดร.สุวิทย์ อารีกุล รองศาสตราจารย์ พ.ญ.มณฑิรา  
คัมภ์เกตุร และอาจารย์สุธี สุนทรธรรม ที่กรุณาให้คำแนะนำวิธานิพนธ์อย่าง  
ดียิ่ง โดยเฉพาะอาจารย์ ดร.สุกัญญา วีระดิษฐ์กุ่มพะ ไคกรุณาให้คำแนะนำ  
ตลอดจนให้ความช่วยเหลือทุกด้านมาตลอด จนวิธานิพนธ์นี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์.

นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความช่วยเหลือ ในขณะที่ทำวิธานิพนธ์ ดังนี้

รองศาสตราจารย์ น.พ.นิกร คุณศิลา

รองศาสตราจารย์ น.พ.ประมวล วีระตมเสน

รองศาสตราจารย์ น.พ.ร.ท.หะทัย เทพพิสัย

คุณเย็นจิต จันทรประสิทธิ์ คุณสมชัย ลิขิตพัฒนไพบูลย์

คุณทิพย์รัตน์ ภูละออ คุณวิฑูรย์ ชัยชาญวัฒนากุล

คุณฉัตรพร จิโรจจาตุรนต์ คุณกัลยาณี จันทรนิยม

คุณสีห์เนา เปรมมณี คุณอัญชลี ประดับทอง

และนักวิทยาศาสตร์ หองปฏิบัติการRIA ตึกโฆษยานนท์ ร.พ.จุฬาฯ

ขอขอบคุณฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและแผนกสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ที่เอื้ออำนวยสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง องค์การ  
อนามัยโลกและ National Institute of Health ที่ช่วยเหลือสารต่างๆที่  
จำเป็นในการทดลอง.

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนใน  
การทำวิธานิพนธ์.



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	น
กิตติกรรมประกาศ .....	ญ
รายการตารางประกอบ .....	ฉ
รายการรูปประกอบ .....	ฉ
คำย่อ .....	ฬ
บทที่	



1	บทนำ .....	1
2	เครื่องมือ สารเคมี และการเตรียมสาร .....	9
2.1	เครื่องมือ .....	9
2.2	สารเคมี .....	10
2.3	การเตรียมสารละลาย .....	12
3	วิธีการทดลอง .....	15
3.1	การทดลองติดสลาทโปรแลคตินด้วยไอโอดีน -125 .....	15
3.2	การเลือกความเข้มข้นของ anti-hPRL เพื่อใช้ในการทดลอง .....	18
3.3	การเลือกความเข้มข้นของผงถ่าน เพื่อความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ .....	18
3.4	การศึกษาเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน .....	19
3.5	การเลือกปริมาตรของซีรัม เพื่อใช้ในการตรวจปริมาณโปรแลคติน .....	21
3.6	การทำมาตรฐานควบคุมการทดลอง .....	21
3.7	การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง .....	21
3.8	การทดสอบอายุการใช้งานของ <sup>125</sup> I-hPRL .....	23
3.9	การคำนวณที่ใช้ .....	23

4 ผลการทดลอง ..... 27

4.1 การคิดสลายโปรแลคตินมาตรฐานด้วยไอโอดีน -125 ..... 27

4.2 การเลือกความเข้มข้นของ anti-hPRL ที่เหมาะสมในการนำไป  
ใช้ในการทดลอง ..... 28

4.3 การเลือกความเข้มข้นของผงถ่าน เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง ..... 28

4.4 การเตรียมกราฟมาตรฐาน ..... 30

4.5 ผลการทดลองเพื่อหาปริมาณซีรัมที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการตรวจ  
หาปริมาณโปรแลคติน ..... 32

4.6 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีการทดลอง ..... 32

4.7 ผลการทดสอบเพื่อหาอายุการใช้งานของ <sup>125</sup>I-hPRL ..... 35

4.8 ผลการตรวจหาปริมาณโปรแลคตินในซีรัม ..... 36

5 บทวิจารณ์ผล ..... 40

เอกสารอ้างอิง ..... 46

ประวัติผู้เขียน ..... 54

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1	วิธีทำกราฟมาตรฐาน สำหรับการหาปริมาณโปรแลคติน ..... 20
2	% bound ที่ต่างกันระหว่างที่เติมโปรแลคตินมาตรฐาน กับที่ไม่เติมโปรแลคติน มาตรฐาน ในการทำ Antiserum dilution curve ..... 29
3	ผลการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินใน Q C P serum ..... 32
4	ความจำเพาะของ anti-hPRL ..... 33
5	ความแม่นยำของการวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม ..... 33
6	ความถูกต้องของวิธีการตรวจวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม ..... 34
7	แสดงปริมาณโปรแลคตินในซีรัมของสตรีอาสาสมัคร 4 ราย ..... 37

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1 การเรียงตัวของแอมมิโนแอซิดของ โมเลกุลของ โปรแลคตินของแกะ.....	3
2 แสดงกลไกการติดสลากโปรแลคตินด้วยไอโอดีน-125.....	17
3 แสดงการเขียนกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาค่า % cross reaction....	24
4 แสดงกราฟมาตรฐานที่เขียนบนกระดาษกราฟธรรมดา เพื่อใช้ในการคำนวณslope.	25
5 First purification profile of iodinated materials.....	27
6 Antiserum dilution curve.....	29
7 อิทธิพลของขนาดต่อการจับ <sup>125</sup> I-hPRL อิสระ (free form).....	30
8 กราฟมาตรฐานเมื่ออินคิวเบชัน 4, 24 และ 48 ชม.....	31
9 อิทธิพลของ charcoaled serum ที่มีต่อกราฟมาตรฐาน.....	31
10 ความไวของวิธีการวัดปริมาณโปรแลคตินในซีรัม.....	35
11 กราฟมาตรฐานที่ทำในสัปดาห์ต่าง ๆ.....	36
12 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเคียนของสตรีอาสาสมัครรายที่ 1.....	38
13 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเคียนของสตรีอาสาสมัครรายที่ 2.....	38
14 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเคียนของสตรีอาสาสมัครรายที่ 3.....	39
15 ปริมาณโปรแลคตินในซีรัมระหว่างรอบเคียนของสตรีอาสาสมัครรายที่ 4.....	39

คำย่อ

คำย่อ

คำเต็ม

<sup>125</sup> I-hPRL	Iodine -125 labelled human prolactin
hPRL	human Prolactin
anti-hPRL	Antiserum to human prolactin
hGH	human Growth hormone
ng	nanogram
ml	millilitre
cpm	count per minute
IU	International unit
°C	degree celcius
A.R.	Analytical Reagent
QCP	Quality control pools
SD	standard deviation
CV	coefficient of variation
WHO	World Health Organization
NIH	National Institute of Health
มก.	มิลลิลิตร
ชม.	ชั่วโมง
mCi	milli-Curie