

การศึกษาเปรียบเทียบแอนติบอดีของกระต่ายต่อเตตราไฮโอโดโรนินเมธิลไฮโดร-  
คลอไรด์-โบวีนเซรัมอัลบูมิน และเตตราไฮโอโดโรนิน-โบวีนเซรัมอัลบูมิน



น.ส.สุนตรา ใจวัฒนาสวัสดิ์


003156

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เกษศาสตรมหาบัณฑิต

ศูนย์วิจัยชีววิทยา  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๑

COMPARATIVE STUDY BETWEEN RABBIT ANTIBODIES TO TETRAIODOTHYRONINE  
METHYLHYDROCHLORIDE - BOVINE SERUM ALBUMIN AND TETRAIODOTHYRONINE-  
BOVINE SERUM ALBUMIN



Miss Sunetra Jaiwatanaswat

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement  
For the Degree of Master of Science in Pharmacy  
Department of Microbiology  
Chulalongkorn University

1978

หัวข้อวิทยานิพนธ์เรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบแอนติบอดีของกระต่ายต่อเตตรา  
 ไอโอดิโรนิน เมธิลไฮโดรคลอไรด์-ไบไวน์เซรุ่ม  
 อลูมิน และเตตราไอโอดิโรนิน-ไบไวน์เซรุ่มอลูมิน  
 โดย น.ส.สุเนตรา ใจวัฒนาสวัสดิ์  
 แผนกวิชา จุลชีววิทยา  
 อาจารย์ที่ปรึกษา พันเอกแพทย์หญิงสายสุดใจ คู่จินดา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น  
 ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

*Prasanna Yamma*  
 ..... รักษาการในตำแหน่งคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุประคิษฐ์ บุณนาค)

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

*Prasanna Yamma*  
 ..... ประธานกรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสวาท ทุติยะโพธิ์)

*สุเชษฐไค*  
 ..... กรรมการ  
 (พันเอกแพทย์หญิงสายสุดใจ คู่จินดา)

*Prasanna Yamma*  
 ..... กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์บุญอรรด สายศรี)

*Prasanna Yamma*  
 ..... กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์สันติ ฤกษ์สุวรรณ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาเปรียบเทียบแอนติบอดีของกระต่ายต่อเตตราไอโอดิโรโรนิน เมธิลไฮโดรคลอไรด์-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมินและเตตราไอโอดิโรนิน-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมิน

อาจารย์ที่ปรึกษา  
ชื่อ

พันเอกแพทย์หญิงสายสุดใจ ตูจันทา  
น.ส.สุเนตรา ใจวัฒนาสวัสดิ์

แผนกวิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

๒๕๒๑



บทคัดย่อ

เตตราไอโอดิโรโรนิน เมธิลไฮโดรคลอไรด์-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมินและเตตราไอโอดิโรนิน-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมิน สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อเตตราไอโอดิโรโรนิน (ไทร็อกซิน) ได้ผลเป็นที่น่าพอใจภายหลังการกระตุ้น ๖ สัปดาห์ จากการศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีทั้งสองพบว่า เตตราไอโอดิโรนิน-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมินแอนติบอดีมีไตเตอร์สูงกว่าเตตราไอโอดิโรโรนิน เมธิลไฮโดรคลอไรด์-โบไวน์ เซรุ่มอัลบูมินแอนติบอดีประมาณสองเท่า แอนติบอดีทั้งสองสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไทร็อกซินโดยวิธีราดิโออิมมูโนแอสเสย์ได้ในปริมาณต่ำสุดถึง ๐.๖๒๕ นาโนกรัม/ซีเอ็ม<sup>๓</sup> แอนติบอดีทั้งสองไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนไอโอดิโรโรนิน และทำปฏิกิริยากับไตรไอโอดิโรโรนินเพียง ๐.๑๙ และ ๐.๑๘% ตามลำดับ แอนติบอดีทั้งสองสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไทร็อกซินในกระแสดโลหิตได้ผลใกล้เคียงกันและจากการตรวจวิเคราะห์น้ำเหลืองของผู้ป่วยไทรอยด์ปกติ ๔๕ คนพบว่าอยู่ในช่วง ๖.๓-๑๑.๕ ไมโครกรัม/๑๐๐ ซีเอ็ม<sup>๓</sup>

Thesis Title      The Comparative Study Between Rabbit Antibodies to  
Tetraiodothyronine methylhydrochloride-Bovine Serum  
Albumin and Tetraiodothyronine-Bovine Serum Albumin

Advisor            Col. Dr. Saisudchai Tuchinda

Name                Miss Sunetra Jaiwatanaswat

Department        Microbiology

Academic Year    1978

#### ABSTRACT

Rabbits immunized with Tetraiodothyronine methylhydrochloride-Bovine Serum Albumin and Tetraiodothyronine-Bovine Albumin induced satisfactory antibodies to Tetraiodothyronine (thyroxine) after six weeks of immunization. The antisera produced from both conjugates were studied in detail and found that Tetraiodothyronine-Bovine Serum Albumin antisera titre were approximately twice of Tetraiodothyronine methylhydrochloride-Bovine Serum Albumin antisera. In radioimmunoassay procedure (RIA) both antisera had a sensitivity of 0.625 ng/ml. They both had good specificity. No cross-reaction with Monoiodotyrosine (MIT) and only 0.19% and 0.18% cross reacted with Tri-iodothyronine respectively. Standard dose response curve for each antisera were found to correlate with each other. Forty-five euthyroid sera were analyzed and the range were 6.3-11.5 ugm/100 ml.

## ACKNOWLEDGEMENT



I wish to express my appreciation to Assistant Professor Miss Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for her interest, guidance and encouragement throughout the course of this work.

I am indebted and grateful to Col. Dr. Saisudchai Tuchinda, Head of the Department of Nuclear Medicine, Pharmengkutklao Hospital, for her guidance, advice, instruction, providing the References and counsel have helped towards the successfulness of this study.

Finally I want to record my sincere thanks to Miss Panida Kanchanapee, Division of Medical Research, Department of Medical Science for her kindness, cooperation, and helpful on the lyophilization of the antibodies obtained.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER	
1. INTRODUCTION	
I. The Antithyroxine Sera	1
II. Radioimmunoassay	4
A. Principles of Radioimmunoassay	4
B. T <sub>4</sub> -RIA	7
2. MATERIALS, REAGENTS AND METHODS	8
MATERIALS	8
REAGENTS	9
METHODS	13
I. Preparation of Antigens	13
A. Conjugation of T <sub>4</sub> .CH <sub>3</sub> HCl to BSA	13
B. Conjugation of T <sub>4</sub> -BSA	15
II. Production of Antibodies	17
A. Immunization	17
B. Booster injection & Antibodies estimation	17



CHAPTER	Page
C. Antibody Titration	18
D. T <sub>4</sub> -RIA Procedure	18
3. RESULTS	19
A. Immunological response of rabbit to T <sub>4</sub> .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA and T <sub>4</sub> -BSA conjugates	19
B. Titre of antisera	20
C. Scatchard Plot	24
- Calculation of affinity constant (K)	26
- Number of binding sites (q.)	26
D. Standard dose response curve	38
E. Intra-assay coefficients of variation	43
F. Sensitivity	43
G. Specificity	43
H. Serum T <sub>4</sub>	48
I. Recovery and dilution experiment	49
J. Storage of antibodies obtained	49
4. DISCUSSION AND CONCLUSION	50
REFERENCES	52
VITA	54



## LIST OF TABLES

	Page
TABLE 1 Antibodies estimated in primary and secondary response of rabbits to $T_4$ .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA conjugate.	18
TABLE 2 Antibodies estimated in primary and secondary response of rabbits to $T_4$ -BSA conjugate.	20
TABLE 3 Comparison of % Bound $T_4$ I <sup>125</sup> to antisera obtained against $T_4$ .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA and $T_4$ -BSA conjugate.	22
TABLE 4 Data processing	24
TABLE 5 Data processing	27
TABLE 6 Data processing	30
TABLE 7 Data processing	33
TABLE 8 Data processing	36
TABLE 9 Standard dose response of $T_4$ .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA antisera	39
TABLE 10 Standard dose response of $T_4$ -BSA antisera	41
TABLE 11 Cross reactivity of MIT and $T_3$ to $T_4$ .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA antiserum	44
TABLE 12 Cross reactivity of MIT and $T_3$ to $T_4$ -BSA antiserum	46
TABLE 13 Serum $T_4$ assay with $T_4$ .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA and $T_4$ -BSA antiserum	48
TABLE 14 $T_4$ -recovery experiment	49

## LIST OF FIGURES

		Page
Fig. 1	Coupling of $T_4$ with carbodiimide to BSA through carboxyl group and amino group.	2
Fig. 2	Competitive antigen-antibody reactions on which radioimmunoassay is based.	5
Fig. 3	Standard curve for assay of human thyroxine.	6
Fig. 4	Immunological response curve of rabbits to $T_4 \cdot CH_3 \cdot HCl$ -BSA conjugate.	19
Fig. 5	Immunological response curve of rabbits to $T_4$ -BSA conjugate.	21
Fig. 6	Antibody titration curve.	23
Fig. 7	The Scatchard Plot of rabbit 1, $T_4 \cdot CH_3 \cdot HCl$ -BSA antisera.	25
Fig. 8	The Scatchard Plot of rabbit 2, $T_4 \cdot CH_3 \cdot HCl$ -BSA antisera.	28
Fig. 9	The Scatchard Plot of rabbit 4, $T_4$ -BSA antisera.	31
Fig. 10	The Scatchard Plot of rabbit 5, $T_4$ -BSA antisera.	34
Fig. 11	The Scatchard Plot of rabbit 6, $T_4$ -BSA antisera.	37
Fig. 12	Standard dose response curve of $T_4 \cdot CH_3 \cdot HCl$ -BSA antisera.	40
Fig. 13	Standard dose response curve of $T_4$ -BSA antisera.	42
Fig. 14	Cross-reactivity of thyroid analogue with $T_4$ for $T_4 \cdot CH_3 \cdot HCl$ -BSA antisera binding site.	45
Fig. 15	Cross reactivity of thyroidanalogue with $T_4$ for $T_4$ -BSA antisera binding site.	47

LIST OF ABBREVIATIONS

ANS	8 - Anilino - 1 - naphthalene-sulphonic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
cpm	Count per minute
L	Litre
ug	Microgram, $10^{-6}$ g
MIT	Monoiodotyrosine
ng	Nanogram, $10^{-9}$ g
NS	Non-specific
pg	Picrogram, $10^{-12}$ g
ppt	Precipitate
rpm	Round per minute
RIA	Radioimmunoassay
Std.	Standard
T <sub>4</sub>	Thyroxine
T <sub>3</sub>	Triiodothyronine
T <sub>4</sub> .CH <sub>3</sub> .HCl-BSA	Thyroxine methyl hydrochloride-Bovine serum albumin conjugate
T <sub>4</sub> -BSA	Thyroxine-Bovine serum albumin conjugate
T.h.f.	Tetrahydrofuran
TBG	Thyroxine binding globulin
TBPA	Thyroxine binding prealbumin