บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาขั้นตอนการแยก AFP จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตชุดช่วยตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ

Twoney และ Sweet (1976) รายงานการแยก AFP จากซีรัมของตัวอ่อน (fetal serum) โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นลำดับส่วนครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 0-20 , 20-30 , 30-40 , 40-50 , 50-60 , 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการตกตะกอนพบว่า แต่ละลำดับส่วนตรวจพบ AFP ได้ 0.46 , 8.60 , 14.40 , 9.40 , 34.50 , 26.30 และ 0.07 เปอร์เซ็นต์ (ของ AFP) เริ่มต้น ตามลำดับ ลำดับส่วนที่ตรวจพบ AFP สูง คือลำดับส่วนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระหว่าง 50-60 และ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Twoney และ Sweet (1976) ซึ่งแยก AFP โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่พบว่า มีความสูญเสีย AFP สูง นอกจากนั้นการทดลองนี้ยังตรวจพบอัลบูมินได้ในทุกลำดับส่วนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Travis และคณะ (1976) ซึ่งทำการตกตะกอนซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยวิธีเดียวกัน พบอัลบูมินได้ทุกลำดับส่วนเช่นกัน และซีรัมที่ผ่านคอลัมน์ซิบาครอน บลู เซฟาโรส ซึ่งผ่านการแยกอัลบูมินออกบางส่วนแล้ว ยังตรวจพบอัลบูมินได้ในลำดับส่วนที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 60-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นลำดับส่วนที่ตรวจพบ AFP สูงเช่นกัน ด้วยเหตุผลนี้สรุปได้ว่าการตกตะกอนด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแยก AFP ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากไม่สามารถแยกโปรตีนปนเปื้อนออกจาก AFP ได้ โดยเฉพาะอัลบูมินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 68,460 ดาลตัน (Hudson and Hay , 1980) ใกล้เคียงกับ AFP อีกทั้งยังมีปริมาณค่อนข้างสูง

ขั้นตอนต่อไปจึงทำการสกัดแยก AFP โดยวิธีโครมาโทกราฟี เนื่องจากในซีรัมประกอบด้วยอัลบูมินประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักโปรตีนทั้งหมด อิมมูโนโกลบูลินประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ไฟบริโนเจนประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 32 เปอร์เซ็นต์ คือโปรตีนชนิดอื่นๆอีกกว่า 100 ชนิด (Travis และคณะ , 1976) ด้วยเหตุผลดังกล่าวขั้นตอนแรกของงานวิจัยจึงเริ่มด้วยการเตรียมซีรัมตัวอย่าง โดยกำจัดโปรตีนปนเปื้อนออกให้มากที่สุด เริ่มจากการแยกเศษเซลตาย และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่ตกตะกอนได้ออกจากซีรัม โดยวิธีปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วในที่เย็น ขั้นตอนนี้สามารถแยกไขมันส่วนใหญ่ออกจากซีรัมได้โดยส่วนที่เป็นไขมันจะจับตัวเป็นก้อนลอยอยู่บนผิวหน้า และสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (ของโปรตีนเริ่มต้น) มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนนี้กำหนดให้สารตัวอย่างมี AFP บริสุทธิ์เริ่มต้นเป็น 1 เท่า

ขั้นตอนต่อมาเป็นการแยกอัลบูมินซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดสัมพรรคภาพโดยใช้คอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล ในการจับอัลบูมิน เม็ดเจลนี้มีองค์ประกอบเป็นอะกาโรสจับอยู่กับสี cibacron blue F-3GA ด้วยพันธะไดเวเลนต์ เนื่องจากโครงสร้างของ cibacron blue F-3GA มีส่วนคล้ายกับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จึงสามารถจับกับโปรตีน เอ็นไซม์ และอัลบูมินได้ดี โดยอาศัยการยึดด้วยแรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) (Birkenmeier et al . , 1983 , Travis et al . , 1976) ส่วนโครงสร้าง AFP มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบด้วย จึงขัดขวางการจับกับสี AFP ที่แยกจากส่วนที่ไม่จับกับซิบาครอน บลู เจล มีความบริสุทธิ์ เพิ่มขึ้นเป็น 1.2 เท่า

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์อัลบูมินในสารส่วนนี้โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน ยังพบอัลบูมินอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Young และ Webb (1978) สำหรับส่วนที่จับกับคอลัมน์ส่วนใหญ่พบว่าเป็นอัลบูมิน และไม่พบ AFP ปนเปื้อนอยู่ในส่วนนี้ โดยสรุปขั้นตอนนี้สามารถกำจัดอัลบูมินได้เพียงประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นมีการสูญเสีย AFP ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของสารก่อนผ่านคอลัมน์

จากการตรวจพบว่าสารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการแยกอัลบูมินออกแล้ว ยังมีการปนเปื้อนของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200,000 ดาลตัน ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการแยกโมเลกุลเหล่านี้ออกโดยวิธี เจลฟิลเตรชัน ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 โดยนำสารตัวอย่างหลังจากแยกอัลบูมิน มากำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ขั้นตอนนี้ได้ศึกษาโดยการเปรียบเทียบปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ผ่านคอลัมน์ในปริมาตรที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกปริมาณสารตัวอย่าง ที่เหมาะสมที่ควรใช้ต่อไป

ผลการแยกโดยใช้ปริมาตร 1 , 2 และ 3 มิลลิลิตรต่อคอลัมน์ปริมาตร 140 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณ AFP ที่แยกได้ต่างกันในลักษณะเพิ่มตามปริมาณสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น คือการใช้สารตัวอย่างปริมาตร 2 และ 3 มิลลิลิตร สามารถแยก AFP ได้เป็น 2 และ 3 เท่า ของสารตัวอย่างที่ใช้เพียง 1 มิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย AFP ใกล้เคียงกันคือ 21 , 23 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปเพื่อเก็บสะสม AFP จึงเลือกใช้การผ่านสารตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อปริมาตร 140 มิลลิลิตรของคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

ในขั้นตอนนี้สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 ดาลตันเป็นส่วนใหญ่ และน้ำหนักโมเลกุล 220,000 ดาลตัน ส่วนที่ 2 ประกอบด้วยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 และ 180,000 ดาลตันเป็นส่วนใหญ่ สำหรับโปรตีนส่วนที่ 3

ซึ่งเป็นส่วนที่ตรวจพบ AFP และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารปนเปื้อน โดยวิธีเจลอีเลคโตรโฟรีซีส พบว่านอกจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 และ 180,000 หลงเหลืออยู่บ้างเล็กน้อยเป็นแถบจางๆ ยังพบว่ามีกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ AFP อยู่ 3 ชนิด ได้แก่ สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 , 67,000 และ 50,000 ดาลตัน ขั้นตอนนี้สามารถกำจัดอิมมูโนโกลบูลินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 160,000 ดาลตัน ออกจากสารตัวอย่างได้ หลังจากผ่านขั้นตอนนี้เก็บสารตัวอย่างในส่วนที่ 3 ซึ่งได้ AFP ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 8.2 เท่า มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนออกได้ถึง 88 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังคงตรวจพบอัลบูมินได้โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ไม่สามารถแยกอัลบูมินที่เหลืออออกได้ เนื่องจากอัลบูมินมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของ AFP จึงถูกแยกออกมาพร้อมกับ AFP ด้วย

เมื่อสารตัวอย่างได้รับการกำจัดสารปนเปื้อนได้ระดับหนึ่งแล้ว ยังคงเหลือสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ AFP ขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการแยก AFP ชนิดต่างๆออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติของ AFP ซึ่งแบ่งกว้างๆได้เป็น ชนิด F-AFP และ H-AFP ทำปฏิกิริยากับคอน เอ แตกต่างกัน คือ F-AFP จะไม่จับกับ คอน เอ (Smith and Kelleher , 1973) ดังนั้นจึงแยก AFP ทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดสัมพรรคภาพด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ทั้งนี้เพราะคอน เอ มีคุณสมบัติในการจับกับโมเลกุลของสารที่ประกอบด้วย α -D-mannopyransyl และ α-D-glucopyranosyl ด้วยกลไกนี้ คอน เอ จึงมีประโยชน์ในการใช้แยกสารประเภทไกลโคโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ และ ไกลโคลิปิด ที่มีความแตกต่างกันในส่วนของคาร์โบไฮเดรต กล่าวคือ AFP ทั้ง 2 ชนิด มีโครงสร้างส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันคือ F-AFP มี

เอ็นอะซิติลกลูโคซามีน เป็นอนุพันธ์เกาะอยู่กับแมนโนสตรงตำแหน่งที่ 3 ของแกน จึงทำให้ขัดขวางการจับกับคอน เอ ส่วน H-AFP มีแมนโนสอิสระจึงจับกับคอน เอ ได้ดี (Sell , 1990)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ผ่านการแยกอัลบูมินและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกแล้ว มาผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกไม่จับกับคอลัมน์ พบ AFP 18.7 เปอร์เซ็นต์ (F-AFP) มีความบริสุทธิ์ 3.5 เท่า แสดงว่ายังคงมีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นอยู่อีกมากจากสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 , 180,000 และ 50,000 ดาลตัน (หน้า 86) และตรวจพบอัลบูมินได้ในส่วนนี้ เนื่องจากอัลบูมินไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจึงไม่จับติดกับคอลัมน์

ส่วนที่ 2 ซึ่งคาดว่ามี F-AFP ผสมกับ H-AFP (ชนิดที่มีโครงสร้างที่ทำปฏิกิริยากับ lentil lectin) ตรวจพบ AFP ได้ 4.7 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ 14 เท่า ยังคงพบสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 , 180,000 , 85,000 และ 50,000 ดาลตัน ในส่วนนี้มีปริมาณ AFP ที่ต่ำ แต่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าส่วนแรก

สำหรับส่วนที่ 3 เป็นส่วนที่จับกับคอลัมน์ ซึ่งมี H-AFP 69.6 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 33.4 เท่า ซึ่งสูงกว่าส่วนที่ 1 และ 2 โปรตีนปนเปื้อนส่วนใหญ่ที่พบในส่วนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85,000 , 50,000 และ 40,000 ดาลตัน ตามลำดับ (หน้า 86)ขั้นตอนนี้มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ (ได้จากการสะสมซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับคนไทยจำนวนหนึ่ง) มีปริมาณ H-AFP สูงกว่า F-AFP ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Buamah และคณะ (1984) และ Chan และ Miao (1986) กล่าวว่า ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับมี AFP ชนิดที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคอน เอ ประมาณ 1.7-18.3 เปอร์เซ็นต์

ในขั้นสุดท้ายเป็นการแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธี anion exchange chromatography ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ด้วยเครื่อง HPLC จากการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ตั้งแต่ความเข้มข้น 0-1.0 , 0-0.50 , 0-0.35 และ 0-0.30 โมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้สารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการกำจัดอัลบูมินและโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกแล้วเป็นสารตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการแยก AFP คือ ที่ความเข้มข้น 0-0.3 โมลาร์ สามารถแยก AFP ออกจากโปรตีนอื่นได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูงๆ AFP ถูกชะออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.3 โมลาร์

ส่วนชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบระหว่าง แอล-ฮีสติดีน เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6 กับไตรเอทาโนลามีน (TEA) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 พบว่า การชะด้วยบัฟเฟอร์ TEA สามารถแยก peak AFP ออกจากโปรตีนอื่นได้ชัดเจนดีกว่า โดย AFP ถูกชะออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.20-0.27 โมลาร์ ได้ AFP กลับคืน 78.6 เปอร์เซ็นต์ (ความบริสุทธิ์ของ AFP คำนวณไม่ได้ เนื่องจากสารที่ได้มีปริมาณโปรตีนน้อยเกินกว่าจะตรวจหาได้)

การใช้บัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน สามารถแยก AFP ออกได้เป็น 3 peak เล็กๆ ลักษณะการแยกนี้มีความหมายถึงสภาวะที่สามารถแยก H-AFP เป็นชนิดย่อยหรือไม่เป็นสิ่งที่ควรศึกษาต่อ จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการแยก AFP โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 คือโดยการชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ ละลายในบัฟเฟอร์ TEA (0.02 โมลาร์ pH 7.0) เป็นเวลา 50 นาที การแยก AFP ในขั้นต่อมาจึงใช้สภาวะนี้ในการแยก AFP จากสารตัวอย่าง ที่ได้จากขั้นตอน

ผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งแยกได้เป็น 3 ส่วนดังกล่าวแล้วในหัวข้อ 4.2.4 เนื่องจาก AFP เนื่องจาก AFP แต่ละชนิดยังแบ่งย่อยได้ด้วยความแตกต่างของคาร์โบไฮเดรต สารตัวอย่างหลังผ่านคอลัมน์คอน เอ ทั้ง 3 ส่วนจึงนำมาทดลองแยกด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 พบว่า AFP จะออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.20-0.25 โมลาร์ AFP ที่แยกได้จากสารตัวอย่างส่วนที่ 1 ตรวจพบว่ายังคงมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นสูง ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่สามารถแยกโปรตีนที่มีค่าประจุใกล้เคียงกับ AFP ออกจากสารตัวอย่างส่วนที่ 1 ได้ การแยก AFP ในสารตัวอย่างส่วนที่ 2 ได้ peak โปรตีนต่ำ แต่มีค่า AFP สูงกว่าส่วนแรก แสดงว่า AFP มีความบริสุทธิ์สูงกว่าส่วนแรก แต่เนื่องจาก AFP ที่แยกได้มีปริมาณน้อย ทำให้ไม่สามารถนำมาทำการศึกษาต่อได้

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ ต้องการสกัดแยก H-AFP ให้มีความบริสุทธิ์มากที่สุด จึงทำการสกัด AFP ในสารตัวอย่างส่วนที่ 3 ซึ่งมี H-AFP ปริมาณสูงที่สุด พบว่าโปรตีนปนเปื้อนส่วนใหญ่แยกออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.09-0.19 โมลาร์ ส่วน AFP จะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.20-0.25 โมลาร์ (ดังรูปที่ 12) อาศัยข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี จึงสรุปได้ว่าขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากสารตัวอย่างได้ค่อนข้างดี

หลังจากทำการแยก H-AFP จากสารตัวอย่างที่ได้ผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 3 โดยใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 และชะคอลัมน์ด้วยสภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่า H-AFP ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ 339 เท่า ขั้นตอนนี้สามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนออกได้ประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์ มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟลิซีสแบบเอสดีเอส พบว่ามีโปรตีน 4 ชนิด ได้แก่ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ

85,000 , 53,000 และ 43,000 ดาลตัน แต่จากการวิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี พบสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68,000 , 35,000 และ 23,000 ดาลตัน ซึ่ง AFP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67,000-68,000 ดาลตัน

เนื่องจาก H-AFP ยังมีรายละเอียดในโครงสร้างส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันอยู่หลายชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการใช้วิธี anion exchange chromatography นี้สามารถแยก H-AFP หลายชนิดออกจากกันได้หรือไม่ และจากรายงานของ Oers และคณะ (1990) กล่าวว่า AFP ของหนูที่สกัดได้จากน้ำคร่ำโดยวิธี antibody-agarose affinity chromatography เมื่อแยกผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ซึ่งชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ระหว่าง 0-0.15 โมลาร์ ละลายในบัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6 สามารถแยก AFP ออกได้เป็น 6 ชนิด สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อนำ H-AFP ที่สกัดได้จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับจากขั้นตอน 4.2.5.4 ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 339 เท่า มาผ่านการแยกด้วยคอลัมน์และบัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีนเดียวกับที่รายงานโดย Oers และคณะ พบว่าไม่สามารถแยก AFP ออกได้เป็นหลายชนิด คือ ได้ AFP เกาะกลุ่มอยู่ใน peak เดียวกัน

ข้อสังเกตคือ

1) AFP ที่ใช้มีปริมาณเพียง 30 ไมโครกรัม แต่ขณะที่ Oers และคณะ ต้องใช้ AFP ปริมาณ 400 ไมโครกรัม สำหรับงานในระดับการวิเคราะห์ (analytical scale)

2) AFP ที่ใช้มีความแตกต่างกันทางสปีชีส์

3) วิธีนี้ทำให้เกิดการสูญเสีย AFP ประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากบัฟเฟอร์ที่ใช้มีคุณสมบัติเป็นกรด pH 5.6

สรุปการแยก H-AFP จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับให้บริสุทธิ์ จำเป็นต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนคือ ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ต้องทำการกำจัดเศษเซล และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พร้อมทั้งกำจัดไขมันโดยการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่าง โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดสัมพรรคภาพ ด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการกำจัดอัลบูมินได้มาก ต่อมาจึงกำจัดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ในการแยก H-AFP จำเป็นต้องผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดอัลบูมินที่หลงเหลืออยู่ออกไปได้หมด จากนั้นนำสารที่ได้มาผ่านการแยก H-AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธี anion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 สามารถแยก AFP ได้บริสุทธิ์ถึง 339 เท่า

การประเมินคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่เตรียมได้ โดยนำ H-AFP ที่เตรียมได้นี้ฉีดกระตุ้นหนูทดลอง หลังจากการกระตุ้นครั้งที่ 2 นาน 5 วัน สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ AFP ในซีรัมหนูได้ เมื่อนำแอนติบอดีนี้ไปทำปฏิกิริยาแอนติเจนแอนติบอดีโดยวิธี ELISA กับสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ส่วนที่ 3 (ขั้นตอน 4.2.3) คอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 1 และ 3 (ขั้นตอน 4.2.4) และคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ขั้นตอน 4.2.5.4) พบว่าแอนติบอดีต่อ AFP ในซีรัมหนูซึ่งเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี สามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารทุกขั้นตอน และยังทำปฏิกิริยาได้สูงกับ AFP มาตรฐานทั้ง 2 ชนิด (คือ AFP ซื้อจากบริษัท Dako เตรียมได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ และ AFP ที่ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Morinaga ซึ่งเตรียมจากน้ำคร่ำ) แสดงว่า H-AFP ที่เตรียมได้นี้มีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่ดี เพราะสามารถกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีได้

เมื่อทำการทดสอบกับโมโนโคลนแอนติบอดี จำนวน 7 โคลน ได้แก่ 2/9E , 2/2F , 5/3B , 3/5H , 4/3E , 5/12G และ 5/12D ซึ่งได้จากการใช้ H-AFP (ชนิดที่แยกได้จากขั้นตอน 4.2.5.4) กระตุ้น พบว่า 2/9F สามารถทำปฏิกิริยาได้สูงกับ AFP ชนิดแยกได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (Dako) เพียงอย่างเดียว 5/12D ทำปฏิกิริยากับ AFP ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับและจากน้ำคร่ำ (Morinaga) แต่ทั้ง 2 โคลนนี้ทำปฏิกิริยากับ AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ต่ำแต่การสรุปผลนี้ต้องรอการทดลองซ้ำ เพราะอาจเกิดได้เนื่องจากสารที่ใช้มีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่ จึงขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 5 โคลน (2/2F , 3/5B , 3/5H , 4/3E และ 5/12G) ไม่ทำปฏิกิริยากับ AFP มาตรฐานทั้ง 2 โคลน แต่ทำปฏิกิริยากับ AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ แอนติบอดีทั้ง 5 โคลนนี้อาจทำปฏิกิริยากับ AFP ที่อิพิโทป ต่างจากAFP มาตรฐานซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

จากการที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้นี้ไม่มีโคลนใดทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน เป็นการยืนยันว่า H-AFP ที่เตรียมได้นี้ไม่มีการปนเปื้อนของอัลบูมิน ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้สามารถหาขั้นตอนที่เหมาะสมในการแยกและทำ AFP จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับให้ปลอดอัลบูมินได้โดยการผ่านขั้นตอนการแยกด้วยวิธีแอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี ที่ใช้คอลัมน์ ซิบาครอน บลู เจล คอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส และการแยกวิธี anion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 เป็นลำดับสุดท้าย