บทที่ 1

บทนำ

ประวัติการค้นพบ

แอลฟา-ฟีโตโปรตีน (alpha-fetoprotein ; AFP) เป็นสารที่พบครั้งแรกในซีรัมลูกวัว โดย Pederson เมื่อ ค.ศ.1944 ต่อมาในปี ค.ศ.1956 Bergstrand และ Czar พบสารนี้ในซีรัมทารกขณะแยกอัลบูมิน (albumin) และแอลฟา-โกลบูลิน (α-globulin) โดยวิธีเปเปอร์อีเล็กโตรโฟลีซิส (paper electrophoresis) จึงตั้งชื่อว่า แอลฟา-ฟีโตโปรตีน (อ้างถึงโดย Ruoslahti and Seppala , 1971) และในปี ค.ศ.1966 Gitlin และ Boesman พบว่า AFP ผลิตขึ้นในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขณะเป็นตัวอ่อนระยะพัฒนาประมาณ 6 สัปดาห์

การตรวจ AFP ครั้งแรกพิสูจน์พบด้วยวิธีอิมมูโนอิเลคโตรโฟรีซีส (immunoelectrophoresis) และ เรดิโอออโตกราฟี (radioautography) พบว่า AFP ส่วนใหญ่ถูกผลิตโดยเซลเยื่อหุ้มไข่แดง (yolk sac) และเซลตับ (liver) ปกติระยะเป็นตัวอ่อนและหลังคลอด 6 เดือน ส่วนเซลท่อทางเดินอาหารผลิตได้บ้างแต่ปริมาณน้อย (Gitlin , Perricelli and Gitlin , 1972) AFP ที่เซลตับ และเซลเยื่อหุ้มถุงไข่แดงผลิตขึ้นจะสะสมมากในซีรัมและน้ำคร่ำจนสามารถตรวจพบได้ระยะที่เป็นทารกในครรภ์อายุ 12-14 สัปดาห์ คือประมาณ 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อคลอดออกมาแล้วการผลิตจะลดลงเหลือประมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะลดลงต่ำสุดเมื่ออายุได้ 1-2 ปี คือประมาณ 4-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Ruoslahti and Seppola , 1979)

ความสัมพันธ์กับมะเร็งตับและมะเร็งชนิดอื่นๆ

ในปี 1965 Tatarinov พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) มีปริมาณ AFPสูงอย่างเด่นชัด และยังพบปริมาณสูงได้ในผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอด ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้ใหญ่ หลอดลม embryonal cell carcinoma และ teratocarcinoma ซึ่งเกิดบ่อยที่บริเวณอัณฑะหรือรังไข่ (Yoshimoto et al. , 1987 ; Bellet et al. , 1984) จากปรากฏการณ์ที่พบว่า AFP มีการสะสมสูงในผู้ป่วยเป็นมะเร็งดังกล่าวข้างต้น AFP จึงถูกใช้เป็นสารช่วยวินิจฉัยมะเร็ง ที่เรียกว่า tumor marker โดยเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยมะเร็งตับ ซึ่ง AFP จะมีปริมาณสูงอย่างเด่นชัด

AFP ของผู้ใหญ่ (adult) คนไทยปกติซึ่งตรวจหาด้วยวิธี RIA พบว่าอยู่ในช่วง0-28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ย ± 2 SD ประมาณ 5.87 ± 10.48 ค่าปกติจึงอยู่ต่ำกว่า 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าที่มากกว่า 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถือว่าผิดปกติ (จงรักษ์ เพิ่มมงคล และ เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล , 2522)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าของ AFP กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ (HBV)

จากข้อมูลผู้ป่วยโรคมะเร็งตับภาคเหนือของประเทศไทย ผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีค่า HBsAg เป็นบวก (ร้อยละ 43.24) มีระดับ AFP ระหว่าง 174-96,960 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีค่า anti HBs เป็นบวก (ร้อยละ 16.21) พบ AFP 174-9,241 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยที่มีค่า anti HBc เป็นบวก (ร้อยละ 27.02) มีระดับ AFP 212-87,870 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มะเร็งตับที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (ร้อยละ 13.53) จะมีระดับ AFP ระหว่าง 287-960 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ข้อมูลเหล่านี้ดูเหมือนจะแสดงว่า ระดับ AFP จะสูงเมื่อเป็นมะเร็งตับชนิดติดเชื้อไวรัสตับอักเสบร่วมด้วย ระดับ AFP จะเพิ่มสูงขึ้นตามขนาดการโตของก้อนมะเร็ง และจะลดต่ำลงระดับหนึ่งเมื่อตัดก้อนมะเร็งออก แต่จะไม่ลดต่ำลงจนเป็นศูนย์ (กรรณิการ์ พรพัฒน์กุล ,

2529) อย่างไรก็ตามผู้ป่วยโรคตับชนิดอื่นๆ เช่น โรคตับอักเสบชนิดบีแบบเรื้อรัง และตับอักเสบชนิดเฉียบพลัน โรคตับแข็ง สามารถตรวจพบ AFP ได้ในระดับ 100-3,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปัญหาในการที่จะใช้ผลการค่า AFP เพื่อใช้วินิจฉัยแยกออกจากผู้ป่วยมะเร็งตับระยะเริ่มเป็น ซึ่งก้อนมะเร็งยังเล็กหรือตรวจไม่พบ

หน้าที่และคุณสมบัติของ AFP

AFP มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเคลื่อนย้าย (transport) กรดไขมัน โดยเฉพาะ arachidonic acid ระยะทารกซึ่งเซลตับ (hepatocytes , parenchymal liver cell) ระยะนี้เพิ่มจำนวนอย่างมาก (Sato et al. , 1994) AFP มีคุณสมบัติผ่านรกได้ จึงทำให้สตรีที่ตั้งครรภ์มีปริมาณ AFP ในเลือดสูงขึ้น (อ้างถึงโดย Gitlin และ Boesman , 1966)

กลไกที่หน้าสนใจของ AFP อีกหน้าที่หนึ่ง คือการที่สามารถกดปฏิกริยาภูมิคุ้มกันมะเร็งได้ จึงเป็นที่เชื่อกันว่า AFP ระยะเป็นตัวอ่อนอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับการกดภูมิคุ้มกันของมารดาต่อทารกในครรภ์ ผลงานของOers , Cohen และ Murgita (1989) พิสูจน์ว่า AFP จากน้ำคร่ำหนูซึ่งมี 7 ชนิด และพบว่ามีเพียงชนิดเดียวที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกัน

ส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมีของ AFP

AFP เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 65,000 ถึง 70,000 ดาลตัน โครงสร้างเป็นโพลีเพพไทด์สายเดียว จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยอาศัยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ โดย Morinaga และคณะ (1983) พบว่า AFP ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 600 โมเลกุล (ดังรูปที่ 1) ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของ AFPประกอบด้วย hexose , hexosamine และ sialic acid ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (Ruoslahti and Seppola , 1971) โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต จับกับกรดอะมิโน โดยมี เอ็น-อะซีติลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine ; Glc NAC) เชื่อมต่อกับ

```
                                                                                                                    AT   (21)
                                        -19                                 -10                                     -1
                                        met lys trp val glu ser ile phe leu ile phe leu leu asn phe thr glu ser arg
ATTGTGCTTCCACCACTGCCAATAACAAAATAACTAGCAACC  ATG AAG TGG GTG GAA TCA ATT TTT TTA ATT TTC CTA CTA AAT TTT ACT GAA TCC AGA   (101)

1                                      10                                      20                                      30
thr leu his arg asn glu tyr gly ile ala ser ile leu asp ser tyr gln cys thr ala glu ile ser leu ala asp leu ala thr ile
ACA CTG CAT AGA AAT GAA TAT GGA ATA GCT TCC ATA TTG GAT TCT TAC CAA TGT ACT GCA GAG ATA AGT TTA GCT GAC CTG GCT ACC ATA   (191)

31                                     40                                      50                                      60
phe phe ala gln phe val gln gln ala thr tyr lys gln val ser lys met val lys asp ala leu thr ala ile glu lys pro thr gly
TTT TTT GCC CAG TTT GTT CAA CAA GCC ACT TAC AAG CAA CTA AGC AAA ATG GTG AAA GAT GCA TTG ACT GCA ATT GAG AAA CCC ACT GGA   (281)

61                                     70                                      80                                      90
asp gln gln ser ser gly cys leu glu asn glu leu pro ala phe leu glu glu leu cys his glu lys glu ile leu glu lys tyr gly
GAT CAA CAG TCT TCA GGG TGT TTA GAA AAC GAG CTA CCT GCC TTT CTG GAA GAA CTT TGC CAT GAG AAA CAA ATT TTG GAG AAG TAC GGA   (371)

91                                     100                                     110                                     120
his ser asp cys cys ser gln ser gln glu gly arg his asn cys phe leu ala his lys lys pro thr pro ala ser ile pro leu phe
CAT TCA GAC TGC TGC AGC CAA AGT CAA GAG GGA AGA CAT AAC TGT TTT CTT GCA CAC AAA AAG CCC ACT CCA GCA TCG ATC CCA CTT TTC   (461)

121                                    130                                     140                                     150
glu val pro glu pro val thr ser cys glu ala tyr glu glu asp arg glu thr phe met asn lys phe ile tyr glu ile ala arg arg
GAA GTT CCA GAA CCT GTC ACA AGC TGT GAA GCA TAT GAA CAA GAC AGG GAG ACA TTC ATG AAC AAA TTC ATT TAT GAG ATA GCA AGA AGG   (551)

151                                    160                                     170                                     180
his pro phe leu tyr ala pro thr ile leu leu trp ala ala arg tyr asp lys ile ile pro ser cys cys lys ala glu asn ala val
CAT CCC TTC CTG TAT GCA CCT ACA ATT CTT CTT TGG GCT GCT CGC TAT GAC AAA ATA ATT CCA TCT TGC TGC AAA GCT GAA AAT GCA GTT   (641)

181                                    190                                     200                                     210
glu cys phe gln thr lys ala ala thr val thr lys glu leu arg glu ser ser leu leu asn gln his ala cys ala val met lys asn
GAA TGC TTC CAA ACA AAG GCA GCA ACA GTT ACA AAA GAA TTA AGA GAA AGC AGC TTG TTA AAT CAA CAT GCA TGT GCA GTA ATG AAA AAT   (731)

211                                    220                                     230                                     240
phe gly thr arg thr phe gln ala ile thr val thr lys leu ser gln lys phe thr lys val asn phe thr glu ile gln lys leu val
TTT GGG ACC CGA ACT TTC CAA GCC ATA ACT GTT ACT AAA CTG AGT CAG AAG TTT ACC AAA GTT AAT TTT ACT GAA ATC CAG AAA CTA GTC   (821)

241                                    250                                     260                                     270
leu asp val ala his val his glu his cys cys arg gly asp val leu asp cys leu gln asp gly glu lys ile met ser tyr ile cys
CTG GAT GTG GCC CAT GTA CAT GAG CAC TGT TGC AGA GGA GAT GTG CTG GAT TGT CTG CAG GAT GGG GAA AAA ATC ATG TCC TAC ATA TGT   (911)

271                                    280                                     290                                     300
ser gln gln asp thr leu ser asn lys ile thr glu cys cys lys leu thr thr leu glu arg gly glu cys ile ile his ala glu asn
TCT CAA CAA GAC ACT CTG TCA AAC AAA ATA ACA GAA TGC TGC AAA CTG ACC ACG CTG GAA CGT GGT GAA TGT ATA ATT CAT GCA GAA AAT   (1001)

301                                    310                                     320                                     330
asp glu lys pro glu gly leu ser pro asn leu asn arg phe leu gly asp arg asp phe asn gln phe ser ser gly glu lys asn ile
GAT GAA AAA CCT GAA GGT CTA TCT CCA AAT CTA AAC AGG TTT TTA GGA GAT AGA GAT TTT AAC CAA TTT TCT TCA GGG GAA AAA AAT ATC   (1091)

331                                    340                                     350                                     360
phe leu ala ser phe val his glu tyr ser arg arg his pro gln leu ala val ser val ile leu arg val ala lys gly tyr gln glu
TTC TTG GCA AGT TTT GTT CAT GAA TAT TCA AGA AGA CAT CCT CAG CTT GCT GTC TCA GTA ATT CTA AGA GTT GCT AAA GGA TAC CAG GAG   (1181)

361                                    370                                     380                                     390
leu leu glu lys cys phe gln thr glu asn pro leu glu cys gln asp lys gly glu glu glu leu gln lys tyr ile gln glu ser gln
TTA TTG GAG AAG TGT TTC CAG ACT GAA AAC CCT CTT GAA TGC CAA GAT AAA GGA GAA GAA GAA TTA CAG AAA TAC ATC CAG GAG AGC CAA   (1271)

391                                    400                                     410                                     420
ala leu ala lys arg ser cys gly leu phe gln lys leu gly glu tyr tyr leu gln asn ala phe leu val ala tyr thr lys lys ala
GCA TTG GCA AAG CGA AGC TGC GGC CTC TTC CAG AAA CTA GGA GAA TAT TAC TTA CAA AAT GCG TTT CTC GTT GCT TAC ACA AAG AAA GCC   (1361)

421                                    430                                     440                                     450
pro gln leu thr ser ser glu leu met ala ile thr arg lys met ala ala thr ala ala thr cys cys gln leu ser glu asp lys leu
CCC CAG CTG ACC TCG TCG GAG CTG ATG GCC ATC ACC AGA AAA ATG GCA GCC ACA GCA GCC ACT TGT TGC CAA CTC AGT GAG GAC AAA CTA   (1451)

451                                    460                                     470                                     480
leu ala cys gly glu gly ala ala asp ile ile ile gly his leu cys ile arg his glu met thr pro val asn pro gly val gly gln
TTG GCC TGT GGC GAG GGA GCC GCT GAC ATT ATT ATC GGA CAG TTA TGT ATC AGA CAT GAA ATG AGT CCA GTA AAC CCT GGT GTT GGC CAG   (1541)

481                                    490                                     500                                     510
cys cys thr ser ser tyr ala asn arg arg pro cys phe ser ser leu val val asp glu thr tyr val pro pro ala phe ser asp asp
TGC TGC ACT TCT TCA TAT GCC AAC AGG AGG CCA TGC TTC AGC AGC TTG GTG GTG GAT GAA ACA TAT GTC CCT CCT GCA TTC TCT GAT GAC   (1631)

511                                    520                                     530                                     540
lys phe ile phe his lys asp leu cys gln ala gln gly val ala leu gln thr met lys gln glu phe leu ile asn leu val lys gln
AAG TTC ATT TTC CAT AAG GAT CTG TGC CAA GCT CAG GGT GTA GCG CTG CAA ACG ATG AAG CAA GAG TTT CTC ATT AAC CTT GTG AAG CAA   (1721)

541                                    550                                     560                                     570
lys pro gln ile thr glu glu gln leu glu ala val ile ala asp phe ser gly leu leu glu lys cys cys gln gly gln glu gln glu
AAG TTC ATT TTC CAT GAG GAA CAA CTT GAG GCT GTC ATT GCA GAT TTC TCA GGC CTG TTG GAG AAA TGC TGC CAA GGC CAG GAA CAG GAA   (1811)

571                                    580                                     590
val cys phe ala glu glu gly gln lys leu ile ser lys thr arg ala ala leu gly val ter
GTC TGC TTT GCT GAA GAG GGA CAA AAA CTG ATT TCA AAA ACT CGT GCT GCT TTG GGA GTT TAA  ATTACTTCAGGGGAAGAGAAGACAAAACGAGTCT   (1908)

TTCATTCGGTGTGAACTTTTCTCTTTAATTTTAACTGATTTAACACTTTTTGTGAATTAATGAAATGATAAAGACTTTTATGTGAGATTTCCTTATCACAGAAATAAAATATCTCCAAA   (2027)

TG(A) 19 (2000)
```

รูปที่ 1 ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ AFP ตามผลของการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน mRNA

(ที่มาจาก Morinaga et al. ; 1983 Proc Natl. Acad. Sci. USA vol 80 , 4604-4608)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอสพาราจีน (asparagine) โครงสร้างทางเคมีและขนาดของ AFP คล้ายคลึงกับอัลบูมิน (albumin) จากการศึกษาของ Ruoslahti และ Pihko (1975) โดยนำ AFP ไปทำปฏิกริยากับ cyanogen bromide แล้วแยกโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส สามารถแยก AFP ออกได้เป็นเพพไทด์ 7 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกันดังนี้คือ 23,000 , 12,000 , 9,000 , 8,000 , 6,500 , 4,000 และ 3,500 ดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของ AFP ส่วนที่เป็นเพพไทด์สายที่ 1 และ 2 กับอัลบูมิน พบว่า AFP มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับอัลบูมินประมาณ 37-45 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า AFP และอัลบูมินมีแหล่งกำเนิดมาจากที่เดียวกัน จึงมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกัน จะต่างกันที่อัลบูมินไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ และมีส่วน N-terminal ที่แตกต่างกันเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 1 (Ruoslahti and Terry , 1976 ; Ruoslahti and pihko , 1975) การที่ AFP มีโครงสร้างบางส่วนเหมือนกับอัลบูมิน ทำให้พบว่า แอนติบอดีต่อ AFP ของคนชนิดโพลีโคลน (polyclone) ที่เตรียมจากกระต่ายสามารถทำปฏิกริยากับอัลบูมินได้ (เกิด cross-reaction) (Ruoslahti and Engvall , 1976)

AFP จากน้ำคร่ำและตับทารกมีขนาดโมเลกุล 70,000 และ 68,500 ตามลำดับ (Awgati , Gordon and Chard , 1978) AFP ที่ผลิตในระยะที่เป็นทารก (fetal AFP ; F-AFP) และ AFP ของผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับ (hepatoma AFP ; H-AFP) มีปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดใกล้เคียงกัน (ดังตารางที่ 2) ความแตกต่างของโครงสร้างในส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตพบว่า F-AFP มีแมนโนส (mannose ; man) และกาแลคโตส (galactos ; Gal) สูงกว่าชนิด H-AFP เล็กน้อย แต่ H-AFP มีกลูโคส (glucose ; Glu) เอ็นอะซิติลกลูโคซามีน และกรดไซอลิค (sialic acid) สูงกว่า F-AFP เล็กน้อย (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนในส่วนที่เป็น N-terminal และเพพไทด์สายที่ 1 และ 2 ของ AFP เปรียบเทียบ กับของอัลบูมิน

AFP N-terminal

1 5 10 15

S T L H R N Q Y G I A S A [L] D S Y X C — AFP-N-terminal 1-19

D A H K S E V A H R F K D [L] C E E N F — human albumin 1-19

peptide I

1 5 10 15 20 25

K N [F G] T [R] T [F] Q [A] I T [V] T K [L S Q] K [F] T [K] V X [F] T Z I — Q-AFP CNBr peptide I

Q K [F G] E [R] A [F] K [A] W A [V] A R [L S Q] R [F] P [K] A E [F] A E V — S-human albumin 203-231

peptide II

1 5 10 15 20 25

S [Y I C] S (Q) [Q D] T L [S] N [K] I T [E C] C K L T T [L E] R G Q S [I] — I-AFP CNBr peptide II

K [Y I C] Z B [Z B] S I [S] S [K] L K [E C] K E P C L [L E] K S H C [I] — A-human albumin 261-2

(Ruoslahti and Seppola , 1979)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ F-AFP , H-AFP และอัลบูมินจากซีรัม (โมล/โมล)

ชนิดของกรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน AFP						อัลบูมิน
	Aoyagi , Ikenaka and Ichida (1977)		Nishi (1970)		Ruoslahti and Seppola (1971)		
	F-AFP	H-AFP	F-AFP	H-AFP	F-AFP	H-AFP	
แอสพาราจีน	43	43	49	49	43	44	54
ทรีโอนีน	36	34	36	35	38	34	30
เซอรีน	38	35	37	36	34	39	22
กลูตามีน	84	96	110	104	92	101	83
โพรลีน	21	21	21	22	25	23	25
ไกลซีน	28	26	26	27	35	35	12
อลานีน	47	45	50	49	50	50	63
วาลีน	29	28	11	13	28	32	35
เมทธิโอนีน	7	8	4	6	6	7	6
ไอโซลิวซีน	30	28	25	26	33	30	8
ลิวซีน	53	51	53	54	58	54	61
ไทโรซีน	17	15	16	16	18	17	18
เฟนิลอลานีน	29	25	27	29	28	29	30
ทริพโตเฟน	1	2	2	2	ND	ND	1
ไลซีน	36	39	36	35	49	46	58
ฮีสติดีน	14	15	12	12	17	16	16
อาร์จินีน	18	20	17	17	20	21	23
รวม	559	559	559	561	605	613	584

ND = ไม่ได้ตรวจหา

ตารางที่ 3 ชนิดและสัดส่วนของคาร์โบไฮเดรตของ F-AFP และ H-AFP (โมล/โมล)

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	F- AFP	H- AFP
แมนโนส	4.5	3.5
แกแลคโตส	3.1	2.9
กลูโคส	1.9	3.3
เอ็นอะซิติลกลูโคซามีน	3	5.1
กรดไซอะลิค	1.5	2.2
รวม	14	17

(Aoyagi et al. , 1977)

AFP พบได้ทั้งในคนและสัตว์เลี้ยงต่างๆ เช่น กระต่าย หนู สุนัข สุกร แกะ วัว และไก่ ความคล้ายและความแตกต่างกันของ AFP ต่างสปีชีส์ แสดงไว้ในตารางที่ 4 การเกิดปฏิกริยา cross-reaction ระหว่าง AFP ของคนกับสัตว์มีความหลากหลายตามชนิดของสัตว์ และความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างที่มีมากน้อยแตกต่างกัน เช่น anti AFP ของคนที่เตรียมจากแกะ และแพะ สามารถทำปฏิกริยาได้ดีกับ AFP จากกระต่ายและวัว ส่วน anti AFP ของกระต่าย ที่เตรียมได้จากแกะทำปฏิกริยาสูงกับ AFP ของคน ส่วน anti AFP ของหนู (rat) ซึ่งเตรียมจากม้า กระต่ายและแพะ ทำปฏิกริยาได้ดีกับ AFP ของหนู (mouse) แต่ไม่ทำปฏิกริยากับ AFP ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ (Ruoslahti and Seppola , 1979)

AFP ของคนแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ yolk sac และ liver AFP ความแตกต่างพบได้ที่บริเวณโอลิโกแซคคาไรด์ คือ H-AFP มีปริมาณ free mannose มากกว่า และมีการเกิด fucosylation และ glucosylation ต่างกัน Chan และ Miao (1986) อาศัยคุณสมบัติที่ AFP ส่วนที่เป็น เบตา-แมนโนสจับกับเลคติน ชนิด คอนคานาวาลิน เอ (คอน เอ) เป็นเครื่องช่วยในการแยก H-AFP ซึ่งผสมอยู่ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ ออกจาก F-AFP ในน้ำคร่ำและมะเร็งชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่จะไม่ทำ

ตารางที่ 4 จำนวนกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของ AFP และ อัลบูมินของสัตว์สปีชีส์ต่างๆ

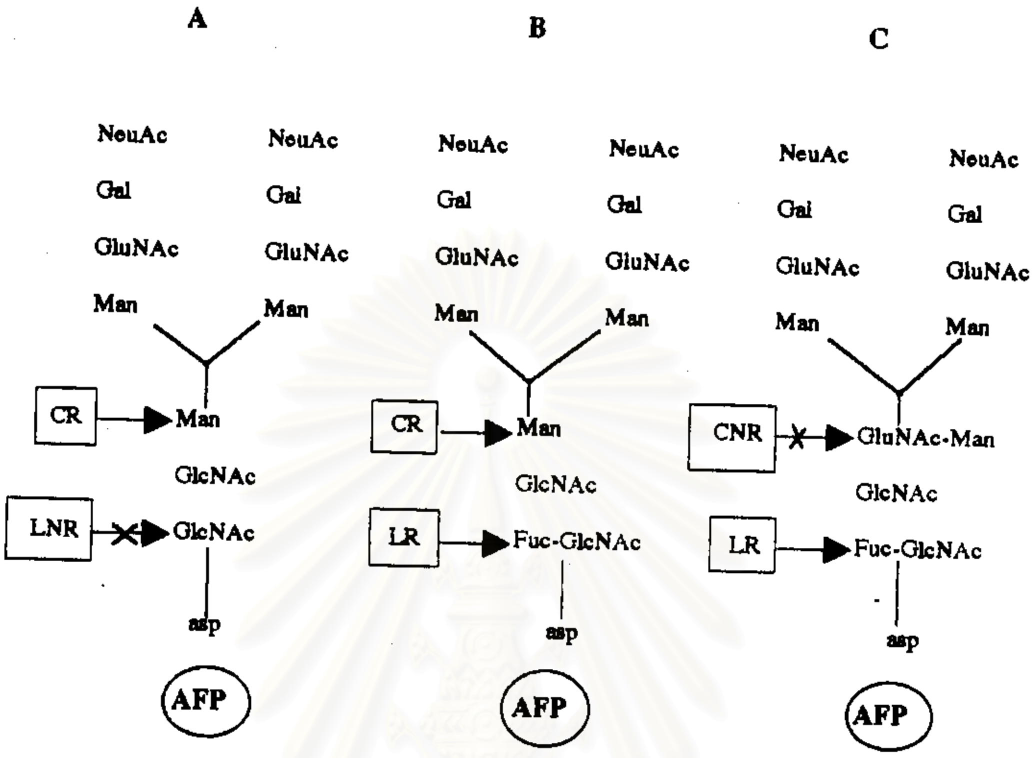
กรดอะมิโน	AFP									อัลบูมิน	
	คน	กระต่าย	หนู(rat)	หนู(mouse)	สุนัข	สุกร	วัว	แกะ	ไก่	วัว	คน
แอสพาราจีน	42	42	54	41	45	40	49	57	59	54	53
ทรีโอนีน	38	27	29	49	31	30	31	37	30	29	34
เซอรีน	33	30	34	33	45	44	32	49	40	23	28
กลูตามีน	92	83	92	83	97	101	91	87	95	83	78
โพรลีน	25	28	29	24	38	34	32	36	29	25	28
ไกลซีน	35	24	28	43	32	32	33	43	37	12	15
อลานีน	50	44	52	42	47	49	40	43	40	63	46
ซีสตีอีน	28	30	31	23	22	28	24	12	33	35	35
วาลีน	31	27	24	26	30	34	35	47	32	39	36
เมทไทโอนีน	6	9	13	9	5	10	5	5	6	6	4
ไอโซลิวซีน	33	35	28	30	28	21	34	26	48	60	61
ลิวซีน	58	63	59	62	53	59	53	55	14	18	19
ไทโรซีน	18	18	13	10	17	17	16	16	23	30	26
เฟนิลอลานีน	28	28	23	26	26	26	23	26	43	58	59
ไลซีน	49	51	48	48	41	36	40	36	17	16	17
ฮีสติดีน	17	23	19	17	13	12	15	14	24	22	23
อาร์จีนีน	20	31	21	23	26	28	26	22	24	22	23
ทริฟโตเฟน	2	ND	1	3	2	ND	ND	ND	ND	1	2
น้ำตาล											
แมนโนส	3		6								
แกแลคโตส	3		6								
เอ็นอะซิติลกลูโคซามีน	5		8								
กรดไซอะลิก	2-3		4-6								

(Ruoslahti and Seppala , 1979)

ปฏิกริยากับคอน เอ H-AFP ที่แยกได้จากซีรัมผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับมีสัดส่วนทำปฏิกริยากับคอน เอ ประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ AFP ชนิดที่สร้างจากเซลเยื่อหุ้มถุงไข่แดงจะมี เอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน มาเชื่อมต่อกับ เบตา-แมนโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลตำแหน่งที่ 3 ของแกน ทำให้ขัดขวางกับการจับกับคอน เอ การศึกษาหรือตรวจหา AFP โดยอาศัยเลคตินชนิดอื่น กระทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติแตกต่างทางองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต เช่นเดียวกับคอน เอ เช่น AFP ที่มีฟิวโคส (fucose ; Fuc) ที่จับกับเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน สามารถทำปฏิกริยากับ lentil lectin ซึ่งพบว่า H-AFP ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกริยากับ lentil lectin ได้เช่นกัน โดยสรุป AFP จากผู้ป่วยมะเร็งตับ (hepatic tumors) และจากโรคตับทั่วไปที่ไม่ใช่มะเร็ง (benign liver disease) ทำปฏิกริยาได้กับคอน เอ ขณะที่ AFP จากมะเร็งถุงไข่แดง (yolk sac tumors) และ จากมะเร็งตับทำปฏิกริยาได้กับเลคตินดังแสดงในรูปที่ 2

AFP ของคนจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของค่า pI ได้แก่ กลุ่มที่มีค่า pI 4.85 และ 5.2 AFP ทั้ง 2 กลุ่มนี้สามารถพบได้ทั้งในซีรัมคนไข้ที่ป่วยเป็นมะเร็งตับ และซีรัมของทารก (F-AFP) (Alpert et al. , 1972)

Smith , Morris และ Kelleher (1977) พบว่า AFP จากซีรัมหนูอายุ 4 สัปดาห์แรกหลังคลอด AFP จากหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งตับระยะเริ่มแรก (primary hepatomas) และระยะลุกลาม (transplantable hepatomas) สามารถทำปฏิกริยากับคอน เอ ได้แตกต่างกันคือ AFP จากหนูแรกคลอด เป็นชนิดที่ไม่ทำปฏิกริยากับคอน เอ ประมาณ 42 ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ AFP จากซีรัมหนูที่เป็นมะเร็งตับระยะเริ่มแรกไม่ทำปฏิกริยากับคอน เอ ระหว่าง 11 ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วน AFP จากซีรัมหนูที่เป็นมะเร็งตับระยะลุกลามแล้วการปรากฏของ AFP ชนิดทำปฏิกริยากับคอน เอ



รูปที่ 2 โครงสร้าง AFP ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งทำปฏิกริยากับเลคติน

A	=	AFP โรคตับที่ไม่ใช่มะเร็ง (benign liver disease)
B	=	AFP มะเร็งตับ (hepatic tumors)
C	=	AFP มะเร็งที่เกิดจากเซลหุ้มถุงไข่แดง (yolk sac tumors)
CR	=	ส่วนที่ทำปฏิกริยากับ Con A
CNR	=	ส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยากับ Con A
LR	=	ส่วนที่ทำปฏิกริยากับ lentil lectin
LNR	=	ส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยากับ lentil lectin

(Sell , 1990)

ในสัดส่วนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับลักษณะของมะเร็งตับ และความเข้มข้นของ AFP รวมทั้งโปรตีนในซีรัม โดยพบว่ายิ่งระยะของการเป็นมะเร็งยิ่งนานมากขึ้นเท่าไรปริมาณ AFP ที่จะทำปฏิกิริยากับคอน เอ จะมากขึ้นเท่านั้น ต่อมา Buamah ,Cornell และ Skellen (1984) พบว่า AFP ของคนที่ป่วยเป็น germ cell tumors ทำปฏิกิริยากับคอน เอ น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ที่น่าสนใจคือ AFP ของผู้ป่วยมะเร็งตับระยะแรกทำปฏิกิริยากับ คอน เอ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Chan และ Miao (1986) พบว่า ในซีรัมคนเป็นมะเร็งตับ มะเร็งอัณฑะ และโรคตับทั่วไป (nonmalignant liver deseases) มีปริมาณ AFP ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคอน เอ 13.4 , 62.2 และ 8.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การแยก AFP

AFP ตรวจพบได้จาก น้ำคร่ำ ตับ และเลือดทารก เลือดคนไข้ น้ำในช่องท้อง (ascites) ของผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับ และตัวก้อนมะเร็งตับ การแยก AFP แต่เดิมนิยมแยกจากน้ำคร่ำและเลือดผู้ป่วย เนื่องจากมี AFP ปริมาณสูง และหาได้ง่าย ส่วนการสกัดแยก AFP จากเนื้อเยื่อมักใช้กับสัตว์ เช่นหนูเป็นส่วนใหญ่

การแยก AFP ให้บริสุทธิ์ ระยะแรกเริ่มใช้เทคนิคทาง physiochemical ร่วมกับ immunochemical เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ต่อมาใช้เทคนิคทาง immunofiltration , immunoprecipitation , ion exchange chromatography และ isoelectic focusing ปัญหาสำคัญประการแรกในการแยก AFP คือการกำจัดอัลบูมินและโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง ที่ปนอยู่ในซีรัมออก โดยเฉพาะอัลบูมินซึ่งสร้างปัญหามากเพราะมีคุณสมบัติทางเคมี และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ AFP การแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติที่อัลบูมินไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะทำให้อัลบูมินไม่ทำปฏิกิริยากับคอน เอ ดังนั้น Smith และ

Kelleher (1973) จึงทำการแยกอัลบูมินออกจาก AFP โดยใช้เทคนิค concanavalin A affinity chromatography ต่อมาปี ค.ศ.1976 Twoney และ Sweet ใช้วิธี immuno absorption โดยใช้ anti albumin ซึ่งเตรียมได้จากกระต่ายเป็นตัวดูดซับอัลบูมินที่เหลือตกค้างจากการแยกโดยวิธี concanavalin A affinity chromatography วิธีนี้มีข้อจำกัดในการใช้คือต้องใช้คอลัมน์ขนาดใหญ่ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และเกิดปัญหาเนื่องจากคุณภาพของแอนติบอดีที่ใช้ ในปี ค.ศ. Travis และคณะ แยกอัลบูมินออกจากซีรั่มโดยใช้วิธี cibacron blue sepharose chromatography สามารถกำจัดอัลบูมินได้สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติที่ อัลบูมินสามารถจับกับสี cibacron blue F-3-GA แต่ AFP ซึ่งมีโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ จึงเป็นสาเหตุขัดขวางการทำปฏิกริยากับสี cibacron blue F-3-GA ทำให้ AFP หลุดรอดพ้นการถูกจับโดยคอลัมน์ เทคนิคนี้ทำให้การแยกอัลบูมินจากซีรั่มตัวอย่างเพื่อแยก AFP หมดปัญหาไปประดับหนึ่ง

การแยก AFP ทั้งชนิดของคนและสัตว์ เช่น หนู และ วัว มีผู้ทำการศึกษากันมาก Young , Reid และ Crawford (1976) แยก AFP จากซีรั่มที่ได้จากรก โดยวิธีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ ion exchange ซึ่งใช้คอลัมน์ DEAE cellulose (Whatman DE 52) และชะด้วยโซเดียมคลอไรด์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง โดยแบ่งการแยกออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกชะคอลัมน์โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0.01 โมลาร์ (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.01 โมลาร์pH 7.8) ถึงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5) ในอัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ขั้นตอนที่ 2 ทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ช้ากว่าครั้งแรก โดยเพิ่มปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์จาก 200 มิลลิลิตร เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกอัลบูมินออกโดยวิธี immunoadsorbent การ

ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้โดยวิธี immunoelectrophoresis และ polyacrylamide gel electrophoresis วิธีนี้แยก AFP ได้ 62.2 เปอร์เซ็นต์

ต่อมา Awquti , Gordon และ Chard (1978) แยก AFP จากน้ำคร่ำ และตับทารกที่ได้จากการแท้ง โดยมีขั้นตอนการแยกแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ gel filtration เพื่อแยกฮีโมกลอบูลิน (haemoglobulin) ซึ่งมีปะปนอยู่มากโดยเฉพาะในเนื้อเยื่อ และแยกสารที่มีค่า isoelectric point ใกล้เคียงกันออก จากนั้นใช้วิธี ion exchange chromatography (DEAE-cellulose ; DE52) ขั้นตอนที่ 3 ใช้วิธี affinity chromatography (concanavalin A sepharose 4B) เพื่อแยกเอาอัลบูมินออก ขั้นสุดท้ายใช้วิธี ion exchange chromatography (CM-cellulose) การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้ได้ AFP ประมาณ 25-37 เปอร์เซ็นต์ ข้อเสียของวิธีนี้ คือการทำ AFP ให้บริสุทธิ์โดยผ่านหลายๆขั้นตอนทำให้เกิดการสูญเสีย AFP สูงมาก โดยเฉพาะขั้นตอน gel filtration และ concanavalin A affinity chromatography นอกจากนี้ทำให้สูญเสีย AFP ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคอลัมน์คอน เอ (F-AFP)

ในปี 1978 Young และ Webb ทดลองแยก AFP จากน้ำคร่ำและซีรัมทารก วิธีที่ใช้ คือ หลังจากแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่างด้วยคอลัมน์ blue sepharose Cl-6B แล้ว ทำการแยก AFP โดยอาศัยค่า pI โดยวิธี chromatofocusing ที่ใช้ ampholyte displacement ในช่วง pH 4-6 ส่วนคอลัมน์ใช้ DEAE-cellulose (DE52) ด้วยวิธีนี้สามารถแยก AFP ได้ 7 ชนิด

Huse และคณะ (1983) แยก AFP จากเลือดที่ได้จากรก เนื้อเยื่อทารก (fetal meterial) ที่ได้จากการแท้ง วิธีที่ใช้ คือ ion exchange chromatography (DEAE-cellulose) ร่วมกับการใช้ cibacron blue-sepharose affinity chromatography การทดลองนี้แยก AFP ได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความบริสุทธิ์ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

Wanatabe และคณะ (1982) ใช้เทคนิค immunoadsorbent column chromatography โดยใช้ anti-AFP ได้จากกระต่าย อาศัยหลักการที่ว่า AFP ในซีรัมตัวอย่างจะทำปฏิกริยากับ anti-AFP และมีผลให้เกาะติดอยู่กับคอลัมน์ และสามารถชะล้างสารที่ไม่ต้องการอื่นๆที่ปะปนอยู่ในซีรัม ผ่านออกจากคอลัมน์ได้ง่าย การแยก AFP ใช้วิธีชะ AFP ออกด้วย ยูเรีย เข้มข้น 6.0 โมลาร์ pH 10.6 จากเทคนิคนี้แยก AFP ได้ปริมาณสูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์ AFP ที่ได้เป็นชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล 70,000 ดาลตัน และมีค่า pI 4.7 วิธีนี้แม้ว่าสามารถแยก AFP ได้สูง แต่ประสิทธิภาพในการแยกจะขึ้นกับคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ใช้จับ AFP ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ และตัวค้ำจุน (support material)

การแยก AFP ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีมีขั้นตอนการแยกที่แตกต่างออกไปดังรายงานของ Chudy และ Zigkovsky (1987) แบ่งขั้นตอนการแยก AFP จาก cord blood serum ออกเป็น 3 ขั้น ขั้นตอนแรกใช้ affinty chromatography ซึ่งใช้ activated CNBr-sepharose 4B ที่จับกับ anti-AFP ของคน ที่เตรียมจากแกะ หลังจากผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ ชะ AFP ออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ glycine HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 2.6 ขั้นตอนที่ 2 ใช้ blue sepharose Cl-4B แยกอัลบูมินแล้วกลับมาแยก AFP ด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส โดยใช้ methyl-alpha-D-glucopyranoside เป็นสารละลายในการชะคอลัมน์ วิธีนี้สามารถแยก AFP ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ การใช้วิธีการดังกล่าวนี้เพราะต้องการหลีกเลี่ยงการใช้ gel filtration ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เกิดการสูญเสีย AFP สูงมาก และเป็นการลดขั้นตอนการแยก AFP ให้สั้นลง เพื่อลดการสูญเสีย AFP แต่ผลที่ได้กลับมีการสูญเสีย AFP สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการสูญเสียส่วนใหญ่อยู่ที่ขั้นตอนแรก ซึ่งขึ้นกับประสิทธิภาพของแอนติบอดี และชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์ จากรายงานของ Wanatabe และคณะ (1982) การใช้บัฟเฟอร์ glycine-HCl สูญเสีย AFP ถึง 47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนขั้นตอนที่ 3

ทำให้สูญเสีย AFP ชนิดที่ไม่ทำปฏิกิริยากับคอน เอ คือ F-AFP ซึ่งมีโอกาสที่จะมีมากกว่า H-AFP ได้ กรณีที่เป็นสารตัวอย่างจากน้ำคร่ำ

เทคนิคที่ใช้วิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) ในการแยก AFP ปี ค.ศ.1985 Wong และ Xu ได้สกัดแยก AFP จากน้ำคร่ำและเนื้อเยื่อตัวอ่อนหนู (rat faetal homogenate) โดยแบ่งการสกัดออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นแรกแยกอัลบูมินออกก่อนด้วยวิธี cibacron blue gel affinity chromatography จากนั้นทำการแยก AFP ต่อโดยวิธี anion exchange high-performance liquid chromatography (HR5/5 Mono Q SI column) ขั้นตอนนี้ทำให้แยก AFP ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว

การแยก AFP จากน้ำคร่ำหนูด้วยวิธี antibody-agarose affinity chromatography จากนั้นนำ AFP ที่ได้มาแยกโดยวิธี fast protein liquid chromatography (FPLC) ที่มี Mono Q HR 16/10 (anion exchange) เป็นคอลัมน์ สามารถแยก AFP จากหนูออกได้เป็น 7 ชนิด ซึ่งมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.1 , 5.0 , 4.9 , 4.85 , 4.85 , 4.8 และ 4.7 ตามลำดับ และพบว่าจาก AFP ตั้งต้น 20 มิลลิกรัม สามารถแยก AFP ได้กลับคืนมา 5.2 มิลลิกรัม (Oers , et. al. , 1990)

Chen และคณะ (1984) ศึกษาระดับ AFP ในผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับระยะเริ่มต้น จำนวน 17 ราย ซึ่งมีขนาดมะเร็ง 1-3 เซนติเมตร และมี 1-4 ก้อน พบว่าผู้ป่วย 12 รายมีระดับ AFP อยู่ระหว่าง 20-3,850 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับต่ำกว่า 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 ราย จากการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยมะเร็งตับระยะเริ่มแรก ร้อยละ 35 ตรวจพบ AFP อยู่ในระดับปกติ โดยทั่วไปผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนใหญ่ (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์)จะมีระดับ AFP สูงมากในรายที่มีการลุกลามของมะเร็งมากแล้ว ทำให้การตรวจพบ AFP ในระยะนี้ไม่มีประโยชน์ในการรักษาให้

หายขาดได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจพบ AFP ในผู้ป่วยในขณะเริ่มเป็น จะทำให้การรักษาได้ผลดี

การปรับปรุงประสิทธิภาพการตรวจหา AFP (เป็นตัวบ่งชี้) เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยมะเร็งในระยะเริ่มแรก มีข้อมูลที่น่าสนใจดังนี้คือ

1. ผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับมักมี AFP ชนิดที่ทำปฏิกิริยากับคอน เอ (H-AFP) ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

2. ในปี ค.ศ.1989 Oers , Cohen and Murijita รายงานว่าสามารถแยก AFP ออกได้เป็น 7 ชนิด โดยวิธี ion exchange chromatography ด้วยเครื่อง FPLC (fast protein liquid chromatography)

3. การใช้ immuno affinity chromatography มีข้อเสียที่แอนติบอดีควบคุมไม่ได้ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ H-AFP ได้น่าจะแก้ไขปัญหานี้ได้

4. มักสูญเสีย AFP ระหว่างขั้นตอนเป็นจำนวนมาก

5. วิธีแยก AFP ของ Watanabe และคณะ (1982) น่าจะดีถ้ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ดีจำนวนหนึ่งในการใช้ทำ immunoadsorbent column chromatography ซึ่งต้องการแอนติเจนชนิด H-AFP ที่ถูกแยกออกไว้ได้อย่างชัดเจนก่อน ถ้าวิธีของ Oers และคณะ (1990) ใช้งานได้ย่อมทำให้ การผลิต anti-AFP ที่ดีได้ใกล้ความเป็นจริงมากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะแยก AFP ที่มีความจำเพาะต่อผู้ป่วยมะเร็งตับ โดยทำการแยก AFP จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ลำดับขั้นตอนการแยก AFP ที่กำหนดไว้มีดังนี้คือ ในขั้นตอนแรกเป็นการแยกอัลบูมินออกจากซีรัมด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลูเจล จากนั้นทำการแยกโปรตีนที่ไม่ต้องการ โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันเป็นหลัก กล่าว

คือ ใช้เทคนิค เจล ฟิลเตรชัน แล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนการแยก F-AFP ออกจาก H-AFP ด้วยคอลัมน์ คอน เอ เซฟฟาโรส ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการแยก H-AFP ตามชนิดของโครงสร้างโมเลกุลโดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 จากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของ AFP ที่แยกได้ด้วยวิธีเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส กับแมสสเปกโตโฟโตเมทรี และทดสอบสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่แยกได้โดยฉีดกระตุ้นหนูทดลอง เพื่อติดตามการสร้างแอนติบอดีต่อ AFP

วัตถุประสงค์การทำงานวิจัยนี้คือ

เพื่อศึกษาเทคนิคที่สะดวกและง่ายในการแยก AFP จากผู้ป่วยมะเร็งตับโดยเฉพาะชนิด H-AFP ที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด และยังมีความเป็นแอนติเจนที่ดี

ประโยชน์ซึ่งคาดว่าจะได้รับ

จะสามารถผลิต H-AFP ใช้ได้เองภายในประเทศ และสามารถเตรียมแอนติบอดีต่อ H-AFP เพื่อใช้ผลิตชุดตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ คือสามารถตรวจหาผู้ป่วยมะเร็งตับระยะเริ่มแรกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย