หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

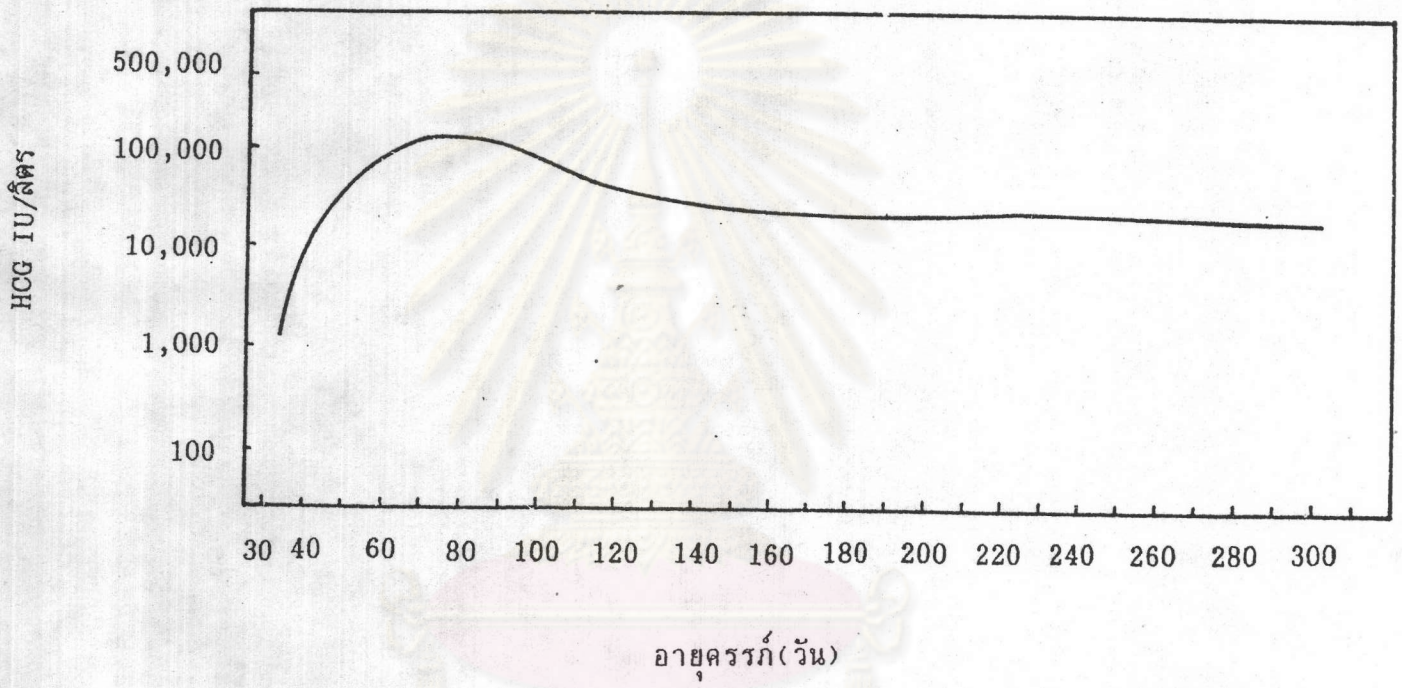
บทที่ 1

บทนำ

HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (HCG) เป็นฮอร์โมนชนิดไกลโคโปรตีน ซึ่งผลิตโดย Syncytiotrophoblast ในรก (Brody,1969)ในช่วง 8-10 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์มีระดับของHCGในเลือดและในปัสสาวะสูงกว่าก่อนตั้งครรภ์มาก ดังนั้นจึงนิยมใช้ฮอร์โมนชนิดนี้เป็นดัชนีเพื่อบ่งบอกการตั้งครรภ์ HCG ที่หลั่งออกมาในช่วงแรกมีหน้าที่ในการรักษาสภาวะการทำงานของคอร์ปัสลูเตียม (Corpus luteum) จนกระทั่งรกสามารถสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนได้พอเพียง (Savard et al., 1965) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ยับยั้งการหลั่ง Luteinizing Hormone(LH)เพื่อป้องกันมิให้มีการตกไข่ขณะตั้งครรภ์(Miyake et al.,1976) การสร้างHCG จะเริ่มขึ้นหลังจากปฏิสนธิในระยะมอรูล่า(morular stage) และปรากฏในระบบเลือดทันทีที่บลาสโตซิส (blastocyst) ฝังตัวที่ผนังชั้นในของมดลูกแม่ ระดับ HCG จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆจนถึงระดับสูงที่สุด 70,000-100,000 IU /ลิตร ภายใน 70 วัน หลังประจำเดือนครั้งสุดท้าย หลังจากนั้นจะลดระดับลงภายในเวลา 20 วัน จนมีระดับคงที่ 50,000 IU/ลิตรเมื่ออายุครรภ์ 140 วัน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติ

นับตั้งแต่ Aschheim และ Zondek ค้นพบฮอร์โมนนี้ในปี ค.ศ. 1927ได้มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติของฮอร์โมนนี้อย่างต่อเนื่อง โดยส่วนใหญ่นิยมนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์ช่วง 8-10 สัปดาห์แรกของการตั้งครรภ์มาทำให้ HCG บริสุทธิ์ ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณ HCG มากถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Mc Carthy et al., 1964) HCG มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39,000 (Got and Bourrillon,1960; Bahl ,1969, Swaminathan and Bahl, 1970) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ



รูปที่ 1 กราฟแสดงระดับของฮอร์โมน HCG ในปัสสาวะหญิงมีครรภ์จากตัวอย่างหญิงมีครรภ์ 240 คน (Wild,1962)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยย่อย α และหน่วยย่อย β (Canfield,1971) แต่ละหน่วยย่อยมีสารประกอบ 2 ชนิด คือคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน

ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตมีประมาณ 33 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักทั้งหมด(Bahl, 1969a) คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของ HCG คือกรดไซเอลิก (Sialic acid) ฟูโคส(L-Fucose) กาแลคโตส(D-Galactose) แมนโนส(D-Mannose) กลูโคซามีน (D-Glucosamine)และ กาแลคโตซามีน (N-Acetylgalactosamine) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตนี้เชื่อมติดกับแอสพาราจีน (Asparagine)และเซอรีน(Serine) (Bahl,1969a) การมีกรดไซเอลิกอยู่ในโมเลกุลเป็นจำนวนมากนั้นทำให้มีจุดไอโซอิเลคตริก (isoelectric point) ต่ำคือ 2.95 และความหลากหลายของกรดไซเอลิก ทำให้ปรากฏโปรตีนหลายแถบเมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซีสแบบไอโซอิเลคติกโฟกัสซิง(isoelectric focusing)(Bell et al.,1969 ;Maffezzoli et al., 1972; Graesslin et al.,1973;Weise et al.,1973) ต่อมา Graesslin และคณะ (1973) และ Merz และคณะ (1974)ได้กำจัดกรดไซเอลิกออกจากโมเลกุลของ HCG และนำมาทำอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่ามีโปรตีนเพียงแถบเดียว แต่อย่างไรก็ตาม Laga และ คณะพบว่า แม้จะกำจัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตออกจากโมเลกุลของ HCG แล้วก็ตามยังคงปรากฏเป็นโปรตีนหลายแถบเมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซีส ดังนั้นการที่ HCG มีโปรตีนหลายแถบเมื่อนำมาทำอิเลคโตรโฟรีซีส อาจเนื่องจากความหลากหลายของคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Laga et al.,1970) นอกจากนี้ Goverde พบว่าความจำเพาะทาง Biological activity ของ HCG นั้นขึ้นอยู่กับกรดไซเอลิก เมื่อกำจัดกรดไซเอลิกบริเวณส่วนปลาย พบว่า HCG สูญเสีย Biological activity (Goverde et al.,1968) Van Hell และ Schurrs (1970) รายงานถึงการกำจัดกรดไซเอลิกออกจากโมเลกุลมีผลลดค่าครึ่งชีวิต (half life) ของ HCG ในกระแสเลือดลงถึง 50 เปอร์เซนต์ สำหรับส่วนที่เป็นโปรตีนการศึกษาในช่วงต้น โดยอาศัยการวิเคราะห์หมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลิกทางด้านปลายทั้งสองของเปปไทด์เชื่อกันว่า HCG ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (Bahl, 1969b) ต่อมามีการ

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต*ที่เป็นส่วนของโมเลกุล HCG

(Swamminathan and Bahl,1970)

คาร์โบไฮเดรต	α - HCG (%)	β - HCG (%)
ฟูโคส	0.36	1.30
กาแลคโตส	1.52	7.50
กาแลคโตซามีน	8.55	7.40
กลูโคซามีน	8.55	7.40
แมนโนส	5.40	4.80
กรดไซเอลิค	3.90	10.20

*ไม่หักน้ำหนักน้ำที่มีในโปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีสของ S-carboxy methylated derivertives จึงพบว่าทั้ง 2 หน่วยย่อยเคลื่อนที่ได้ต่างกันและมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน(Canfield.,1970) หน่วยย่อย α มีน้ำหนักโมเลกุล 14,900 ดาลตัน มีส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณ 10,200 ดาลตันและคาร์โบไฮเดรต 4,700 ดาลตัน ส่วนที่เป็นโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 89 - 92 โมเลกุล ซึ่งพบความแตกต่างของกรดอะมิโนในบริเวณส่วนท้ายของโมเลกุล ความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการย่อยสลายที่เกิดขึ้นในปัสสาวะหรือขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำฮอร์โมนให้บริสุทธิ์ (Chatterjee and Munro,1976) ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 20 โมเลกุล ลำดับของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นหน่วยย่อย α ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 (Bellisalio et al.,1973) หน่วยย่อย β มีน้ำหนักโมเลกุล 23,000 ดาลตัน มีส่วนที่เป็นโปรตีนประมาณ 16,000 ดาลตัน และคาร์โบไฮเดรตประมาณ 7,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 145-147 โมเลกุลและน้ำตาลชนิดโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) 5 โมเลกุล(Carlsen et al.,1973; Morgan, 1975) ลำดับของกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นหน่วยย่อย β ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่งต่างๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ยังคงมีข้อโต้แย้งระหว่างกลุ่มของ Canfield(1971)ซึ่งรายงานว่าหน่วยย่อย β มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 145โมเลกุล ขณะที่ Bahl และ คณะ (1972)รายงานว่า มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 147 โมเลกุล กลุ่มของ Canfield พบกลูตามิกแต่ไม่พบกลูตามีนในตำแหน่งที่สาม พบวาลีนมิใช่ลูซีนในตำแหน่งที่ 55 นอกจากนี้ยังพบเซอรีนในตำแหน่ง 121 และ 138 ไม่พบเซอรีน ลูซีน และโปรลีนต่อกันในช่วงปลายหมู่คาร์บอกซิลิก ตามที่ Bahlและคณะ(1972)ได้รายงานไว้ แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีความหลากหลายของชนิดกรดอะมิโนบริเวณปลายสายของโปรตีนทั้งสองด้าน หน่วยย่อย α ของ HCG นี้มีแหล่งกำเนิดเหมือนกับหน่วยย่อย α ของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองอื่น ๆ จึงมีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกันเช่น hLH (Sairam et al.,1972) และ hTSH (Sairam and Li,1973) ความจำเพาะของฮอร์โมนนี้จึงขึ้นกับหน่วยย่อย β ซึ่งมีความแตกต่างจากหน่วยย่อย β ของไกลโคโปรตีนอื่นๆ

Ala Pro - Asp - Val - Gln - Asp - Cys - Pro (10) - Glu - Cys - Thr

- Leu - Gln - Glu - Asp - Pro - Phe - Phe - Ser - Gln (20) - Pro - Gly

- Ala - Pro - Ile - Leu - Gln - Cys - Met. - Gly (30) - Cys - Phe - Ser

- Arg - Ala - Tyr - Pro - Thr - Pro (40) - Leu - Arg - Ser - Lys - Lys

- Thr - Met. - Leu - Val - Gln (50) - Lys - Asn (CHO) - Val - Thr - Ser - Glu

- Ser - Thr - Cys - Cys (60) - Val - Ala - Lys - Ser - Tyr - Asn - Arg

- Val - Thr - Val (70) - Met. - Gly - Gly - Phe - Lys - Val - Glu - Asn

- His - Thr (80) - Ala - Cys - His - Cys - Ser - Thr - Cys - Tyr - Tyr

- His (90) - Lys - Ser

รูปที่ 2 ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยย่อย α
(คัดจาก Bellisario et al., 1973)

Ser - Lys - Gln - Pro - Leu - Arg - Pro - Arg - Cys - Arg - Pro (10)

- Ile - Asn - Ala - Thr - Leu - Ala - Val - Glu - Lys (20) - Glu - Gly

- Cys - Pro - Val - Cys - Ile - Thr - Val - Asn (CHO) - Thr - Thr - Ile

- Cys - Ala - Gly - Tyr - Cys (40) - Pro - Thr - Met. - Thr - Arg - Val

- Leu - Gln - Gly - Val - Leu - Pro (80) - Ala - Leu - Pro - Gln - Leu

- Val - Cys - Asn - Tyr - Arg (60) - Asp - Val - Arg - Phe - Glu - Ser

- Ile - Arg - Leu - Pro (70) - Gly - Cys - Pro - Arg - Gly - Val - Asn

- Pro - Val - Val (80) - Ser - Tyr - Ala - Val - Ala - Leu - Ser - Cys

- Gln - Cys (90) - Ala - Leu - Cys - Arg - (Arg) - Ser - Thr - Thr - Asp

- Cys (100) - Gly - Gly - Pro - Lys - Asp - His - Pro - Leu - Thr - Cys (110)

- Asp - Asp - Pro - Arg - Phe - Gln - Asp - Ser (CHO) - Ser - Ser (120) - Lys

- Ala - Pro - Pro - Pro - Ser - Leu - Pro - Ser (CHO) - Pro (130) - Ser (CHO) - Arg

- Leu - Pro - Gly - Pro - Pro - Asp - Thr - Pro (140) - Ile - Leu - Pro

- Gln - Ser - Leu - Pro

รูปที่ 3 ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของหน่วยย่อย β
(คัดจาก Carlsen et al., 1973)

บริเวณปลายด้าน C (Pierce et al.,1971) นอกจากนี้ยังพบว่าหน่วยย่อย α มี Biological activity น้อยกว่า 1เปอร์เซนต์ของ HCG ตามธรรมชาติขณะที่หน่วยย่อย β มีมากถึง 6 เปอร์เซนต์ และสามารถทำให้หน่วยย่อยทั้งสองรวมกันใหม่โดยที่ HCG ที่ได้มีแอคติวิตีอย่างน้อย 66 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับ HCG ตามธรรมชาติ (Morgan et al., 1971)

การทำ HCG ให้บริสุทธิ์

สำหรับการทำ HCG ให้บริสุทธิ์นั้น ได้มีผู้ให้ความสนใจศึกษาหลายกลุ่ม (Got and Bourrillon,1959 ;Reisfeld and Hertz ,1960 ; Tallberg et al., 1964 ; Van Hell et al.,1966 ,Bell et al.,1969 ;Bahl et al.,1969) วิธีการทำให้บริสุทธิ์คล้ายคลึงกันคือนำปัสสาวะหญิงมีครรภ์มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไปผ่านขบวนการทางโครมาโตกราฟี (Van Hell et al.,1966) ใช้ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-25 (CM Sephadex C-25)ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดความเข้มข้นต่างๆกันพบว่า HCG ถูกชะออกจากคอลัมน์ เมื่อสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตดเข้มข้น 0.3 โมลาร์ HCG ที่ได้มี Biological activity เฉลี่ย 10,500 IU/มก. โดยใช้วิธีตรวจสอบแบบ Mouse uterine weight bioassay * นำ HCG ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ พบว่าเซฟาเด็กซ์ จี 100 สามารถแยก HCGได้ดีกว่าเซฟาเด็กซ์ จี 200 และได้ HCG ที่มี Biological activity สูงถึง 18,800 IU/มก. แอคติวิตีที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับการเพิ่มของโปรลีน (Proline) และ กรดไซเอลิก (Sialic) นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างโมเลกุลของ HCG ที่จำเป็นสำหรับ Biological activity และ immunological activity อยู่คนละบริเวณกัน ต่อมา Bell และคณะ(1969)

---

* Mouse Uterine Weight bioassay ทำโดยฉีด HCG ให้กับหนู mouse ที่เพิ่งหย่านม (21 วัน) จากนั้น Autopsy และชั่งน้ำหนักมดลูกหลังจากฉีดฮอร์โมน 2 วัน

ได้ปรับปรุงวิธีทำ HCG ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์ พบว่า HCG ตกตะกอนได้มากที่สุดเมื่อใช้แอลกอฮอล์เข้มข้น 80 เปอร์เซนต์ HCG ที่ได้เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ(ion-exchange chromatography) โดยใช้ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ชะด้วยเกรเดียนท์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปด้วยไบโอเจล พี-60 พบว่า HCG ที่ได้มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบและขนาดของโมเลกุล HCG เป็นแบบเดียวกัน แต่ยังคงมีประจุทางไฟฟ้าและปริมาณกรดไซเอลิกที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน Wilde and Bhagshawe (1965) รายงานว่าสามารถแยก HCG จากปัสสาวะหญิงที่ป่วยเป็น trophoblastic tumorsโดยการสกัด HCG จากปัสสาวะด้วยกรดเบนโซอิก จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส และดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ พบว่า HCG ที่ได้มี Biological activity 14,600 IU/มก. (โปรตีน) เมื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า HCGที่ได้ยังคงมีลักษณะหลายแถบแม้ว่าลักษณะทางอิมมูโนวิทยาจะเห็นแนวของตะกอน (Precipitin) เพียงแนวเดียว ในการศึกษาโครงสร้างและหน่วยย่อยของ HCG ในระยะต่อมา Bahl และคณะ(1969) มักใช้วิธีการทำ HCG ให้บริสุทธิ์โดยนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ แล้วชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ-50 อีกครั้ง ชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.1-0.2 โมลาร์แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์เซฟา-เด็กซ์ จี-100 HCG ที่ได้มีลักษณะ Homogeneous เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเลค-โตรโฟรีซีส และอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซีส

ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคโครมาโตกราฟีที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารได้แก่ High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)มาใช้ในการแยก HCG(Yasuyaki et al.,1983; Grego and Hearn,1984 ; Wilks and Butler, 1984) ทั้งนี้เนื่องจากความสะดวกและรวดเร็วในการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ Yasuyaki และคณะ (1983) ได้ศึกษาการใช้ HPLC ในการแยก HCG และอนุพันธ์ของ HCG 11 ชนิดโดยใช้คอลัมน์ TSK G-SW (G-2000 SW และ G-3000 SW) พบว่า

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการชะ HCG คือแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1โมลาร์ pH 1.0 อัตราการไหล 1 มล./นาที นอกจากนี้ยังมีผู้ใช้เทคนิค Reversed-phase HPLC และสภาวะในการชะคอลัมน์ต่าง ๆ เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG (Zee and Welling,1982) Grego และ Hearn (1984)ได้ศึกษาการใช้ HPLCในการแยกโปรตีนหลายชนิดรวมทั้งHCG โดยใช้คอลัมน์ u-Boundapak C-18 พบว่าสามารถแยก HCGได้ดีและมีเปอร์เซนต์ผลผลิต 83 เปอร์เซนต์โดยคิดจากปริมาณโปรตีน รายงานดังกล่าวขัดแย้งกับ Puttermanและคณะ(1982) ซึ่งใช้คอลัมน์และสภาวะในการชะเหมือนกัน พบว่ากราฟที่ได้กว้างและแยก HCG ได้ไม่ดีนัก Parsons (1984) ได้ศึกษาการทำไกล-โคโปรตีนชนิดต่างๆ ของคนให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC ได้มุ่งเน้นถึงวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว ใช้คอลัมน์ vydac 218 TP1010 ขนาด 10 มล.x25 ซม. ชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.1โมลาร์ pH 6.8 และอะซิโตไนตริล พบว่าการเติมกวานิดีน ไฮโดรคลอไรด์ลงในฮอร์โมนก่อนฉีดเข้า HPLC จะช่วยทำให้ประสิทธิภาพในการแยกดีขึ้นโดยมีเปอร์เซนต์ผลผลิต 10-50 เปอร์เซนต์ และสำหรับ HCG การชะด้วยไอของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ทำให้ได้เปอร์เซนต์ผลผลิต 85 เปอร์เซนต์ ต่อมา Wilks และ Butler (1984) ได้ศึกษาการแยก HCG ด้วย HPLC และศึกษา Biological activity ควบคู่ไปด้วยโดยใช้คอลัมน์ u Boundapak C- 18 และคอลัมน์ Ultra-sphere Octyl และสภาวะในการชะแบบเกรเดียนท์เส้นตรงของ 1-โพรพานอล เข้มข้น 0-40 เปอร์เซนต์ พบว่าคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิดสามารถแยก HCG ได้ดีไม่แตกต่างกันและ HCG ที่ได้มีค่า Biological activity คงเหลือเพียง 10-60 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการแตกตัวของหน่วยย่อยและการเสียสภาพของ HCG เนื่องจากสารอินทรีย์ที่ใช้ในการชะ

HCG บริสุทธิ์ที่เตรียมได้นี้ ได้มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมี (Bell et al., 1969; Bahl, 1972) ยังมีผู้นำ HCG มาใช้เตรียมแอนติบอดี (Chang et al., 1967 ;Hirunyavasit,1978) เพื่อตรวจวัดปริมาณ HCG (Raford et al.,1972) ในการผลิตแอนติบอดีต่อ HCG สัตว์ทดลองที่ใช้กันคือกระต่าย Chang และคณะ (1967)

ได้ฉีด HCG เข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular)บริเวณขาหลัง ครั้งแรก 500 IUแล้วฉีดกระตุ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ด้วย HCG 2000 IU นอกจากนี้ยังมีผู้ใช้แกะ (Hirunyavasit, 1978) ฉีดเข้าบริเวณใต้ผิวหนัง (Subcutaneous)โดยฉีดครั้งแรก 3000 IU แล้วฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 12 และรายงานว่าแอนติบอดีต่อ HCG เพิ่มสูงสุดในช่วง 4- 8 เดือน แอนติบอดีต่อหน่วยย่อย β ของ HCGที่ได้จากกระต่ายมีความแตกต่างกันทางอิมมูโนวิทยาระหว่าง HCG และ HLH (Ross et al.,1972 ; Vaitukaitis et al., 1972a) โดยแอนตีบอดีที่ได้อาจเข้าจับกับฮอร์โมนในส่วนที่แตกต่างกันคือบริเวณปลายด้าน C ของหน่วยย่อย β -HCG เมื่อไม่นานนี้ C.H.Schneider และคณะ (1975) รายงานถึงการสังเคราะห์สายของโปรตีนบริเวณปลายด้าน C ของหน่วยย่อย β -HCGว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนตีบอดีที่จับกับฮอร์โมน HCG ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอนตีบอดีที่ได้จากหน่วยย่อย α ไม่มีความจำเพาะขณะที่แอนตีบอดีที่ได้จากหน่วยย่อย β มีความจำเพาะแต่ยังคงมีปฏิกิริยาข้างเคียง (cross reaction) เล็กน้อย (Vaitukitis et al.,1972 b ; Jacobs and Lawton,1974 ; Parlow and Shome , 1974) แต่สำหรับในการทำเรดิโอ อิมมูโนเอสเสย์ ใช้แอนตีบอดีต่อ HCG ให้ผลดีกว่าการใช้แอนตีบอดีต่อหน่วยย่อย β ของ HCG (Rayford et al.,1972) Jacobs และ Lowton(1974)ได้รายงานว่า ปฏิกิริยาข้างเคียงระหว่างไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ นั้น อาจเกิดเนื่องจากความคล้ายคลึงกันของโครงรูปของฮอร์โมนเหล่านั้นตามธรรมชาติ ไม่ใช้เพียงแต่การมีหน่วยย่อย α ที่เหมือนกันเท่านั้น

สำหรับในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแยก HCG จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์และทำให้บริสุทธิ์โดยมุ่งเน้นวิธีการที่รวดเร็วและได้ HCG ที่มีความบริสุทธิ์สูง จากนั้นนำ HCG ที่ได้ไปกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อ HCG และทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีประโยชน์ในการนำไปผลิตชุดตรวจสอบการตั้งครรภ์(Pregnancy Test Kit) ใช้ได้เองในประเทศ ดังนั้นเป้าหมายของงานวิจัยนี้คือ

1. พัฒนาเทคนิคการเตรียม HCG บริสุทธิ์จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์
2. เตรียมแอนติบอดีต่อ HCG โดยการใช้ HCG ที่เตรียมได้เป็นตัวกระตุ้น (immunogen) ให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี
3. ทำให้แอนติบอดีต่อ HCG บริสุทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย