บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยก AFP โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแบบเพิ่มความเข้มข้นเป็นลำดับส่วน

Twomey และ Sweet (1976) รายงานว่าสามารถแยก AFP จากซีรัมทารกได้โดยการตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นแรกของการวิจัยจึงได้ทดลองแยก AFP โดยวิธีตกตะกอนเป็นลำดับส่วน โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่สามารถตกตะกอน AFP ออกได้มากที่สุด และความเป็นไปได้ที่จะแยกอัลบูมินออกจาก AFP

สารตัวอย่างที่ใช้เป็นซีรัมคนไข้มะเร็งตับที่มีโปรตีนเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์โดยวิธี Abbott-EIA พบว่า มี AFP 240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในทุกลำดับส่วน สามารถตรวจพบ AFP ได้ แต่ลำดับส่วนที่พบ AFP มากคือ ลำดับส่วนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 50-60 และ 60-70 เปอร์เซ็นต์ คือพบ AFP เท่ากับ 416 และ 318 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 5 และเมื่อนำแต่ละลำดับส่วนที่แยกได้ มาตรวจหาอัลบูมินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน ซึ่งมีความไวต่ออัลบูมิน 0.0625 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าเกิดเส้นตะกอนสีขาวกับสารที่ได้จากทุกลำดับส่วน แสดงว่าโปรตีนทุกส่วนที่แยกได้ยังคงมีอัลบูมินปนเปื้อนอยู่

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณAFP (ไมโครกรัม)	ความบริสุทธิ์ ของ AFP (AFP/โปรตีน) (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์ ผลผลิต	อัลบูมิน
ซีรัมดั้งเดิม	753	1208	0.0016	100	+
ความเข้มข้น 0-20 %	4.3	5.5	0.0001	0.46	+
ความเข้มข้น 20-30 %	212.8	104.5	0.0005	8.6	+
ความเข้มข้น 30-40 %	89	174.2	0.0019	14.4	+
ความเข้มข้น 40-50 %	29.5	113.8	0.0037	9.4	+
ความเข้มข้น 50-60 %	32.7	416.7	0.0127	34.5	+
ความเข้มข้น 60-70 %	36.5	318.5	0.0088	26.3	+
ความเข้มข้น 70-80 %	1.6	0.8	0.0005	0.07	+

4.2 การแยกและทำ AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี

จากผลการแยก AFP โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงให้เห็นว่าวิธีดังกล่าวไม่สามารถแยกอัลบูมินและโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆออกจาก AFP ได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้วิธีโครมาโทกราฟี ในการทดลองขั้นต้นได้ทำการเตรียมสารตัวอย่าง ที่ใช้ในการสกัดแยก AFP โดยแยกสารอื่นๆที่ปะปนอยู่ในซีรัมออก ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้คือ

4.2.1 การแยกเศษเซลล์ และสารตกตะกอนออกจากซีรัม

ซีรัมที่นำมาแยก AFP เป็นชนิดที่สะสมได้จากผู้ป่วยมะเร็งตับโดยในปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีโปรตีน 123.4 มิลลิกรัม และมี AFP 314 ไมโครกรัม

นำซีรัมมาปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอน และเศษเซลล์ตามวิธีที่กล่าวในขั้นตอน 3.5.1 ก แล้วนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP พบว่าซีรัมก่อนการแยกมีปริมาณโปรตีน 8.6 กรัม มี AFP 22 มิลลิกรัม โดยมีความบริสุทธิ์ 0.0025 หลังจากปั่นแยก และปรับซีรัมให้ละลายอยู่ใน PBS มีปริมาณโปรตีน 6.5 กรัม มี AFP 15 มิลลิกรัม และมี

ความบริสุทธิ์ 0.0023 ในขั้นตอนนี้ถึงแม้ว่าจะสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆออกไปได้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ได้สูญเสีย AFP ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP ก่อนและหลังปั่นแยกเศษเซลล์ และสารตกตะกอนออกจากซีรัม

ชนิดของซีรัม	ปริมาณโปรตีน (กรัม)	ปริมาณ AFP (มิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
ซีรัมตั้งต้น	8.6	22	0.0025	100
ซีรัมหลังปั่นแยก (ปรับให้อยู่ใน PBS)	6.5	15	0.0023	68

หมายเหตุ กำหนดให้ความบริสุทธิ์ของ AFP จากซีรัมหลังปั่นแยกมีค่าเท่ากับ 1 สำหรับเปรียบเทียบกับการทดลองขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การแยกอัลบูมินออกจากซีรัมโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ

เพื่อต้องการแยกโปรตีนที่ไม่ใช่ AFP (non specific proteins) ออกจากซีรัมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เป็นการกำจัดสารปนเปื้อนในสารละลายตัวอย่างที่ใช้สกัดแยก AFP อัลบูมินเป็นโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องที่มีปริมาณมากในซีรัม การแยกอัลบูมินจึงเป็นงานสำคัญที่จำเป็นต้องกระทำเป็นอันดับแรก

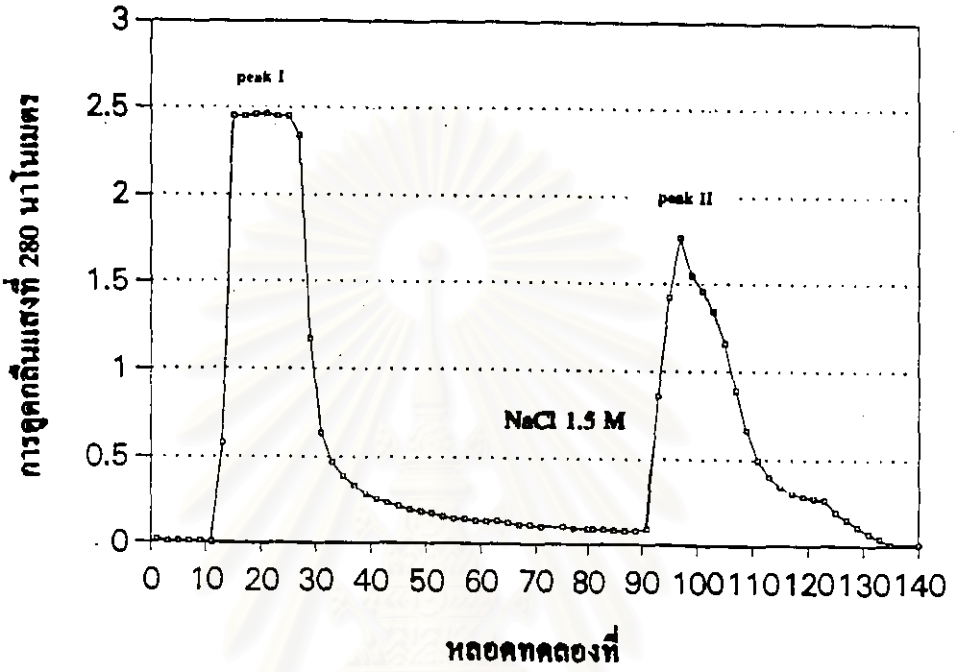
การผ่านคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล สามารถแยกอัลบูมินได้ดังนี้ เมื่อนำตัวอย่างซีรัมที่เตรียมได้จากขั้นตอน 4.2.1 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีนเท่ากับ 555.6 มิลลิกรัม และมี AFP เท่ากับ 1.28 มิลลิกรัมกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ที่มีขนาด 40 มิลลิลิตร (ตามวิธีข้อ 3.5.1 ข) สามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 ส่วน ดังกราฟรูปที่ 3 ส่วนแรกเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ พบว่า AFP ปรากฏในส่วนของ peak แรกนี้ peak โปรตีนชัดเจนตั้งแต่หลอดที่ 12-65 โดยมีปริมาตรรวม 159 มิลลิลิตร มี AFP ประมาณ 0.87 มิลลิกรัม และมีโปรตีนทั้งหมด 318

มิลลิกรัม ส่วนที่สอง เป็นโปรตีนที่จับคอลัมน์(อัลบูมิน) และทำการชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ใน PBS พบ peak ชัดเจนระหว่างหลอดที่ 91-130 รวมปริมาตร 120 มิลลิลิตร มีโปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่พบ AFP ในโปรตีนส่วนนี้ เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจ Abbott AFP-EIA ที่มีความไว AFP 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการผ่านซีรัมตัวอย่างปริมาตรทั้งหมด 66 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ข้างต้น สามารถแยกสารละลายส่วนแรกที่มี AFP ได้ปริมาตร 1,435 มิลลิลิตร มีโปรตีนเข้มข้น 2.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี AFP เข้มข้น 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากทำสารละลายให้มีความเข้มข้นขึ้นประมาณ 12 เท่า โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ได้สารละลายปริมาตร 115 มิลลิลิตร มีโปรตีน 2,921 มิลลิกรัม มี AFP ทั้งหมด 8.1 มิลลิกรัม ดังตารางที่ 7 ขั้นตอนนี้มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกำจัดอัลบูมินและโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ ออกได้ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด จากการตรวจหาอัลบูมินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน สามารถตรวจพบอัลบูมินทั้งในส่วนที่จับและส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ แต่เฉพาะส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์เท่านั้นที่ตรวจพบว่ามี AFP

ตารางที่ 7 ความบริสุทธิ์ของ AFP ก่อนและหลังการแยกอัลบูมินออกจากสารตัวอย่าง โดยวิธีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณ AFP (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP		เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	อัลบูมิน
				AFP(มิลลิกรัม) / โปรตีน(มิลลิกรัม)	เทียบเป็นเท่า		
ก่อนผ่านคอลัมน์	66	14.08	6,111	0.0023	1	100	+
หลังผ่านคอลัมน์							
ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์	1,435	8.6	3,343	0.0026	1.1	61	+
ส่วนที่จับกับคอลัมน์	1,320	-	1,320	-	-	-	+
ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ หลังผ่านอัลตราฟิลเตรชัน	115	8.1	2,921	0.0028	1.2	58	+



รูปที่ 3 กราฟแสดงการแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่างด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บดู เซล : โดยผ่านสารละลายตัวอย่างปริมาตร 6 มิลลิลิตร ที่มีโปรตีน 555.6 มิลลิกรัม และ AFP 1.28 มิลลิกรัม ขนาดคอลัมน์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

peak I โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย PBS เริ่มปรากฏตั้งแต่หลอดที่ 12-65 รวมปริมาตร 159 มิลลิลิตร ส่วนนี้มีโปรตีน 318 มิลลิกรัม AFP 0.87 มิลลิกรัม

peak II : ซึ่งเป็นอัลบูมิน คอลัมน์ถูกชะด้วยไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ใน PBS เริ่มปรากฏตั้งแต่หลอดที่ 91-130 รวมปริมาตร 120 มิลลิลิตร มีโปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจไม่พบ AFP ในสารละลายส่วนนี้

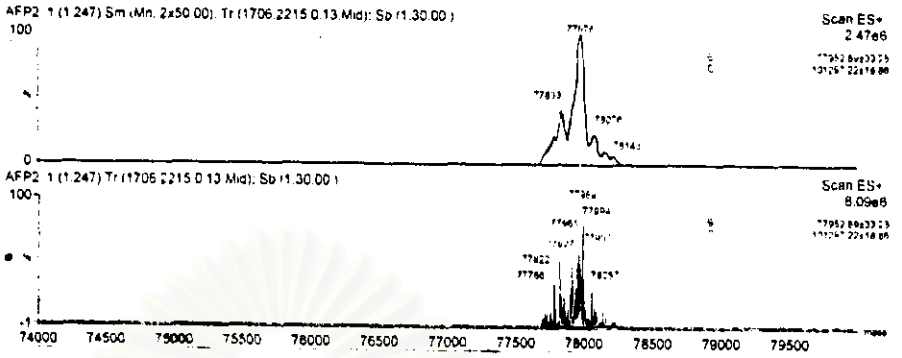
4.2.3 การแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200,000 ดาลตัน ออกจากตัวอย่างโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

เดิมทีเชื่อว่าอัลบูมินคือ โปรตีนชนิดเดียวที่มีจำนวนมากที่ควรต้องทำการกำจัด (Travis et al., 1976) แต่จากการใช้แมสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารหลังจากแยกอัลบูมินออก แล้วนำไปแยก AFP ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ายังมีสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 200,000 , 100,000 และ 70,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 4 จากข้อมูลดังกล่าวก่อนการสกัดแยก AFP จึงนำสารตัวอย่างหลังผ่านการแยกอัลบูมินที่ได้จากขั้นตอน 4.2.2 ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีน 25.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร AFP เข้มข้น 70.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 เพื่อกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงตามวิธีในข้อ 3.5.1 ค

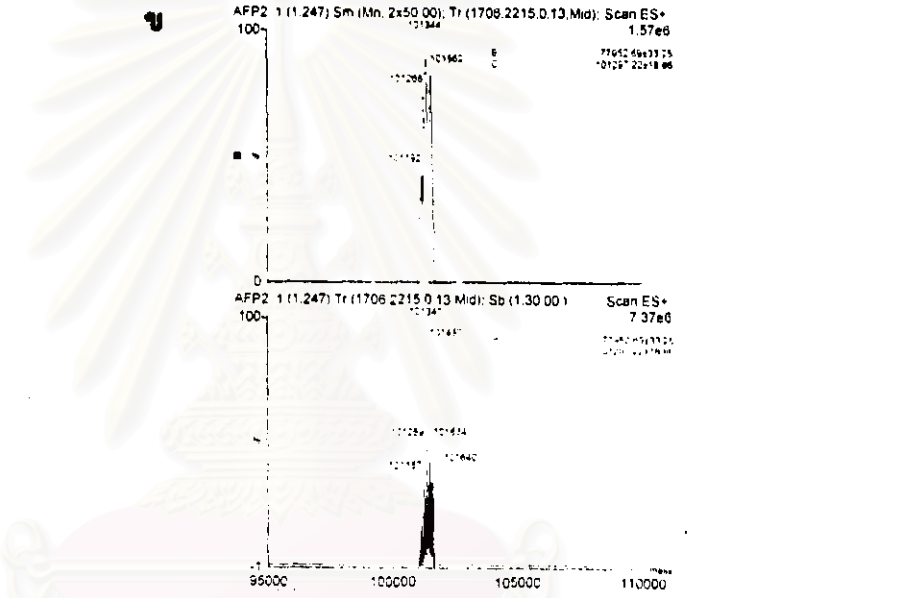
เพื่อกำหนดปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจึงได้ทำการเปรียบเทียบปริมาตรของสารตัวอย่างที่นำไปผ่านคอลัมน์ เนื่องจากคอลัมน์มีความสามารถในการแยกสารได้ ปริมาตรตั้งแต่ 2.8-4.2 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงผ่านสารตัวอย่างที่มี ปริมาตร 1 , 2 และ 3 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า peak โปรตีนที่ได้จากการแยกสารตัวอย่างปริมาณ 1 , 2 และ 3 สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 peak เช่นเดียวกัน ดังรูปที่ 5 peak แรกเริ่มตั้งแต่หลอดที่ 55-70 peak ที่สองพบระหว่างหลอดที่ 71-90 และ peak ที่สามปรากฏตั้งแต่หลอดที่ 91-110 ซึ่งเป็นส่วนที่ตรวจพบ AFP สูงที่สุด

จากการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์และปริมาณAFP ที่ได้หลังการผ่านสารตัวอย่างปริมาณที่แตกต่างกันได้ผลดังตารางที่ 8 คือ เมื่อผ่านสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีน 25.4 มิลลิกรัม AFP 70.9 ไมโครกรัม หลังผ่านคอลัมน์ เป็นที่น่าสนใจว่า peak ที่สาม มี

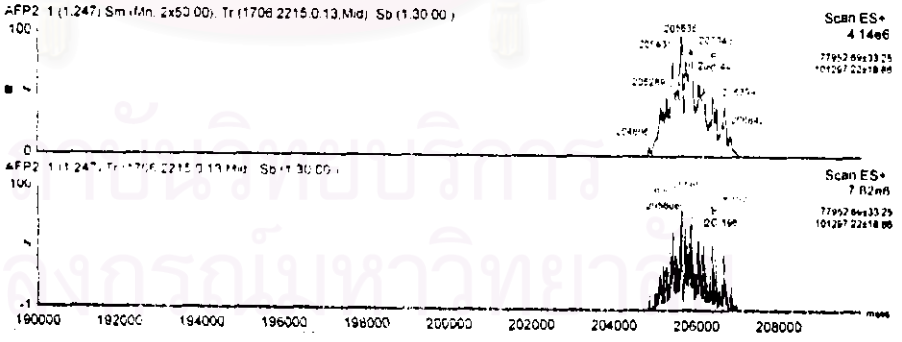
ก



ข



ค

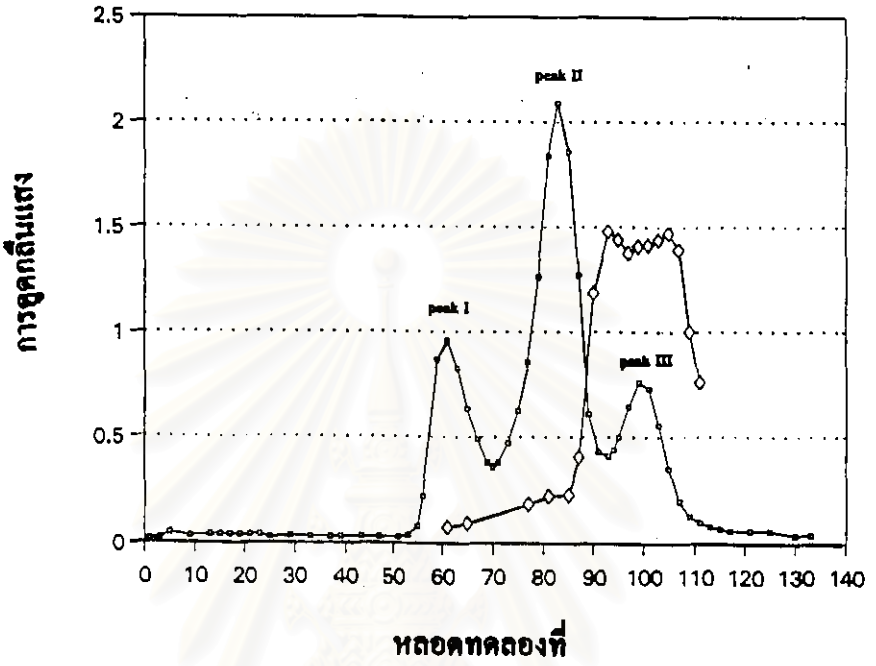


รูปที่ 4 การตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างหลังผ่านการแยกอัลบูมิน และผ่านการแยก AFP ด้วย HPLC โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

ก = น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 74,000 - 79,500 ดาลตัน

ข = น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 95,000 - 110,000 ดาลตัน

ค = น้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 190,000 - 208,500 ดาลตัน



—•— ปริมาณโปรตีนที่ปรากฏ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

—◇— ตำแหน่งที่ตรวจพบ AFP

จากการตรวจด้วยชุดตรวจ Abbott AFP-EIA(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร)

รูปที่ 5 แสดงการปรากฏของโปรตีนและ AFP เมื่อแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 สารตัวอย่างจากขั้นตอน 4.2.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร มีโปรตีน 11.7 มิลลิกรัม AFP 160.8 ไมโครกรัม

Peak I : ปรากฏหลอดที่ 55 - 70

Peak II : ปรากฏหลอดที่ 71 - 90

Peak III : ปรากฏหลอดที่ 91 - 110 ส่วนที่ตรวจพบ AFP มากที่สุด

หมายเหตุ : การแยกสารตัวอย่างปริมาตร 1 , 2 และ 3 มิลลิลิตรได้แบบเดียวกันดังรูปที่ 5 แต่ค่าโปรตีนที่ได้จะเพิ่มเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น

AFP ถึง 56 ไมโครกรัม คิดเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ (ของAFP ตั้งต้น) มีโปรตีน 2.38 มิลลิกรัม กล่าวคือ AFP มีความบริสุทธิ์ของ เพิ่มเป็น 10.3 เท่า กรณีที่ผ่านสารตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรซึ่งมีโปรตีน50.8 มิลลิกรัม AFP 141ไมโครกรัม หลังผ่านคอลัมน์พบ AFP 109.2 ไมโครกรัม คิดเป็น 77 เปอร์เซ็นต์ (ของ AFP ตั้งต้น) มีโปรตีน 6.9 มิลลิกรัม คำนวณความบริสุทธิ์ของ AFP ได้ 6.9 เท่า สำหรับการแยกที่ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีนตั้งต้น 76.2 มิลลิกรัม AFP 212.7 ไมโครกรัม แยก AFP ได้ 160.8 ไมโครกรัมคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ (ของ AFP ตั้งต้น) มีโปรตีน 11.7 มิลลิกรัม คำนวณความบริสุทธิ์ของ AFP ได้5.9 เท่า ดังจะเห็นได้ว่าปริมาตรของสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการแยกสารคือ 1 มิลลิลิตร เพราะได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด แต่การใช้สารตั้งต้นปริมาตรต่ำก็จะได้ AFP ปริมาณต่ำด้วย และเนื่องจากขั้นตอนการแยกสารโดยวิธีการนี้ในแต่ละครั้งต้องใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 2-3 วัน และมีขั้นตอนต้องดำเนินการอีกมาก ที่สำคัญคือต้องคำนึงถึงการรักษาสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ให้มากที่สุด ดังนั้นเพื่อการสะสมสารตัวอย่างให้มากในเวลาสั้น สำหรับการดำเนินงานขั้นตอนต่อไปในที่นี้จึงเลือกใช้สารตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรในการผ่านคอลัมน์แต่ละครั้ง เนื่องจากเปอร์เซ็นต์สูญเสีย AFP สูงกว่ากรณีที่ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 1 หรือ 2 มิลลิลิตร เพียงเล็กน้อยโดยมีเปอร์เซ็นต์สูญเสีย 21 , 23 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สารตั้งต้นปริมาตร 1 , 2 และ 3 มิลลิลิตรตามลำดับ การใช้สารตั้งต้น 3 มิลลิลิตรสามารถแยก AFP ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า แต่ใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกันกับเมื่อใช้ปริมาตรต่ำ

จากการนำวิธีการดังกล่าวข้างต้นมาแยกสารตัวอย่าง ปริมาตรรวม 84 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีน 2,133 มิลลิกรัม AFP 5,955 ไมโครกรัม ได้ผลดังตารางที่ 9 คือหลังผ่านคอลัมน์ ได้สารละลายปริมาตรรวม 775 มิลลิลิตร มี AFP 5,115 ไมโครกรัม โปรตีน 395 มิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ของ AFP เพิ่มเป็น 5.6 เท่า เมื่อนำสารที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นประมาณ 45

เท่า โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ได้สารปริมาตร 17 มิลลิลิตร มีโปรตีนเข้มข้น 14.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP เข้มข้น 279 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความบริสุทธิ์ของ AFP เพิ่มเป็น 8.2 เท่า ในขั้นตอนนี้มีการสูญเสีย AFP ประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP ที่ปรากฏใน peak ที่ 3 รูปที่ 5 ภายหลังการผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี 200 ด้วยปริมาณสารตั้งต้นที่ต่างกัน

ปริมาณสารตัวอย่างตั้งต้น (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณ AFP (ไมโครกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP		เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	เวลาที่ใช้แยกสาร (ชั่วโมง)
			AFP(มิลลิกรัม) / โปรตีน(มิลลิกรัม)	เทียบเป็นเท่า		
1	8.86 (25.4)	56 (70.9)	0.0237 (0.0028)	10.3 (1.2)	79 (100)	43
2	6.9 (50.8)	109.2 (141.8)	0.0159 (0.0028)	6.9 (1.2)	77 (100)	50
3	11.7 (76.2)	160.8 (212.7)	0.0137 (0.0028)	5.9 (1.2)	75 (100)	53

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ ปริมาณสารเริ่มต้นก่อนผ่านคอลัมน์
ตัวเลขนอกวงเล็บคือ ปริมาณสารที่พบใน peak ที่ 3 รูปที่ 5

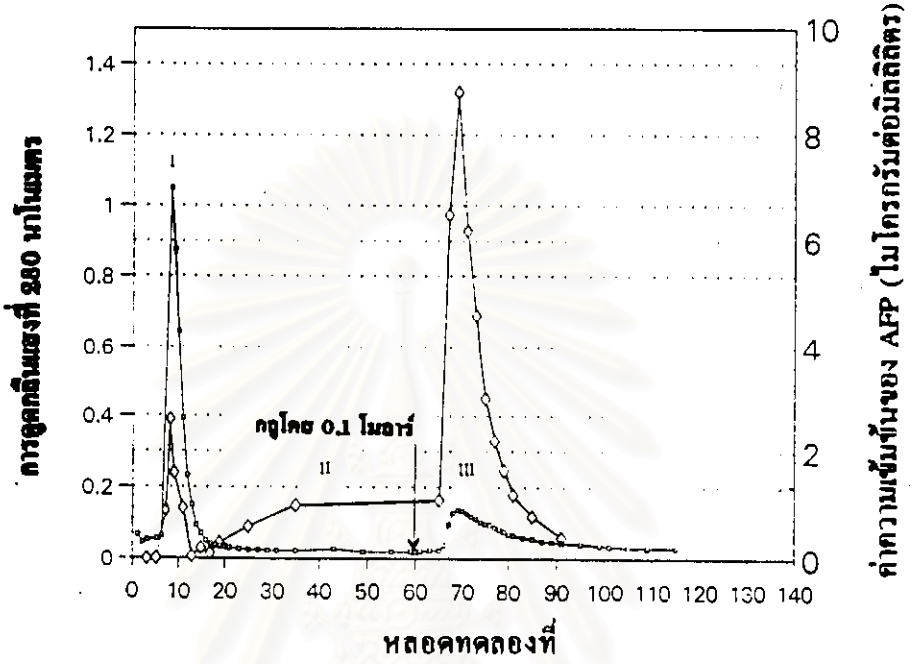
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ AFP หลังผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี 200 ได้จากการแยกรวม 28 ครั้ง

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณ AFP (ไมโครกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP		เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%)
			AFP(มิลลิกรัม) / โปรตีน(มิลลิกรัม)	เทียบเป็นเท่า	
ก่อนผ่านคอลัมน์	2,133	5,955	0.0028	1.2	100
หลังผ่านคอลัมน์	395	5,115	0.0129	5.6	85
สารหลังทำให้เข้มข้นขึ้น	251	4,750	0.0189	8.2	79

4.2.4 การแยก F-AFP ออกจาก H-AFP โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส

การสกัดแยก F-AFP ออกจาก H-AFP ขั้นตอนนี้ใช้สารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 4.2.3 ซึ่งปรับให้ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ เอ (ดังกล่าวในหน้า 31) ได้สารตัวอย่างที่มีโปรตีนเข้มข้น 13.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP เข้มข้น 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ตามวิธีในข้อ 3.5.1 ง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6 พบว่าสามารถแยกสารออกได้เป็น ส่วนที่ไม่จับ และส่วนที่จับกับคอลัมน์คอน เอ จากการตรวจวิเคราะห์ AFP ในส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ปรากฏเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกมีค่าโปรตีนสูง ส่วนนี้คาดว่าเป็น F-AFP (Sell , 1990) ถูกชะออกประมาณหลอดที่ 6-19 ตรวจพบ AFP ทั้งหมด 17.6 ไมโครกรัม ส่วนที่ 2 (หลอดที่ 20-66) AFP ปรากฏอย่างต่ำๆ และต่อเนื่อง ส่วนนี้ตรวจพบ AFP รวมทั้งหมด 9 ไมโครกรัม สำหรับ AFP ส่วนที่ 3 ที่จับกับคอลัมน์ คาดว่าเป็น H-AFP (Sell , 1990) ชะออกด้วยกลูโคสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ละลายในบัฟเฟอร์ เอ) โดยปรากฏตั้งแต่หลอดที่ 67-90 วัดค่า AFP ได้ 213 ไมโครกรัม



—•— ค่าโปรตีนได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

—◇— ความเข้มข้นของ AFP

รูปที่ 6 ลักษณะการปรากฏของ F-AFP และ H-AFP เมื่อแยกโดยวิธีคอน เอ แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี

สารตัวอย่าง (จากขั้นตอน 4.2.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีโปรตีน 13.4 มิลลิกรัม AFP 260 ไมโครกรัม หลังผ่านคอลัมน์ ปรากฏเป็น 3 ช่วง ช่วงแรก (I) เป็น AFP ที่ไม่จับกับคอลัมน์ปรากฏตั้งแต่หลอดที่ 6-19 มี AFP 17.6 ไมโครกรัม ช่วงที่ 2 (II)ปรากฏหลอดที่ 71-90 มี AFP 9.0 ไมโครกรัม และช่วงที่ 3 (III) เป็น AFP ซึ่งจับกับคอลัมน์ มี AFP 213 ไมโครกรัม

ความบริสุทธิ์ของ AFP หลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ

จากการแยกสารตัวอย่างรวม 11 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปรตีนเริ่มต้น 147.4 มิลลิกรัม มี AFP 2.86 มิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ 0.0194 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 คือสารส่วนที่ 1 ได้ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร มีโปรตีน 65.9 มิลลิกรัม AFP 533 ไมโครกรัม มีความบริสุทธิ์ 0.008 สารส่วนที่ 2 ได้ปริมาตร 13 มิลลิลิตร มีโปรตีน 4.2 มิลลิกรัม AFP 135 ไมโครกรัม มีความบริสุทธิ์ 0.032 และสารส่วนที่ 3 ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีโปรตีน 25.9 มิลลิกรัม AFP 1990 ไมโครกรัม มีความบริสุทธิ์ 0.077

ตารางที่ 10 ลักษณะการปรากฏของ F- AFP และ H- AFP เมื่อแยกสารตัวอย่างโดยวิธี คอน เอ แอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	AFP ทั้งหมด (ไมโครกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP		เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
				AFP(มิลลิกรัม) / โปรตีน(มิลลิกรัม)	เทียบเป็นเท่า	
ก่อนผ่านคอลัมน์	11	147.4	2,860	0.0194	8.4	100
หลังผ่านคอลัมน์ชนิดที่ไม่จับคอลัมน์ (F-AFP)						
ส่วนที่ 1 (หลอดที่ 6-19)	11.5	65.9	533	0.008	3.5	18.7
ส่วนที่ 2 (หลอดที่ 20-66)	13	4.2	135	0.032	14	4.7
ชนิดที่จับคอลัมน์(H- AFP)						
ส่วนที่ 3 (หลอดที่ 67-90)	10	25.9	1,990	0.077	33.4	69.6

4.2.5 การแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดย HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

เนื่องจากการแยกสารโดยวิธี anion exchange chromatography ด้วยเครื่อง HPLC นั้น ปัจจัยซึ่งมีผลต่อการแยกสารคือ ชนิดของบัฟเฟอร์ ซึ่งจะมีค่า pH แตกต่างกัน และเป็นผลทำให้ค่า isoelectic point ของสารเปลี่ยนแปลงไปด้วย ดังนั้นการเลือกชนิดของบัฟเฟอร์จึงมีความสำคัญ นอกจากนี้ปริมาณความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ชะคอลัมน์ และปริมาณสารตัวอย่างที่นำมาแยกยังมีผลต่อการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก AFP ได้ผลดังต่อไปนี้

4.2.5.1 การศึกษาหาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมในการชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง

สารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เตรียมได้จากขั้นตอน 4.2.3 ซึ่งผ่านขั้นตอนการแยกอัลบูมิน และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกแล้ว ทั้งนี้สารตัวอย่างได้รับการปรับให้ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ TEA (เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0) สารตัวอย่างมีโปรตีน 1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การแยกสารด้วยวิธีผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 แต่ละครั้งใช้สารตัวอย่างปริมาตร 60 ไมโครลิตร หลังผ่านสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TEA ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากการชะโปรตีน (ซึ่งมี AFP) เกาะติดกับคอลัมน์ ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-1 โมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที พบว่าแยกโปรตีนได้ 3 peak ดังรูปที่ 7ก peak แรกปรากฏเมื่อเวลาประมาณ 25-33 นาที peak ที่ 2 ปรากฏเมื่อเวลา 34-36 นาที ส่วน peak ที่ 3 ปรากฏเมื่อเวลา 37-42 นาที โดยตรวจพบ AFP ได้ใน peak ที่ 3 นี้ ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 0.4-0.5 โมลาร์ จากกราฟรูป

ที่ 7 ก peak 2 และ 3 ยังมีส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่ ดังนั้นจึงทำการลดปริมาณความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ชะคอลัมน์

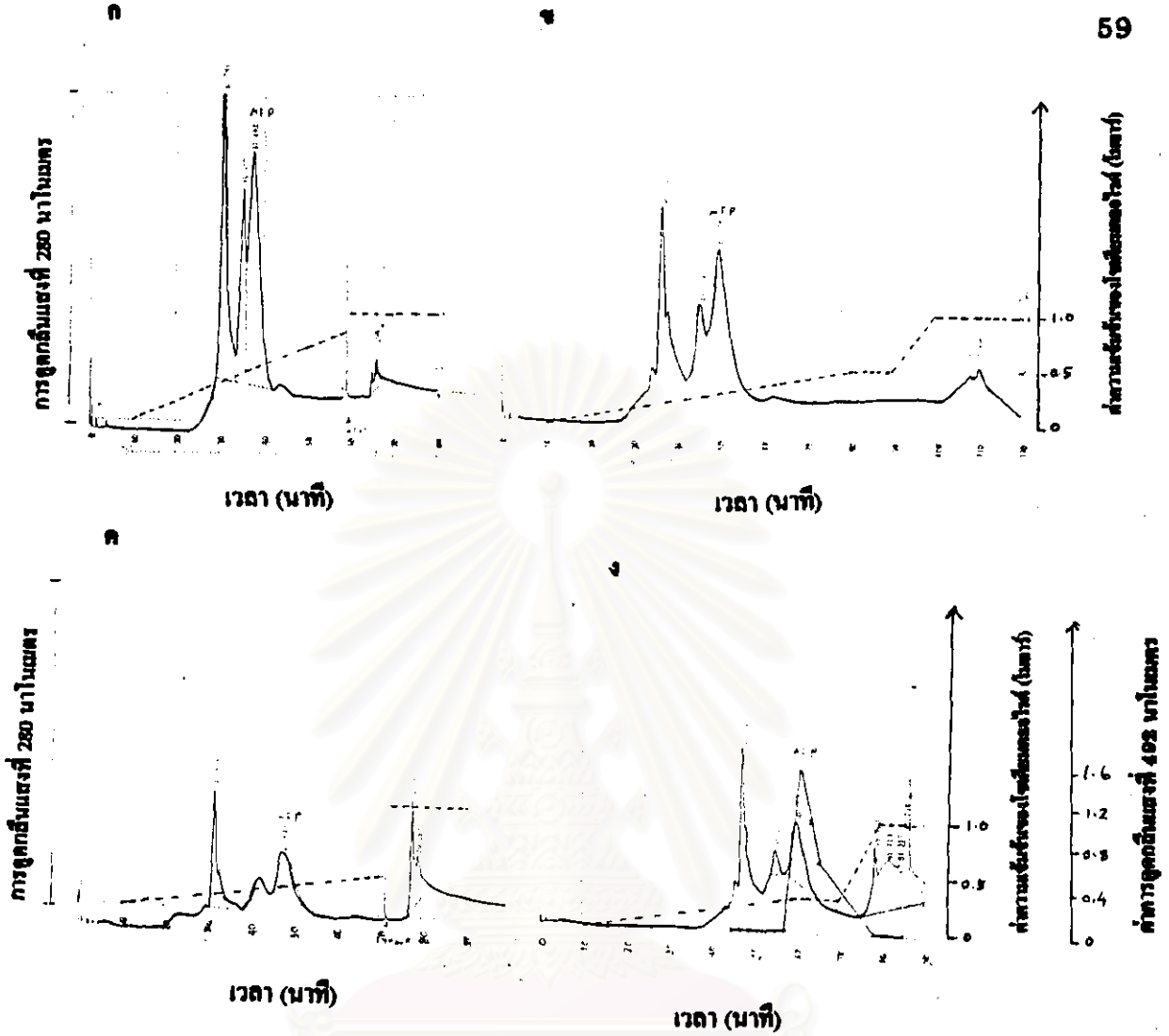
การชะคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 70 นาที แยกโปรตีนออกได้ 3 peak ดังรูปที่ 7ข peak แรกปรากฏเวลาประมาณ 34-43 นาที peak ที่ 2 ปรากฏเมื่อเวลา 44-47 นาที ส่วน peak ที่ 3 ปรากฏเมื่อเวลา 48-55 นาที peak ที่ 3 ซึ่งตรวจพบ AFP ถูกชะออกที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 0.2-0.35 โมลาร์ แต่การแยกระหว่าง peak ที่ 2 และ peak ที่ 3 ยังแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจน

เมื่อเปลี่ยนเป็นชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.35 โมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที โปรตีนปรากฏเมื่อเวลาประมาณ 30 นาที ยังคงแยกโปรตีนออกได้เพียง 3 peak ดังรูปที่ 7ค peak แรกปรากฏเวลาประมาณ 30-39 นาที peak ที่ 2 ปรากฏเมื่อเวลา 40-45 นาที ส่วน peak ที่ 3 ซึ่งตรวจพบ AFP ปรากฏเมื่อเวลา 46-55 นาที ถูกชะด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.2-0.27 โมลาร์

การชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 50 นาที แยกโปรตีนออกได้ 3 peak เช่นเดียวกัน peak แรกปรากฏเวลาประมาณ 40-52 นาที ชะด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.225 โมลาร์ peak ที่ 2 ถูกชะออกเมื่อเวลา 53-57 นาที ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.275 โมลาร์ ส่วน peak ที่ 3 ปรากฏเมื่อเวลา 58-65 นาที ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ ดังรูปที่ 7ง จากการตรวจ AFP พบว่าโปรตีน peak ที่ 1 และ 2 ไม่พบ AFP แต่พบเฉพาะใน peak ที่ 3 เท่านั้น ซึ่ง AFP เริ่มปรากฏหลอดที่ 59-70

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกชะคอลัมน์ด้วยวิธีแกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 50 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที (atten เท่ากับ 0 ค่า absorbance unit full scale ;a.u.f.s. เท่ากับ 0.04) เนื่องจากวิธีนี้สามารถแยก peak ที่ 3 ซึ่งตรวจพบ AFP ออกจาก peak อื่นได้ดีกว่าการชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นสูงดังรูปที่ 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(——) โปรตีนค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(- - -) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

(×—×) ค่า AFP

ตรวจวัดด้วยชุดตรวจ Abbott EIA AFP (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร)

รูปที่ 7 การปรากฏของ peak โปรตีน และ AFP แยกสารตัวอย่างจากขั้นตอน 4.2.3 โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

ก ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที
AFP ปรากฏใน peak ที่ 3 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4-0.5 โมลาร์

ข ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 70 นาที
AFP ปรากฏใน peak ที่ 3 ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2-0.35 โมลาร์

ค ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.35 โมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที
AFP ถูกชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2-0.27 โมลาร์

ง ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 50 นาที
AFP ปรากฏเมื่อเวลานาทีที่ 54-75 ถูกชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นประมาณ 0.3 โมลาร์

4.2.5.2 การศึกษาบัฟเฟอร์ชนิดที่เหมาะสมในการแยก AFP

มีรายงานการใช้แอล-ฮีสติดีนเป็นบัฟเฟอร์สำหรับการแยก AFP โดยวิธีโครมาโทกราฟีที่ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (Oers et al. , 1990) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของบัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน โดยทำการเปรียบเทียบกับบัฟเฟอร์ TEA (ซึ่งแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตคอลัมน์) โดยเลือกชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 50 นาที (ขั้นตอน 4.2.5.1)

การแยก AFP โดยใช้บัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน

เมื่อผ่านสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอน 4.2.3 ซึ่งมีโปรตีนเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP 32.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผ่านลงคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 หลังจากชะคอลัมน์ โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายใน แอล-ฮีสติดีน(เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6) สามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 4 peak ดังรูปที่ 8 peak แรกปรากฏที่เวลา 23-31 นาที peak ที่ 2 ปรากฏที่เวลา 32-40 นาที peak ที่ 3 ปรากฏที่เวลา 41-43 นาที และ peak ที่ 4 ปรากฏที่เวลา 44-50 นาที ตรวจพบ AFP ได้ใน peak ที่ 3 และ 4 สารละลายที่ถูกชะออกเมื่อเวลา 41 นาที ตรวจพบ AFP เท่ากับ 175 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 46 นาที พบ AFP เท่ากับ 124 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2-0.25 โมลาร์ แต่ยังไม่สามารถแยก AFP ออกจากโปรตีนอื่นได้ (รูปที่ 8)

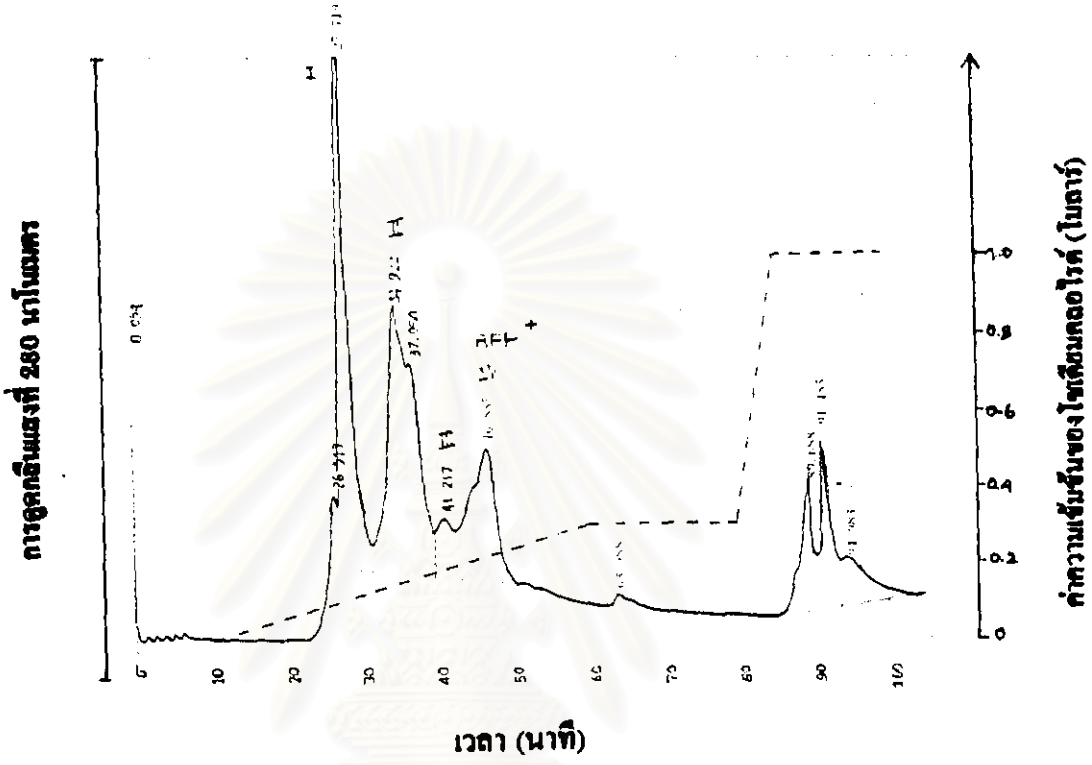
การแยก AFP โดยใช้บัฟเฟอร์ TEA

เมื่อผ่านสารตัวอย่างจากขั้นตอน 4.2.3 ที่มีความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP 40.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และชะคอลัมน์ด้วย

โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-0.3 โมลาร์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ TEA (เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0) สามารถแยกโปรตีนได้เป็น 3 peak ดังรูปที่ 9 คือ peak แรกปรากฏที่เวลา 30-40 นาที peak ที่ 2 ที่เวลา 41-44 นาที และ peak ที่ 3 ที่เวลา 45-55 นาที พบ AFP ใน peak ที่ 3 ซึ่งชะออกจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2-0.27 โมลาร์ มี AFP เท่ากับ 1.28 ไมโครกรัมโปรตีน peak ที่ 1 และ 2 ตรวจไม่พบ AFP

การแยก AFP ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 โดยใช้บัฟเฟอร์ TEA น่าจะสามารถแยก AFP ออกจากโปรตีนอื่นได้ดีกว่าการใช้บัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ TEA เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 ในการทดลองขั้นต่อไป

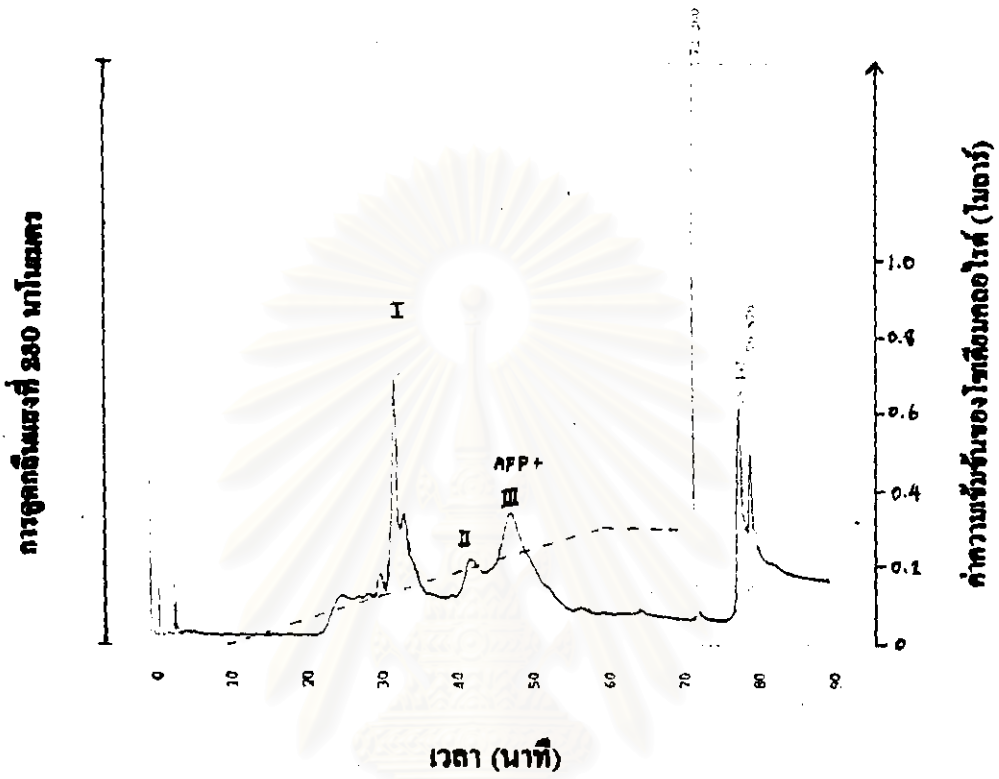
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(——) : ค่าโปรตีน (จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร)

(- - -) : ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 8 การปรากฏของโปรตีนและ AFP แยกโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 แยกสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร มีโปรตีน 250 ไมโครกรัม AFP3.27 ไมโครกรัมชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายใน *L*-histidine เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6 ความเร็ว 1มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที สามารถแยกโปรตีนออกเป็น 4 peak และตรวจพบ AFP ใน peak ที่ 3 และ 4



(——) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(- - -) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 9 การปรากฏของโปรตีน และ AFP โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 สารตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตร มีโปรตีน 108 ไมโครกรัม มีAFP1.63 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ละลายในบัฟเฟอร์ TEA เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 ความเร็ว 1มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที แยกโปรตีนได้ 3 peak ตรวจพบ AFP ใน peak ที่ 3 มี AFP 1.2 ไมโครกรัม

4.2.5.3 การแยก F-AFP และ H-AFP ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

ผลจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก AFP โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 พบว่าการชะคอลัมน์วิธีที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลอง (ขั้นตอน 4.2.5.1) โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TEA เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 (ขั้นตอน 4.2.5.2) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที ในการทดลองนี้ได้นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จากขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส (ขั้นตอน 4.2.4) ที่สามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ซึ่งคาดว่าประกอบไปด้วย F-AFP ส่วนที่ 2 ประกอบด้วย F-AFP และ H-AFP และ ส่วนที่ 3 ประกอบด้วย H-AFP มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธี HPLC ดังกล่าวข้างต้น

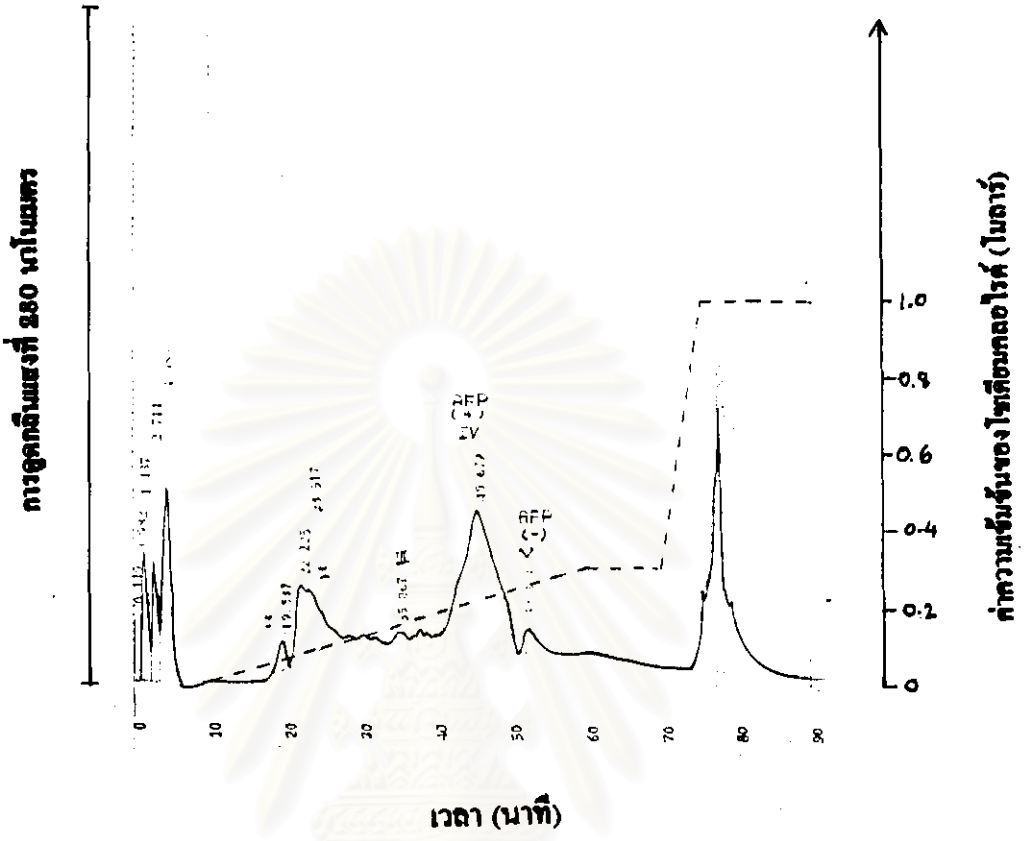
1) การแยกสารละลายส่วนที่ 1 ซึ่งไม่จับกับคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส มีโปรตีน 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP (คาดว่าเป็น F-AFP) 11.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 5 peak ดังรูปที่ 10 การปรากฏของ peak โปรตีนมีดังนี้คือ peak แรกเริ่มนาทีที่ 18-21 peak ที่ 2 เริ่มนาทีที่ 22-28 peak ที่ 3 เริ่มนาทีที่ 33-36 peak ที่ 4 เริ่มนาทีที่ 41-50 ซึ่งเป็น peak ที่มีโปรตีนสูงสุด และตรวจพบ AFP ใน peak นี้ ในลำดับส่วนที่เก็บที่นาทีที่ 45 พบ AFP 1.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร peak ที่ 5 เริ่มนาทีที่ 52-55 นอกจาก peak ที่ 4 แล้ว peak อื่นๆตรวจไม่พบ AFP

2) เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส สารละลายส่วนที่ 2 ซึ่งมีโปรตีนเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP (ซึ่งน่าจะเป็น F-AFP ผสมกับ H-AFP ชนิดทำปฏิกิริยากับ lentil lectin) เข้มข้น 56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80

ไมโครลิตร มาแยกผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 สามารถแยกโปรตีนได้ดังรูปที่ 11 ลักษณะ peak โปรตีนที่แยกได้มีรูปแบบคล้ายกับการแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 1 นอกจากนั้นลำดับส่วนที่แยกได้นาทีที่ 45 สามารถตรวจพบ AFP เข้มข้น 337 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

3) สารตัวอย่างที่ได้จากการผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 3 ซึ่งมีโปรตีนเข้มข้น 1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี AFP (H-AFP) 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร การปรากฏของ H-AFP หลังผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 สามารถแยกโปรตีนได้5 peak ดังรูปที่ 12 โดยโปรตีนส่วนใหญ่ปรากฏในช่วงนาทีที่ 20-40 และไม่สามารถตรวจพบ AFP แต่ตรวจพบ AFP ใน peak ที่ 5 โดยในลำดับส่วนที่เก็บที่นาทีที่ 45 ตรวจพบ AFP เข้มข้น 625 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การแยกสารตัวอย่าง ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรสทั้ง 3 ส่วน (จากขั้นตอน 4.2.4) หลังผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 peak โปรตีนที่ปรากฏ AFP จะถูกชะออกจากคอลัมน์ประมาณนาทีที่ 40-50 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 0.2-0.25 โมลาร์ จากการแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 1 สารละลายที่แยกได้นาทีที่ 45 ซึ่งเป็นส่วนของยอด peak ที่มี AFP ปรากฏ มีโปรตีนสูงแต่มี AFP ต่ำ แสดงว่าขั้นตอนการแยก AFP โดยผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส สามารถแยกสารที่มีค่า ประจุใกล้เคียงกับ AFP ออกมาในโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ได้ สำหรับสารตัวอย่างส่วนที่ 3 นอกจากจะประกอบด้วย H-AFP แล้วยังมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่ด้วย ซึ่งมีความสามารถจับกับคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส เช่นเดียวกับ H-AFP แต่สารเหล่านี้สามารถแยกออกได้โดยผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

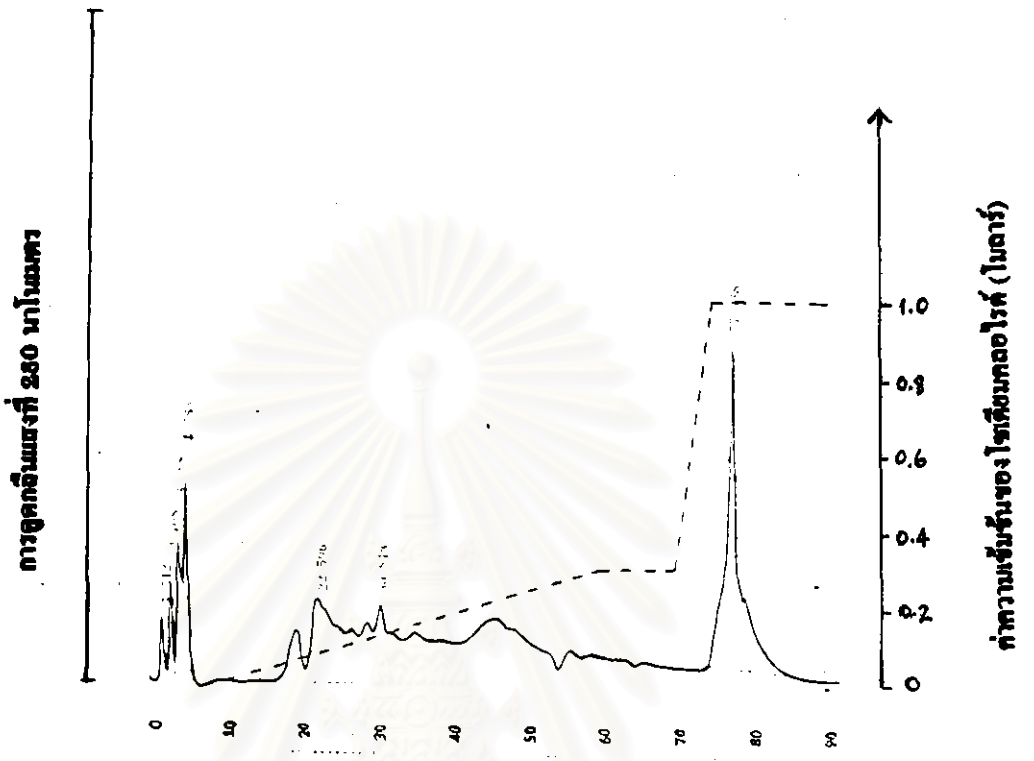


(—) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(---) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 10 การแยก F-AFP (สารตัวอย่างส่วนที่ 1 จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

สารตัวอย่างปริมาตร 40 ไมโครลิตร มีโปรตีน 96 ไมโครกรัม มี AFP (คาดว่าเป็น F-AFP) 0.47 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายใน TEA (เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.4) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที พบว่า AFP ปรากฏที่ peak ที่ 4 ในลำดับส่วนที่เก็บนาทีที่ 45 มี AFP 1.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

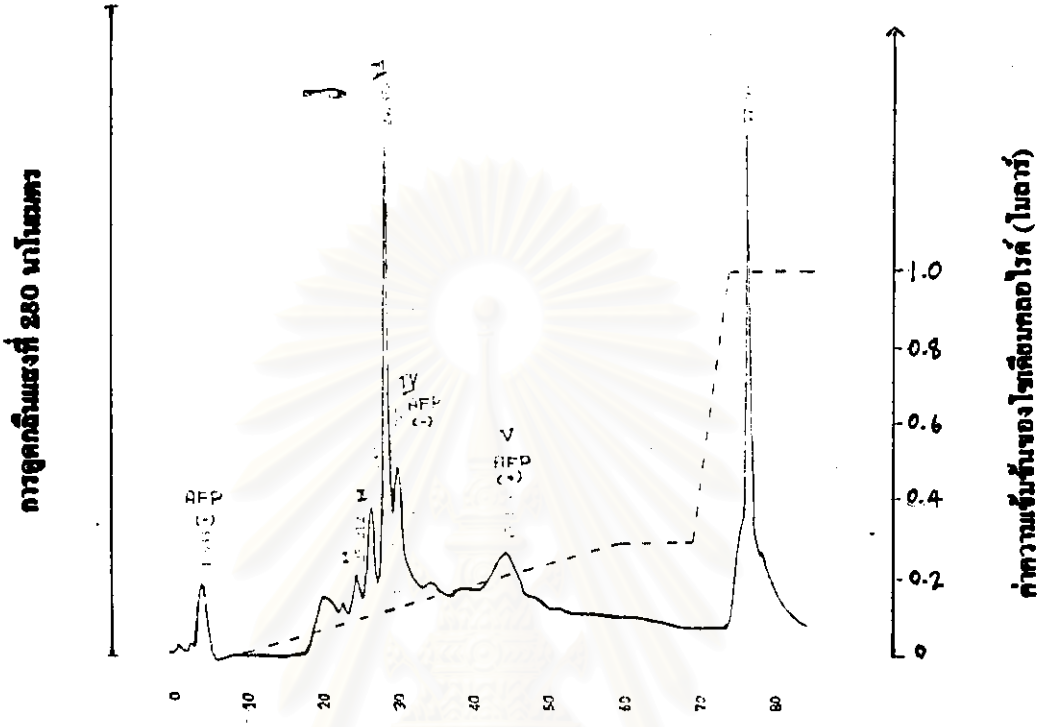


(——) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(- - -) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 11 การแยกสารตัวอย่าง ส่วนที่ 2 (จากขั้นตอนข้อ 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

สารตัวอย่างปริมาตร 80 ไมโครลิตร มีโปรตีน 64 ไมโครกรัม มี AFP (คาดว่าเป็น F-AFP ผสมกับ H-AFP) 4.5 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ละลายใน TEA (เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0) ชะด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที ในลำดับส่วนที่เก็บนาทีที่ 45 ตรวจพบ AFP 337 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



(——) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(----) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

รูปที่ 12 การแยกสารตัวอย่างส่วนที่ 3 (จากขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5)

สารตัวอย่างปริมาตร 80 ไมโครลิตร มีโปรตีน 100 ไมโครกรัม มี AFP (คาดว่าเป็น H-AFP) 7.2 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายใน TEA (เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที ในลำดับส่วนที่เก็บนาทีที่ 45 ตรวจพบ AFP 625 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

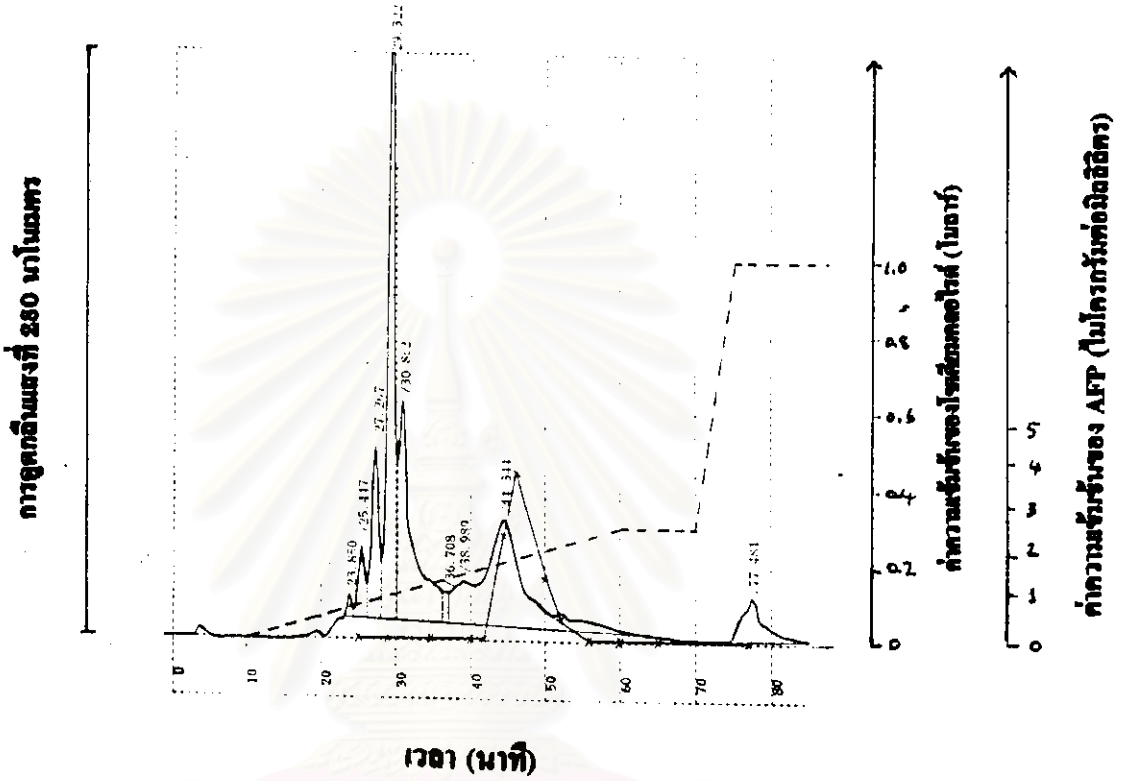
4.2.5.4 การเพิ่มปริมาณสารตัวอย่างในการสกัดแยก H-AFP โดยวิธี HPLC

จากผลการทดลองขั้นตอน 4.2.5.3 ข้อ 3 ได้ทำการแยกสารตัวอย่าง ที่มีโปรตีน 100 ไมโครกรัม สามารถแยก H-AFP ได้ปริมาณน้อย ซึ่งจะเป็นปัญหาที่ต้องศึกษาต่อ เมื่อต้องการนำไปใช้ผลิตจำนวนมาก จึงได้ศึกษาหาข้อมูลเพื่อทำการเพิ่มปริมาณสารตัวอย่าง โดยทดลองเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ คือ 100 เป็น 250 , 460 และ 920 ไมโครกรัมตามลำดับ การทดสอบคงใช้วิธีเดิมที่กล่าวไว้แล้วในขั้นตอน 4.2.5.3 พบว่า peak โปรตีนที่แยกได้ยังคงมีรูปแบบคล้ายกับรูปที่ 12 คือโปรตีนส่วนใหญ่ถูกแยกออกเมื่อเวลาประมาณ 20-40 นาที ประกอบด้วย peak ประมาณ 5 peak ซึ่งตรวจไม่พบ AFP แต่จะตรวจพบ AFP ใน peak ที่ปรากฏเมื่อเวลาประมาณ 41-55 นาที ดังรูปที่ 13 จำนวน AFP ที่ได้เนื่องจากการใช้สารเริ่มต้นที่แตกต่างกันดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 11 คือ สารตัวอย่างที่มีโปรตีน 100 , 250 , 460 และ 920 ไมโครกรัม มี AFP ตั้งต้นเท่ากับ 7.2 , 18 , 39.7 และ 79.8 ไมโครกรัมตามลำดับ หลังจากผ่านคอลัมน์สามารถแยก AFP ได้ 2.7 , 7.1 , 13.8 และ 40.2 ไมโครกรัมตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 37.5 , 39.4 , 34.8 และ 50.4 ตามลำดับ

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าการแยกสารตัวอย่าง ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 :7 ซึ่งสามารถจับโปรตีนได้ 20-50 มิลลิกรัมต่อปริมาตรคอลัมน์ 1 มิลลิลิตร โดยวิธี HPLC ถึงแม้จะใช้โปรตีนตั้งต้น 920 ไมโครกรัม (AFP 79.8 ไมโครกรัม) ความสูญเสีย AFP เกิดน้อยกว่าเมื่อใช้สารตัวอย่างเริ่มต้นในปริมาณน้อย คือได้ AFP มากขึ้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารเริ่มต้น (ดังตารางที่ 11) ดังนั้นในการแยก H-AFP (เพื่อการสะสมไว้ใช้ต่อไป) แต่ละครั้งจึงใช้สารตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตร มีโปรตีน 920 ไมโครกรัม มี AFP 79.8 ไมโครกรัม เพื่อทำการเก็บสะสม H-AFP

จากการแยกสารตัวอย่างหลายครั้งรวมทั้งหมด 6.4 มิลลิลิตร มีโปรตีนเท่ากับ 14.7 มิลลิกรัม มี AFP 1.23 มิลลิกรัมมีความบริสุทธิ์ของสารเท่ากับ 0.084 หลังจากผ่านคอลัมน์และนำสารละลายส่วนที่มี AFP มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ได้สารละลาย 7 มิลลิลิตร มีโปรตีนเท่ากับ 0.97 มิลลิกรัม มี AFP 0.76 มิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ของ AFP เพิ่มขึ้นจาก 0.084 เป็น 0.789 หรือประมาณ 9 เท่า ดังตารางที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(——) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(- - -) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

(-*—*-) ค่าความเข้มข้นของ AFP

รูปที่ 13 การแยกสารตัวอย่าง ส่วนที่ 3 (ขั้นตอน 4.2.4) โดยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

สารตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตร มีโปรตีน 920 ไมโครกรัม มี AFP (คาดว่าเป็น H-AFP) 79.8 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ ซึ่งละลายใน TEA (เข้มข้น 0.02โมลาร์ pH 7.0) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที AFP เริ่มปรากฏที่ช่วงเวลานาทีที่ 41-55 ตรวจพบ AFP 40.2 ไมโครกรัม

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบ H- AFP ที่แยกได้เมื่อใช้สารตัวอย่างเริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

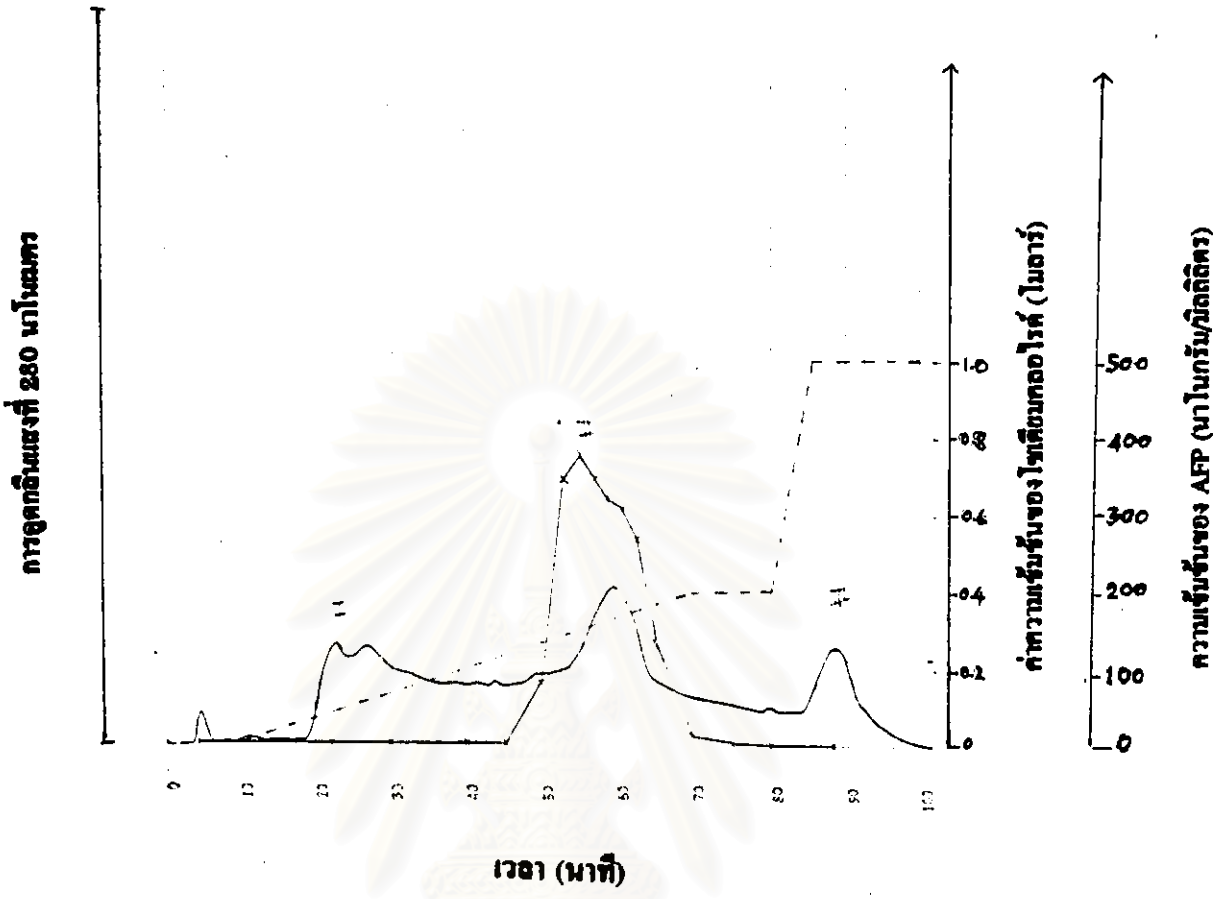
ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง (ไมโครกรัม)	ปริมาณ AFP (ไมโครกรัม)		เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
	ก่อนผ่านคอลัมน์	หลังผ่านคอลัมน์	
100	7.2	2.7	37.5
250	18	7.1	39.5
460	39.7	13.8	34.8
920	79.8	40.2	50.4

ตารางที่ 12 H- AFP ที่แยกได้โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ปริมาณ AFP (มิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ของ AFP		เปอรเซ็นต์ผลผลิต (%)
			AFP (มิลลิกรัม) / โปรตีน (มิลลิกรัม)	เทียบเป็นเท่า	
ก่อนผ่านคอลัมน์	14.7	1.23	0.084	36.4	100
หลังผ่านคอลัมน์ (เข้มข้น)	0.97	0.76	0.789	339	64

4.2.5.5 การแยก H-AFP ซ้ำเพื่อแยก AFP ชนิดย่อยโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 และชะด้วยบัฟเฟอร์ แอล-ฮิสติดีน

เนื่องจาก H-AFP ที่ได้จากขั้นตอน 4.2.5.4 ยังมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด และมีรายงานว่า AFP สามารถแยกออกได้เป็น 6 peak โดยใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (Oers et al. , 1990) ดังนั้นจึงนำสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการแยก H-AFP ด้วยบัฟเฟอร์ TEA ในข้อ 4.2.5.4 ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีน 138 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี AFP 108 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความบริสุทธิ์ 0.789 ปริมาตร 280 ไมโครลิตร มาแยกโดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0-0.2 โมลาร์ ละลายในบัฟเฟอร์แอล-ฮิสติดีนตามข้อ 3.5.2.4 แยกโปรตีนออกได้เป็น 3 ส่วน ดังรูปที่ 14 คือโปรตีนที่ไม่สามารถตรวจพบ AFP (non specific protein) ยังปรากฏก่อนเป็นยอดดับแรก ระหว่างเวลา 20-30 นาที ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.030-0.065 โมลาร์ สำหรับ peak ที่ 2 ซึ่งชะออกมาระหว่างเวลา 50-70 นาที ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.125-0.200 โมลาร์ ตรวจพบ AFP ได้ทั้งหมด 3.9 ไมโครกรัม เมื่อชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ โปรตีนที่ยังคงเหลืออยู่ในคอลัมน์จะถูกชะออกมาระหว่างเวลา 85-100 นาที การแยก H-AFP ด้วยขั้นตอนนี้สูญเสีย AFP ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 13 แต่ไม่สามารถตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารได้ เนื่องจากสารที่ได้เจือจางมากไม่สามารถตรวจหาปริมาณโปรตีนได้



(——) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(- - -) ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

(—×—) ค่าความเข้มข้นของ AFP

รูปที่ 14 การแยก H-AFP จากสารตัวอย่างขั้นตอน 4.2.5.4 โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

สารตัวอย่างปริมาตร 280 ไมโครลิตร มีโปรตีน 38.6 ไมโครกรัม มี AFP 30 ไมโครกรัม ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.2 โมลาร์ ละลายใน แอซ-ฮีสติดีน (เข้มข้น 0.02โมลาร์ pH 5.6) ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 13 การแยก H- AFP ซ้ำ โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5
(ชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.2 โมลาร์ ในแอล-ฮีสติดีน เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6)

ชนิดของสารตัวอย่าง	ปริมาณ AFP (ไมโครกรัม)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต
ก่อนผ่านคอลัมน์	30	100
หลังผ่านคอลัมน์	3.9	13

4.3 การทดสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของ สารตัวอย่าง โดยวิธี โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตโฟรีซีสแบบเอสดีเอส

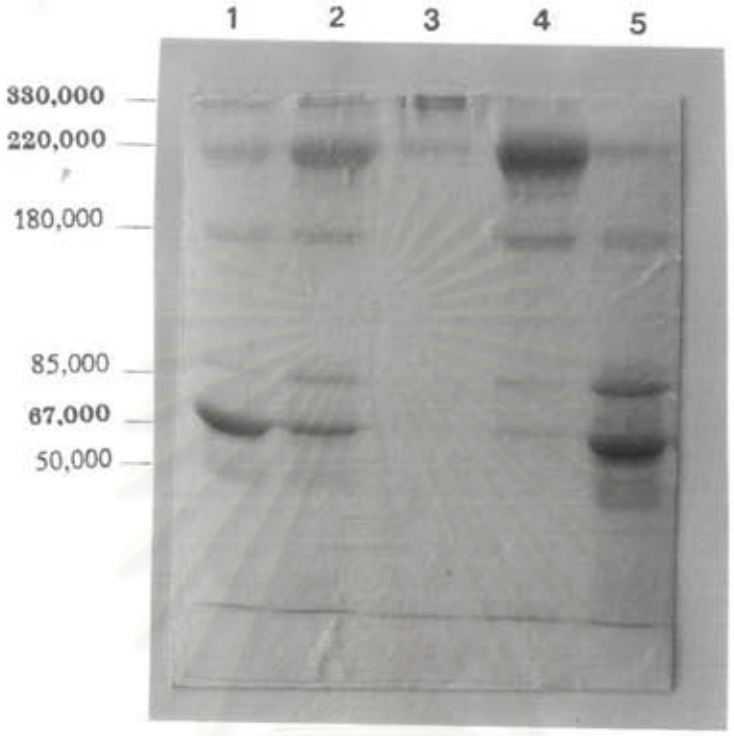
จากการนำสารตัวอย่างที่สกัดได้ในแต่ละขั้นตอนโดยวิธีดังกล่าว มาวิเคราะห์แถบโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตโฟรีซีส แบบเอสดีเอส ได้ผลดังรูปที่ 15 และ 16 พบว่าซีรัมคนไข้ตั้งต้นก่อน และหลังการปั่นแยกเศษเซลล์ตายออก (รูปที่ 15 แถวที่ 1) มีรูปแบบของแถบโปรตีนเหมือนกัน โดยมี 6 แถบเช่นเดียวกัน และเมื่อนำแถบโปรตีนไปนี้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล เปรียบเทียบกับกราฟ ระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (ดังรูปในภาคผนวกที่ ง) พบว่าแถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 , 220,000 , 180,000 , 85,000 , 67,000 และ 50,000 ดาลตันตามลำดับ

เมื่อนำซีรัมคนไข้ซึ่งผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล มาวิเคราะห์ พบว่าโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ยังคงให้รูปแบบของแถบโปรตีน และ มีน้ำหนักโมเลกุลเช่นเดียวกับข้างต้น คือ 6 กลุ่ม แต่กลุ่มน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน มีความเข้มของแถบโปรตีนลดลง (รูปที่ 15 แถวที่ 2) ส่วนโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล ซึ่งถูกชะออกมาพร้อมกับอัลบูมิน พบว่าเหลือโปรตีนเพียง 3 แถบ ได้แก่ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 330,000 ,

220,000 (เห็นเป็นสีจาง) และ 67,000 ดาลตัน ซึ่งก็คืออัลบูมินโดยปรากฏเป็นแถบสีเข้มเด่นชัด (ไม่ได้แสดงรูป) แสดงว่า อัลบูมินถูกกำจัดออกมาในส่วนนี้

สารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการแยก ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ซึ่งแยกโปรตีนออกได้เป็น 3 ส่วน และเมื่อนำแต่ละส่วนมาวิเคราะห์หาน้ำหนักโปรตีน พบว่าโปรตีนส่วนที่ 1 สามารถแยกแถบโปรตีนออกได้ 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 และ 220,000 ดาลตัน (รูปที่ 15 แถวที่ 3) โปรตีนส่วนที่ 2 แยกแถบโปรตีนได้ 4 แถบมีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 และ 180,000 ดาลตัน แถบโปรตีนเข้ม ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 และ 67,000 ดาลตันแถบโปรตีนจาง (รูปที่ 15 แถวที่ 4) สำหรับโปรตีนส่วนที่ 3 แยกแถบโปรตีนได้ 5 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 220,000 , 180,000 (แถบจางๆ) และ 50,000 ส่วนแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 , 67,000 ดาลตัน ปรากฏเป็นแถบเข้ม (ดังรูปที่ 15 แถวที่ 5)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการแยกด้วย คอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งแยกโปรตีนได้ 3 ส่วน มาวิเคราะห์แถบโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตโฟรีซีส แบบเอสดีเอส ดังรูปที่ 16 พบว่า ส่วนที่ 1 มีแถบโปรตีน 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 , 180,000 และ 50,000 ดาลตัน โดยมีปริมาณโปรตีนไม่สูงนัก และมีแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน ปรากฏเป็นแถบเข้มขนาดใหญ่ (รูปที่ 16 แถวที่ 4)โปรตีนส่วนที่ 2 มีรูปแบบของแถบโปรตีนคล้ายโปรตีน ส่วนที่ 1 เป็นส่วนใหญ่ แต่มีโปรตีนในปริมาณที่ต่ำมาก และโปรตีนส่วนที่ 3 แยกแถบโปรตีนได้ 4 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 ดาลตัน เป็นแถบเข้มขนาดใหญ่ คือ โปรตีนที่มีปริมาณรองลงมา 67,000 , 54,000 และ 40,000 ดาลตัน เป็นแถบโปรตีนที่มีปริมาณต่ำ (รูปที่ 16 แถวที่ 5) ขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส สารส่วนที่ 1 ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสารน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน สำหรับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 ดาลตัน ส่วนใหญ่จะถูกแยกออกมาในสารส่วนที่ 3



รูปที่ 15 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารตัวอย่างซึ่งได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล และเซฟาเดกซ์ จี 200 (โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อีเลกโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส)

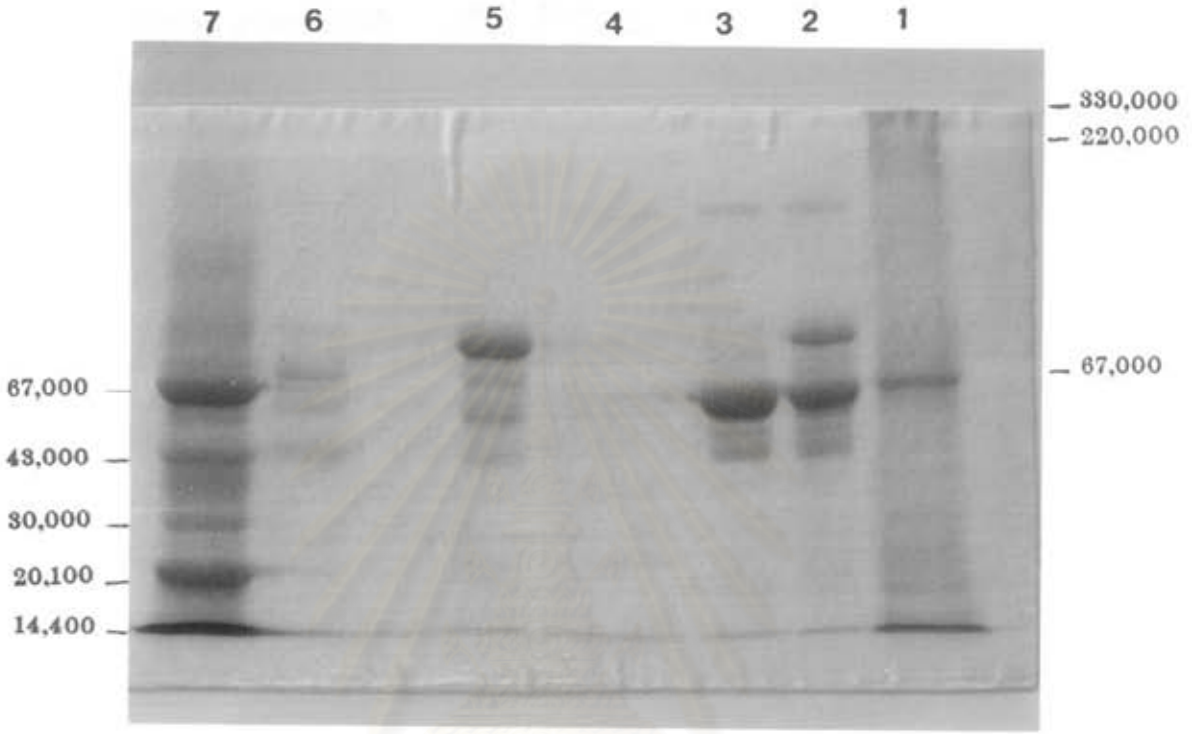
1 ซีรั่มคนไข้

2 โปรตีนส่วนที่ปนกับสารละลายซึ่งไม่จับกับคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล

3 โปรตีนส่วนที่ 1 แยกได้ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

4 โปรตีนส่วนที่ 2 แยกได้ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

5 โปรตีนส่วนที่ 3 แยกได้ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 (ส่วนที่มี AFP)



รูปที่ 16 ลักษณะของแถบโปรตีนในสารตัวอย่างที่ได้จากการผ่านคอลัมน์คอน เอ และ Mono Q HR 5/5 (โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อีเลกโตรโฟลิซีส แบบเอสดีเอส)

1 โปรตีนมาตรฐานกลุ่มที่โมเลกุลขนาดใหญ่

2 โปรตีนส่วนที่ 3 แยกได้ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

3 โปรตีนส่วนที่ 1 แยกได้ด้วยคอลัมน์คอน เอ

4 โปรตีนส่วนที่ 2 แยกได้ด้วยคอลัมน์คอน เอ

5 โปรตีนส่วนที่ 3 แยกได้ด้วยคอลัมน์คอน เอ

6 ส่วนที่มี H-AFP เป็นส่วนสำคัญตามทฤษฎี (จากขั้นตอน 4.2.5.4)

7 โปรตีนมาตรฐานกลุ่มที่โมเลกุลขนาดเล็ก

สารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 โดยวิธี HPLC ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่คาดว่าเป็น H-AFP ได้จากขั้นตอนตอน 4.2.5.4 พบว่า ในสารละลายนี้ประกอบด้วยสารน้ำหนักโมเลกุล 67,000 ดาลตัน มากที่สุด ซึ่งเป็นแถบของ AFP แต่ยังคงมีการปนเปื้อนของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 85,000 , 53,000 และ 43,000 ดาลตัน(แถบจาง) (ดังรูปที่ 16 แถวที่ 6)

4.4 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างโดยวิธี แมสสเปกโตรเมทรี

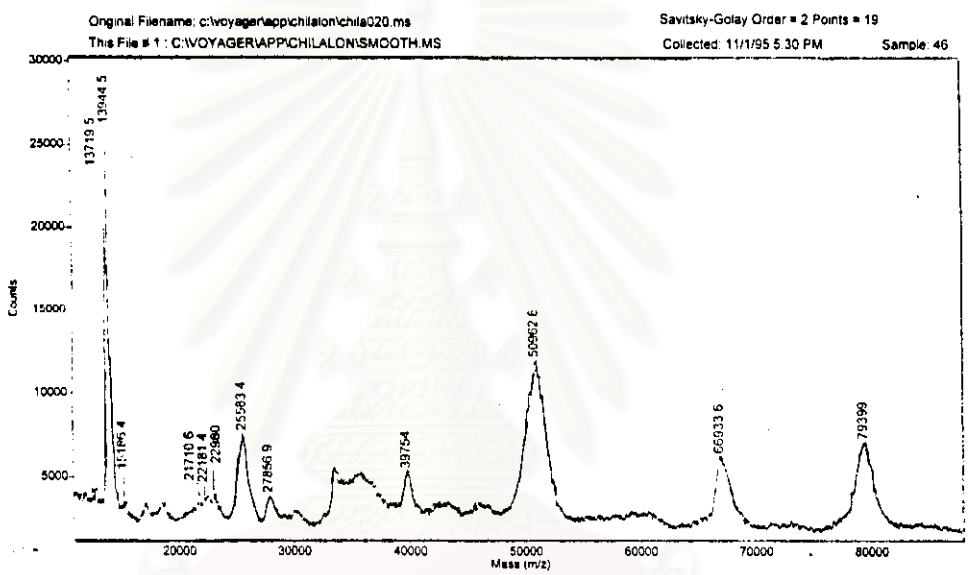
จากการนำสารโปรตีนส่วนที่ 3 ที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ซึ่งเป็นส่วนที่มี AFP สูงที่สุด มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี นอกจากจะพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 79,399 , 66,933 , 50,962 ดาลตัน ซึ่งคล้ายกับที่ตรวจพบโดยวิธีอิเลคโตรโฟลิซีสแล้ว ยังพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 40,000 ดาลตัน อีกประมาณ 6 peak ดังรูปที่ 17

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งแยกโปรตีนได้เป็น 3 ส่วน มาวิเคราะห์โดยวิธีข้างต้น พบว่า โปรตีนส่วนที่ 1 ซึ่งไม่จับกับคอลัมน์ คอน เอ เซฟาโรส (มี F-AFP) มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ต่ำกว่า AFP อยู่ 4 กลุ่ม คือ 66,905 , 53,473 , 50834 , 47,178 , 33,491 ดังรูปที่ 18 โปรตีนส่วนที่ 2 ซึ่งคาดว่ามี F-AFP ผสมกับ H-AFP (lentil AFP) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 79,382 , 66,956 , 53,482 , 39,857 , 33,601 และ 25,537 ดาลตัน ดังรูปที่ 19 สำหรับโปรตีนส่วนที่ 3 ซึ่งเป็นสารที่จับกับคอลัมน์ คอน เอ และเป็นส่วนที่มี H-AFP ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 79,246 , 68,288 , 45,021 , 39,770 และกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 20

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ H-AFP ที่ได้จากการแยกผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ตามขั้นตอน4.2.5.4 พบว่า ยังมีการปนเปื้อนของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 35,604 , 34,321 และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 21

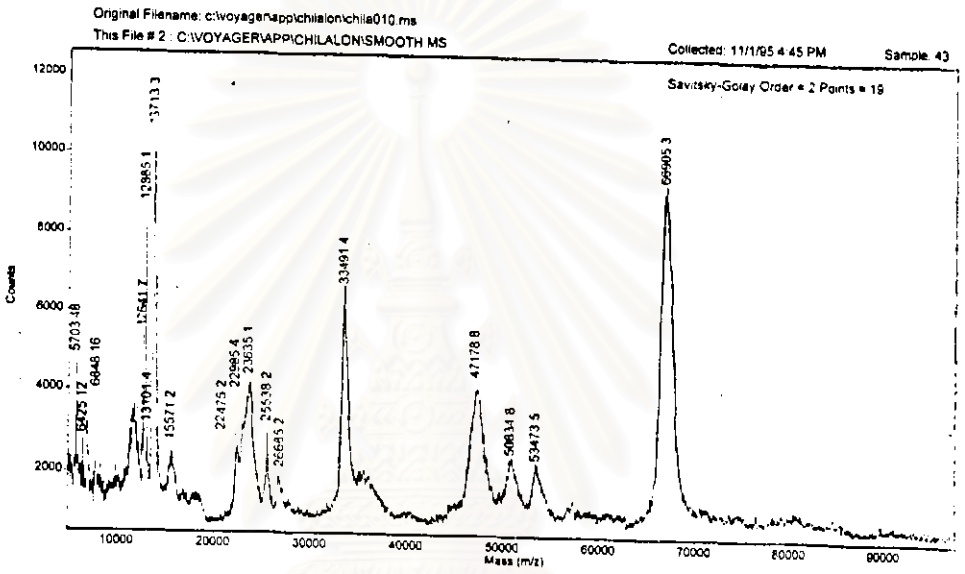
ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอน โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส และแมสสเปกโตรเมทรี สรุปได้ว่าทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ได้ชนิดของโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน แต่วิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส แบบเอสดีเอส ไม่ไวพอที่จะตรวจสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 ดาลตัน ที่มีปริมาณต่ำ ผลเปรียบเทียบสรุปไว้ในตารางที่ 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

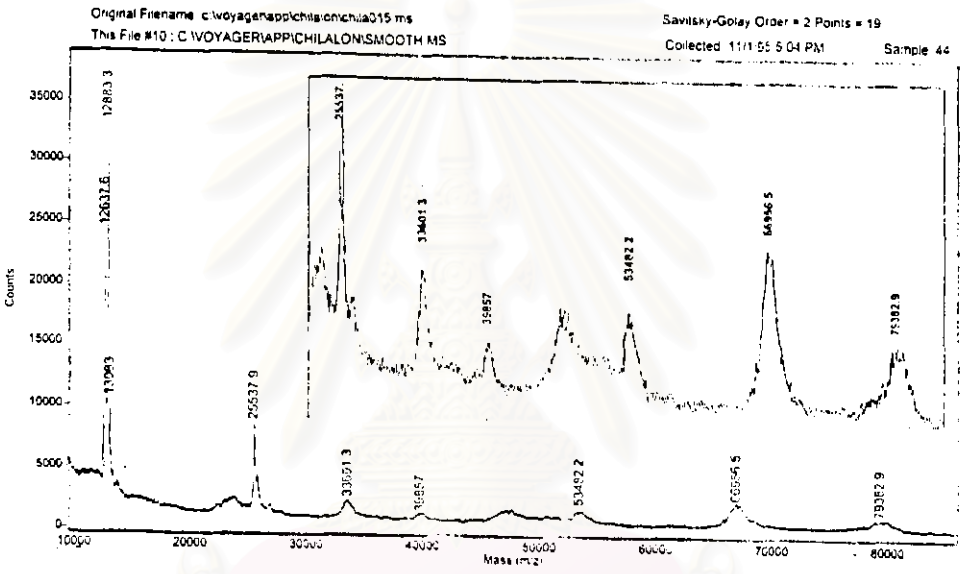


รูปที่ 17 ลักษณะของโปรตีนขนาดต่างๆ ที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี 200 ตรวจสอบโดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

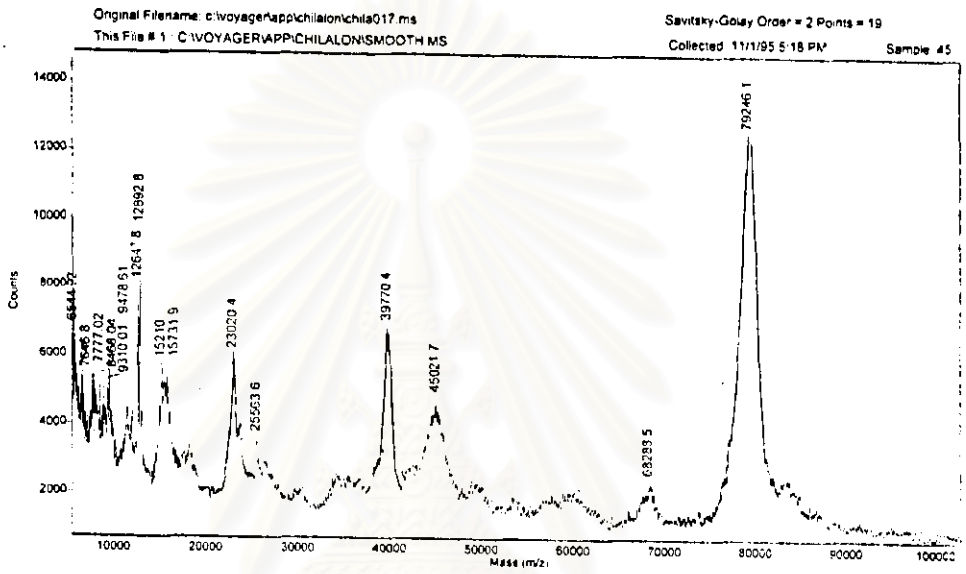
โมเลกุลที่เป็น AFP มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66,933 ในสารนี้มีโมเลกุลใกล้เคียงกับอัลบูมิน และแสดงถึงการที่ยังมีโปรตีนปนเปื้อนที่ไม่ต้องการอยู่อีกมาก



รูปที่ 18 ลักษณะของโปรตีนขนาดต่างๆ ที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 1 หลังผ่านคอลัมน์ คอน เอ เซฟ่าโรสซึ่งคาดว่ามี F-AFP วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี โมเลกุลน้ำหนัก 66905 คือ AFP ยังคงพบโมเลกุลใกล้เคียงกับอัลบูมิน และเป็นโมเลกุลที่ไม่เกี่ยวข้อง

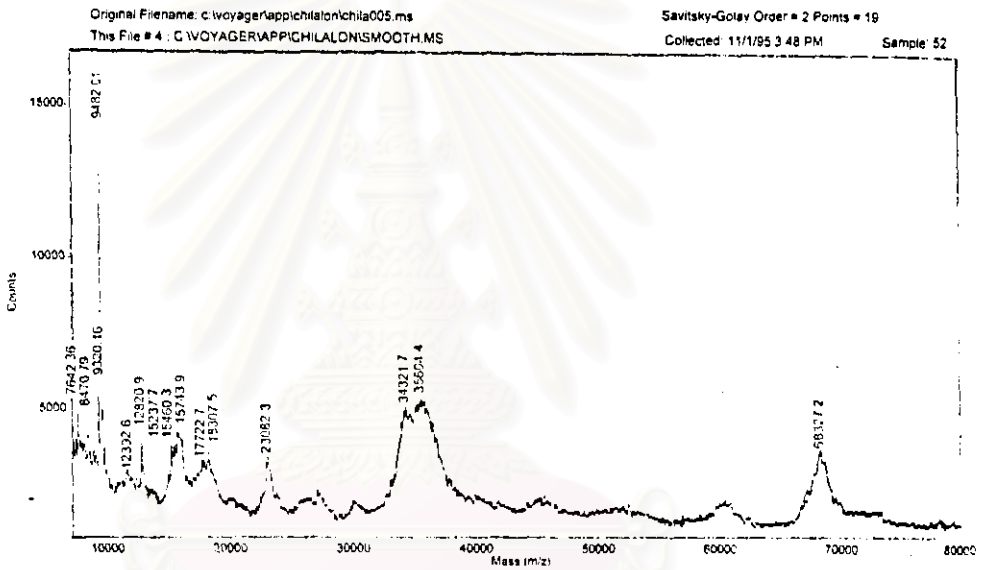


รูปที่ 19 ลักษณะของโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี



รูปที่ 20 ลักษณะของโปรตีนที่อยู่ในสารตัวอย่างส่วนที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งคาดว่ามี H-AFP วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 ลักษณะของโปรตีนที่พบอยู่ในสารตัวอย่างหลังผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ขั้นตอน 4.2.5.4) วิเคราะห์โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบส่วนประกอบโปรตีนที่พบได้จากขั้นตอนการเตรียมระดับต่างๆ โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อีเลกโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และวิธีแมสสเปกโตรโฟโตเมตรี (Mass.)

สารตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการสกัดแยก	วิธีตรวจหาน้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้ (ดาลตัน)								
		แถบที่ 1	แถบที่ 2	แถบที่ 3	แถบที่ 4	แถบที่ 5	แถบที่ 6	แถบที่ 7	แถบที่ 8	แถบที่ 9
ซีรั่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัส	SDS-PAGE	330,000 (++)	22,000 (+++)	180,000 (++)	85,000 (+)	67,000 (++++)	50,000 (+)			
ผ่านคอลัมน์ซิบาครอน บลู เอ										
1 ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์	SDS-PAGE	330,000 (+)	220,000 (+++)	180,000 (+)	85,000 (+)	67,000 (+)	50,000 (++)			
2 ส่วนที่จับกับคอลัมน์	SDS-PAGE	330,000 (++)	220,000 (+)	-	-	67,000 (++++)	-			
ผ่านคอลัมน์เซฟาโรสซุปเปอร์ ซี 200										
โปรตีนส่วนที่ 1	SDS-PAGE	330,000 (++)	220,000 (+)	-	-	-	-			
โปรตีนส่วนที่ 2	SDS-PAGE	-	220,000 (++++)	180,000 (++)	85,000 (+)	67,000 (+)	-			
โปรตีนส่วนที่ 3	SDS-PAGE	-	220,000 (+)	180,000 (+)	85,000 (++)	67,000 (+++)	50,000 (++)			-
	Mass.	-	-	-	79,399 (++)	66,933 (++)	50,902 (+++)			39,754
ผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส										
โปรตีนส่วนที่ 1	SDS-PAGE	-	220,000 (+)	180,000 (+)		67,000 (++++)	50,000 (++)	-	-	-
	Mass.	-	-	-	-	66,905 (++++)	53,473 (+)	50,834 (+)	47,178 (++)	33,491 (+++)
โปรตีนส่วนที่ 2	SDS-PAGE	-	220,000	180,000 (++)	85,000	67,000 (++)	50,000			20,000 (++)
	Mass.	-	-	-	79,399 (++)	66,956 (++)	53,482 (++)			39,754 (++)
โปรตีนส่วนที่ 3	SDS-PAGE	-	-	-	85,000 (+++)	67,000 (+)	54,000 (+)		40,000 (+)	-
	Mass.	-	-	-	79,246 (+++)	68,288 (+)	-		45,021 (++)	39,770 (++)
ผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5										
โปรตีนส่วนที่มี H-AFP	SDS-PAGE				85,000 (++)	67,000 (++)	53,000 (+)		43,000 (+)	
	Mass.					68,000 (+)	-			35,604 (+)

(-) = ไม่ปรากฏแถบโปรตีน

(+-) = ปรากฏแถบจางๆ

(+) = ความเข้มของแถบโปรตีน

(++) = ความเข้มของแถบโปรตีนปานกลาง

(+++) = ความเข้มของแถบโปรตีนมาก

(++++) = ความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด

4.5 การตรวจหาอัลบูมินในสารตัวอย่างที่เตรียมได้ ในแต่ละขั้นตอนการสกัดแยก AFP โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

การตรวจหาอัลบูมินทำตามวิธีในข้อ 3.3 ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่ออัลบูมินที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 0.0625 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ได้ผลดังตารางที่ 15 ซึ่งพบว่า สารที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ยังคงมีอัลบูมินปนเปื้อนอยู่ เมื่อนำสารส่วนนี้มาผ่านคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี 200 พบว่ามีอัลบูมินปนเปื้อนอยู่ในส่วนที่ 3 ซึ่งมี F-AFP และเมื่อนำส่วนที่ 3 นี้มาผ่านคอลัมน์ คอน เอ เซฟาโรส ยังคงพบอัลบูมินปนเปื้อนอยู่ในส่วนที่ 1 ซึ่งมี F-AFP อยู่ในจำนวนที่ต่ำ (17.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนที่ 3 ที่มี H-AFP ปริมาณสูง (213 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่มีอัลบูมินปนเปื้อน และได้นำส่วนนี้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธี HPLC

สรุปขั้นตอนที่ใช้ในการแยก H-AFP ให้บริสุทธิ์จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ

ขั้นตอนแรกเป็นการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อแยก AFP โดยการปั่นแยกเศษเซลตายและสารตกตะกอนขนาดใหญ่ จากนั้นนำซีรัมส่วนใส มาแยกอัลบูมินออกโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดสัมพรรคภาพ ด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล เก็บสารส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งมี AFP อยู่ นำมาแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออก โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน โครมาโทกราฟี แยกเก็บสารได้เป็น 3 ส่วน นำสารส่วนที่ 3 ที่มี AFP มากที่สุดมาผ่านขั้นตอนการแยก F-AFP ออกจาก H-AFP โดยวิธีแอฟฟินิตี โครมาโทกราฟี ด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งแยก AFP ได้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกไม่จับกับคอลัมน์ มี F-AFP ส่วนที่ 2 มี F-AFP ผสมกับ H-AFP และส่วนที่ 3 ซึ่งจับกับคอลัมน์เป็นส่วนที่มี H-AFP จึงนำส่วนที่ 3 นี้มาแยก H-AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนเส้นตรงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที H-AFP ที่แยกได้จากขั้นตอนนี้ นำไปใช้ศึกษาในแง่การเตรียมแอนติบอดีต่อไป

ตารางที่ 15 การตรวจพบอัลบูมิน ในสารตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (ความไวในการตรวจหา 0.0625 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

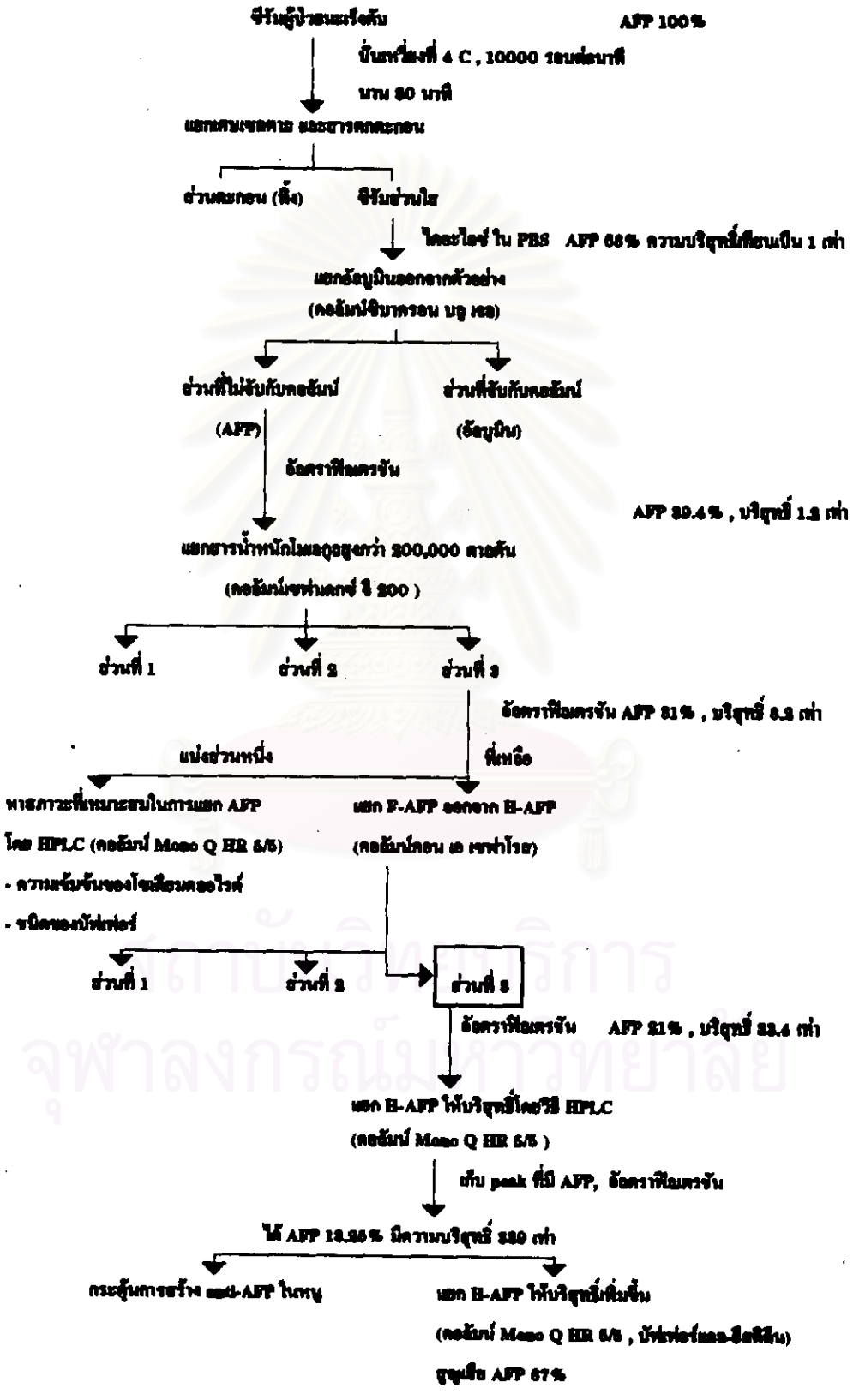
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของอัลบูมิน
ซีรั่มคนไข้เริ่มต้น	+++
ส่วนที่จับกับคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล	+++
ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล	++
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ส่วนที่ 1	-
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ส่วนที่ 2	-
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ส่วนที่ 3	++
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 1	+
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 2	-
ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ส่วนที่ 3	-
ส่วนที่เป็น H-AFP (แยกโดยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5)	-

(+) ความเข้มข้นของอัลบูมินที่ตรวจพบ

(-) ตรวจไม่พบอัลบูมิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปโดยแผนการทำ AFP จากซีรั่มผู้ป่วยมะเร็งตับให้บริสุทธิ์



4.6 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่เตรียมได้

นำ AFP ที่เตรียมได้หลังการผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 จากขั้นตอน 4.2.5.4 ไปฉีดกระตุ้นหนูทดลองจำนวน 2 ตัว ตามวิธีข้อ 3.8.1 ภายหลังจากการฉีดกระตุ้นหนูครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 วันแล้วได้ตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ดังกล่าวในข้อ 3.8.2 สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ AFP ทั้ง 3 ชนิด ในซีรัมหนูได้ผลการทดลองดังตารางที่ 16 โดยพบว่าแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะสูงกับ AFP ที่เตรียมได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (บริษัท Dako ประเทศสหรัฐอเมริกา) และทำปฏิกิริยาจำเพาะต่ำกว่าชนิดแรกกับ AFP ที่แยกได้จากน้ำคร่ำ (ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Morinaga ประเทศญี่ปุ่น)

ตารางที่ 16 คุณสมบัติของแอนติบอดีต่อ AFP (anti-AFP) ที่เกิดจากการใช้ AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัย กระตุ้นหนู (เม้าส์)

หนู (เมาส์)	ความเข้มข้นของ anti-AFP (ซีรัม)	AFP (จากงานวิจัย) (OD 492)	AFP (Dako) (OD 492)	AFP (Morinaga) (OD 492)
ตัวที่ 1	1 : 250	1.50	2.40	1.70
	1 : 500	1.20	2.00	1.30
	1 : 1000	0.90	1:60	1.00
	1 : 2000	0.70	1.10	0.77
	1 : 4000	0.40	0.90	0.50
ตัวที่ 2	1 : 250	1.60	2.70	1.90
	1 : 500	1.30	2.30	1.50
	1 : 1000	1.00	2.00	1.20
	1 : 2000	0.55	1.50	0.89
	1 : 4000	0.28	1.10	0.66
หนูปกติ	1 : 500	0.00	0.00	0.00

4.7 การทำปฏิกริยาของ anti-AFP กับสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอนการสกัดแยก AFP

แอนติบอดีต่อ AFP เตรียมได้จากแหล่งต่างๆดังนี้

ชนิดที่ 1 แอนติบอดีที่ผลิตโดยเซลไฮบริโดมา ซึ่งเตรียมได้จากเซลม้ามหนูซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ (จากขั้นตอน 4.2.5.4) พบว่าได้เซลไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดี 7 ตัวอย่าง (clones) ให้ชื่อว่า 2/9F , 2/2F , 3/5B , 3.5H , 4/3B ,5/12G และ 5/12D

ชนิดที่ 2 แอนติบอดีจากซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFP ชนิดแยกได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (จากบริษัท Dako)

ชนิดที่ 3 แอนติบอดีจากซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFP ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้จากขั้นตอน 4.2.5.4

ผลการทำปฏิกิริยาได้แสดงในตารางที่ 17 โดยแอนติบอดีชนิดที่ 1 มี 2/9F ทำปฏิกริยากับ AFP จากบริษัท Dako เพียงอย่างเดียว มี 5/12D ทำปฏิกริยากับ AFP มาตรฐานทั้ง 2 ชนิด ขณะที่ 2/2F , 3/5B และ 3/5H ทำปฏิกริยากับ AFP ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ และสารตัวอย่างส่วนที่ 3 ที่ได้จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 (ข้อ 4.2.3) 4/3D และ 5/12G ทำปฏิกริยากับ AFP ที่เตรียมได้เพียงอย่างเดียว

แอนติบอดีที่ได้จากซีรัมหนูทั้งที่กระตุ้นด้วย AFP ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (บริษัท Dako) และที่แยกได้จากซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ (แอนติบอดี ชนิดที่ 2 และ 3) ทำปฏิกริยาได้กับแอนติเจนทุกชนิดที่ทดสอบ แต่ทำปฏิกิริยาได้ต่ำกับสารละลายส่วนที่ 1 จากขั้นตอนการผ่านคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส และมีความสามารถทำปฏิกริยากับ AFP แต่ละชนิดต่างกัน คือแอนติบอดีจากซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFP จาก DAKO สามารถทำปฏิกริยากับ AFP ทั้ง 3 ชนิดได้สูง โดยเรียงลำดับความแรงของปฏิกริยาต่อ AFP ดังนี้คือ AFP จากบริษัท Dako ,

AFP ที่ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Morinaga และ AFP ที่เตรียมได้เอง ตามลำดับ สำหรับแอนติบอดีจากซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วย AFP ที่สกัดได้เอง สามารถทำปฏิกริยาได้สูงสุดกับ AFP จากบริษัท Dako รองลงมาคือ AFP ที่สกัดได้เองและ AFP จากบริษัท Morinaga ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่ออัลบูมินโดยวิธี ELISA พบว่าแอนติบอดีจากซีรัมหนูสามารถทำปฏิกิริยากับอัลบูมินได้ แต่แอนติบอดีที่ผลิตจากเซลไฮบริโดรมา ไม่ทำปฏิกิริยากับอัลบูมิน

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า งานวิจัยนี้สามารถเตรียม H-AFP ที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง โดยสามารถชักนำให้สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อ AFP ที่เตรียมจากน้ำในช่องท้องของผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีขายทางการค้า (Dako) แต่มีความจำเพาะต่ำต่อ AFP ที่เตรียมจากน้ำคร่ำ (ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Morinaga ประเทศญี่ปุ่น)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่แยกได้จากขั้นตอนต่างๆ

แอนติเจน / แอนติบอดี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร						
	ชนิดของ AFP						
	สารตัวอย่างส่วนที่ 3 ผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200	ผ่านคอลัมน์โดยเอเซฟาโรส		ได้จากขั้นตอนผ่าน HPLC (4.2.5.4)	บริษัท Dako	บริษัท Morinaga	อัลบูมิน
		สารส่วนที่ 1	สารส่วนที่ 3				
ชนิดที่ 1							
2/9F	-	-	-	0.10	1.35	0.17	-
2/2F	0.37	-	-	0.28	-	-	-
3/5B	0.74	-	-	0.66	-	-	-
3/5H	1.40	-	-	1.67	-	-	-
4/3E	-	-	-	0.46	-	-	-
5/12G	-	-	-	0.32	-	-	-
5/12D	-	-	-	-	1.88	1.00	-
ชนิดที่ 2 ซีรัมหนูกระตุ้นด้วย AFP (Dako) เจือจาง 1:500	2.00	0.51	2.87	1.15	3.10	2.45	3.1
ชนิดที่ 3 ซีรัมหนูกระตุ้นด้วย AFP จากขั้นตอน (4.2.5.4)	1.40	0.58	1.16	1.00	1.38	0.54	1.29
ซีรัมหนูปกติเจือจาง1:500	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ สารตัวอย่างที่ใช้เคลือบเพลตเจือจางให้ AFP มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย