การเตรียม แอนติเซรุ่ม สำหรับ เซรูโลพลาสมิน และ แฮปโตโกลบิน ของคน

นางจันทร์เพ็ญ บุญค้ำ

000318

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๐

THE PREPARATION OF ANTISERA TO HUMAN CERULOPLASMIN AND HAPTOGLOBIN

Mrs. Chanphen Boonkham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology.
Graduate School
Chulalongkorn University

1977

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)
คณบดี

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ .....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร จีรวงส์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิสวาท ทุติยะโพธิ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุมนา วรรธนะภูติ)

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย : น.พ. เบญจะ เพชรหล้าย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์เรื่อง การเตรียมแอนติเซรุ่มสำหรับ เซรูโลพลาสมิน และแฮปโตโกลบิน ของคน
โดย จันทร์เพ็ญ บุญค้ำ
แผนกวิชา จุลชีววิทยา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมแอนติเซรุ่ม สำหรับเซรูโลพลาสมิน และแฮปโตโกลบิน ของคน

ชื่อ นางจันทร์เพ็ญ บุญคำ แผนกวิชาจุลชีววิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๑๙

บทคัดย่อ

การเตรียมเซรูโลพลาสมิน และแฮปโตโกลบิน บริสุทธิ์จากพลาสมา ของคน โดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนอิออน และ รงลเลช์สัมพรรคภาพ โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ฉีดเข้ากระต่ายเต็มวัยในเวลา ๒-๔ สัปดาห์ แอนติเซรุ่มที่ได้มาทำให้มีปฏิกิริยาเฉพาะกับโปรตีนที่ต้องการ โดยการดูดซับด้วยเซรุ่มโปรตีนที่เหมาะสม แอนติเซรุ่มนี้ใช้ตรวจหาระดับเซรูโลพลาสมิน และแฮปโตโกลบินในเซรุ่มของคนไข้โรคตับและโรคเฮโมโกลบินผิดปรกติ พบว่าเซรูโลพลาสมินในเซรุ่มคนไข้โรคตับมีค่าสูงขึ้น ส่วนแฮปโตโกลบินในคนไข้โรคเฮโมโกลบินผิดปรกติ จะมีระดับต่ำลง

Thesis Title: The Preparation of Antisera To Human Ceruloplasmin and Haptoglobin

Name: Mrs. Chanphen Boonkham

Department of Microbiology

Academic Year: 1976

ABSTRACT

Purifications of human ceruloplasmin and haptoglobin were employed, using ion exchange and affinity chromatography. The purified proteins were used to immunize adult rabbits for 2 to 4 weeks. The rabbit antisera were made monospecific to respective proteins by immunoadsorption with suitable serum proteins. The antisera obtained were used in quantitative determinations of serum ceruloplasmin and haptoglobin in patients who suffered from liver diseases, and hemoglobinopathies. Serum ceruloplasmin was increased in case of liver diseases. Serum haptoglobin was decreased in case of hemoglobinopathies.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation and gratitude to:

Assistant Professor Dr. Bencha Petchclai, Chief Clinical Immunology Laboratory, Department of Pathology, Mahidol University Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital for his supervision, guidance and his encouragement, which as enabled me to carry on this study successfully.

Professor Dr. Prakob Tuchinda, under-secretary of state Ministry of Public Health, my first advisor, for giving me the apportunity to carry on this study.

Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Chulalongkorn University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, for her valable advice and permission in conducting this study.

Professor Dr. Natth Bhamarapravati, Head of the Department of Pathology, Mahidol University, Faculty of Medicine for his valuable suggestion and permission in conducting this study.

Assistant Professor Sumana Vardhanabhuti, Department of Microbiology, Chulalongkorn University, Faculty of Pharmaceutical Sciences for her advice and kindness in correction of the manuscript.

Associate Professor Vichiara Jirawongse, Head of Department of Pharmacognosy, Chulalongkorn University, Faculty of Pharmaceutical

Sciences, for his valuable suggestion.

Dr. Patraporn Issarangkul Na Ayudhaya, Department of Pediatric, Mahidol University, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, for supplying specimens, which were used in this study.

Miss Tasanee Chavanakul, for supplying Patient's record which was indispensible to this study.

The Staff of Blood barking Division, Department of Pathology, Mahidol University, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital in supplying donor blood and outdated plasma.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to all of my friends in Clinical Chemistry, Serological and Medical Illustration Division, Department of Pathology, Mahidol University Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital for their valuable helps. Without them, this thesis would not be smoothly finished.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
LIST OF TABLES	x
ABBREVIATIONS	xi
LIST OF FIGURES	xii
INTRODUCTION	1
Literature Review	3
MATERIALS AND METHODS	
Materials	14
Reagents	
Buffers	
Animal used	
Equipments	
Methods	15
General Method	15
Purification of human serum protein	16
Ceruloplasmin	16
Haptoglobins	18
Preparation of antisera	20
Preparation of Immunodiffusion plate	21
Serum specimens	21
Determination of ceruloplasmin and haptoglobin in patients' sera	22

Page

RESULTS

Purification of antigens 24

Ceruloplasmin 24

Haptoglobin 30

DISCUSSION AND CONCLUSION 43

BIBLIOGRAPHY 48

VITA 62

LIST OF TABLES

Table .		Page
I	Serum ceruloplasmin in normal human and patients with liver diseases expressed in percentage of a standard preparation	34
II	Serum haptoglobin in normal human serum and patients with hemoglobinopathies expressed in percentage of a standard preparation	42

ABBREVIATIONS

CM-Sephadex C-50	= Carboxymethyl-Sephadex cation 50
CNBr	= Cyanogen Bromide
CNS	= Central Nervous System
Cp	= ceruloplasmin
Cu^{+}	= cuprous ion
Cu^{2+}	= cupric ion
DEAE-Sephadex A-50	= Diethylaminoethyl-Sephadex Anion 50
Hb	= hemoglobin
Hp	= haptoglobin
Hp-Hb complex	= haptoglobin-hemoglobin complex
IgG	= immunoglobulin G.
mcg	= microgram
mcl	= microlitre
mEq/g	= milli equivalent per gram
ml	= millilitre
mol	= molecule
M.W.	= molecular weight
O.D.	= optical density
PBS.	= Phosphate Buffer Saline
P-CN	= Phosphate cyanide
RID	= radial immunodiffusion
rpm	= round per minute

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The monomuclear copper complex of Ceruloplasmin molecule study by using Resonance Raman Spectroscopy	6
Figure 2	Elution of ceruloplasmin from CM-Sephadex column at the first run, flow rate of 30 drops/min.	25
Figure 3	Immunoelectrophoresis of protein peaks obtained from two CM-Sephadex chromatography	26
Figure 4	Rechromatography of ceruloplasmin on CM-Sephadex column. (Flow rate 36 drops/min.).	27
Figure 5	Ouchterlony double diffusion showing precipitation of purified ceruloplasmin	28
Figure 6	Immunoelectrophoresis of two fractions obtained from rechromatography on CM-Sephadex column	29
Figure 7	Immunoelectrophoretic comparison between commercial and prepared anticeruloplasmin	32
Figure 8	The radial immunodiffusion plate demonstrating various concentrations of ceruloplasmin	33
Figure 9	Elution of haptoglobin with 3.6 M Urea from affinity chromatography.	34
Figure 10	Double immunodiffusion showing precipitation lines of reaction of prepared haptoglobin	36
Figure 11	Immunoelectrophoresis of prepared haptoglobin	37
Figure 12	Immunoelectrophoresis precipitation demonstrating the precipitin line of prepared anti-haptoglobin	38

page

Figure 13 Immunoelectrophoretic comparison between commercial and prepared antihaptoglobin 39

Figure 14 Double diffusion showing lines of identity in precipitin reaction 40

Figure 15 The quantitative determination of haptoglobin by Radial Immunodiffusion 41