นิพนธ์ต้นฉบับ

การใช้อนุพันธ์สารเหล็กสำหรับขั้นตอนการแยกส่วนในวิธี radioimmunoassay สำหรับ luteinizing hormones

สมพงษ์ จินายน*

Chinayon S. An application of magnetizable second antibody for separation in radioimmunoassay of luteinizing hormone. Chula Med J 1983 Nov ; 27 (6) : 403-415

Double antibody magnetic particles (DAMP) and a mini-magnet were used for separation techique in radioimmunoassay (RIA) of luteinizing hormone (LH). The appropriate volume of ferromagnetic particles coupled with anti-rabbit serum using for precipitation the hormone bound fraction was determined. As well the time-course study for the incubation was demonstrated. In comparison with the conventional double antibody RIA, the DAMP-RIA showed the comparable precision and sensitivity. The logit plot type of standard calibrations ranging from 1.56-50 IU/litre were similar. When 42 serum samples were assayed for their LH levels, the results obtained by two techniques were correlated and were not statistically different. No need for centrifugation, in DAMP separation, also it spends shorter time for the whole assay procedure.

* ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Radioimmunoassay (RIA) เป็นวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการที่ใช้วัดปริมาณสารจำนวนน้อยในชีววัตถุ[1] หลักการนั้นใช้การแทนที่ระหว่างสารที่ติดฉลากด้วยไอโซโทปกับสารมาตรฐานชนิดเดียวกัน เพื่อการรวมตัวกับแอนติบอดีย์ที่มีจำนวน binding sites จำกัด ทั้งนี้ต้องไม่มีความแตกต่างกันในความสามารถที่สารแอนติเจนทั้งสองรูปแบบจะรวมตัวกับแอนติบอดีย์ และปฏิกิริยาเกิดขึ้นในสภาวะที่มีแอนติเจนปริมาณเกินพอ แอนติเจนเมื่อรวมตัวกับแอนติบอดีย์เรียกว่า bound form ส่วนแอนติเจนที่อิสระเรียกว่า free form ถ้าเพิ่มปริมาณสารมาตรฐาน สารที่ติดฉลากถูกแทนที่ในการรวมตัวกับแอนติบอดีย์ ทำให้ปริมาณ labelled bound form ลดลง และ labelled free form เพิ่มขึ้น ผลิตผลจากปฏิกริยาอยู่ในลักษณะของน้ำยาเพราะมีขนาดโมเลกุลเล็กไม่อาจบั๋นแยกได้ การแยกส่วน bound fraction (B) และ free fraction (F) ออกจากกันจึงใช้เทคนิคทางฟิสิกส์หรือทางเคมีช่วย วิธีแยกที่ใช้กันในปัจจุบันนั้น พิจารณาจากประโยชน์ เช่น ความง่าย ความรวดเร็ว และจากชนิดของไอโซโทปที่ใช้ในการติดฉลากสาร รวมทั้งชนิดของสารที่ต้องการวัดปริมาณ ตลอดจนความแม่นยำและความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ สำหรับ liquid–phase RIA สารที่นิยมใช้เป็นตัวแยก (separating agents) มี 2 ชนิดคือ charcoal และ แอนติบอดีย์ชนิดที่สอง (second antibody or antigamma globulin) RIA ที่ใช้แอนติบอดีย์ต่อสารแอนติเจน (แอนติบอดีย์ชนิดที่หนึ่ง) และแอนติบอดีย์ชนิดที่สองสำหรับตกตะกอน B fraction นั้นเรียกว่า double antibody technique ใช้สำหรับวัดปริมาณของ protein hormone หลายชนิด[2] และในกระบวนการวิเคราะห์เมื่อแอนติบอดีย์ชนิดที่สองรวมตัวกับ B fraction แล้ว ต้องบั๋นแยกในเครื่องที่มีอัตราความเร็วรอบสูง (เกินกว่า 1,500 g) ที่อุณหภูมิ 4°C เวลา 45 นาทีจึงจะตกตะกอน การใช้สารประกอบแม่เหล็กซึ่งเตรียมโดยวิธีการทางฟิสิกส์และเคมีให้เชื่อมต่อกับแอนติบอดีย์ชนิดที่หนึ่งหรือชนิดที่สอง และการใช้สนามแม่เหล็กทำให้ B fraction ตกตะกอน ทำให้ไม่ต้องใช้เครื่องบั๋นแยกซึ่งมีราคาสูง[3]

รายงานนี้แสดงการประเมินผลวิธีวัดปริมาณ luteinizing hormone (LH) ในซีรั่มด้วยวิธี double antibody magnetic particle RIA ซึ่งเป็นระบบ solid phase โดยการใช้แอนติบอดีย์ชนิดที่สองซึ่งเชื่อมต่อกับอนุพันธ์เหล็ก ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี double antibody technique (conventional double antibody RIA) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ

1. WHO matched assay reagents สำหรับ LH assay [4] ซึ่งประกอบด้วย

1.1 ^{125}I-hLH batch W-8008 (lyophilized form) และละลายใน assay buffer 1 ml ในการทดสอบใช้ 0.2 ml ผสมกับ tracer diluent จำนวน 10.5 ml

1.2 Human LH standard lot 80/25 มีปริมาณ 50 mU/vial (lyophilized form) เมื่อละลายใน assay buffer 1.0 ml จึงมีความเข้มข้น 50 IU/litre ขั้นต่อไปเตรียมน้ำยามาตรฐานให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 25, 12.5,6.25, 3.125 และ 1.56 IU/litre โดยวิธี doubling dilution technique

1.3 Anti LH serum batch 80/1

1.4 Assay buffer คือ mono-and di-sodium hydrogen phosphate 0.05 M, pH 7.2-7.4 และมี bovine serum albumin 0.5%

1.5 Tracer diluent คือ 0.5% normal rabbit serum ใน assay buffer

1.6 Donkey anti rabbit serum lot 80/71

2. วิเคราะห์หาปริมาณ LH ในซีรั่มจำนวน 42 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี manual method[4] ซึ่งเป็น conventional double antibody technique ดังมีปริมาตรน้ำยาและลำดับขั้นตอนวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 1

เมื่อครบ 48 ชม. แล้วเติม second antibody คือ anti rabbit gamma globulin ผสมน้ำยาทุกหลอดทดลองโดยใช้ vortex mixer และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 18-20 ชม. และปั่นแยกในเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ 4°C ใช้อัตราความเร็วอย่างต่ำ 1500 g นาน 45 นาที ส่วน hormone bound fraction (B) ตกตะกอนอยู่ข้างล่างหลอดทดลอง เทส่วนน้ำใสทิ้ง วัดปริมาณไอโซโทปที่อยู่ใน B fraction โดยใช้ gamma counter (counts per minute)

3. สำหรับการหาระดับ LH ด้วยระบบ solid phase โดยใช้ double-antibody magnetic particle (DAMP) นั้นใช้วัสดุเคมีภัณฑ์ เช่น เดียวข้อ 1.1 ถึง 1.4 ยกเว้นน้ำยาที่ใช้ละลาย ^{125}I-LH นั้นใช้ assay buffer ส่วนอุปกรณ์และวัสดุภัณฑ์ที่เพิ่มเติมได้แก่

3.1 double antibody magnetic particle (DAMP) or anti-rabbit solid phase lot 1504 (50 mg/ml) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Technicon Immunoassay Division, Technia Diagnostics Ltd. London, U.K.

3.2 Mini magnet เป็นแท่งแม่เหล็กใช้สำหรับตกตะกอนอนุพันธ์สารเหล็กผลิตโดย

ตารางที่ 1 ปริมาตรน้ำยาและลำดับขั้นตอนการหาปริมาณ LH โดย double antibody technique RIA

Tube label*	LH standard ml	^{125}I-LH ml	assay buffer ml	anti LH serum ml		anti rabbit serum ml
TC	—	0.1	—	—	—	—
NSB	—	0.1	0.6	—	ผสมน้ำยาทุกหลอด	0.1
Bo	—	0.1	0.5	0.1	ทดลองโดยใช้ vortex	0.1
Std	0.1	0.1	0.4	0.1	mixer และปล่อยให้เกิด	0.1
Unk	0.1	0.1	0.4	0.1	ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 48 ชม.	0.1

* Tube label : TC = total count คือ จำนวนฮอร์โมนที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทปทั้งหมดที่เติมลงในหลอดทดลอง NSB = non specific binding คือ จำนวนสารไอโซโทปซึ่งพบอยู่ใน B fraction เมื่อไม่ได้เติม anti LH serum ในหลอดทดลอง Bo = จำนวนฮอร์โมนที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทปที่รวมกับ anti LH serum ซึ่งพบอยู่ใน B fraction เมื่อไม่ได้เติมฮอร์โมนมาตรฐาน Std = standard hormone ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นในหลอดทดลองที่กล่าวในวัสดุและวิธีการข้อ 1.2 ซึ่งเติมลงในหลอดทดลองเพื่อให้แทนที่ ฮอร์โมนที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทป ในการรวมตัวกับ anti LH serum Unk = unknown ซึ่งอาจเป็นซีรั่มหรือพลาสมาที่ต้องการวัดปริมาณฮอร์โมน

Technicon Instruments Co Ltd. Hants, U.K.

3.3 0.1 % Triton ในน้ำ (ปริมาตร vol/vol)

3.4 Water–pump aspirator

4. วิธีทดลองหาปริมาตรที่เหมาะสมของน้ำยา DAMP เตรียมหลอดทดลองเพื่อการทดลอง 7 ชุด เติมน้ำยาในหลอดทดลองแต่ละชุด เช่น เดียวกับตารางที่ 1 ใช้ standard LH ความเข้มข้นเดียว คือ 3.125 IU/litre ซึ่งเป็นฮอร์โมนความเข้มข้นต่ำเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี double antibody technique แล้วให้ค่าความแม่นยำของเทคนิคพอใช้[4] และใช้ pooled serum ซึ่งทราบค่า LH แล้ว (7.23 IU/litre) อีกหนึ่งตัวอย่างด้วย ขั้นตอนในวิธีวิเคราะห์ทำ เช่น เดียวกับวิธี double antibody technique แต่เติม DAMP ที่เจือจางด้วย assay buffer (10 mg/ml) แทน anti rabbit serum ทั้งนี้ในแต่ละชุดทดลองใช้ DAMP ปริมาตรดังนี้ 25,50,75,100,150,200, และ 300 micro

litres ผสมน้ำยาให้ทั่วโดยใช้ vortex mixer แล้วปล่อยไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 ชม. ขั้นต่อไปเติม 0.1 % Triton จำนวน 1 ml. ผสมโดยใช้ vortex mixer แล้ววางหลอดทดลองในแนวเอียง 45 องศา บนแท่นแม่เหล็กนาน $\frac{1}{2}$ นาที และจากแรงดึงดูดของสนามแม่เหล็กทำให้ hormone bound fraction ตกตะกอน ใช้ aspirator ชนิดธรรมดา คือ Pastuer pipette ต่อกับ water pump suction ดูดส่วนน้ำใสข้างบนทิ้งไป ล้างตะกอนด้วย 0.1 % Triton อีกครั้งหนึ่งและปฏิบัติ เช่นเดิม นำหลอดทดลองที่มีส่วนตะกอนเหลืออยู่ (B fraction) ไปนับปริมาณไอโซโทป โดยใช้ gamma counter

5. การทดลองหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยก F และ B fraction โดยใช้ DAMP เตรียมหลอดทดลองเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวในข้อ 4 จำนวน 9 ชุดทดลอง ซึ่งทุกชุดทดลองใช้ DAMP *ปริมาตร 0.1 ml.* สำหรับแยก F และ B fraction แต่ใช้เวลาก่อนการแยกส่วนทั้งสองดังนี้ $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2,3,4 และ 6 ชม.

6. วิธีหาปริมาณ LH ในซีรั่มจำนวน 42 ตัวอย่าง (ตัวอย่างเดียวกับข้อ 2) โดยวิธี DAMP–RIA เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับค่าที่วิเคราะห์โดยวิธี double antibody technique โดยใช้ correlation coefficient และ student t–test ส่วนความแม่นยำ (precision) นั้นพิจารณาโดยใช้ precision dose profile curve[4,5] สำหรับความไว (sensitivity) นั้นสังเกตจากค่า standard deviation ของ dose response curve ซึ่งเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับอ่านค่าฮอร์โมนในซีรั่ม เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนเป็น o คือ จุดที่เส้นกราฟตัดแกน y[2,5]

ผลการศึกษา

ได้ศึกษาการใช้ DAMP เพื่อใช้ในขั้นตอนการแยกส่วนสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ LH ในซีรั่มด้วยวิธี RIA

1. ขั้นแรกเป็นการทดลองหาปริมาตร DAMP ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการวิเคราะห์ (ดูวัสดุและวิธีการข้อ 4) ผลการทดลองดังแสดงในกราฟที่ 1 เห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณ DAMP จากปริมาตรตั้งแต่ 25 ถึง 100 microlitres ระยะเวลา 3 ชั่วโมงตลอดการทดลองจะเพิ่มปริมาณของ hormone bound (B) fractions ที่รวมตัวกับแอนติบอดีย์ชนิดที่สองซึ่งเชื่อมอยู่กับอนุพันธ์สารแม่เหล็กและปริมาณ B fraction ซึ่งคิดเป็น percent (% B) ของ total radioactivity ของสาร

^{125}I–LH ที่เติมลงในระบบทดลอง (TC) มีแนวโน้มที่จะคงที่เมื่อใช้ DAMP ปริมาตรตั้งแต่ 100 ถึง 300 microlitres และรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงเหมือนกันในหลอดทดลอง Bo หรือฮอร์โมน LH ความเข้มข้น 3.12 IU/litre หรือ pooled serum ซึ่งมีค่า LH 7.23 IU/litre ดังนั้นจึงได้เลือกใช้น้ำยา DAMP ปริมาตร 100 microlitre สำหรับการประเมินผลต่อไป

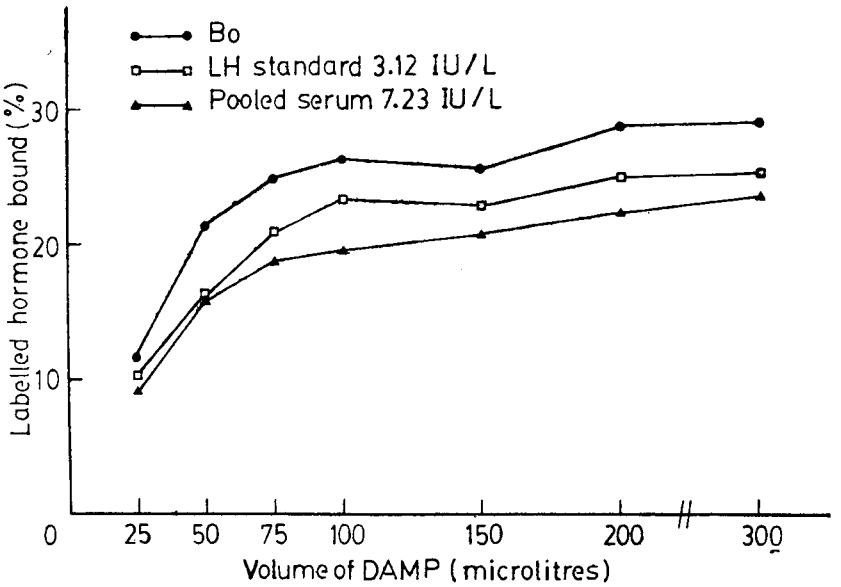
2. การทดลอง หาเวลาที่เหมาะสม (time–course study) สำหรับการรวมตัวของ DAMP กับ B fraction (ดูวัสดุและวิธีการข้อ 5) ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟที่ 2 ซึ่งแสดงว่าสารผสม DAMP สามารถรวมตัวกับ B fraction ของฮอร์โมน LH ได้ อย่างสมบูรณ์ในเวลาตั้งแต่ $\frac{3}{4}$ ถึง 6 ชั่วโมง รูปแบบของปฏิกิริยาเหมือนกันในหลอดทดลอง Bo หรือ LH หรือ pooled serum จึงได้พิจารณาเลือกใช้เวลา $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง สำหรับหาค่า LH ในซีรั่มตัวอย่าง

3. กราฟที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างโดยใช้ค่า logit type plot* ของปฏิกิริยา[2,5] และค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน LH เส้นตรงทึบแสดงกราฟมาตรฐานซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี conventional double antibody RIA ส่วนเส้นไข่ปลาเป็นกราฟมาตรฐาน ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี double antibody magnetic particle RIA เมื่อเปรียบเทียบเส้นกราฟทั้งสอง โดยพิจารณาดูจากค่า slope (−2.54 vs −2.28) ค่า y intercept (3.14 vs 2.71) ค่า 50 % intercept (17.40 vs 15.45) ค่า correlation coefficient หรือ r (0.99 vs 0.99) ค่า Bo (32.6 vs 32.0 %) ค่า NSB (0.7 vs 0.5 %) เห็นว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

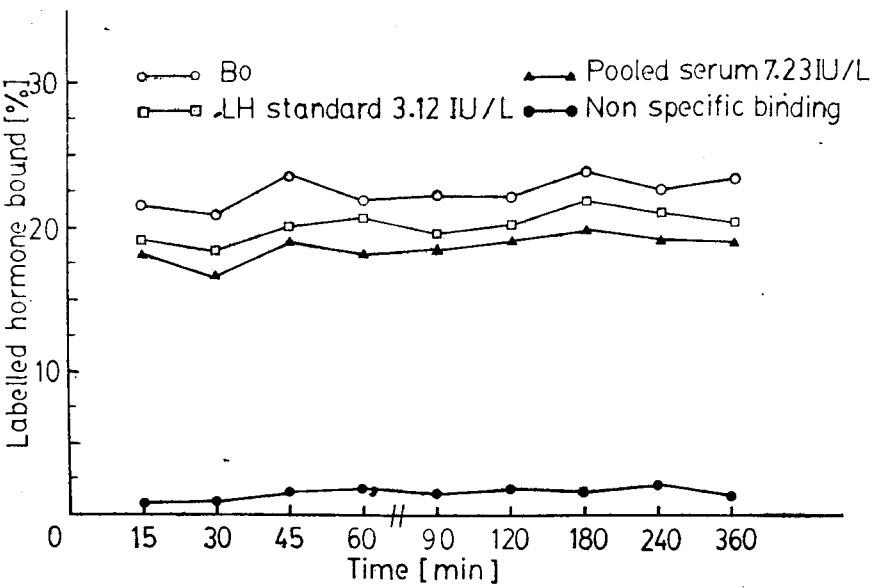
4. เปรียบเทียบความแม่นยำของวิธี DAMP กับ double antibody technique โดยใช้กราฟแสดงค่า precision profile dose ของฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในกราฟที่ 4 พบว่าเส้นโค้งที่ได้จากวิธีทั้งสองมีรูปแบบคล้ายกัน และมีค่าความแม่นยำที่มีความแปรปรวนน้อย คือ ค่า coefficient of variation (CV) ต่ำกว่า 10 % เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าฮอร์โมนระหว่าง 6.25 ถึง 50 IU/litre

---

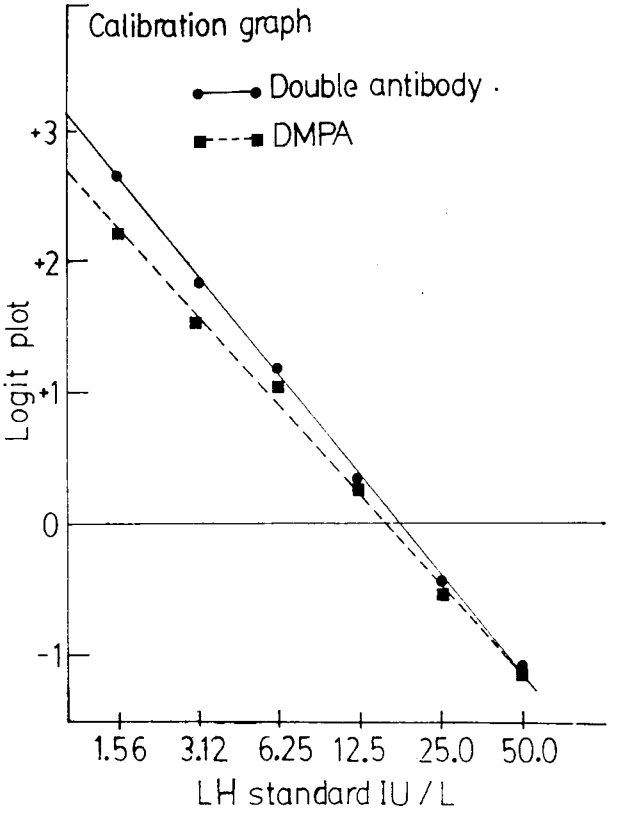
* Logit type plot (logit $Z = \log \frac{Z}{1-Z}$ เมื่อ $Z = \frac{B/F}{Bo/Fo}$)



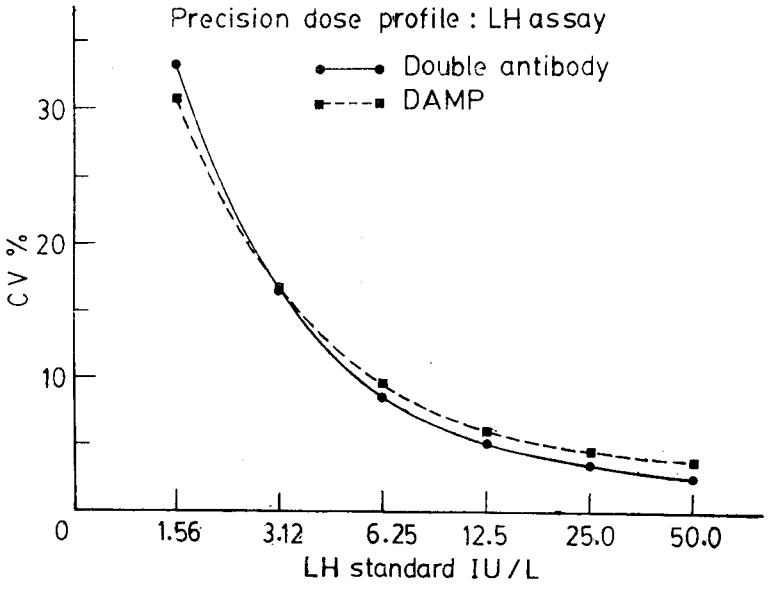
กราฟที่ 1 การศึกษาปริมาตรของน้ำยา DAMP ที่ใช้ในขั้นตอนการแยก



กราฟที่ 2 การศึกษาเวลาที่ DAMP รวมตัวกับ B fraction



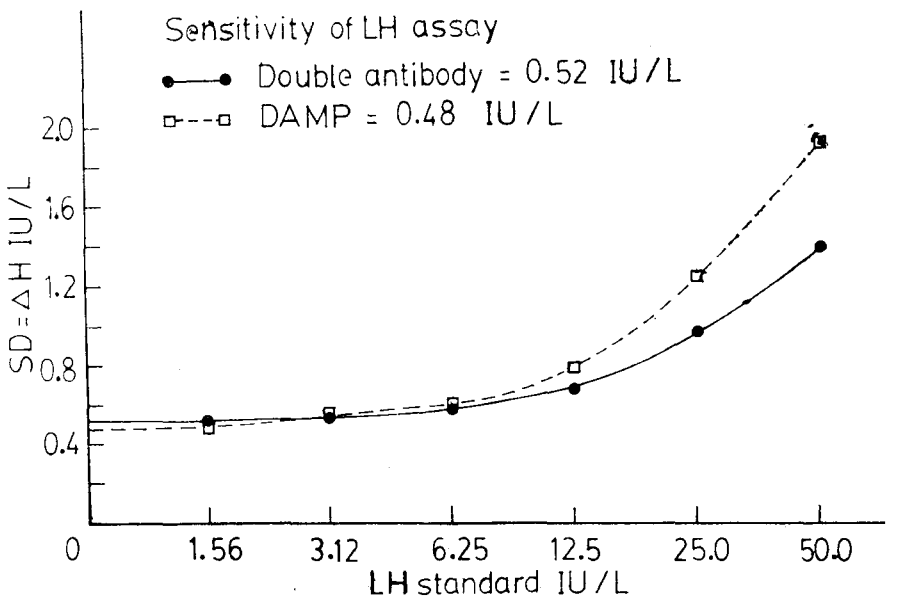
กราฟที่ 3 เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานระหว่างการใช้เทคนิคต่างกัน สำหรับขั้นตอนการแยก B และ F fraction



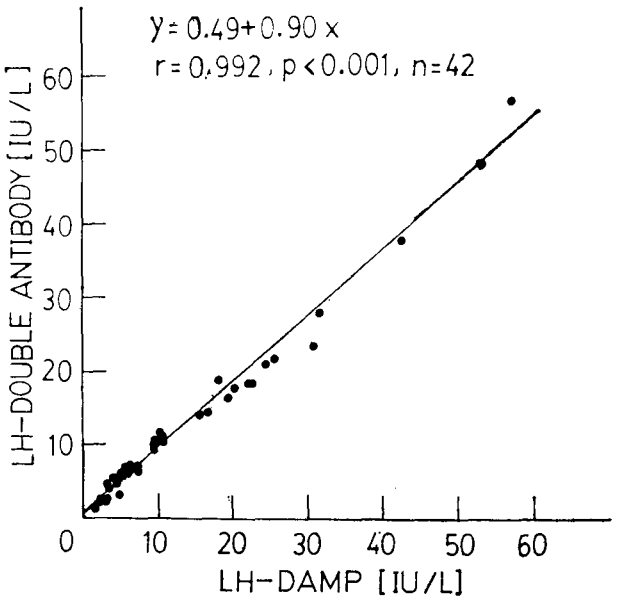
กราฟที่ 4 เปรียบเทียบรูปแบบของความแม่นยำระหว่างการใช้เทคนิคต่างกัน สำหรับขั้นตอนการแยก B และ F fraction

5. ความไวของวิธี DAMP–RIA วิธีนี้สามารถวัดปริมาณฮอร์โมน LH ได้ต่ำสุดถึง 0.48 IU/litre ซึ่งค่านี้ใกล้เคียงกับความไวของวิธี double antibody technique คือ 0.52 IU/litre ดังแสดงในกราฟที่ 5 ค่าความไวของวิธีวิเคราะห์ฮอร์โมนโดย RIA ทั้ง 2 วิธี ประเมินโดยค่า standard deviation (ΔH) ของความเข้มข้นของฮอร์โมนขนาดตั้งแต่ 1.56–50.00 IU/litre และจุดที่เส้นกราฟตัดกับแกน y คือ ค่าความไวของวิธีวิเคราะห์[5]

6. ความสัมพันธ์ระหว่างค่า LH ในซีรั่มซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี RIA โดยใช้ DAMP separation และ double antibody technique ทำการวิเคราะห์ซีรั่มจำนวน 42 ตัวอย่างโดยใช้วิธีทั้งสอง พบว่าค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ดังแสดงในกราฟที่ 6 ซึ่งมี regression equation $y = 0.49 + 0.90\ x$ และค่า $r = 0.992$ ($p < 0.001$, $n = 42$) แต่เมื่อพิจารณาเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์และการกระจายตัวของจุดต่าง ๆ เห็นว่าค่าที่วัดด้วยวิธี DAMP–RIA มีแนวโน้มที่สูงกว่าวิธี double antibody technique สำหรับค่าระหว่าง 15–57 IU/litre จึงได้นำข้อมูลทั้งหมดมาเปรียบเทียบโดยใช้ unpaired t test ผลดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกระดับ ฮอร์โมน LH ที่ได้ทดสอบในการทดลองครั้งนี้



กราฟที่ 5 เปรียบเทียบความไวของวิธี DAMP–RIA และ double antibody teehnique



กราฟที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า LH ที่วิเคราะห์โดยวิธี DAMP-RIA และ double antibody technique

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า LH ทดสอบโดยวิธี DAMP-RIA และ double antibody technique

ลำดับ	จำนวน	Serum LH (IU/litre) mean ± SD		P value
		DAMP-RIA	Double antibody technique RIA	
1	14	3.89 ± 1.37	4.05 ± 1.38	NS
2	12	7.72 ± 1.97	8.07 ± 1.99	NS
3	9	17.28 ± 4.54	15.83 ± 2.98	NS
4	7	37.58 ± 13.04	34.02 ± 14.07	NS

วิจารณ์ผล

การใช้ ferromagnetic antibody particles เป็นการแยก B fraction ออกจาก F fraction ในกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณ LH โดยวิธี RIA โดยไม่ต้องใช้เครื่องปั่นแยก ทำให้การวิเคราะห์ใช้เวลาน้อยลง คือ สามารถแยก B และ F fraction ออกจากกันได้ภายในเวลา $1\frac{1}{2}$ ชม. โดยที่การใช้ double antibody technique เมื่อเติม anti gamma globulin ซึ่งเป็นแอนติบอดีย์ชนิดที่สองแล้วต้องรอให้

เกิดปฏิกิริยาสมดุลอย่างน้อย 20 ชม. และใช้เวลาปั่นแยกที่อุณหภูมิ 4°C อีก 45 นาที อย่างไรก็ตามการใช้ ferromagnetic antibody particles ต้องใช้เวลาในการตกตะกอน B fraction ในสนามแม่เหล็กและการดูดน้ำใสข้างบนออกและการล้างตะกอนประมาณหลอดทดลองละ 2 นาทีและต้องทำทีละหลอดทดลองจนหมดชุด ถ้ามีหลอดทดลอง 100 หลอดก็จะใช้เวลาในการแยก 3 ชั่วโมง 20 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับการปั่นและการเทน้ำใสข้างบนทิ้งในการวิเคราะห์โดย double antibody technique วิธี DAMP อาจจะเหมาะในการเริ่มงาน RIA ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กซึ่งอาจจะมีงบประมาณจำกัดในการจัดหาครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์

ได้มีผู้ศึกษาประโยชน์ของการใช้ ferromagnetic particle[3,6,7] ในขั้นตอนการแยก B และ F fraction ใน RIA ของ peptide และ steroid hormones และยาเช่น digoxin ทั้งนี้โดยใช้ iron oxide ที่ผสมกับ charcoal และ polyacrylamide gel ซึ่งใช้สำหรับตกตะกอน F fraction และได้ใช้ใน RIA ของ peptide และ steroid hromone[6,7] นอกจากนั้นยังมีการใช้ ferric oxide ที่ฉาบด้วย polymerised m–diaminobenzene (Enzacryl FEO–M) และเชื่อมต่อโดยปฏิกิริยาเคมีกับแอนติบอดีย์ชนิดแรกที่จะใช้ในการรวมตัวกับสารมาตรฐานหรือฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งใช้ใน RIA เพื่อหาปริมาณของ human placental lactogen (hPL) thyroxine และ digoxin[7] หรือแอนติบอดีย์ชนิดที่สองที่ใช้รวมตัวกับ B fraction ซึ่งได้ใช้ในวิธี RIA ของ human chorionicgonadotropin (HCG) วิธีหลังนี้เรียกว่า double antibody magnetic particle (DAMP) การใช้ ferromagnetic particle ในกระบวนการ RIA นั้นจัดเป็น solid phase–RIA

ในรายงานนี้ได้ประเมินผลการใช้ DAMP ซึ่งอนุพันธ์สารแม่เหล็กเชื่อมต่อกับแอนติบอดีย์ชนิดที่สอง โดยเปรียบเทียบกับวิธี conventional double antibody ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว ความแม่นยำ และความเหมาะสมในเทคโนโลยีสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ RIA ของโรงพยาบาลขนาดใหญ่หรือหน่วยงานวิจัย[4]

ผลการทดลองวิธี DAMP–RIA มีความไว และความแม่นยำ ใกล้เคียงกับวิธี double antibody RIA โดยเฉพาะความแม่นยำเมื่อพิจารณาจาก precision dose profile (PDP) ดังแสดงในกราฟที่ 4 ซึ่งค่า CV% นั้นคำนวณจาก $\frac{\Delta H}{H}$ เมื่อ ΔH คือค่า 1 SD ของฮอร์โมนที่ความเข้มข้นที่กำหนด[5] และถ้าค่า CV% ต่ำกว่า 10% ลงไป แสดงว่าความแม่นยำที่

ระดับฮอร์โมนที่ทดสอบด้วยวิธีนั้นอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ดังนั้นวิธีทั้งสองที่ได้ศึกษาในรายงานนี้จึงมีความแม่นยำดีอยู่ระหว่างความเข้มข้น 6.25–50.00 IU/litre และระดับฮอร์โมนต่ำ คือ 3.125 และ 1.56 IU/litre มีความแปรปรวนมากขึ้นตามลำดับ ส่วนระดับที่สูงกว่า50IU/litre ไม่ได้ประเมินผล ถ้าซีรั่มตัวอย่างที่วิเคราะห์มีค่าสูงกว่ากราฟมาตรฐานก็จะเจือจางซีรั่มด้วย assay buffer แล้วจึงทำการวิเคราะห์

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณารูปแบบของกราฟมาตรฐานของวิธี DAMP–RIA และวิธี double antibody technique มีลักษณะเหมือนกันเมื่อพิจารณาถึงความชันของกราฟ เส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ของจุดแสดงค่า logit และความเข้มข้นของฮอร์โมน ส่วนค่า Bo ของทั้ง 2 วิธีก็เท่ากัน (32.0 vs 32.6%)

การประเมินผลความถูกต้องของการวัดค่าซีรั่ม LH ด้วยวิธี DAMP–RIA โดยเปรียบเทียบค่าของซีรั่มตัวอย่างเดียวกันซึ่งวัดโดยวิธี double antibody technique พบว่ามีความสัมพันธ์กับเป็นเส้นตรง และค่าทุกระดับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และซีรั่มจำนวน 42 ตัวอย่างนั้นมีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ คือ ค่าตั้งแต่ 1.7–56.6 IU/litre สำหรับค่าอ้างอิงของ LH ในคนปกติ[8] หน่วย คือ IU/litre มีดังนี้ ตั้งแต่วัยเด็กถึงวัยหนุ่มสาวต่ำกว่า 1 ผู้ชาย 1–10 ผู้หญิงในวัยเจริญพันธุ์ 1–8 และที่ mid–cycle peak ของรอบประจำเดือน 10–60 ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน 20–50 ดังนั้นวิธี DAMP–RIA ที่ได้ศึกษาจึงมีความแม่นยำและความถูกต้องที่ยอมรับได้สำหรับใช้ในการวินิจฉัยโรคและงานวิจัยทางด้านชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ ข้อที่ควรระวังซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ DAMP–RIA ขาดความแม่นยำ คือ ferromagnetic particles นั้นมักจะตกตะกอนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นก่อนที่จะเติมลงในหลอดทดลองต้องเขย่าให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ มิฉะนั้นจำนวนต่อปริมาตรจะไม่เท่ากัน อีกประการหนึ่งการใช้ water–pump aspirator สำหรับดูดส่วนน้ำใสทิ้งในขั้นตอนสุดท้าย ควรระวังไม่ให้ตะกอนสารแม่เหล็กติดไปด้วย เพราะทำให้ B fraction น้อยลงเป็นสาเหตุให้มีความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ ผู้วิเคราะห์จึงต้องมีความชำนาญเป็นพิเศษและทำการทดสอบด้วยความระมัดระวัง

สรุป

ได้ประเมินผลการใช้ double antibody magnetic particle (DAMP) และแท่งแม่เหล็กในขั้นตอนการแยก hormone bound fraction (B) และ free fraction (F) ในการวิเคราะห์หาค่า Luteinizing hormone (LH) ด้วยวิธี

radioimmunoassay (RIA) ได้ทดลองหาปริมาตรของ DAMP ที่ควรใช้ในการตกตะกอน B fraction และเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา และเมื่อเปรียบเทียบกับ conventional double antibody RIA ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานพบว่าวิธี DAMP–RIA มีความแม่นยำ และความไวเท่ากัน นอกจากนั้นกราฟมาตรที่สร้างแบบ logit ที่ระดับ LH 1.625–50 IU/litre มีรูปแบบเหมือนกัน และค่าซีรั่ม LH จำนวน 42 ตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทั้งสอง มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง และค่าไม่แตกต่างกัน วิธี DAMP–RIA ไม่ต้องใช้เครื่องปั่นแยก และใช้เวลาทั้งหมดสำหรับกระบวนการวิเคราะห์น้อยกว่า double antibody RIA

อ้างอิง

1. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest 1960 Jul ; 39 (7) 1157–1175
2. Thorell JI, Larson SM. Radioimmunoassay and related technique. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, Missouri, 1978
3. Nye L, Forrest GC, Greenwood H, Gardner JS, Jay R, Robert JR, London J. Solid phase, magnetic particle radioimmunoassay. Clin Chim Acta 1976 Jun ; 79 (3) : 387–396
4. WHO programme for the provision of matched assay reagents for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology, Method manual, Fourth edition, January 1980
5. Ekins RP. Basic principles and therory. in "Radioimmunoassay and saturation analysis." Br Med Bull 1974 Jan ; 30 (1) : 3–11
6. Al-Dujaili EAS, Forrest GC, Edwards CRW, London J. Evaluation and application of magnetizable charcoal for separation in radioimmunoassays. Clin Chem 1979 Aug ; 25 (8) : 1402–1405
7. Dawes C, Gardner J. Radioimmunoassay of digoxin employing charcoal entrapped in magnetic polyacrylamide particles. Clin Chim Acta 1978 Jun ; 86 (3) : 353–356
8. Butt WR. Human pituitary gonadotropins. Medical monograph 11, The Radiochemical Centre, Amersham, England, 1977 p. 13

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 22 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2525