หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์ในช่วง 8-10 สัปดาห์แรกมาแยก HCG และทำ HCG ให้บริสุทธิ์โดยศึกษาเปรียบเทียบการตกตะกอน HCG ด้วยอะซิโตนหรือแอลกอฮอล์ ขั้นตอนนี้ทำตามวิธีของ Bell และคณะ (1969) แต่พบว่าทั้งสองวิธีไม่สามารถตกตะกอน HCG ออกมาจากปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวคือค่าเปอร์เซนต์ผลผลิตต่ำมากคือ 4.6 เปอร์เซนต์และ 27.6 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากตะกอนที่ได้ไม่ละลาย จึงทำให้เปอร์เซนต์ผลผลิตที่ได้จากการตกตะกอนต่ำ ดังนั้นในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์จึงไม่ใช้วิธีการตกตะกอนด้วยสารทั้งสอง ขั้นต่อไปได้ทดลองนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์มาผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ซึ่งเป็นชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบ ขั้นตอนนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Bahl (1969b) โดย Bahlได้นำ HCG มาผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์เอ-50 ซึ่งเป็นคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ 2 ครั้ง โดยมีเปอร์เซนต์ผลผลิตคิดเป็น 19 เปอร์-เซนต์ ในงานวิจัยนี้ได้นำปัสสาวะหญิงมีครรภ์มาผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ 2 ครั้งเช่นกัน โดยในครั้งแรกผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์เช่นเดียวกับ Bahl พบว่ามีเปอร์เซนต์ผลผลิตเท่ากับ 58 เปอร์เซนต์ ในครั้งถัดมาได้ดัดแปลงใช้คอลัมน์ พีเอ-ดีอีเออี และวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้แรงดันสูง พบว่าการแยกกันของ peakโปรตีนที่มีและไม่มีแอคติวิตีของ HCG ยังไม่ดีนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียม-คลอไรด์อย่างรวดเร็วเกินไป จึงทำให้ไม่สามารถแยก peak ของโปรตีนออกจากกันได้ อีกทั้งขั้นตอนการทำ HCGให้บริสุทธิ์ดังกล่าวมีวิธีการที่ยุ่งยากและซ้ำซ้อนกล่าวคือนำปัสสาวะตัวอย่างมาผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์และพีเอ ดีอีเออี ซึ่งทั้ง 2 คอลัมน์นี้ใช้หลักการเดียวกันในการแยกจึงตัดขั้นตอนที่ซ้ำซ้อนกันออกไปและดัดแปลงวิธีการดังกล่าวเสียใหม่โดยนำปัสสาวะตัวอย่างมาทำให้เข้มข้นขึ้น และกำจัดสารโมเลกุลเล็กด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ พีเอ-ดีอีเออี ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์

แบบเกรเดียนท์ โดยให้เพิ่มความเข้มข้นอย่างช้าๆตั้งแต่ 0-0.6 โมลาร์ในเวลา 90 นาที พบว่า peak ของ โปรตีนยังแยกกันได้ไม่ดีนัก HCG ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.5 เท่า และมีเปอร์เซนต์ผลผลิต 67.7 เปอร์เซนต์ เห็นได้ว่า HCG ที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์ไม่สูงนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการชะไม่เหมาะสม การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีเกรเดียนท์ดังกล่าว อาจจะยังเป็นการเพิ่มอย่างรวดเร็วเกินไปอยู่อีก ทำให้ peak ของโปรตีนยังติดกัน จึงทดลองเปลี่ยนสภาวะที่ใช้โดยชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นคงที่ 0.12 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที พบว่า peakของโปรตีนแยกจากกันได้ดีกว่าเดิม HCG ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 20.2 เท่า และมีเปอร์-เซนต์ผลผลิต 75.62 เปอร์เซนต์ ทดลองเปลี่ยนสภาวะของการชะโดยลดความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.06 โมลาร์ตลอดการชะเป็นเวลา 90 นาที พบว่า peak ของโปรตีนแยกกันได้ดียิ่งขึ้น HCG ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 67.8 เท่า มีแอคติวิตีจำเพาะ 1957.5 IU/มก. มีเปอร์เซนต์ผลผลิต 56.5 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำ HCG ที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นโดยใช้เมมเบรนซึ่งยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 ดาลตันผ่าน พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกได้อีก 36.4 เปอร์-เซนต์ ต่อจากนั้นทำให้แห้ง โดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง ด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้ HCG มีแอคติวิตีจำเพาะ2,874.0 IU/มก.(โปรตีน) มีความบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้น 99.5 เท่า และมีเปอร์เซนต์ผลผลิต 51.8เปอร์เซนต์ สำหรับเปอร์เซนต์ผลผลิตและแอคติวิตีจำเพาะนั้นขึ้นอยู่กับจำนวนหลอดที่เก็บรวมกัน ดังนั้นเปอร์เซนต์ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างดีจะทำให้แอคติวิตีจำเพาะต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีใช้โครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิม ซึ่งมีผู้ศึกษากันมากในช่วงปี 1960-1970 และรายงานว่าสามารถทำให้ HCG บริสุทธิ์โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 16,000-21,800 IU/มก.(โปรตีน) (Got., 1959; Reisfeld and Hertz.,1960; Tallberg et al., 1964; Van Hell et al., 1966)ซึ่งเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะที่สูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะของ HCG ที่ได้จากการทดลองนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการวัด HCG ที่แตกต่างกันโดยช่วงแรกๆ การทำ HCG ให้บริสุทธิ์มักใช้วิธีการวัดแอคติวิตีทางชีววิทยา (Mouse uterine weight assay) ในงาน

วิจัยนี้ใช้การวัดแอคติวิตีทางอิมมูนวิทยาทำให้ค่าที่ได้แตกต่างกันและไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ดังที่ปรากฏในรายงานช่วงต่อมาของการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ ในระหว่างปี 1970 - 1980 อาทิเช่น Yuem-Min Choy และคณะ (1979) ได้ศึกษาการทำ HCG จากปัสสาวะของผู้ป่วยเป็น Hydatidiform Moleให้บริสุทธิ์ ได้รายงานว่า HCG ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 45 เท่า มีแอคติวิตีจำเพาะ 4,090 IU /มก. เมื่อตรวจวัดทางอิมมูนวิทยาและมีแอคติวิตีจำเพาะ 24,400 IU/มก. เมื่อตรวจวัดทางชีววิทยา (Mouse uterine weight assay) อนึ่งค่าแอคติวิตีจำเพาะของ HCG ที่ได้สูงกว่าจากการทดลองนี้ซึ่งอาจเนื่องมาจากปัสสาวะที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน โดยปัสสาวะของหญิงที่ป่วยเป็น Hydatidiform Mole จะมี HCG สูงกว่าปัสสาวะหญิงมีครรภ์ปกติ (Rizkallah et al.,1969) Wilksและ Butler(1984)ได้รายงานถึงการนำเทคนิค Reversed phase HPLC มาใช้ในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ รวมทั้งแอคติวิตีของ HCG ที่เหลือภายหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า HCG สูญเสียแอคติวิตีไปถึง 90 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้สารละลายอินทรีย์(0-40เปอร์เซนต์ของ1-โพรพานอล)ในการชะ สำหรับในการทดลองนี้ใช้ทริส-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์และโซเดียมคลอไรด์ในการชะ เพื่อให้ได้ HCG ที่ยังคงมีแอคติวิตีสูงและปริมาณมาก การใช้ HPLCในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์วิธีนี้ ได้ HCG ที่มีแอคติวิตีจำเพาะและความบริสุทธิ์สูงภายในเวลาที่รวดเร็ว อีกทั้งวิธีการไม่ซับซ้อนนัก เมื่อนำ HCG ที่ได้ไปศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนหน่วยย่อยด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบแถบโปรตีน 2 แถบ มี Rf.เท่ากับ 0.55 และ 0.58 คิดเป็นน้ำหนักโมเลกุล 35,494 ดาลตัน และ 38,968 ดาลตัน จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นหน่วยย่อยของ HCG Manjunath และ Sairam(1982)รายงานการหาน้ำหนักโมเลกุล HCG ด้วยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสว่า HCG ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 23,000 และ 35,000 ดาลตัน อย่างไรก็ดีเห็นได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของ HCG ที่ได้แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก HCG เป็นฮอร์โมนชนิดไกลโคโปรตีน จึงมีบางส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตมีผลให้โมเลกุลเกะกะและเคลื่อนที่ได้ช้า ลักษณะดังกล่าวยังทำให้แถบ

โปรตีนที่ได้ไม่คมชัดจึงอาจมีผลทำให้การวัดค่า Rf. คลาดเคลื่อนไปบ้าง นอกจากนี้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีสไม่มีไกลโคโปรตีนมาตราฐานในการหาน้ำหนักโมเลกุล จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลที่ได้คลาดเคลื่อนไป

เมื่อนำ HCG ที่ได้มาฉีดกระตุ้นกระต่ายเพศผู้อายุ 6-12 เดือนให้สร้างแอนติบอดีต่อ HCG โดยแบ่งกระต่ายเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว โดยกลุ่มหนึ่งฉีด HCG จำนวน 1,000 IU และอีกกลุ่มหนึ่งฉีด 2,000 IU) กระต่าย 3 ตัวมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นสูงที่สุด 5 $x10^5$ ภายหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่สองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ Hirunyavasit (1978) รายงานถึงการฉีด HCG กระตุ้นให้แกะสร้างแอนติบอดี พบว่าแกะสร้างแอนติบอดีสูงสุดที่เวลา 6 เดือนหลังจากฉีด HCG ครั้งแรก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสัตว์ทดลองที่ใช้ วิธีในการฉีด รวมทั้งวิธีการในการเตรียม HCG สำหรับกระต่ายหมายเลข 593 ถูกกระตุ้นด้วย HCG 2,000IU มีระดับแอนติบอดีสูงสุด 2.5x10 ^{5} ซึ่งน้อยกว่ากระต่ายตัวอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพทางร่างกายของสัตว์ทดลอง เมื่อนำซีรั่มกระต่ายซึ่งมีแอนติบอดีสูงมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0-40 40-65 และ 65-70 เปอร์เซนต์ พบว่าโปรตีนในซีรั่มกระต่ายตกตะกอนได้มากที่สุดในช่วง 0-40 เปอร์เซนต์ ส่วนในช่วงที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมากขึ้นจะเกิดตะกอนโปรตีนน้อยลงตามลำดับ และเมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีพบว่าตะกอนโปรตีนที่ได้จากแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวช่วง 0-40 เปอร์เซนต์ มีปริมาณแอนติบอดีสูงที่สุดซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบแถบโปรตีนขนาดใหญ่ในตำแหน่งเดียวกับแกมม่าโกลบูลิน แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 เปอร์เซนต์ ยังคงมีแถบโปรตีนอื่นๆ ปนอยู่อีกมาก จึงนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ ซึ่งใช้ HCG มาเชื่อมติดกับเซฟาโรส 4 บี ซึ่งเป็นแกนกลาง พบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 357 เท่า ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสโดยในแถวของแอนติบอดีภายหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะพบแถบโปรตีนขนาดใหญ่เพียงแถบเดียว เมื่อนำแอนติบอดี

ที่ได้มาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าแอนติบอดีที่ได้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 46,060และ63,580 ดาลตัน

เมื่อนำ HCG และแอนติบอดีต่อ HCG ที่ได้ไปทดสอบความจำเพาะโดยนำมาทำอิมมิวโนดิฟฟิวชั่นและอิมมิวโนอิเลคโตรโฟรีซีส พบเส้นตะกอนมากกว่า 1 เส้น ดังนั้นแอนติบอดีที่ได้น่าจะมีความจำเพาะไม่มากนัก ซึ่งอาจเนื่องจาก HCG ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธี 3.4.4 ง ยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ เมื่อนำมาฉีดกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี จึงทำให้ได้แอนติบอดีต่อโปรตีนปนเปื้อนซึ่งยังคงมีอยู่ในHCG ที่ฉีดกระตุ้น ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ HCG ไม่สูงนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย