บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาความเสถียรของฮอร์โมน HCG

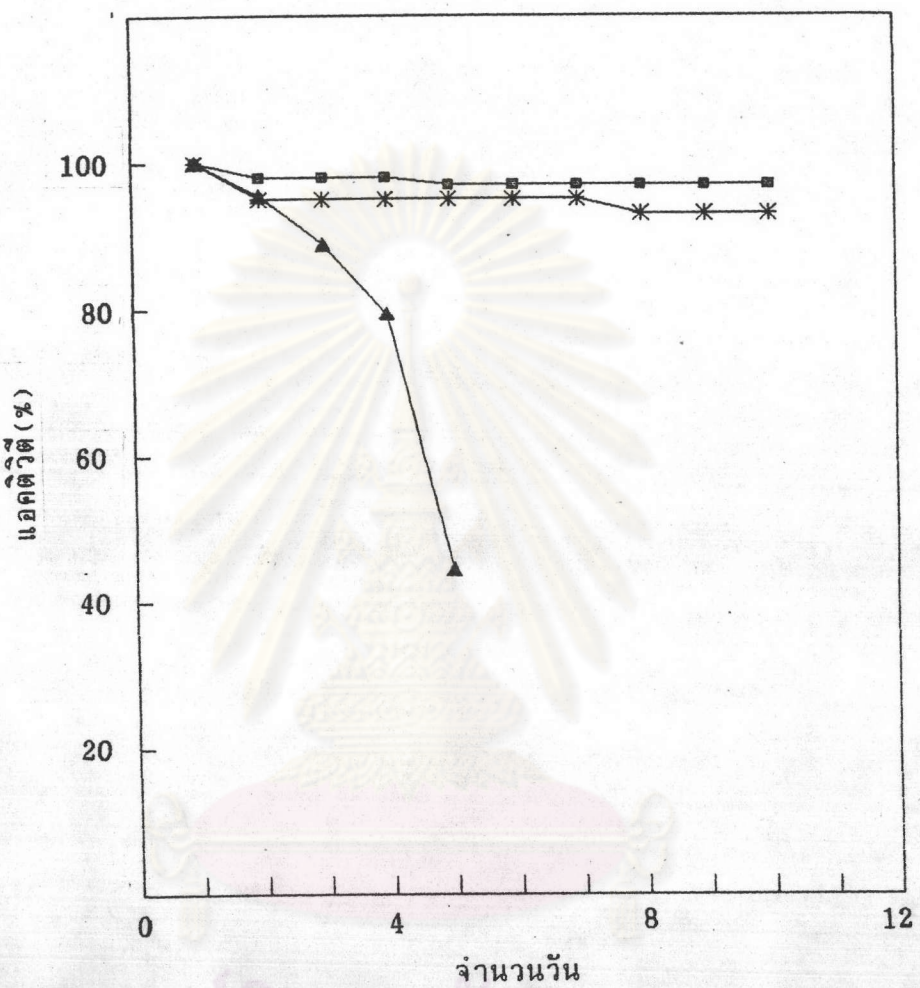
จากการศึกษาความเสถียรของฮอร์โมน HCG ที่อยู่ในปัสสาวะหญิงมีครรภ์โดยเก็บรักษาในสภาวะต่างๆคือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ โดยเติมและไม่เติมไทเมอโรซอลและเก็บที่ - 20 ° ซ นำปัสสาวะที่เก็บไว้มาตรวจหาแอคติวิตีตามวิธีในภาคผนวกที่ 1 พบว่าถ้าไม่เติมสารละลายไทเมอโรซอลที่อุณหภูมิ 4 ° ซ แอคติวิตีของฮอร์โมนลดลงอย่างรวดเร็วคือมีแอคติวิตีคงเหลือเพียง 40 เปอร์เซนต์ หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 วัน นอกจากนี้ปัสสาวะที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ ยังมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพคือมีตะกอนขาวขุ่น และมีกลิ่นเหม็นรุนแรง ส่วนปัสสาวะที่เติมไทเมอโรซอลเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ.และที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ -20° ซ. ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและมีแอคติวิตีของฮอร์โมนค่อนข้างคงที่ในระยะ 10 วันของการทดลอง **ดังรูปที่ 4**

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจะเก็บปัสสาวะหญิงมีครรภ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. และเติมไทเมอโรซอลเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ จำนวน 2-3 หยด

4.2 การทำฮอร์โมน HCG จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ให้บริสุทธิ์

4.2.1 การตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์และอะซิโตน

จากการนำปัสสาวะตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์และอะซิโตน พบว่าทั้งสองวิธีไม่สามารถตกตะกอนของ HCG ออกมาจากปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตะกอนที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะที่ได้ต่ำลงคือมีค่า 1.84 IU/มก. เมื่อตกตะกอนด้วยอะซิโตน และ 9.37 IU/มก. เมื่อตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ และสามารถตกตะกอนของ HCG ได้ 4.6 และ 27.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ **ดังตารางที่ 2**



รูปที่4 ความเสถียรของ HCGในปัสสาวะที่เก็บไว้ณอุณหภูมิต่างๆกัน คือ 4 °ซ. ไม่เติมไทเมอโรซอล (▲) -20 ° ซ. ไม่เติมไทเมอโรซอล (■) และ 4 ° ซ.(*) เติมไทเมอโรซอลวัดแอคติวิตีของ HCG ในปัสสาวะที่วิเคราะห์เทียบกับในวันแรก

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการตกตะกอน HCG ในปัสสาวะหญิงมีครรภ์ด้วยแอลกอฮอล์และอะซิโตน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณ HCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	%ผลผลิต
ปัสสาวะหญิงมีครรภ์เริ่มต้น	2.4	44.2	18.4	100.0
ตกตะกอนด้วย 50 % อะซิโตน	1.1	2.0	1.84	4.6
ตกตะกอนด้วย 80%แอลกอฮอล์	1.3	12.2	9.37	27.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

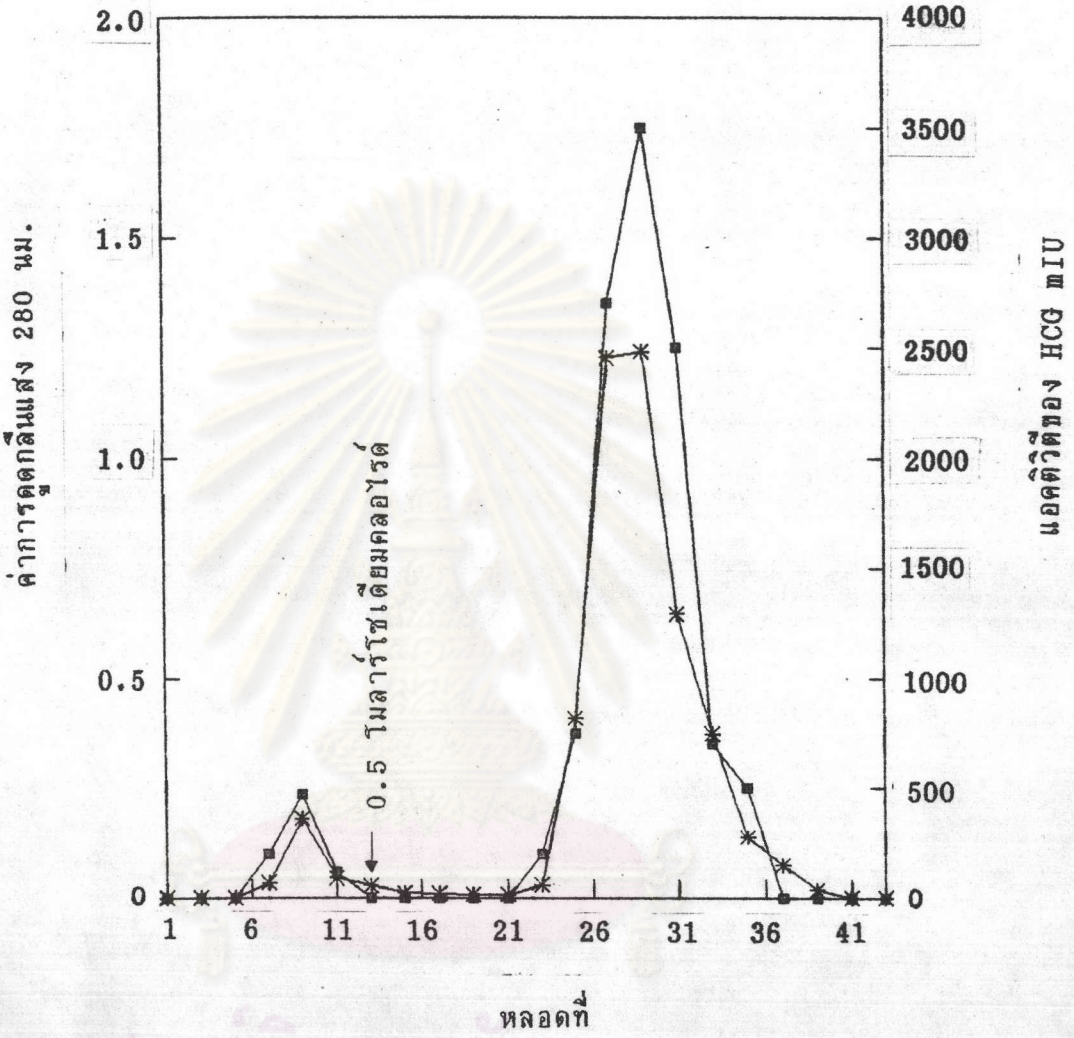
4.2.2 การทำฮอร์โมน HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ที่ผ่านการไดอะไลซีส เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ตามวิธีในข้อ 3.4.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5 ปรากฏว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 peak โดยที่ peak แรกมีโปรตีนและแอคติวิตีของ HCG น้อย โปรตีนส่วนใหญ่จะออกมาใน peak ที่ 2 ซึ่งเป็น peak ที่ชะออกด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในทริส-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 โมลาร์ pH 8.3 พบว่ามีแอคติวิตีของฮอร์โมน HCG ในส่วนนี้มาก HCG ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า คิดเป็นเปอร์เซนต์ผลผลิต 52.0 ดังตารางที่ 3 ได้รวมสารละลายใน peak นี้(หลอดที่ 23-38) มาทำให้บริมาตรลดลง โดยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นและนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปอีกโดยวิธีโครมาโตกราฟแบบใช้ความดันสูง

4.2.3 การทำฮอร์โมน HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง(High Performance Liquid Chromatrography)

ในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิดพีเอ ดีอีเออี ได้ใช้สภาวะการชะด้วยเกรเดียนท์ 3 แบบ ดังวิธีในข้อ 3.4.4 ได้ผลดังนี้

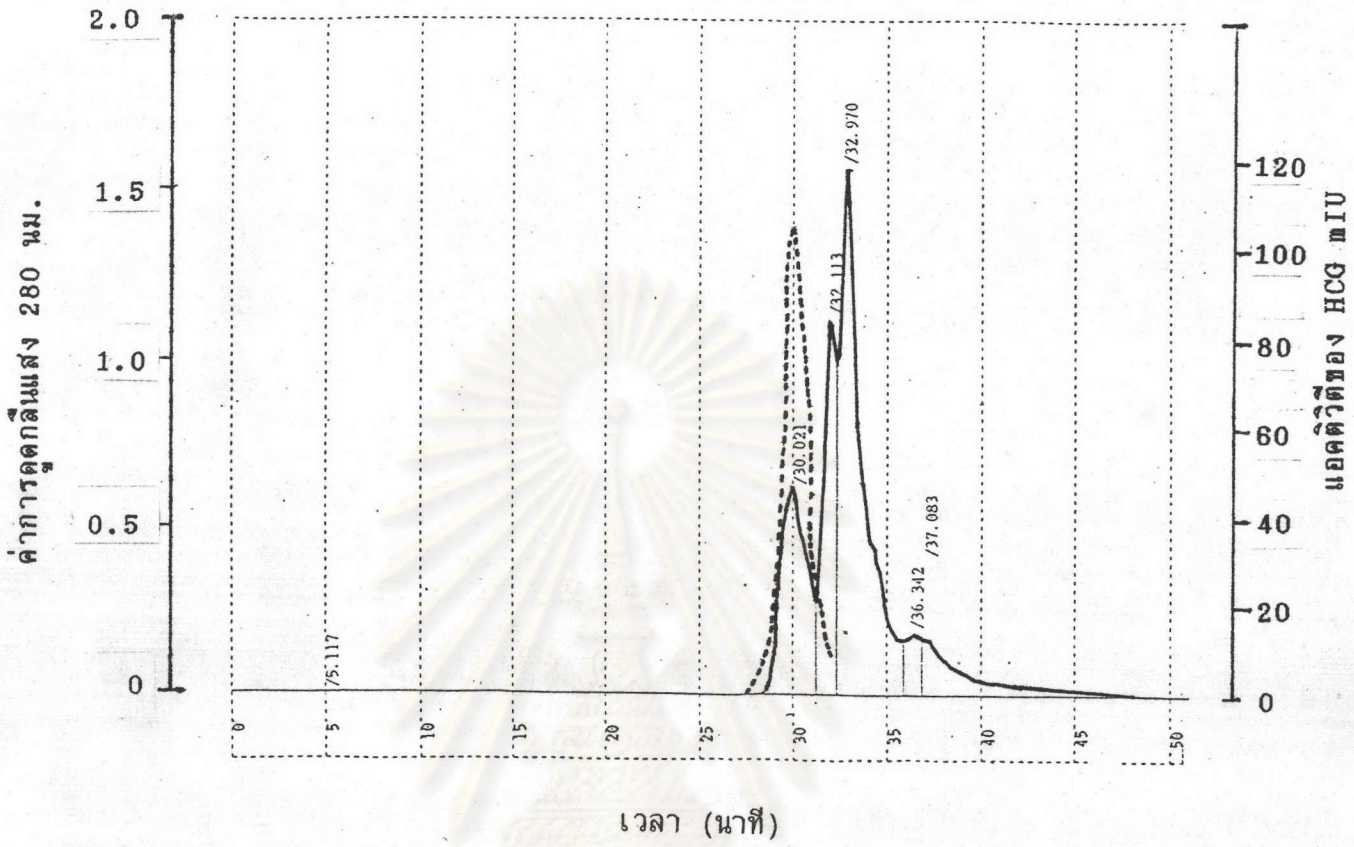
ก. นำฮอร์โมน HCG ซึ่งมีแอคติวิตี 8.6 IU และ 10.7 IU (แอคติวิตีจำเพาะ 21.50 IU/มก.) ชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 โมลาร์ในเวลา 40 นาที และ 50 นาที ได้ผล ดังรูป 6 และ 7 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 3 peak โดยที่ peak แรกมีโปรตีนน้อยถูกชะออกในเวลา 30 นาทีแรก โปรตีนส่วนใหญ่ถูกชะออกมาในช่วงเวลา 32-38 นาที ดังรูปที่ 6 และเมื่อเพิ่มเวลาในการชะเป็น 50 นาทีจะเห็นได้ว่าสามารถแยกโปรตีนได้เป็น 3 peak เช่นกัน โดย peak แรกชะออกมาในเวลา 30 นาที โปรตีนส่วนใหญ่ถูกชะออกมาในเวลา 33-35 นาที แต่สารละลายที่ออกจากคอลัมน์เจือจางมากจนไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ เมื่อนำไปทดสอบ พบว่าโปรตีนใน peak แรกเท่านั้นที่มีแอคติวิตีของ HCG ส่วนโปรตีนใน peak อื่นไม่พบแอคติวิตีและจากการใช้เวลาต่างกันในการชะคือ 40 นาทีและ 50 นาที พบว่าการชะด้วยเวลา 40 และ 50 นาที ไม่สามารถแยก



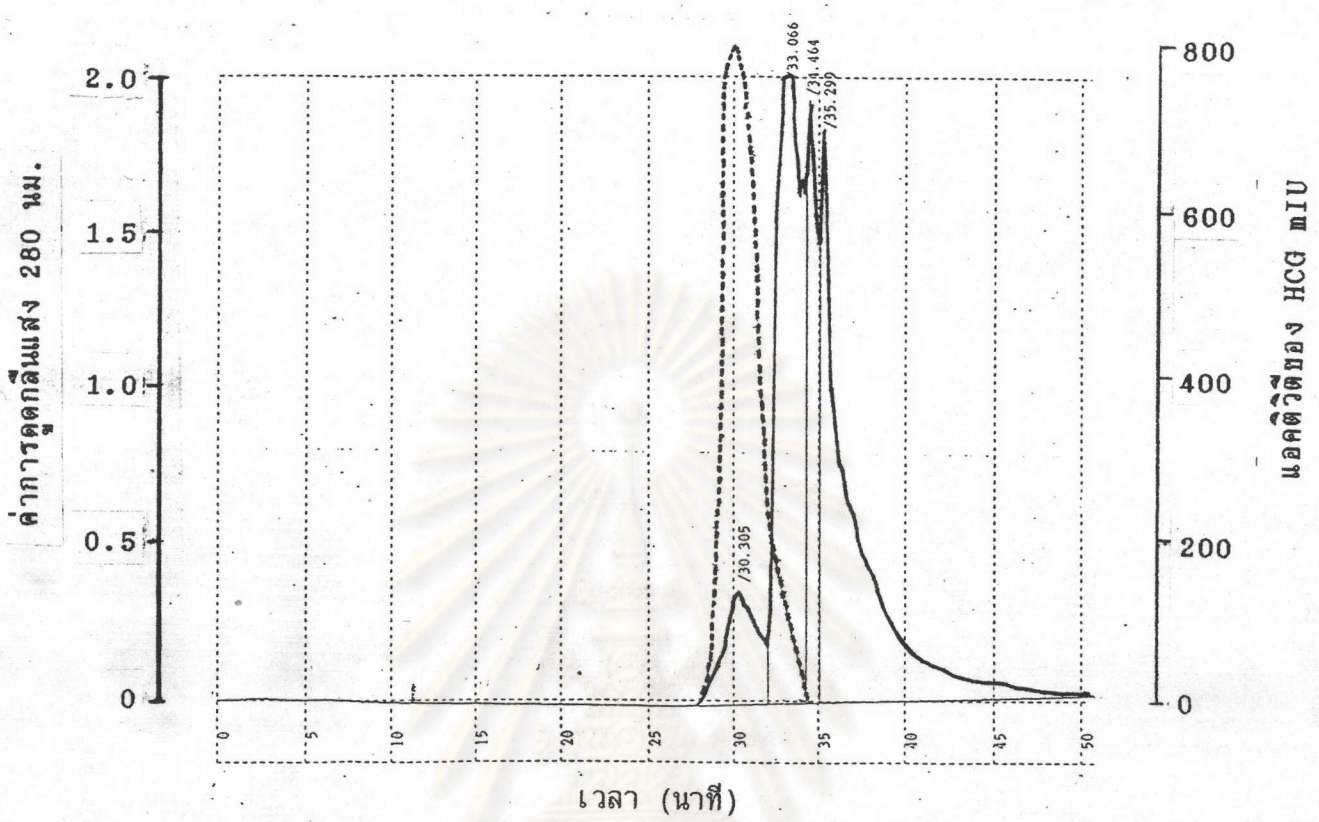
รูปที่ 5 กราฟแสดงการทำฮอร์โมน HCG จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดีอีเออีเซฟาเด็กซ์ เอ 50 โดยการชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (*) และแอคติวิตีของ HCG (■)

ตารางที่ 3 แสดงผลการทำHCGให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์เอ 50

วิธีการ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณHCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	%ผลผลิต
ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ภายหลังผ่านการปั่น	37.2	703.5	18.90	1.0	100.0
ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ภายหลังผ่านการไดอะไลซ์	21.7	481.5	22.20	1.2	68.4
ปัสสาวะหญิงมีครรภ์ภายหลังผ่าน DEAE-Sephadex	9.1	365.9	40.00	2.1	52.0



รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอดีอีเออี โดยใช้สารละลายโปรตีน ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 -1.0 โมลาร์ เวลา 40 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (——) และแอคติวิตีของ HCG (-----)



รูปที่ 7 กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี โดยใช้สารละลายโปรตีน ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ เวลา 50 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (——) และแอคติวิตีของ HCG (-----)

ตารางที่ 4 ผลการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ชนิดดี อีเออี เซฟาเด็กซ์ (ก) และ HPLC โดยใช้คอลัมน์ พีเอ-ดีอีเออี และชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-1โมลาร์ เวลา 40 นาที (ข)และ 50 นาที (ค)

วิธีการ		ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณ HCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	% ผลผลิต
ก	ปัสสาวะหลังผ่านการปั่น	18.3	230.7	1.26	100
	ปัสสาวะก่อนผ่าน DEAE-Sephadex	16.7	152.2	9.10	66
	สารละลายหลังผ่าน DEAE-Sephadex	6.2	133.8	21.50	58
ข	สารละลายก่อนผ่าน HPLC	0.4	8.6	21.58	100
	สารละลายหลังผ่าน HPLC	- *	8.0	- *	93
ค	สารละลายก่อนผ่าน HPLC	0.5	10.8	21.58	100
	สารละลายหลังผ่าน HPLC	- *	4.0	- *	37

หมายเหตุ * ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้

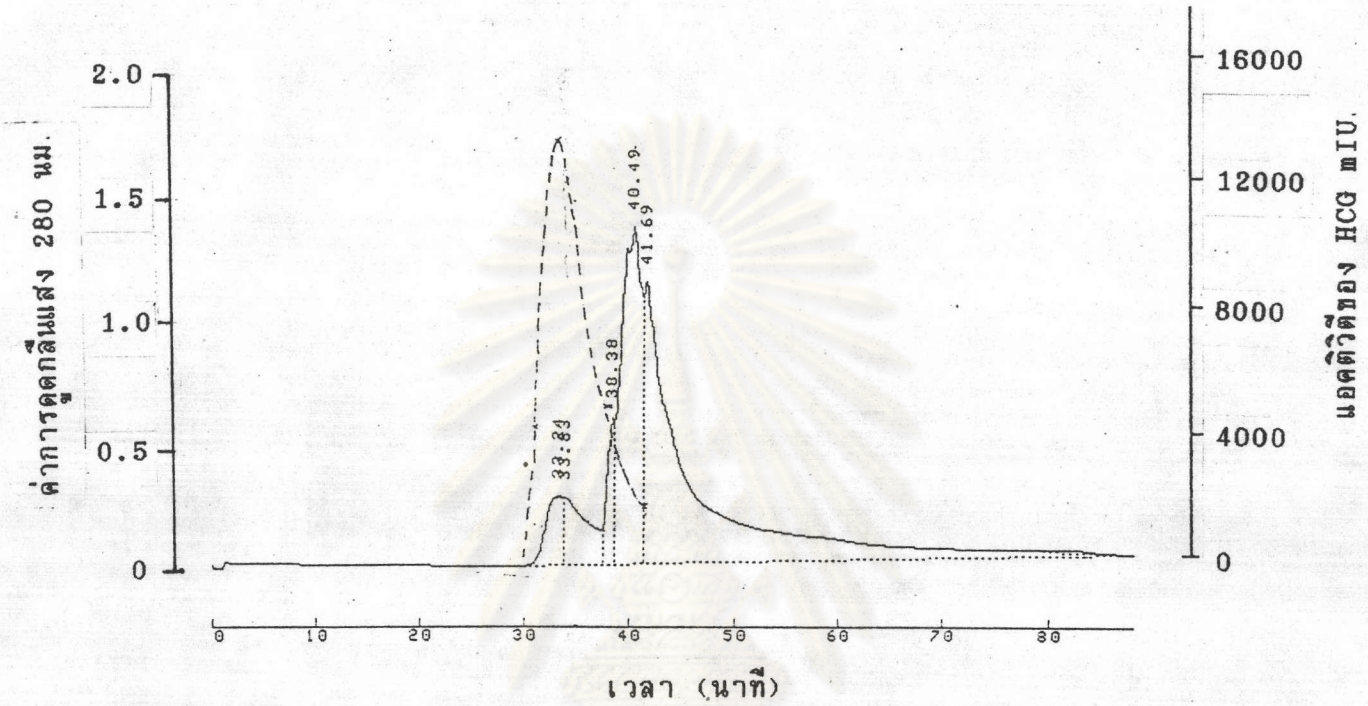
HCG ออกจากกลุ่มโปรตีนอื่นๆได้ ดังกราฟรูปที่ 6 และ 7 สำหรับความแตกต่างของเปอร์เซนต์ผลผลิตนั้น เนื่องจากการชะด้วยเวลา 40 นาทีเก็บส่วนของสารละลายหลอดที่17-32 แต่การชะด้วยเวลา 50นาทีเก็บส่วนของสารละลายเฉพาะหลอดที่ 30จึงทำให้มีเปอร์เซนต์ผลผลิตต่ำกว่าการชะด้วยเวลา 40 นาที

ข. จากการนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์มาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ และ HPLC พบว่าสารละลาย HCG ที่ได้มีความเจือจางมาก และสภาวะที่ใช้ในการแยกใช้ได้กับโปรตีนปริมาณน้อย ๆ เท่านั้น จึงได้เปลี่ยนวิธีการเสียใหม่โดยนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นโดยใช้เมมเบรนที่ยอมให้สารมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตันผ่านออกไปได้ แล้วนำสารละลายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี จากการชะคอลัมน์แบบเกรเดียนท์เส้นตรงด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ ในเวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที ได้ผลดัง **รูปที่ 8** ซึ่งจะเห็นว่าโปรตีนยังแยกกันได้ไม่ดีนัก คือยังมีแอคติวิตีของ HCG บางส่วนปะปนกับโปรตีนใน peak ใหญ่ สารละลาย HCG ที่ได้ภายหลังผ่านคอลัมน์มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 227.09 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.5 เท่า และมีผลผลิต 67.7 เปอร์เซนต์ **ดังตารางที่ 5**

ค. เมื่อใช้ HPLC ในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์โดยเปลี่ยนสภาวะการชะคอลัมน์เป็นดังข้อ 3.4.4 ข คือ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.12 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ เป็นเวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที ได้ผล**ดังรูปที่ 9** พบว่าผลที่ได้มีรูปแบบคล้ายกับที่ได้กล่าวแล้วในข้อ ข กล่าวคือ peak ของโปรตีนทั้งสองยังแยกกันได้ไม่ดีนัก สารละลาย HCG ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะ 169.80 IU/มก. โปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 20.3 เท่า และมีผลผลิต 75.6 เปอร์เซนต์**ดังตารางที่ 6**

ง. ได้ทดลองเปลี่ยนสภาวะที่ใช้อีกครั้งโดยชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น0.06โมลาร์ในบัฟเฟอร์เอ เวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที พบว่าโปรตีนที่ยึดกับคอลัมน์แยกออกได้เป็น 2 peak **ดังรูปที่ 10** โปรตีนใน peak แรกเป็นโปรตีนส่วนน้อยถูกชะออกในช่วงเวลา 39-44 นาที โปรตีนส่วนใหญ่ถูกชะออกช่วงเวลา 46-60 นาที เมื่อนำไปทดสอบแอคติวิตีของ HCG พบว่าโปรตีนใน peak แรก

I1624803X

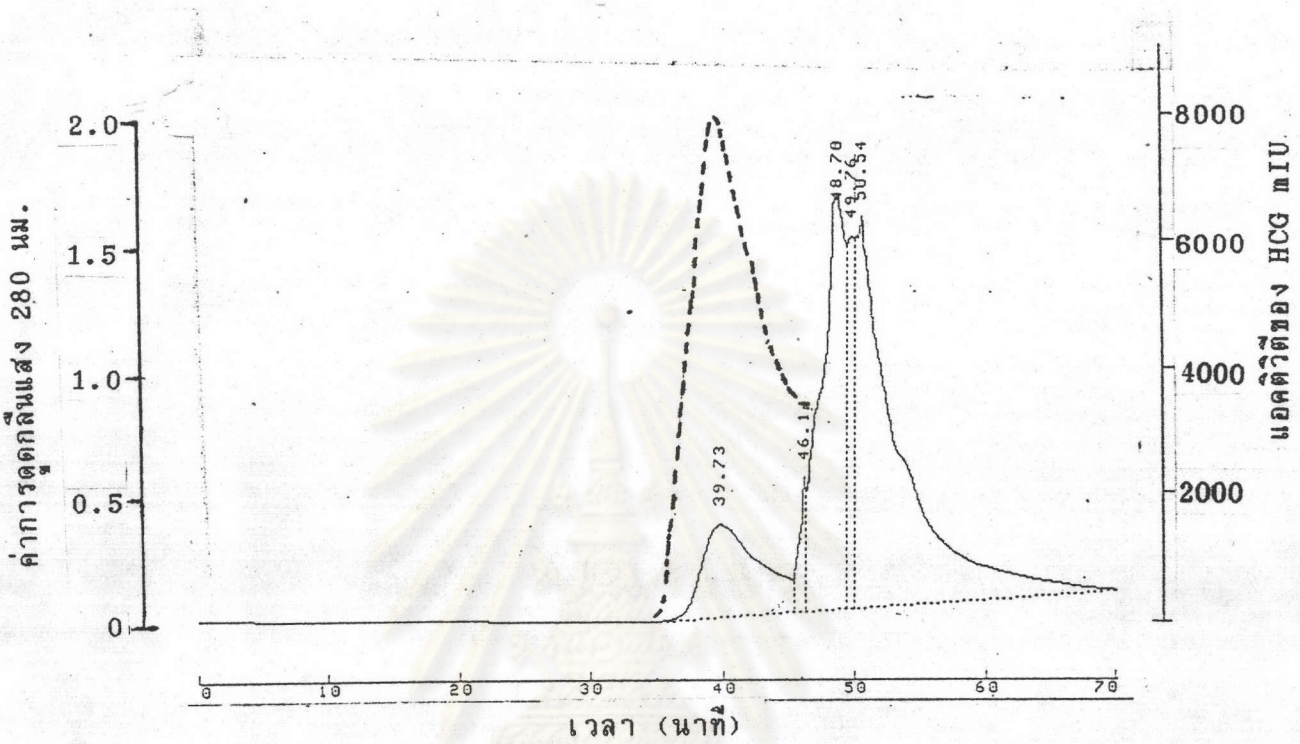


รูปที่ 8 กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ เวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (——) และแอคติวิตีของ HCG (-----)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที

วิธีการ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณHCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	%ผลผลิต
สารละลายก่อน HPLC	23.0	696.9	30.36	1.0	100.0
สารละลายหลัง HPLC	2.1	472.4	227.09	7.5	67.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

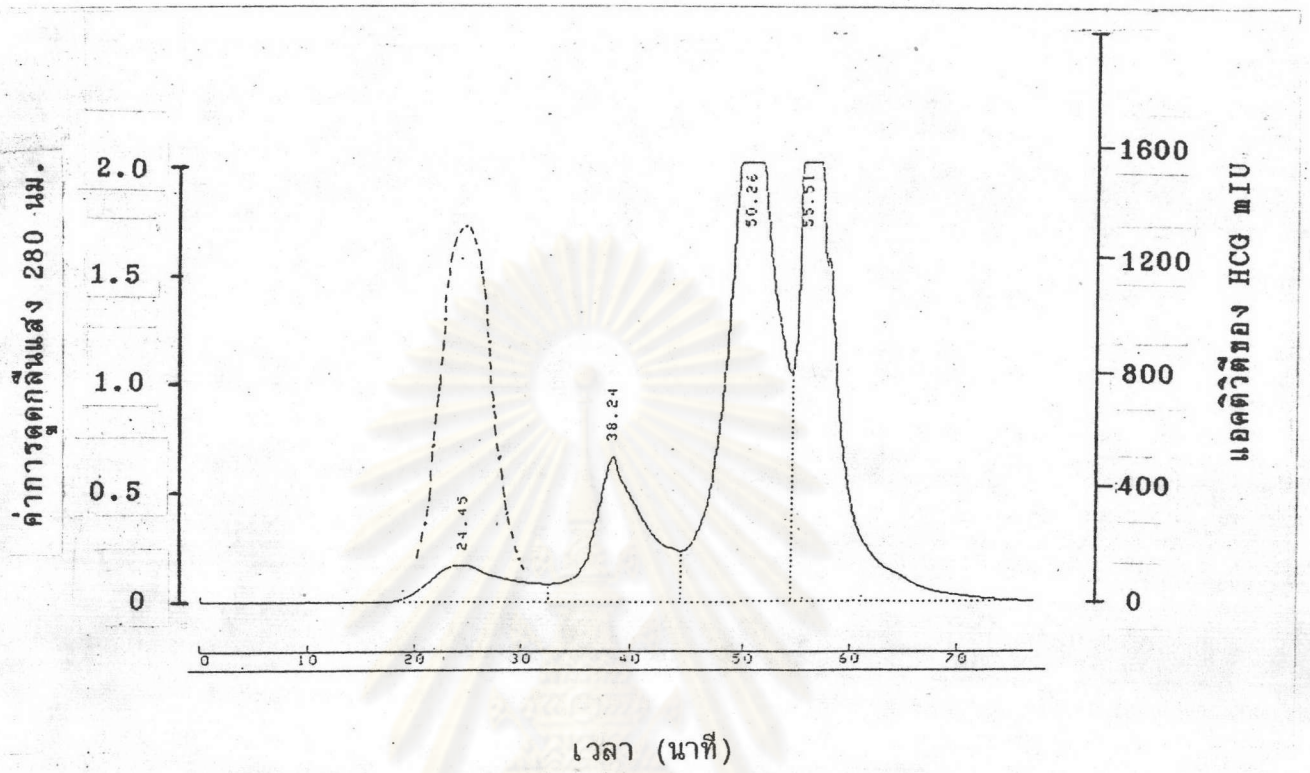


รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอดีอีเออี ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.12 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (——)และแอคติวิตีของ HCG (-----)

ตารางที่ 6 แสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 - 0.12 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที

วิธีการ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณHCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	%ผลผลิต
สารละลายก่อน HPLC	48.0	402.0	8.38	1.0	100.0
สารละลายหลัง HPLC	1.8	304.0	169.80	20.3	75.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.06 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที อัตราการไหล 3 มล./นาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (——) และแอคติวิตีของ HCG (-----)

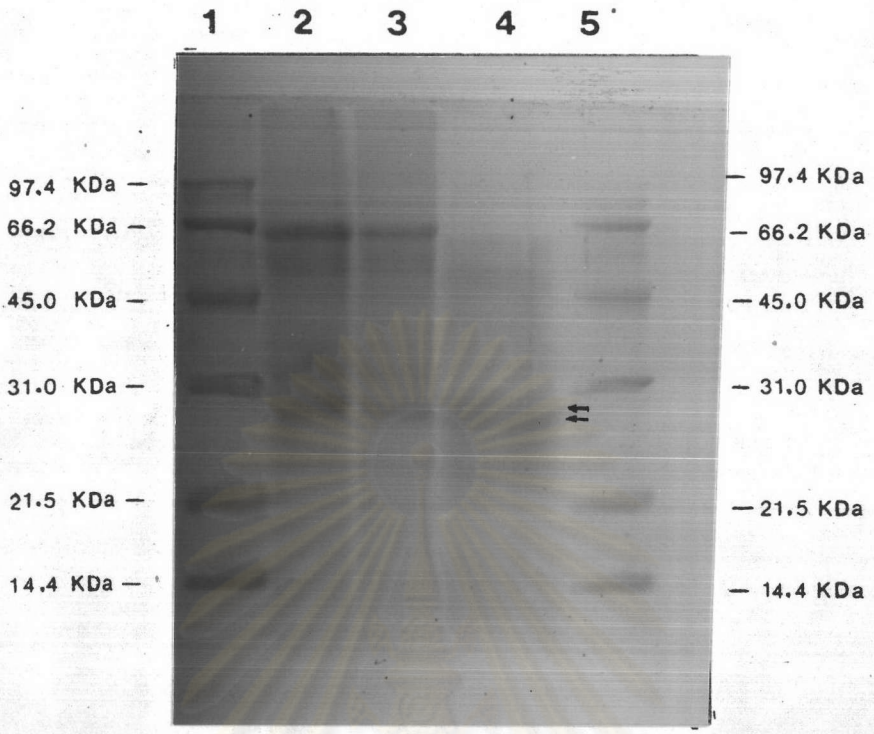
เท่านั้นที่มีแอคติวิตีของ HCGส่วนโปรตีนใน peak อื่น ๆ ไม่พบแอคติวิตีของ HCG แอคติวิตีจำเพาะของ HCG เท่ากับ 1957.50 IU/มก. มีความบริสุทธิ์ 67.8 เท่า และมีผลผลิตเท่ากับ 56.5 เปอร์เซนต์ **ดังตารางที่** 7 หลังจากนำสารละลายในหลอดที่ 37-43 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นโดยใช้เมมเบรนซึ่งยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 ดาลตันผ่านออกไปได้ พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกได้อีก 36.4 เปอร์เซนต์ ต่อจากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 ° ซ. HCG ที่ได้จากการทดลองนี้นำไปฉีดเข้าในสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อไป

4.3 <u>การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส</u>

HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.4.4 ง เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานได้ผลการทดลอง**ดังรูปที่** 11 พบว่าในปัสสาวะที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ และปัสสาวะที่ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่น มีแถบโปรตีน 5 แถบเช่นเดียวกัน (แถวที่ 2 และ 3) ส่วน HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีข้อ 3.4.4 ง มีแถบโปรตีนที่เห็นชัดเพียง 2 แถบซึ่งอยู่ชิดกันมากในบริเวณต่ำกว่า Bovine carbonic anhydrase โดยมีค่า Rf 0.55 และ 0.58 ตามลำดับ (แถวที่ 4) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีโปรตีนเป็นแถบจาง ๆ ทางด้านบนและด้านล่างของแผ่นเจลอีกหลายแถบ เมื่อนำแถบโปรตีนที่เห็นชัดนี้ไปเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Hen egg white, Soybean Trypsin, Bovine carbonic anhydrase, ovalbumin, BSA และ Rabbit muscle) **ดังรูปที่** 12 พบว่าแถบโปรตีนทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,494 และ 38,968

ตารางที่ 7 แสดงการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.06 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที

วิธีการ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณHCG (IU.)	แอคติวิตีจำเพาะ (IU./มก.)	จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์	%ผลผลิต
ปัสสาวะก่อนผ่านอัลตราฟิลเตรชั่น	105.5	3,048.0	28.88	1.0	100.0
ปัสสาวะหลังผ่านอัลตราฟิลเตรชั่น	40.3	2,134.4	52.95	1.8	70.0
หลังผ่าน HPLC	0.9	1,722.6	1,957.50	67.8	56.5
หลังผ่านเมมเบรน	0.6	1,580.7	2,874.00	99.5	51.8



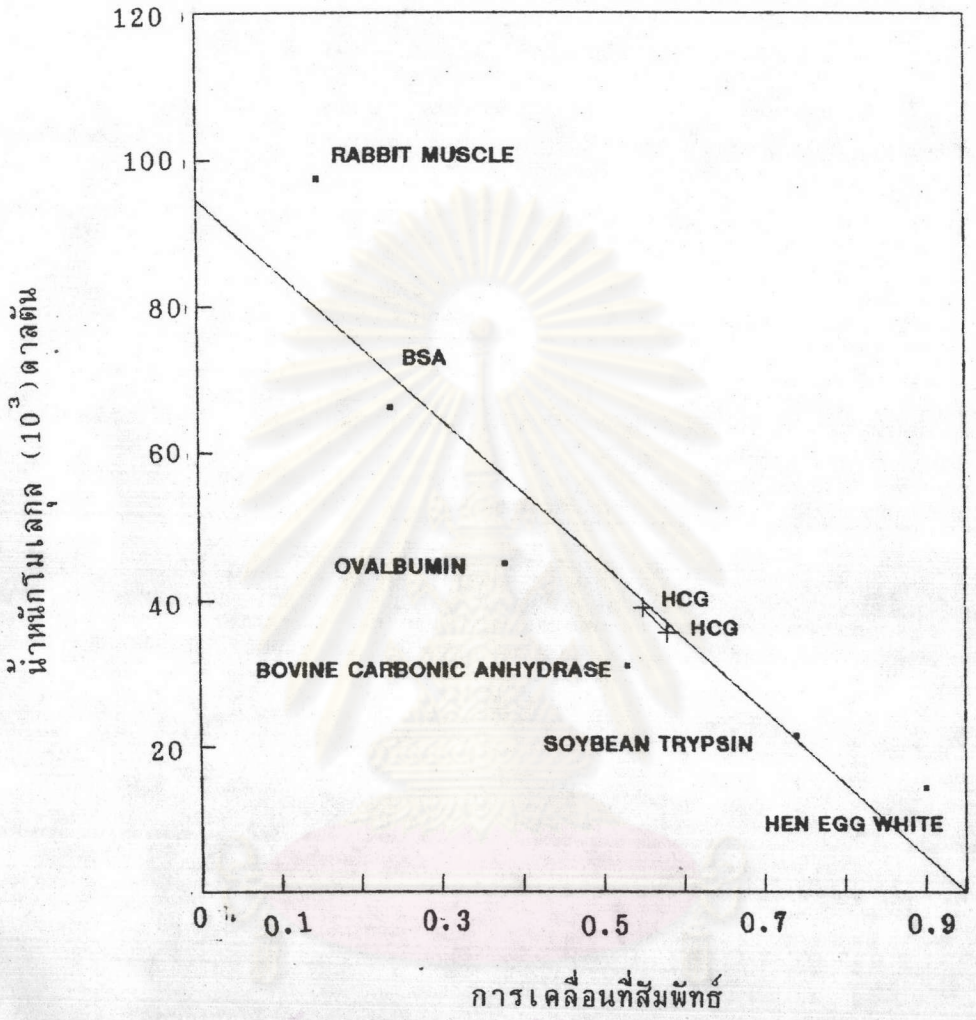
รูปที่ 11 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและ HCG แยกโดยเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

1 โปรตีนมาตรฐาน Hen egg white , Soybean , Trypsin , Bovine carbonic anhydrase , Ovalbumin , BSA , Rabbit muscle

2 ปัสสาวะ (มีโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

3 ปัสสาวะหลังจากทำอัลตร้าฟิลเตรชั่น (มีโปรตีน 40 ไมโครกรัม)

4 HCG ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.4.4 ง (มีโปรตีน 25 ไมโครกรัม)



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (.) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG (+) โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส

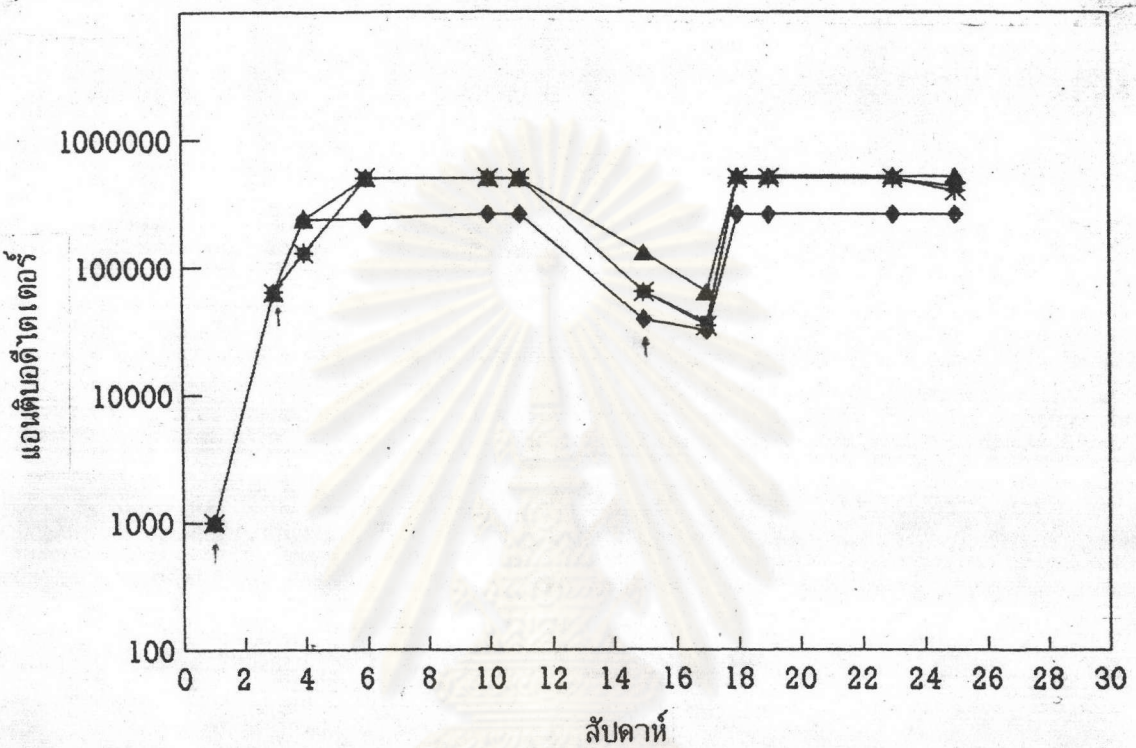
4.4 ผลการผลิตแอนติบอดีต่อ HCGในกระต่าย

จากการนำ HCG ที่ได้จากวิธีในข้อ 3.4.4 ง ซึ่งมีแอคติวิตี 1000 และ 2000 IU ผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 จนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังกระต่ายเพศผู้ แล้วฉีดกระตุ้นอีก 2 ครั้ง เมื่อระดับแอนติบอดีลดลง ได้ตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีต่อ HCG ที่กระต่ายสร้างขึ้นเป็นระยะทุก 2 สัปดาห์ด้วยวิธีการในข้อ 3.7 ได้ผลดังรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าระดับของแอนติบอดีในกระต่ายที่กระตุ้นด้วย HCG 1000 IU (เบอร์ 141, 129) และ 2000 IU (เบอร์ 142) มีปริมาณแอนติบอดีเพิ่มสูงสุดที่ 5×10^5 ภายหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และคงที่อยู่เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สำหรับกระต่ายเบอร์ 593 ซึ่งฉีด HCG 2000 IU เช่นเดียวกับเบอร์ 142 มีระดับแอนติบอดีสูงสุด 2.5×10^5 ซึ่งน้อยกว่ากระต่าย 3 ตัวข้างต้น ส่วนการกระตุ้นครั้งที่ 3 ซึ่งฉีดหลังครั้งที่ 2 เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าไม่มีการเพิ่มของแอนติบอดีไตเตอร์แต่ประการใด จึงทำการเจาะเลือดและเก็บซีรั่มกระต่ายในช่วงที่ระดับของแอนติบอดีขึ้นสูง เพื่อไว้ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.5 การทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์

ก. การตกตะกอนแอนติบอดีด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

จากการนำซีรั่มกระต่ายที่ได้จากข้อ 3.6.2 ซึ่งมีแอนติบอดีสูงมาตกตะกอนในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวต่าง ๆ คือ 0-40, 40-65 และ 65-70 เปอร์เซนต์ พบว่าที่แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 เปอร์เซนต์มีระดับแอนติบอดี 4×10^4 มีแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 35.0 ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีผลผลิต 50.0 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.3 เท่า สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-65 และ 65-70 เปอร์เซนต์ มีระดับแอนติบอดีน้อยมากคือน้อยกว่า 10^3 และมีแอนติบอดีไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเพียง 3.50 และ 1.50 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 0-40 เปอร์เซนต์ ตกตะกอนแอนติบอดีในซีรั่มกระต่ายได้สูงที่สุดและได้ใช้ตะกอนส่วนนี้ทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 13 แสดงปริมาณแอนติบอดีต่อ HCG ในซีรั่มกระต่ายหลังจากฉีดด้วยฮอร์โมน HCG ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.4.4 ง ลูกศรหมายถึงการฉีดกระตุ้น

■ 141 ▲ 142 * 129 ♦ 593

ตารางที่ 8 ผลการทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอนติบอดีไตเตอร์	แอนติบอดีไตเตอร์/มิลลิกรัมโปรตีน	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
ซีรั่ม	38.1	$4x10^4$	1050	1
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว				
0-40%	13.9	$4x10^4$	$2.9x10^3$	2.7
40-65%	25.0	$<10^3$	-	-
65-70%	15.8	$<10^3$	-	-
โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ				
ก่อนผ่านคอลัมน์	13.9	$4x10^4$	$2.9x10^3$	2.7
หลังผ่านคอลัมน์	0.04	$1.5x10^4$	$3.8x10^5$	357

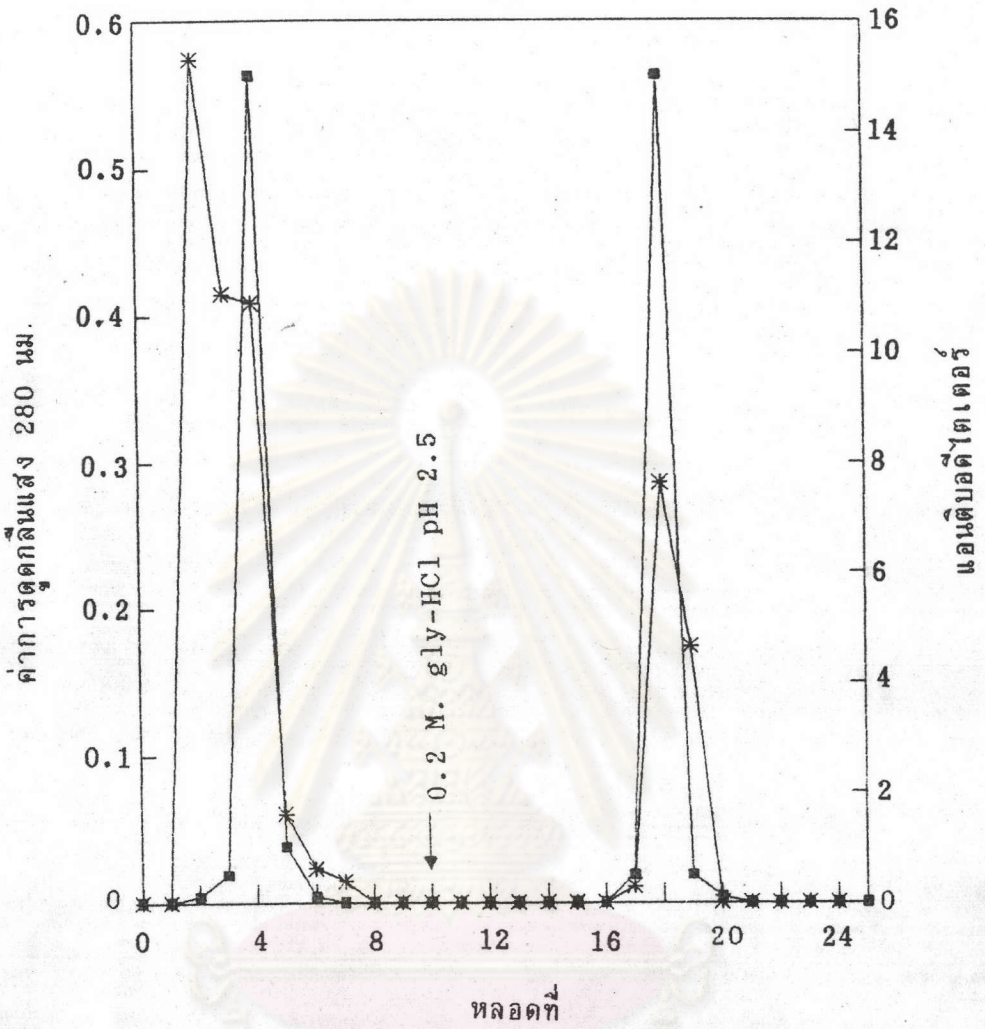
ข. การทำแอนติบอดีต่อ HCGให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 เปอร์เซนต์มีปริมาณโปรตีน 1.4 มก. มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography) พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 peak ดังรูปที่ 14 โดยโปรตีนส่วนใหญ่ไม่ยึดกับคอลัมน์ สำหรับโปรตีนที่ยึดกับคอลัมน์ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนน้อยสามารถชะให้ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์ pH 2.5 พบว่ามีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ 1.5×10^{4} แอนติบอดีไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเท่ากับ 3.8×10^{5} มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 357 เท่า ดังตารางที่ 8

จากผลการทดลองในข้อ 4.4 ก และ ข พบว่าการนำซีรั่มกระต่ายมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 เปอร์เซนต์ สามารถตกตะกอนแอนติบอดีได้ 50 เปอร์เซนต์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า ส่วนวิธีการโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะพบว่าทำให้แอนติบอดีต่อ HCG มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 357 เท่า

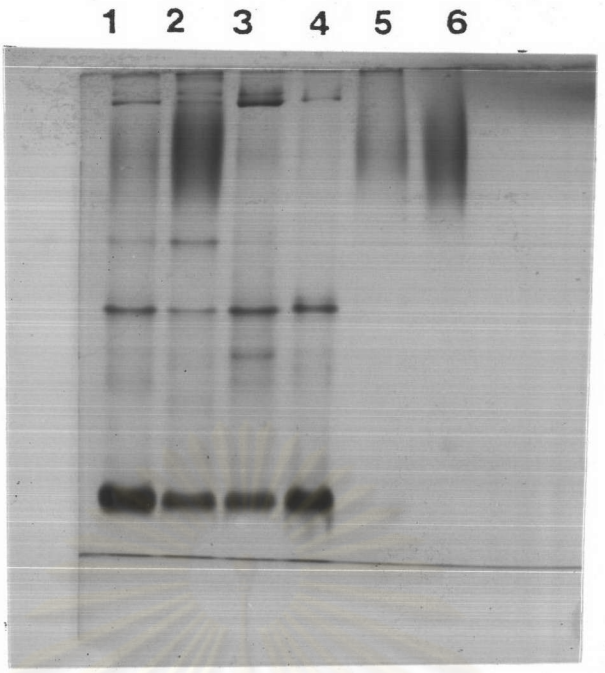
4.6 <u>ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟรีซีส</u>

จากการนำเอาแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนและวิธีโครมาโตกราฟีจำเพาะมาแยกโปรตีนออกเป็นแถบด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าซีรั่มที่ได้จากแต่ละขั้นตอนจะมีแถบโปรตีนขนาดใหญ่อยู่ตรงกัน ส่วนซีรั่มที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเข้มข้น 40-65 และ 65-70 เปอร์เซนต์ ไม่มีแถบโปรตีนดังกล่าว และแถบโปรตีนทั้งหมดบนแผ่นเจลที่ได้จากซีรั่มกระต่ายเริ่มต้นที่นำมาทำให้บริสุทธิ์จะค่อย ๆ ลดลง จนกระทั่งเหลือแถบโปรตีนขนาดใหญ่ 1 แถบ หลังจากนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ ดังรูปที่ 15



รูปที่ 14 กราฟแสดงการทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการโครมาโตรกราฟีแบบจำเพาะโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (*)

แอนติบอดีไตเตอร์ (■)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำแอนติบอดีต่อ HCG แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส pH 8.3 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.8.3

1 ซีรั่มกระต่ายที่ถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ HCG

2 ซีรั่มที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 % (มีโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

3 ซีรั่มที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-65 % (มีโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

4 ซีรั่มที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 65-70 % (มีโปรตีน 50 ไมโครกรัม)

5 ซีรั่มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโปรตีน เอ (มีโปรตีน 20 ไมโครกรัม)

6 ซีรั่มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบจำเพาะ (มีโปรตีน 40 ไมโครกรัม)

4.7 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

จากการนำซีรั่มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.8.3 มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานได้ผล **ดังรูปที่ 16** พบว่าซีรั่มที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.8.3 มีแถบโปรตีน 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน Phosphorylase b, BSA, Ovabumin, Carbonic anhydrase และSoybean trypsin inhibitor **ดังรูปที่ 17** พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 46,060 และ 63,580 ดาลตัน

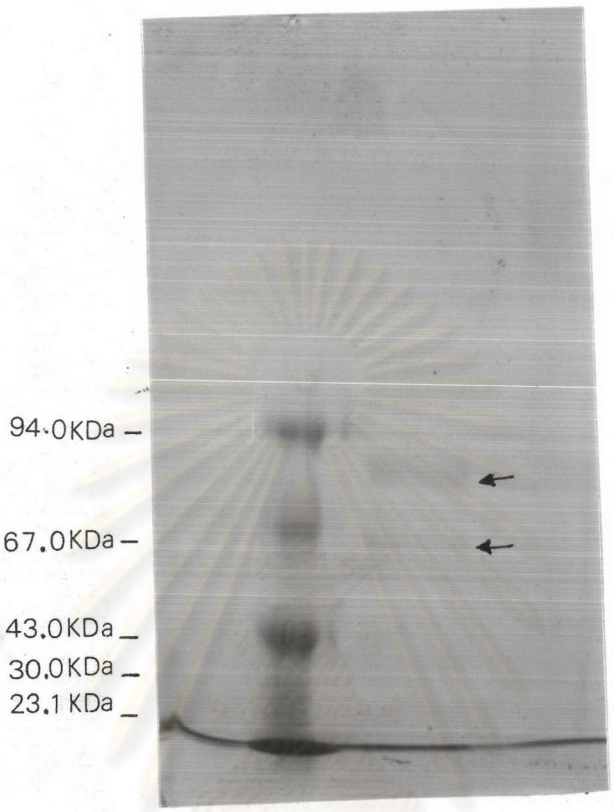
4.8 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี

4.8.1 วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น (Immunodiffusion)

จากการนำ HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 3.4.5 ง มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ HCG ที่ได้จากการเก็บไว้ดังข้อ 3.6.6 เทียบกับ HCG มาตรฐาน พบว่า HCG ทั้งสองชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่นำมาทดสอบ คือจะปรากฏเป็นเส้นตะกอนสีขาว (precipitin line) ล้อมรอบหลุมที่ใส่แอนติบอดีที่นำมาทดสอบ (หลุมตรงกลาง) **ดังรูปที่ 18** โดยเส้นตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้นแสดงถึงความเหมือนกัน (identity)ของ HCG ทั้งสองชนิด แต่อย่างไรก็ตามบริเวณหลุมที่ 1, 2, 3 ซึ่งเป็น HCG ที่ได้จากเก็บไว้ดังข้อ 3.6.6 มีเส้นตะกอนเส้นบาง ๆ อีก 1 เส้นซึ่งไม่ปรากฏใน HCG มาตรฐาน

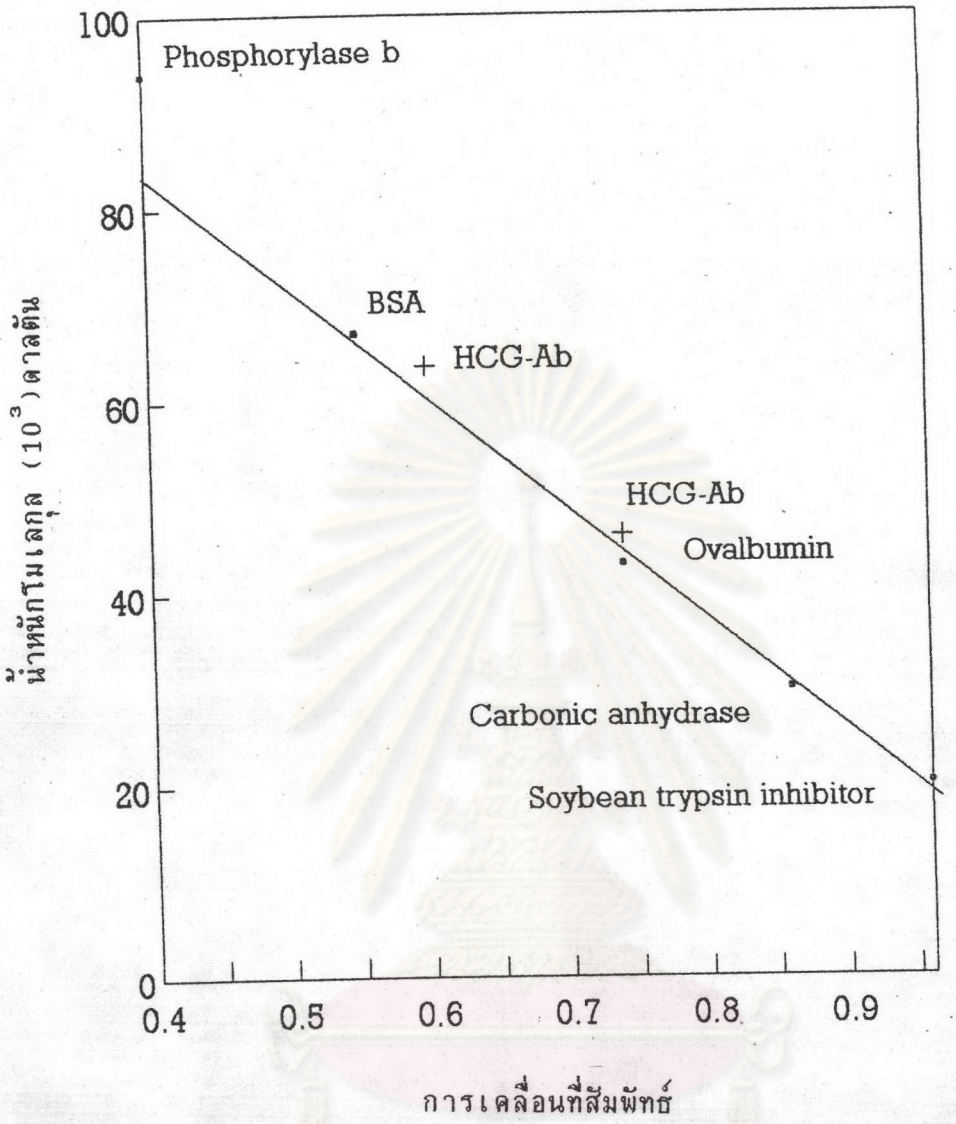
4.8.2 วิธีอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซีส

เมื่อนำ HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.4.4 ง และ HCG มาตรฐานมาทำอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซีสได้ผลการทดลอง**ดังรูปที่ 19** ปรากฏว่ามีเส้นตะกอนสีขาวชัดเจนเกิดขึ้น โดยเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นเส้นบนสุดของทุกหลุมมีความเหมือนกัน (identity) แต่อย่างไรก็ตามบริเวณหลุมที่ 1 (เป็น HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ

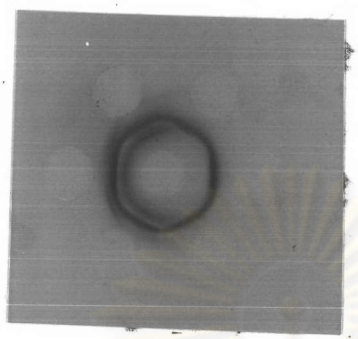


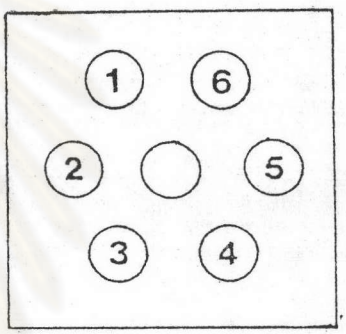
รูปที่ 16 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อ HCG แยกโดย เอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

1. โปรตีนมาตรฐาน Phosphorylase b, BSA, Ovalbumin, Carbonic anhydrase และ Soybean trypsin inhibitor
2. แอนติบอดีต่อ HCG ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 3.8.2



รูปที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility.) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน(·)เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีต่อ HCG (+)โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส





รูปที่ 18 ผลการทดสอบความจำเพาะของ HCG และ HCG แอนติบอดี โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่นหลุมตรงกลาง HCG แอนติบอดี

หลุมที่ 1,2,3 HCG ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี 3.4.4 ง

หลุมที่ 4,5,6 HCG มาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 HCG ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธี 3.4.4ง

2 HCG มาตรฐาน

3 HCG มาตรฐาน

รูปที่ 19 ผลการทดสอบความจำเพาะของ HCG แอนติบอดี โดยวิธีอิมมูโนอิเลกโตรโฟรีซิส

1. HCG ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.4.4ง
2. HCG มาตรฐาน
3. HCG มาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4 ง) มีเส้นตะกอนขาวมากกว่า 1 เส้น ซึ่งแสดงว่าแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะต่อ HCG ไม่มากนัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย