เอกสารอ้างอิง

Bahl,O.P. Nature of Carbohydrate Unit Human Chorionic Gonadotropin. J.Biol.Chem. Vol.24 (1969 a):567.

————. Purification and physiochemical Properties Human Chorionic Gonadotropin. J.Biol.Chem. Vol. 244 (1969b): 575-583.

————. Gonadotropins. New York:Wiley Interscience,1972.

Bell, J. J. ,Canfield, R. E. ,and Sciarra, J.J. Purification and Characterization of Human Chorionic Gonadotropin. Endrocrinology Vol.84 (1969):298-308.

Bellisario,R. ,Carlsen, R. B. ,and Bahl, O.P. Linear Amino Acid Sequence of the α Subunit Human Chorionic Gonadotropin. J.Biol Chem. Vol.248 (1973):6796-6809.

Braunstein, G. D., Reichert, L. E., Jr., Vall Hall , E. V., Vaitukaitis, J. L.,and Ross, G. T. The Effects of Desialylation on the Biology and Immunological Activity of Human Pituitary Luteinizing Hormone. Biochem.Biophys.Res.Commun. Vol.42 (1971):962-967.

Brody, S. Foetus and Placenta. Edinburgh,Oxford:Blackwell, 1969, pp. 299-411.

Brossmer, R.,Dorner, M.,Hilgenfeldt, U.,Leidenberger, F., and Trude, E. Purification and Characterization of Human Chorionic Gonadotropin. FEBS. Lett. Vol.15 (1971): 33.

Canfield, R. E., Agosto, G. M., and Bell, J.J. Gonadotropins Ovarian Dev., Proc. Workshop Meet.,1970 pp.161-170.

Carlsen, R. B., Bahl, O.P., and Swaminathan, N. Linear Amino Acid Sequence of the β -Subunit Human Chorionic Gonadotropin. J.Biol.Chem. Vol.248 (1973):6810-6827.

Chatterjee,M., and Munro, H.N. Changing Rats of Human Chorionic Gonadotropin Subunit Synthesized by Early and Full-Term Placental Polyribosome. Biochem.Biophys.Res. Commun. Vol.77,(1977):426-433.

Choy,Yuen-Min,Lau,Kit-Man.,and Lee, Cheuk-Yu. Purification and Characterization of Urinary Chorionic Gonadotropin from Patients with Hydatidiform Mole. J.Biol.Chem Vol.254 (1979):1159-1183.

Got, R.,and Bourrillon, R. Phys. Properties of Human Gonadotropin. Biochem.Biophys.Acta Vol.42 (1960): 505

Goverde, B. C.,Veenkamp, F. J. N., and Homan J. D. H. HCG II Chemical Composition and its Related to Biological Activity. Acta Endocrinol. Copenhagen vol. 59(1968):105-109.

Graesslin, D., Czygan, P.J., and Weise, H. C. Structure Activity Relationship of Protein and Peptide Hormone Amsterdam : Excerpta Med. Found. Int. Congr. Ser. No. Vol.241,Part 2 ,1972,pp.366-368.

Graesslin,D.,Weise,H.C., and Braendle, W. Isolation of human FSH and human LH Controlled by Isoelectric Focusing. FEBS Lett.Vol.31 (1973):214-216.

Grego, B.,and Hearn, T. W. High Performance Liquid Chromatography of Amino Acid Peptides and Proteins. J.Chromato.Vol.336 (1984) : 25-40.

Hirunyavasit, Watcharee. Biochemical and Immunological Studies on Urinary HCG from Pataients with Gestational Trophoblastic Disease. Master's Thesis, Mahidol U.,1978.

Maffeezzoli,R.D.,Kaplan,G.N.,andChrambach,A. Fractionation of Immunoreactive Human Chorionic Gonadotropin and Lutenizing Hormones by Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel. J.Clin.Endocrinol.Metab. Vol.34 (1972):361-369.

McCarthy, C.,and Pennington, G. W. Amer.J.Obstet.Gynecol.Vol.63 (1964):847

Merz, W. E., Hilgenfeldt, U., Brossmer, R., and Rehberger, G. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem Vol.355 (1974):1035-1045.

Miyake, A., Tanizawa, O.,Aono, T., Yasuda, M.,and Kurachi, K. Suppression of Luteinizing Hormone in Lastrated Woman by the Adminstration of Human Chorionic Gonadotropin. J.Clin.Endocrinol.Metab.Vol.43 (1976): 928-932.

Morgan,F. J., Birken,S.,and Canfield, R. E. The Amino Acid Sequence of Human Chorionic Gonadotropin the α-Subunit and β-Subunit. J.Biol.Chem. Vol.250 (1975): 5247-5258.

Parlow,A.F., and Shome, B. Specific,Homologous Radioimmunoassay (RIA) of Highly Purifieded Subunits of Human Pituitary Follicles Stimulating Hormones (hFSH). J.Clin.Invest. Vol.39, (1974):195-198.

Pierce, J. G., Bahl, O. P., Cornell, J. S.,and Swaminathan, N. Biologically Active Hormones Prepared by Recombination of the α-Chain of Human Chorionic Gonadotropin and the Hormone Specific Chain of Bovine Thryrotropin or Bovine Luteinizing Hormone. J.Biol.Chem.Vol.246 (1984):2321-2324.

Putterman, G. J.,Spear. M. B.,Meade-Cobun. K. S.,Widra, M.,and Hixson, C. V. A Rapid Isolation of Human Chorionic Gonadotropin and its Subunits by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. J.Liqiud Chromato. Vol.5 (1982):715

Reisfeld, R.A.,Bergenstal, D. M.,and Hertz, R.Distribution of Gonadotropic Hormone Activity Serum Proteins of Normal Pregnant Women and Patients with Thombolblastic Tumors. Arch. Biolchem.Biophys. Vol.81 (1959): 456

Rayford, P.L., Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T.,Morgan, F.J., and Canfield, R. E. Use of Specific Antisera to Characterize Biologic Activity of HCG β-Subunit Preparation. Endocrinology Vol.91 (1972):144-146.

Ross, G. T., Vaitukaitis, J. L.,and Robbin, J. B.(1972) . Structure-Activity Relationship of Protein and Peptide Hormone. Amsterdam:Excerpta Med. Found. Int. Congr.Ser.No.Vol.241,Part 2, 1972 pp.153-157.

Sairam,. M.R.,Papkoff, H.,and Li, C. H. Biochemical Biological and Immunological Properties of Chemically Deglycosylated Human Chorionic Gonadotropin. Biochem.Biophys.Res.Commun.Vol.48 (1972):530-537.

Sairam,. M.R.,and Li, C. H. Human Pituitary Thyrotropin Isolation and Chemical Charaterization of its Subunit. Biochem. Biophys.Res.Commun.Vol.51 (1973):336

Savard,K., Marsh,J.M.,and Rice. B. F. Gonadotropins and Ovarian Steroido Genesis. Recent Prog.Horm.Res.Vol.21 (1965): 285-365.

Schneider, C.H.,Blaser, K.,Pfeutti, C.,and Gruden, E. Possible Interaction of Luteinizing Hormone-Releasing Factor with Other Hypothalamic Releasing Factors at the Level of the Adenohypophysis. FEBS Lett. Vol.50 (1975):270

Swaminathan, N., and Bahl, O.P. Dissosiation and Recombination of the Subunit of Human Chorionic Gonadotropin. Biochem. Biophys.Res.Commun. Vol.40 (1970):422-427.

Tallberg,T., Rouslahti,E.,and Ehnholm, C. Immunological Studies on Human Plancental Proteins and the Purification of Human Plancental Lactogen. Ann.Med.Exp.Biol.Fenn. Vol.43 (1965):67

Vaitukaitis, J. L.,Ross, G. T.,Reichert, L. E.,Jr., and Ward, D. N. Radioimmunoassay which Specifically Measures Human Chorionic Gonadotropin the Presence of Human Luteinizing Hormone. Am.J.Obstet.Gynecol. Vol.113 (1972a) :751-758.

Vaitukaitis, J. L.,Ross, G. T., Reichert, L. E.,Jr., and Ward, D. N. Immunologic Basic for within and between Species Cross-Reactivity of Luteinizing Hormone. Endocrinology . Vol.91(1972b):1337

Van Hell, H., and Schuurs, A. H. W. M. Gonadotropins Ovarian Dev. Proc.Workshop Meet. 1970, pp.70-76.

Wilde, C. E.,Orr. A. H.,and Bagshawe, K. D. Excretion of Gonadotropin Hormone by Patients with Trophoblastic Tumors. Nature(London) Vol.205 (1965):191

Wilks, W., and Butler, S. Biological Activity of Human Chorionic Gonadotropin Following Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. J.Chromatogr. Vol.298 (1984):123-130

Yasuyaki,S.,Lee,R.,and Chen,H. High Performance Liqiud Chromatographic Studies on the Elution Behaviour of Chemical Deglycosylated Human Chorionic Gonadotropin and its Subunit. J.Chromatogr.Vol 266 (1983)

Yuki, Y., Nishimura R., and Mochizuki M. Nippon-Sanka-Fujika-Gakkai-Zasshi, Vol.38 (1986): 417-422

Zee, R., and Welling G.W. Molecular Sieving during Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. J.Chromatro. Vol.244 (1982):555-565

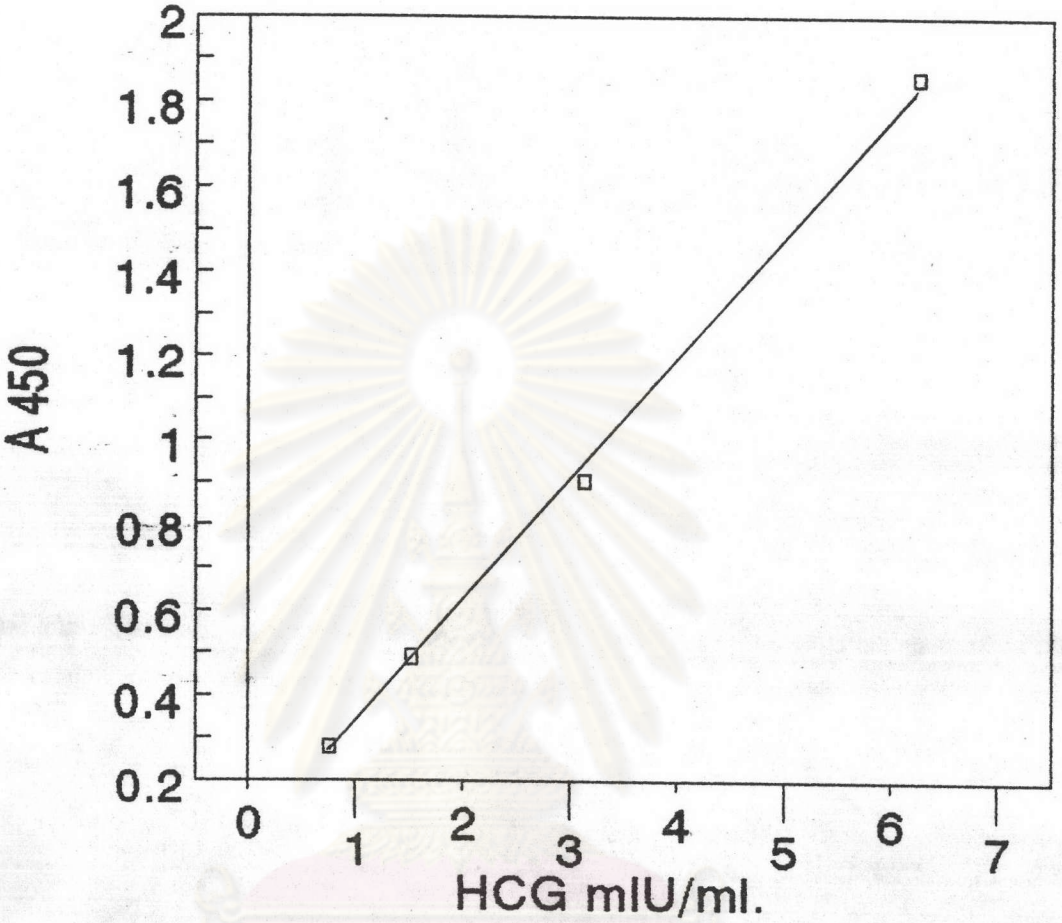
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1 การหาปริมาณ HCG โดยวิธี ELISA

หาโดยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)โดยใช้ชุดตรวจการตั้งครรภ์ของบริษัท Syntron Bioresearch :2015 ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เจือจางสารละลายตัวอย่างหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้แอคติวิตีของ HCG อยู่ในช่วงประมาณ 0.75-12.0 mIU/ml เติมสารละลายดังกล่าวจำนวน 100 ไมโครลิตรลงในหลุม (well) ตั้งทิ้งไว้ 1 ช.ม. ที่อุณหภูมิห้อง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์เอแล้วสะบัดจนกระทั่งแห้ง เติมแอนติบอดีต่อ HCG ซึ่งเชื่อมติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) จำนวน 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ช.ม. ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างออกด้วยบัฟเฟอร์เอ สะบัดจนกระทั่งแห้งสนิทอีกครั้งหนึ่ง เติมสารตั้งต้น A (OPD = 1,2 - Phenylene diamine dihydrochloride) และ สารเร่งปฏิกิริยา B (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) อย่างละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที ปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร อ่านค่าแอคติวิตี HCG ในสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HCG มาตรฐานที่มีแอคติวิตี 0.75-12.0 mIU/ml.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

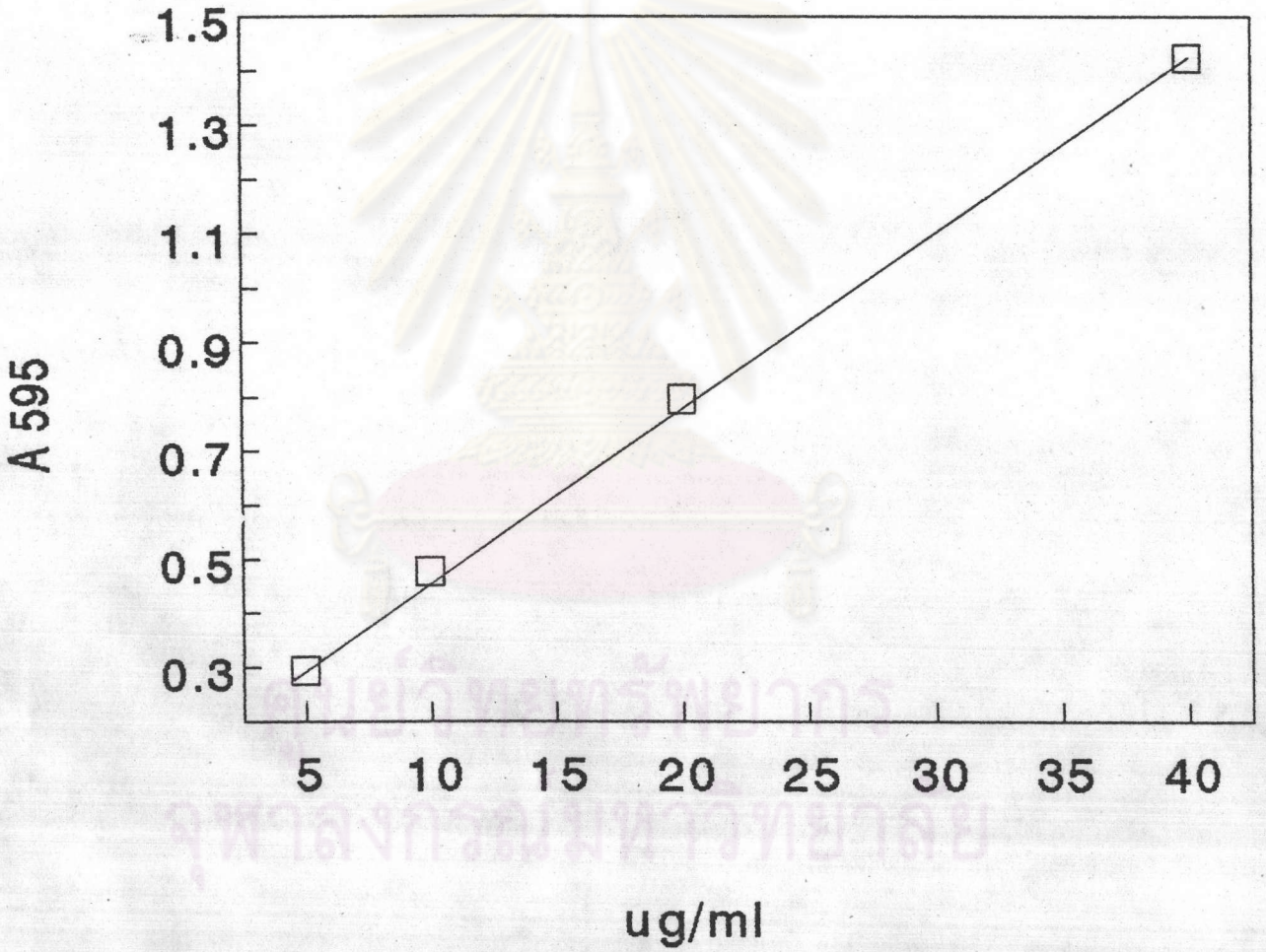


รูปที่20 กราฟมาตรฐานของฮอร์โมน HCG วัดโดยใช้วิธี ELISA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้สีย้อมไบโอแรด

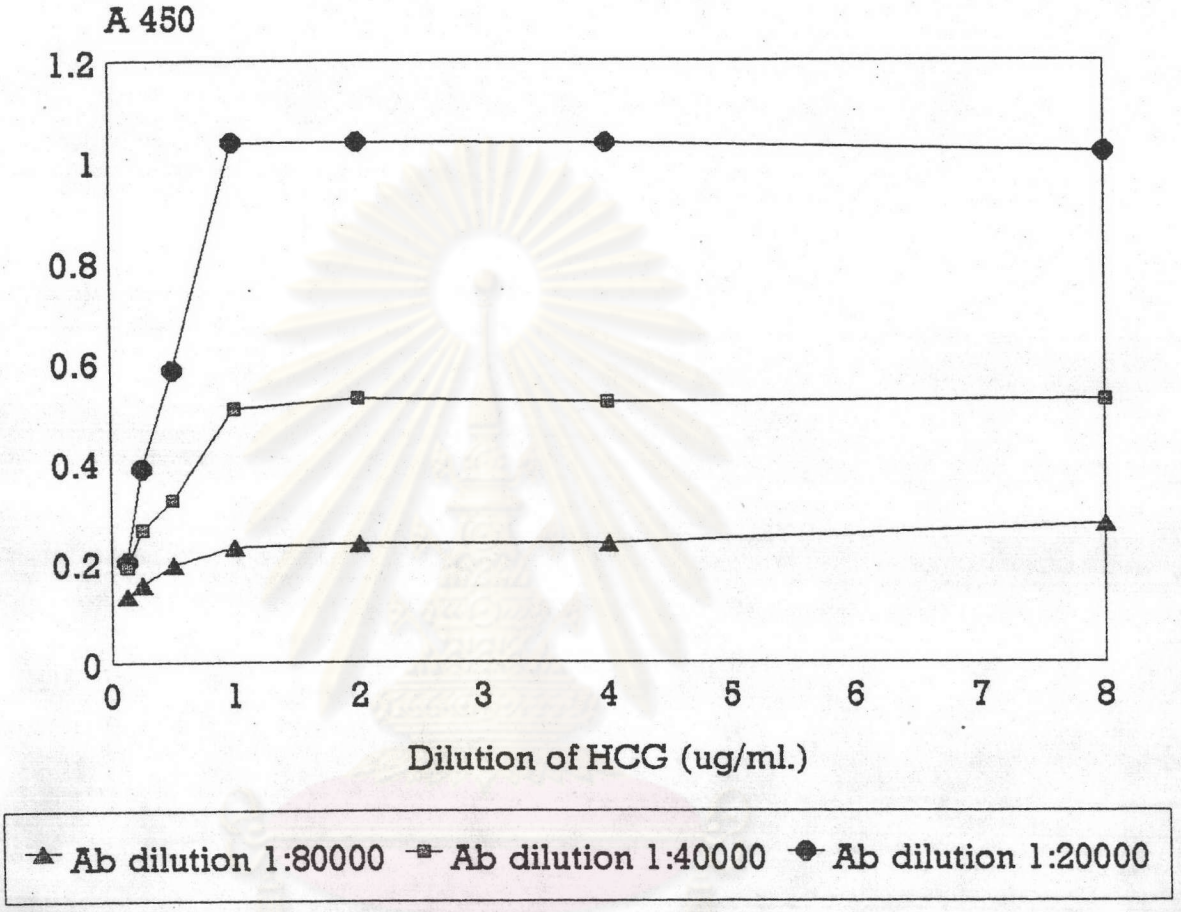
ใช้ในการวัดโปรตีนที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.025 มก./มล. ทำโดย นำสีย้อมไบโอแรดผสมกับสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วน 1:4 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ระหว่าง 0.025-0.04 มก./มล.



รูปที่21 กราฟมาตรฐานของโปรตีนวัดโดยใช้สีย้อม ไบโอแรด

3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HCG ที่ใช้เคลือบเพลท

เตรียมสารละลาย HCG (Iodination Grade) ใน PBS (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ pH 8.3ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.125 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 และ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ ใส่ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 1 คืน ล้าง HCG ที่มากเกินพอด้วย PBS pH 8.3 จำนวน 300 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมแอนติบอดีต่อ HCG ที่เจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 ในอัตราส่วนต่าง ๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีที่เหลือออกด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 เติมคอนจูเกต (Goat-antirabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate) ซึ่งเจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 ในอัตราส่วน 1 : 5000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างคอนจูเกตที่เหลือออกด้วยสารละลาย PBS pH 8.3 เติมซับสเทรต OPD (1,2 - Phenylene diamine dihydrochloride) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมตัวเร่งปฏิกิริยา (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีในที่มืด แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านเพลต (Plate Reader) แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{450} และความเจือจางของ HCG



รูปที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{450} และความเจือจางของ HCG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพัชรี วรานุเคราะห์โชค เกิดวันที่ 17 ตุลาคม พศ.2508 จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปี พศ.2531

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย