

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของฮอร์โมน เอชซีจี จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์  
และการเตรียมแอนติบอดีต่อ เอชซีจี ในกระต่าย



นางสาว พัชรี วรานุเคราะห์โชค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-994-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019584 I1624803X

Separation and Purification of HCG Hormone from Urine of Pregnant  
Woman and Preparation of Rabbit Anti-HCG Antibody



Miss Patcharee Waranukroxchoke

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-582-994-3



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

พัชรี วรานุเคราะห์โชค : การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของฮอร์โมน เอชซีจี จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ และการเตรียมแอนติบอดีต่อ เอชซีจี ในกระต่าย (SEPARATION AND PURIFICATION OF HCG HORMONE FROM URINE OF PREGNANT WOMAN AND PREPARATION OF RABBIT ANTI-HCG ANTIBODY) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ, 73 หน้า. ISBN 974-582-994-3

งานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงวิธีแยก HCG ออกจากปัสสาวะของสตรีตั้งครรภ์ระยะแรกและทำให้ HCG บริสุทธิ์ โดยนำปัสสาวะมาผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชันเพื่อขจัดสารโมเลกุลเล็กและทำให้ HCG เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ PA-DEAE สามารถแยกฮอร์โมนที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 99.5 เท่า และมีแอกติวิตีจำเพาะ 2874.0 IU/มก. (โปรตีน) -ทดสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิคเอลลีเอช โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่า HCG ที่ได้ประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยมีขนาดโมเลกุล 35,494 และ 38,968 ดาลตัน เมื่อนำ HCG ที่เตรียมได้มาฉีดกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี พบว่ากระต่ายสร้างแอนติบอดี มีค่าไตเตอร์สูงสุด  $5 \times 10^5$  และไม่พบความแตกต่างของระดับแอนติบอดี เมื่อกระตุ้นด้วย HCG ที่มีแอกติวิตี 1,000 และ 2,000 IU ได้นำแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะพบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 357 เท่า จากการทดสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของแอนติบอดีนี้ด้วยเทคนิคเอลลีเอช โพลีอะครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่ามีแถบโปรตีน 2 แถบมีน้ำหนักโมเลกุล 46,060 และ 63,580 ดาลตัน

เมื่อนำแอนติบอดีที่เตรียมได้มาทดสอบจำเพาะกับ HCG ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟูชันและอิมมูโนอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าเกิดเส้นตะกอน (precipitin line) 1 เส้น ที่คมชัดเจนและเหมือน (identical) กับ HCG มาตรฐาน นอกจากนี้ยังมีเส้นจาง 1 เส้นซึ่งอาจเกิดจาก HCG ที่เปลี่ยนแปลงไป หรือโปรตีนอื่น ๆ ที่ปนมากับ HCG ที่เตรียมได้



ภาควิชา ..... เทคโนโลยีชีวภาพ  
สาขาวิชา ..... เทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา ..... 2535

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C226060 : MAJOR BIOTECHNOLOGY  
KEY WORD: PURIFICATION / HCG

SEPARATION AND PURIFICATION OF HCG HORMONE FROM URINE OF PREGNANT WOMAN AND PREPARATION OF RABBIT ANTI-HCG ANTIBODY. THESIS ADVISOR: ASSO. PROF NIKOM CHAISIRI, Ph.D., 73 pp. ISBN 974-582-994-3

Human Chorionic Gonadotropin from early pregnancy urine was purified to approximately 99.5 folds by HPLC technique using PA-DEAE column after ultrafiltration. The specific activity of HCG determined by ELISA method, was 2,784.0 IU/mg of protein. The purified hormone may comprise 2 subunits with molecular weights of 35,494 and 38,968 daltons as observed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The purified HCG when immunized to rabbits, gave maximum titer of approximately  $5 \times 10^5$ . There was no difference between immunization with 1,000 IU or 2,000 IU of the hormone. The antisera obtained were pooled and purified to 357 folds by using ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography. The purified antibody showed two bands with a molecular weight of 46,060 and 63,580 daltons by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The HCG, however, showed one sharp precipitin line and a faint line when subjected to either immunodiffusion or immunoelectrophoresis. The faint precipitin line may be due to altered HCG or impurities in the HCG preparation.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2535

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง " การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของฮอว์โมน เอชซีจี จากปัสสาวะหญิง มีครรภ์และการเตรียมแอนติบอดีต่อ เอชซีจี ในกระต่าย " ได้สำเร็จจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นราย งานการวิจัยฉบับนี้ได้ก็ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นิคม ชัยศิริ รศ.ดร.นลิน นิลอุบล รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ดร.สาธิต พิษณุวงกูรและคุณชัชฌาญ โพธิเวชกุล ที่ได้กรุณา รับเป็น อาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ และ แนวความคิด อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนและอนุญาติให้ใช้สถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ และสารเคมีจาก ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการ สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัย ของบัณฑิตวิทยาลัย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การวิจัยนี้สามารถ ดำเนินการและบรรลุความสำเร็จได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณา รับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์ รศ.น.สพ.ดร.โสมทัต วงศ์สว่าง ศ.มณีวรรณ กมลวัฒน์ ผศ.สพ.ญ.ราตรี แพลท รศ.ดร.จริญญา บุญวัฒน์ ที่ได้ช่วยเหลือแนะนำให้ แนวความคิดตลอดจนให้คำปรึกษาในการทดลองจนสามารถดำเนินการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอ ขอบคุณ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ฝ่ายช่างเทคนิค เจ้าหน้าที่สถาบันทุกท่าน ที่ เพื่อนและน้องๆ ที่ได้มีส่วน ช่วยเหลือในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ค่าแนะนำ และกำลังใจอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อ การดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณคุณประเสริฐ มีชัย ที่ช่วยดูแลสัตว์ทดลองสำหรับทำวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และผู้อยู่เบื้องหลังทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน ตั้งแต่เริ่มต้นจนงานวิจัยสำเร็จลง ข้าพเจ้าได้ตระหนักถึงบุญคุณที่ได้รับจากทุกท่าน ด้วยดีเสมอมา

สารบัญ




๘

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๖
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๗
กิตติกรรมประกาศ.....	๘
สารบัญรูป.....	๑๑
สารบัญตาราง.....	๑๒
คำย่อ.....	๑๓
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วัสดุ อุปกรณ์ และ เคมีภัณฑ์.....	12
3 วิธีการทดลอง	
3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเก็บรักษาปัสสาวะหญิงมีครรภ์ ที่ใช้ในการทดลอง.....	14
3.2 การหาแอกติวิตีของ HCG.....	14
3.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีสีไบโอแรด (Biorad Dye).....	14
3.4 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์.....	14
3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน.....	15
3.4.2 การทำให้ปัสสาวะเข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน.....	15
3.4.3 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ 50.....	16
3.4.4 การทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบไอซความดันสูง (High Performance Liquid Chromotography).....	16
3.5 การศึกษาสมบัติบางประการของ HCG.....	17
3.6 การผลิตแอนติบอดี.....	19

3.6.1	การเตรียม HCG และการฉีดเข้ากระต่าย.....	19
3.6.2	การเจาะเลือดและการเก็บรักษาซีรัมเพื่อตรวจวัดแอนติบอดี.....	20
3.7	การหาปริมาณแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอบเบนทแอสเสย์.....	20
3.8	การทำให้แอนติบอดีต่อ HCG บริสุทธิ์.....	21
3.8.1	การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	21
3.8.2	การทำ แอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography).....	22
3.8.3	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อ HCG ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส .....	23
3.9	การศึกษาสมบัติบางประการของแอนติบอดีต่อ HCG.....	24
3.10	การตรวจสอบความจำเพาะระหว่าง HCG และแอนติบอดีต่อ HCG .....	24
3.10.1	วิธีอิมมูโนดิฟฟิชั่น.....	24
3.10.2	วิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	25
4	ผลการทดลอง	
4.1	ผลการศึกษาความเสถียรของฮอร์โมน HCG.....	26
4.2	ผลการทำฮอร์โมน HCG จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ให้บริสุทธิ์.....	26
4.2.1	ผลการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์และอะซิโตน.....	26
4.2.2	ผลการทำฮอร์โมน HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	29
4.2.3	การทำฮอร์โมน HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบใช้ความดันสูง.....	29
4.3	การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส.....	41
4.4	ผลการผลิตแอนติบอดีต่อ HCG ในกระต่าย.....	45
4.5	การทำให้แอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์.....	45
4.6	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส.....	48
4.7	การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีต่อ HCG โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส.....	48



4.8	การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี.....	51
4.8.1	วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชั่น .....	51
4.8.2	วิธีอิมมูโนอิเล็กโตรเฟรีซิส.....	51
5	วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....	57
	เอกสารอ้างอิง.....	62
	ภาคผนวก.....	69
	ประวัติผู้เขียน.....	73



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของฮอร์โมน HCG.....	4
2	เปรียบเทียบการตกตะกอน HCG ในปัสสาวะหญิงมีครรภ์ ด้วยแอลกอฮอล์และอะซิโตน.....	28
3	แสดงผลการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยน ประจุโดยใช้ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ 50.....	31
4	ผลการทำ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ชนิดดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ (ก) และ HPLC โดยใช้คอลัมน์ พีเอ-ดีอีเออี และชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของโซเดียม คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เวลา 40 นาที (ข) และ 50 นาที (ค)....	34
5	แสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์.....	37
6	แสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 - 0.12 โมลาร์.....	39
7	แสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยชะด้วยสารละลาย โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.06 โมลาร์.....	42
8	ผลการทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวและโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ.....	47

## สารบัญรูป



รูปที่

หน้า

1	กราฟแสดงระดับของฮอร์โมน HCG ในปัสสาวะหญิงมีครรภ์จากตัวอย่างหญิงมีครรภ์ 240 คน.....	2
2	ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ HCG.....	6
3	แสดงการจัดเรียงตัวของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ HCG.....	6
4	ความเสถียรของ HCG ในปัสสาวะที่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิต่างๆ กัน .....	27
5	กราฟแสดงการทำฮอร์โมน HCG จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดีอีเอซี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 .....	30
6	กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี โดยใช้สารละลายโพรตีน ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0 -1.0 โมลาร์ เวลา 40 นาที.....	32
7	กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี โดยใช้สารละลายโพรตีน ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี เซฟาเด็กซ์ เอ 50 ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ เวลา 50 นาที .....	33
8	กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี ชะออกด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ เวลา 90 นาที.....	36

9	กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี ะออกด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.12 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที.....	38
10	กราฟแสดงผลการทำ HCG จากปัสสาวะให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์พีเอ ดีอีเออี ะออกด้วยเกรเดียนต์เส้นตรงของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.06 โมลาร์ เป็นเวลา 90 นาที .....	40
11	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและ HCG แยกโดยเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส .....	43
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของ HCG โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส .....	44
13	แสดงปริมาณแอนติบอดีต่อ HCG ในซีรัมกระต่ายหลังจากฉีดด้วยฮอร์โมน HCG .....	46
14	กราฟแสดงการทำแอนติบอดีต่อ HCG ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีแบบ จำเพาะ .....	49
15	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากชั้นตอนต่าง ๆ ในการทำแอนติบอดีต่อ HCG แยกโดย โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส pH 8.3 .....	50
16	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อ HCG แยกโดยเอสดีเอส โพลีอะคริ ลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส .....	52
17	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดี ต่อ HCG โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส .....	53
18	ผลการทดสอบความจำเพาะของ HCG และ HCG แอนติบอดี โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิชั่น....	54
19	ผลการทดสอบความจำเพาะของ HCG แอนติบอดีโดยวิธีอิมมูโนอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	55

## คำย่อ

HCG	=	Human Chorionic Gonadotropin
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
BSA	=	Bovine Serum Albumin
IgG	=	Immunoglobulin
CM	=	Carboxymethyl
DEAE	=	Diethylaminoethyl
Kda	=	Kilodalton
Rf	=	Relative mobility
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
IU	=	International Unit
mIU	=	mili-International Unit
มล.	=	มิลลิลิตร
๐ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
บัฟเฟอร์เอ	=	0.04 Tris-Phosphate buffer pH 8.3