การทำให้บริสุทธิ์ของแอลฟา-ฟีโตโปรตีนจากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-927-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T174130094

PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN FROM SERUM OF HEPATOMA PATIENT

Mrs. Songjun Puthong

Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-634-927-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์ของแอลฟา-ฟีโตโปรตีนจากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ
โดย	นางทรงจันทร์ ภู่ทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. กิ่งกาญจน์ เสาหทัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

.....

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. กิ่งกาญจน์ เสาหทัย)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ ชิดารัตน์ เอกสิทธิกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทรงจันทร์ ภู่ทอง : การทำให้บริสุทธิ์ของแอลฟา-ฟีโตโปรตีนจากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ (PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN FROM SERUM OF HEPATOMA PATIENT) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.พญ.กิ่งกาญจน์ เลาหทัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 119 หน้า. ISBN 974-634-927-9

แอลฟา-ฟีโตโปรตีน (AFP) เป็นสารไกลโคโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโดยเซลเยื่อหุ้มถุงไข่แดง และเซลตับเป็นส่วนใหญ่ พบว่าในระยะที่เป็นตัวอ่อนและทารกหลังคลอด 6 เดือน จะมีการผลิต AFP ในปริมาณสูงในซีรัม หลังจากนั้นปริมาณการผลิต AFP จะลดลงจนเกือบตรวจไม่พบ แต่ผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับจะกลับมาตรวจพบได้ใหม่ในปริมาณที่สูง ดังนั้นการตรวจค่า AFP จึงเป็นประโยชน์ในการใช้ช่วยวินิจฉัยมะเร็งตับ

เนื่องจาก AFP ที่พบในระยะที่เป็นตัวอ่อน (Fetal AFP, F-AFP) และป่วยเป็นมะเร็งตับ (Hepatoma AFP, H-AFP) มีโครงสร้างบางส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน แต่การใช้ anti-AFP ทั่วไปที่มีขายอยู่ในท้องตลาดไม่สามารถวินิจฉัยมะเร็งตับระยะเริ่มเป็นได้ ข้อมูลเหล่านี้ทำให้เกิดข้อคิดว่าการแยก AFP สองกลุ่มนี้ออกจากกัน และนำมาใช้ผลิต anti-AFP น่าจะได้ anti-AFP ที่มีความจำเพาะจริง ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นสารแอนติบอดีประกอบการผลิตชุดช่วยวินิจฉัย เพื่อใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับระยะเริ่มเป็นได้ (ขณะที่ระดับ AFP ต่ำกว่า 200 นาโนกรัมต่อซีรัม 1 มิลลิลิตร)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีแยก AFP ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว โดยเฉพาะ H-AFP จากซีรัมผู้ป่วยเป็นมะเร็งตับ โดยอาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นหลัก การเตรียมสารตัวอย่าง เริ่มจากการนำซีรัมผู้ป่วยมากำจัดอัลบูมิน โดยผ่านคอลัมน์ ซิบาครอน บลูเจล และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200,000 ดาลตัน โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ตามลำดับ ขั้นตอนดังกล่าวนี้กำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนเริ่มต้น และยังคงมี AFP เหลืออยู่ 31 เปอร์เซ็นต์ของ AFP เริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.2 เท่า การแยก F-AFP ออกจาก H-AFP โดยผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส แยกสารได้เป็น 3 ส่วน ตามทฤษฎี ส่วนแรกเป็นส่วนที่คาดว่ามี F-AFP ส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่มี AFP ชนิดผสม และ lentil AFP และส่วนที่ 3 เป็นส่วนที่มี H-AFP ความบริสุทธิ์ของ AFP ทั้ง 3 ส่วน เป็น 3.5, 14.0 และ 33.4 เท่า ตามลำดับ ในขั้นสุดท้ายเมื่อนำส่วนที่ 3 มาแยก H-AFP โดยวิธี anion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 แยกได้ H-AFP ทั้งหมดประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ (ของ AFP เริ่มต้น) แต่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 339 เท่า H-AFP ที่แยกได้นี้ปราศจากการปนเปื้อนของอัลบูมิน และยังคงมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่ดี โดยสามารถกระตุ้นหนูทดลอง ให้ผลิตแอนติบอดีต่อ AFP ได้

ภาควิชา .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต ทรงจันทร์ ภู่ทอง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626847 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: PURIFICATION / α -FETOPROTEIN / HEPATOMA- α -FETOPROTEIN FETAL- α - FETOPROTEIN / AFP
SONGJUN PUTHONG : PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN FROM SERUM OF HEPATOMA PATIENT. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KINGKARN LAOHATHAI, M.D., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 119 pp. ISBN 974-634-927-9

Alpha-fetoprotein (AFP) is a glycoprotein containing about 4% carbohydrate. In normal condition it is mainly produced by liver cell and yolk sac. AFP is secreted and accumulated into serum and amniotic fluid at significant volume during fetus stage until 6 months, after birth. The production is then gradually fall to insignificant level in normal adult serum. AFP became significant again when one has gotten hepatoma or related cancers. Therefore, AFP is used as a tumour marker which is more popular by using immunodiagnostic form. However, anti-AFP, which is commonly used in diagnostic kits, has a limitation in providing an early diagnosis for hepatoma. Since AFP are classifiable into fetal, yolk sac, and hepatoma AFP, according to the sources and its carbohydrate compartment, the specificity of antibody, especially the monoclonal antibody type, is controllable by the purity of immunogen. By these reasons, the hepatoma AFP will provide the specificity which overcome the above-memtioned limitation.

The work done in this thesis puts the main effort on separating the hepatoma AFP from patients who carry hepatoma. The techniques were firstly tried to get rid of undesired proteins, especially the albumin and those are large molecules. From the first step about 95% of nonspecific proteins were cleaned-up. At this step the purity of AFP were of 31% yield which was countable with 8.2 fold. The second step was to separate the hepatoma AFP from fetal AFP by using the Con A-sepharose column. At this process AFP occurred in three dirrerent fractions. Theoretically, the first fraction was supposed to be fetal AFP. The second peak should has lentil AFP mixed with. The hepatoma AFP occurred lately as it is Con A bound AFP. The ratio of these AFP were 3.5, 14.0 and 33.4 fold, respectively. In the attemp to subseparate the hepatoma AFP by HPLC, for an anion exchange chromatography, the Mono Q 5/5 was used. According to this anion exchange chromatography, the purity of AFP was increased up to 339 fold. However, the volume was lost considerably to only 13% left. But the albumin was completely discarded from the sample. The separation was still preserved the antigenicity.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. กิ่งกาญจน์ เลาหทัย ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำ รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุดไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ชิดารัตน์ เอกสิทธิกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำอันมีคุณค่ายิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ ในการส่งวิเคราะห์สารตัวอย่าง ทางด้านแมสสเปกโตรเมทรี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ สุภาภรณ์ หิรัญรัศ ห้องอิมมูโนวิทยา โรงพยาบาล รามาธิบดี ที่ให้การอนุเคราะห์เก็บซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้ความรักและความเข้าใจอันเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งต่อผู้ทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณชัยยา ภู่ทอง คุณดวงแข นนท์ศรี และ คุณสายทอง จรรยา ที่ช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกาย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ในระหว่างการทำวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฏ
คำอธิบายคำย่อ.....ฑ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 วัสดุ อุปกรณ์ และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....19
3 วิธีการทดลอง
3.1 การวิเคราะห์ปริมาณ AFP ด้วยวิธี EIA.....23
3.2 การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง.....24
3.2.1 โดยวิธีอัลตราไวโอเลต สเปกโตรโฟโตเมทรี.....24
3.2.2 โดยวิธีแบรดฟอร์ด.....25
3.3 การตรวจหาอัลบูมินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน.....26
3.4 การสกัดแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แบบเพิ่มความเข้มข้นเป็นลำดับส่วน.....26
3.5 การแยกและทำ AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี.....27
3.5.1 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการแยก AFP ให้บริสุทธิ์.....27
3.5.2 การแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก AFP ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5.....34
3.5.2.2 การแยก F-AFP และ H-AFP โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5.....35
3.5.2.3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง(เริ่มต้น) ต่อความบริสุทธิ์ และปริมาณ H-AFP ที่แยกได้.....36
3.5.2.4 การแยก H-AFP ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ชะคอลัมน์ด้วยแอล-ฮีสติดีน.....36
3.6 การทดสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารต่างๆ ในสารตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ ของการทำ AFP ให้บริสุทธิ์.....37
3.6.1 โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส แบบเอสดีเอส.....37
3.6.2 โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....39
3.7 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่แยกได้.....39
3.7.1 การกระตุ้นหนูให้สร้าง anti-AFP.....40
3.7.2 วิธีทดสอบแอนติบอดีต่อ AFP ในซีรัมหนูโดยวิธีเอนไซม์ ลิงค์ อิมมูโนซอยเบนท์ เอสเสย์.....40
3.8 การศึกษาการทำปฏิกิริยาของ anti-AFP กับกับสารตัวอย่างที่เตรียมได้ ในแต่ละขั้นตอนการแยก AFP.....41
4 ผลการทดลอง
4.1 การแยก AFP โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเพิ่มความเข้มข้นเป็นลำดับส่วน.....43
4.2 การแยก และทำAFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี.....44
4.2.1 การแยกเศษเซลล์และสารตกตะกอนออกจากซีรัม.....44
4.2.2 การแยกอัลบูมินออกจากซีรัมโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ.....45
4.2.3 การแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200,000 ดาลตัน ออกจากสารตัวอย่างโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน.....48

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.4 การแยก F-AFP ออกจาก H-AFP โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี ด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส.....53
4.2.5 การแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดย HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5.....56
4.2.5.1 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม ในการชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง.....56
4.2.5.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ชนิดที่เหมาะสมในการแยก AFP.....60
4.2.5.3 การแยก F-AFP และ H-AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5.....64
4.2.5.4 การเพิ่มปริมาณสารตัวอย่างในการแยก H-AFP โดยวิธี HPLC.....69
4.2.5.5 การแยก H-AFP ซ้ำเพื่อแยก AFP ชนิดย่อยโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์Mono Q HR 5/5 และชะด้วยบัฟเฟอร์แอล-ฮิสติดีน.....73
4.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างที่สกัดได้ โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส.....75
4.4 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างโดยวิธีแมสสเปกโตเมทรี.....79
4.5 การตรวจหาอัลบูมินในสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอนการแยก AFP โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน.....87
4.6 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่เตรียมได้.....90
4.7 การทำปฏิกิริยาของ anti-AFP กับสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอน การแยก AFP.....91
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....94
รายการอ้างอิง.....104
ภาคผนวก.....111
ประวัติผู้เขียน.....119

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงลำดับกรดอะมิโนส่วนที่เป็น N-terminal และ เพพไทด์สายที่ 1 และ 2 ของ AFP เปรียบเทียบกับอัลบูมิน....6
2 การเปรียบเทียบจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ AFP ชนิดต่างๆ และอัลบูมินจากซีรัม....7
3 สัดส่วนคาร์โบไฮเดรตของ F-AFP และ H-AFP....8
4 จำนวนกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่เป็นสัดส่วนของ AFP และอัลบูมินจากสัตว์สปีชีส์ต่างๆ....9
5 ผลการแยก AFP โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ....44
6 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP ก่อนและหลังปั่นแยกเศษเซลตาย และสารตกตะกอนออกจากซีรัม....45
7 ความบริสุทธิ์ของ AFP ก่อนและหลังแยกอัลบูมินออกจากสารตัวอย่าง โดยวิธีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล....46
8 การเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP ที่ปรากฏใน peak ที่ 3 รูปที่ 5 ภายหลังผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ด้วยปริมาณสารตั้งต้นแตกต่างกัน....52
9 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP หลังผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ได้จากการแยก 28 ครั้ง....53
10 ลักษณะการปรากฏของ F-AFP และ H-AFP เมื่อแยกสารตัวอย่างโดยวิธี คอน เอ แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี....55
11 เปรียบเทียบ H-AFP ที่แยกได้เมื่อใช้สารเริ่มในปริมาณที่แตกต่างกัน ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....72
12 H-AFP ที่แยกได้โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 72
13 การแยก H-AFP ซ้ำโดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ระคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ 0-0.2 โมลาร์ ในแอล-ฮีสติดีนเข้มข้น 0.02 โมลาร์pH 5.6 75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14 การเปรียบเทียบส่วนประกอบโปรตีนที่พบได้จากขั้นตอนการเตรียม ระดับต่างๆ วิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส และวิธีแมสสเปกโตรโฟโตเมทรี.....86

15 การตรวจพบอัลบูมินในสารตัวอย่างที่แยกได้จากขั้นตอนต่างๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน.....88

16 ปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อ AFP (anti-AFP) ที่เกิดจากการใช้ AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัย.....89

17 ความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่แยกได้จากขั้นตอนต่างๆ.....93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ AFP คน และการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์บน RNA....4
2 โครงสร้าง AFP ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรดซึ่งทำปฏิกิริยากับ เลคติน....11
3 การแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่างด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล....47
4 การตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างหลังผ่านการแยกอัลบูมินและผ่านการแยก AFP ด้วย HPLC โดยวิธีแมสเปกโตรเมทรี....49
5 การปรากฏของโปรตีนและ AFP เมื่อแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200....50
6 ลักษณะการปรากฏของ F-AFP และ H-AFP เมื่อแยกโดยวิธีคอน เอ แอฟฟินิตีโครมาโทกราฟี....54
7 การปรากฏของ peak โปรตีน และ AFP แยกสารตัวอย่างจากขั้นตอน 4.2.3 โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....59
8 การปรากฏของ peak โปรตีนและ AFP แยกโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ใช้บัฟเฟอร์ แอล-ฮีสติดีน)....62
9 การปรากฏของ peak โปรตีนและ AFP แยกโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ใช้บัฟเฟอร์ TEA)....63
10 การแยก F-AFP (สารตัวอย่างส่วนที่ 1 จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....66
11 การแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 2 (จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....67
12 การแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 3 (จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....68
13 การแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 3 มีโปรตีน 920 ไมโครกรัม(จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....71
14 การแยก H-AFP จากสารตัวอย่างขั้นตอน 4.2.5.4 โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5....74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15 ลักษณะของแถบโปรตีนที่อยู่ในสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ ซิบาครอน บลู เจล และเซฟาเดกซ์ จี 200วิเคราะห์โดย วิธีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส.....77

16 ลักษณะของแถบโปรตีนที่อยู่ในสารตัวอย่างที่ได้จากการผ่านคอลัมน์คอน เอ และ คอลัมน์ MonoQ HR5/5วิเคราะห์โดยวิธีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส.....78

17 ลักษณะของโปรตีนขนาดต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี 200 วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....81

18 ลักษณะของโปรตีนขนาดต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 1 หลังผ่าน คอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....82

19 ลักษณะของโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 2 หลังผ่าน คอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....83

20 ลักษณะของโปรตีนขนาดต่างๆที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งคาดว่ามี H-AFP วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....84

21 ลักษณะของโปรตีนที่อยู่ในสารตัวอย่างหลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ขั้นตอน 4.2.5.4) วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี.....85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

AFP = แอลฟา-ฟีโตโปรตีน

BSA = โบวายซีรัมอัลบูมิน

CM = คาร์บอกซีเมทิล

DEAE = ไดเอทิลอะมิโนเอทิล

ELISA = เอ็นไซม์ ลิงค์เกด อิมมูโนซอบเบนท์ เอสเสย์

Ig = อิมมูโนโกลบูลิน

HPLC = ไฮเปอร์ ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

FPLC = ฟาสต์ โปรตีน ลิควิด โครมาโทกราฟี

M.W. = น้ำหนักโมเลกุล

Rf = การเคลื่อนที่สัมพัทธ์

PBS = ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย