บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณ AFP ด้วยวิธี EIA (enzyme immuno assay)

ใช้ชุดตรวจสอบ AFP ที่ผลิตโดยบริษัท Abbott laboratories USA. ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิตดังต่อไปนี้

1 เติม AFP มาตรฐานเข้มข้น 0 , 2 , 5 , 10 และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมบนจานทดสอบ (titer plate) ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control)

2 นำสารตัวอย่างที่ต้องการหาค่า AFP มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของ AFP อยู่ในช่วง 2-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมเปล่าบนจานทดสอบ

3 นำ anti-AFP (goat) ซึ่งถูกตรึงไว้บนเม็ดพลาสติก (bead) ใส่ลงในหลุมที่มีสารตาม ข้อ1 และ 2 หลุมละ 1 เม็ด จากนั้นบ่มไว้ในอ่างปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างเม็ดพลาสติกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อให้สารตัวอย่างถูกจับไว้ด้วย anti-AFP ที่ตรึงไว้บนเม็ดพลาสติก

4 เติม anti-AFP (goat) ตัวที่ 2 ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เพื่อช่วยในการตรวจหา AFP ที่ anti-AFP ตัวแรกจับไว้ แล้วบ่มปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3

5 เติมสารละลายซับสเตรต OPD (o-phenylenediamine 2 HCL) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หลังเกิดสี หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดย กรดซัลฟิวริค 1 นอร์มอล หลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าปฏิกิริยาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ปริมาณ AFP ในสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน (ดังภาคผนวก ก) ที่แสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.2 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

3.2.1 โดยวิธีอัลตราไวโอเลต สเปคโตรโฟโตเมทรี (ultravioletspectrophotometry) (Johnson and Thorpe , 1987)

วิธีนี้ใช้วัดปริมาณโปรตีนที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.05 - 2 มิลลิกรัม โดยอาศัยหลักการที่ กลุ่มฟีนอล (phenolic group) ของกรดอะมิโนไทโรซีน และกลุ่มอินโดล (indolic group) ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน ของโปรตีน สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร กรณีที่สารตัวอย่างไม่บริสุทธิ์ และมีการปนเปื้อนของกรดนิวคลีอิก การหาปริมาณโปรตีนทำโดย นำสารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาค่าโปรตีนด้วยสูตรสมการดังต่อไปนี้

โปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = 1.55 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

- 0.77 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

<u>หมายเหตุ</u> ที่ระยะทางแสงผ่าน (light path) 1 เซนติเมตร

3.2.2 โดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford's method หรือ dyebinding method)

(Bradford , 1976)

หลักการของวิธีนี้คือ การย้อมติดสีของโปรตีนด้วยสี coomasie brilliant blue ซึ่งเตรียมในสารละลายกรด โดยเมื่อโปรตีนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสี จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสี จาก 465 เป็น 595 นาโนเมตร สำหรับในการทดลองนี้ใช้สีย้อมโปรตีนสำเร็จรูปที่ผลิตโดยบริษัท Bio-Rad laboratories , USA. (สีย้อมโปรตีนไบโอแรด) การหาโปรตีนโดยวิธีนี้สามารวัดโปรตีนที่ระดับความไว 2 ระดับ คือ

1 วิธีวัดโปรตีนปริมาณน้อย (micro assay) : วัดโปรตีนความเข้มข้นระหว่าง 1-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการผสมระหว่างสารละลายตัวอย่างกับสีย้อมโปรตีนไบโอแรดในสัดส่วน 4 ต่อ 1 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 5-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 2 , 4 , 8 , 16 และ 25 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (ดังภาคผนวก ข)

2 วิธีมาตรฐาน (standard assay) : วัดโปรตีนที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.2 -1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางสีย้อมโปรตีนไบโอแรด ด้วยน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 ต่อ 4 โดยปริมาตร จากนั้นผสมสารละลายตัวอย่างกับสีที่เจือจางแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 5-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีน BSA มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 100 , 200 , 300 , 400 , 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังภาคผนวก ค)

3.3 การตรวจหาอัลบูมินโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (immuno diffusion : Ouchterlony) (Johnson and Thorpe , 1987)

เตรียมอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline ; PBS) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 หลังจากหลอมรุ้นให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทอะกาโรสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ขนาดกว้าง2.5 ยาว 7.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้รุ้นแข็งตัว เจาะรุ้นให้เป็นรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3 เซนติเมตร จำนวน 6 หลุม ให้หลุมหนึ่งอยู่ตรงกลาง หลุมอื่นเป็นรัศมี นำแอนติบอดีต่ออัลบูมิน ซึ่งเตรียมได้จากกระต่าย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งมี IgG เข้มข้น 13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงในหลุมตรงกลาง และหยดสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาอัลบูมิน ซึ่งมีโปรตีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่อยู่รอบๆหลุมกลาง ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (อัลบูมิน) กับ แอนติบอดี (anti-albumin) ในกล่องที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอัลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 , 0.5 , 0.25 , 0.125 , 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรณีที่มีอัลบูมินในสารละลายตัวอย่าง จะพบเส้นขาวขุ่น (precipitin line) ซึ่งเกิดจากการตกตะกอนของสารอัลบูมินกับแอนติอัลบูมินบนวุ้น

3.4 การสกัดแยก AFP ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แบบเพิ่มความเข้มข้นเป็นลำดับส่วน

วิธีนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ต้องการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการแยก AFP ออกจากโปรตีนอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีของ Twomey และ Sweet (1976) จึงทำการตกตะกอนโปรตีนเป็นลำดับส่วน โดยการนำซีรัมคนไข้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร จนกระทั่ง

ซีรัมมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ โดยกวนตลอดเวลาในที่เย็นจนกระทั่งตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารผสมนี้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนที่เป็นตะกอน นำไปละลายใน PBS เข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 นำสารละลายส่วนบน ไปตกตะกอนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวปริมาตร 0.895 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปั่นแยกส่วนที่เป็นตะกอน และนำส่วนสารละลายไปตกตะกอนต่อโดยเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ โดยเติมแอมซัลเฟตอิ่มตัวปริมาตร 1.19 , 1.67 , 2.5 , 4.17 และ 8.33 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำตะกอนที่ได้แต่ละขั้นไปละลายใน PBS จากนั้นตรวจหาโปรตีน AFP และอัลบูมิน (ตามวิธีในข้อ 3.1 , 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ)

3.5 การแยกและทำ AFP ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโทกราฟี

3.5.1 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อการสกัดแยก AFP ให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างที่ใช้เพื่อการแยก AFP เป็นซีรัมผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่สะสมจากเลือดผู้ป่วยซึ่งให้ผลการตรวจ AFP เป็นบวก ปกติในซีรัมมีโปรตีนหลายชนิดปะปนอยู่ การวิจัยเบื้องต้นจึงเริ่มด้วยการแยกสารที่ไม่ต้องการเหล่านี้ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยนำซีรัมมาผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

ก) แยกเศษเซลตาย (debris) และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 14,000 ดาลตัน

ด้วยการนำซีรัมดังกล่าวปริมาตร 70 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเศษเซลตายและสารปนเปื้อนที่มีขนาดใหญ่ซึ่งเป็นส่วนตะกอนทิ้ง จากนั้นนำสารละลายส่วนบนที่ปั่นแยกได้

ไปชะล้างสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 14,000 ดาลตัน ด้วยวิธีไดอะไลซ์ใน PBS ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 20 เท่าของสารตัวอย่าง (ถุงไดอะไลซิส ที่ใช้มีรูพรุนซึ่งยอมให้สารที่มีขนาดเล็กกว่า 14,000 ดาลตัน ผ่านได้) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (โดยกวนบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วย magnetic stiror พร้อมกันนี้เพื่อเป็นการปรับให้สารตัวอย่างสมดุลย์กับ PBS) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และตะกอนขนาดเล็ก (เนื่องจากแต่ละขั้นตอนการแยก AFP ต้องใช้เวลานานจึงมีโอกาสเพิ่มการปนเปื้อน) จากนั้นเก็บสารตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ตรวจหาค่าโปรตีนและความบริสุทธิ์ของ AFP ได้จากสมการ

ความบริสุทธิ์ของ AFP = AFP (มิลลิกรัม) / โปรตีน (มิลลิกรัม)

ช) การแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่างโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดสัมพรรคภาพ (affinity chromatography)

เนื่องจากอัลบูมินเป็นสารที่มีปริมาณสูงในซีรัม (ประมาณ 4-6 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ที่สำคัญคือมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับ AFP มาก จึงต้องกำจัดออกไปจากตัวอย่างให้มากที่สุดก่อน จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนอื่นๆต่อไป การแยกอัลบูมินในที่นี้ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ ใช้คอลัมน์ชนิดที่บรรจุด้วยเม็ดเจล ซิบาครอน บลู

วิธีเตรียมเจล และคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล

นำซิบาครอน บลู เจล มาล้างด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanal) ที่มีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 เท่าของเจลที่ใช้ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ให้เม็ดเจลตกตะกอน แล้วจึงดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 เท่าของปริมาตรเจล นำเจลที่เตรียมด้วยวิธีดังกล่าวแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร (3 เท่าของปริมาตรเจล) เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ คอลัมน์ที่เตรียมได้นี้มีประสิทธิภาพในการจับกับอัลบูมินได้เท่ากับ 11.4 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Young and Webb , 1978)

การแยกอัลบูมินด้วยคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเกลือและโมเลกุลขนาดเล็กออกแล้ว ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ซิบาครอน บลู เจล ที่เตรียมไว้ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วย PBS ความเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายชะคอลัมน์ เป็นลำดับส่วนๆ ละ 3 มิลลิลิตร วัดโปรตีนในแต่ละหลอด โดยวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD 280) ชะคอลัมน์จนกระทั่งโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่ง AFP อาจจะอยู่ในส่วนนี้ ถูกกำจัดออกหมด โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คงที่ ซึ่งต่ำกว่า 0.1

จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่คืออัลบูมิน ด้วยสารละลาย PBS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จนกระทั่งโปรตีนหลุดจากคอลัมน์จนหมด

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและ AFP จากสารละลายโปรตีน ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และส่วนที่จับกับคอลัมน์ (อัลบูมิน) ที่แยกได้ โดยวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีอัลตราไวโอเลตสเปคโตรโฟโตเมทรี ตามวิธี 3.2.1 ส่วน AFP ตามวิธี 3.1 และตรวจหาอัลบูมินตามวิธี 3.3

นำสารละลายตัวอย่างส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งมี AFP มาทำให้เข้มข้นขึ้น พร้อมทั้งแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน ออกด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ให้ได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 20-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารยับยั้งเอ็นไซม์โปรติเอส (protease inhibitor) (วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (เพื่อยับยั้งการย่อยสลายของโปรตีน) กรองสารตัวอย่างที่เตรียมได้ผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลองในขั้นต่อไป โดยเรียกสารที่ได้นี้ว่าสารแยกอัลบูมินแล้ว

ค) การกำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200,000 ดาลตัน ออกจากสารตัวอย่างโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

หลังการแยกอัลบูมินออกจากตัวอย่าง แล้วนำสารละลายที่ได้มาแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200,000 ดาลตัล โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน ใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200 ซึ่งมีวิธีการแยกดังนี้คือ

การเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

ชั่งเซฟาเดกซ์ จี 200 ประมาณ 6 กรัม นำมาแขวนลอยใน PBS ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แช่ไว้ในอ่างปรับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อเจลพองตัวสมบูรณ์แล้วนำไปล้างด้วย PBS 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดเม็ดเจลละเอียดทิ้ง กำจัดฟองอากาศ (degassing) แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง1.7 ยาว 60 เซนติเมตร ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย PBS ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล เพื่อปรับสภาพคอลัมน์ให้สมดุลย์

การแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ออกจากตัวอย่างด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี 200

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการแยกอัลบูมินออกแล้ว ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 20-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ประมาณ 2.8 - 4.2 มิลลิลิตร (2 - 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรคอลัมน์) ชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย PBS ด้วยอัตราเร็ว 4 - 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการแยกในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บลำดับส่วนจนกระทั่งโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์หมด โดยมีค่า OD_{280} ต่ำกว่า 0.1 นำสารละลายที่แยกได้มาตรวจหาค่าโปรตีน และแอคติวิตีของ AFP ตามวิธี 3.1 รวมลำดับส่วนสารละลายที่มี AFP เข้าด้วยกัน

นำสารละลายส่วนที่มี AFP ที่แยกได้ มากำจัดน้ำออกเพื่อให้ได้ AFP ที่มีความเข้มข้นสูง โดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ผ่านแผ่นกรองชนิดที่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 30,000 ดาลตันผ่านออกได้ จากนั้นนำมาไดอะไลส์ โดยแช่ในบัฟเฟอร์ เอ (ทริส เอ็ช ซี แอล บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ มักเนเซียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ เข้มข้นอย่างละ 1.0 มิลลิโมลาร์ ทวีน 20 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมเอไซด์ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10-20 เท่าของสารละลายตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อปรับสภาพสารละลายให้อยู่ในบัฟเฟอร์ เอ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีน และ AFP เก็บสารละลายไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : สารที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนจะเติมสารยับยั้งเอ็นไซม์โปรติเอส ในอัตราส่วน 1: 10 โดยปริมาตร เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีน และกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเสมอ

ง) การแยก F-AFP ออกจาก H-AFP โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส (concanavalin A sepharose)

วิธีเตรียมคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส

นำคอน เอ เซฟาโรส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ยาว 8.5 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ เอ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็ว 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ความจุของคอลัมน์ในการจับกับ AFP เท่ากับ 52 ไมโครกรัมต่อปริมาตรคอลัมน์ 0.9 มิลลิลิตร (Chan and Miao , 1986)

การแยก F-AFP ออกจาก H-AFP ด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้จาก 3.5.1 ค ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาผ่านลงในคอลัมน์ คอน เอ เซฟาโรสที่เตรียมไว้ ด้วยอัตราเร็ว 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นชะสารละลายส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ด้วยบัฟเฟอร์ เอ (F-AFP จะปนอยู่ในส่วนนี้) เก็บสารละลายที่ชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บลำดับส่วนจนกระทั่งโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์หมด โดยวัดค่า OD_{280} ได้ต่ำกว่า 0.1 แล้วจึงชะโปรตีนส่วนที่เกาะติดกับคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เอ ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (H-AFP จะถูกชะออกมาปนอยู่ในส่วนนี้) เก็บสารละลายเป็นลำดับส่วน นำไปตรวจหาค่าโปรตีนและ AFP รวบรวม AFP แต่ละส่วนที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน

3.5.2 การแยก AFP ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบใช้ความดันสูง (high performance liquid chromatography ; HPLC) ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

การเตรียมสารละลายที่เกี่ยวข้อง และคอลัมน์ ก่อนการสกัดแยก AFP มีข้อควรระวังดังต่อไปนี้คือ

คุณภาพน้ำ : ใช้น้ำบริสุทธิ์ชนิดที่ผ่านระบบ Milli q ซึ่งผ่านขั้นตอน การแยกสารอินทรีย์ออกโดยใช้ถ่านกัมมันต์ แล้วจึงไปผ่านขั้นตอนการขจัดอิออน และกรองผ่าน millipore membrane เพื่อขจัดสารแขวนลอย และเชื้อจุลินทรีย์ให้หมดเป็นขั้นสุดท้าย (น้ำนี้มีความบริสุทธิ์สูงมากจะมีค่าความต้านทานไฟฟ้า 18 megaohm-cm)

เตรียม mobile phase : ใช้ชนิด HPLC grade และกำจัดเศษผงและตะกอนขนาดเล็กโดยกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนใช้

กำจัดฟองกาซที่อยู่ในน้ำ และ mobile phase : โดยใช้ ultrasonic bath หรือ vacuum pump การกำจัดฟองกาซเพื่อไม่ให้ระบบการแยก และระบบ detecter ซึ่งจะทำให้เกิด peak ที่ผิดปกติ

สารตัวอย่าง : ก่อนการแยกด้วย HPLC นำสารตัวอย่างมาผ่านการกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อกำจัดตะกอนขนาดเล็ก และเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งอาจทำให้ความดันของระบบสูงกว่าปกติ

เตรียมคอลัมน์ : ล้างคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ด้วยน้ำบริสุทธิ์ ด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ตั้งต้น (starting buffer : มีค่า ionic strength ต่ำ) อีกประมาณ 1 ชั่วโมง ตามด้วยการชะโปรตีนที่อาจติดค้างในคอลัมน์ ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่า ionic strength สูง (eluting buffer) ประมาณ 1-2 ชั่วโมง เพื่อ

ยืนยันว่าไม่มีโปรตีนตกค้างอีกแล้ว (วัดค่า OD $_{280}$ ได้เท่ากับ 0) จึงเริ่มปรับสภาพคอลัมน์ให้สมดุลย์ด้วยบัฟเฟอร์ดั้งเดิม

การทำความสะอาดคอลัมน์ : ภายหลังการใช้งานประมาณ 5-10 ครั้ง จะต้องทำความสะอาดคอลัมน์ โดยการฉีดล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และล้างคอลัมน์ด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ ด้วยอัตราเร็ว 0.25-0.5 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วฉีดซ้ำด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ

3.5.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก AFP ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

ในการแยก AFP ให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด Mono Q HR 5/5 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารคือ ปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคลอลัมน์ ดังนั้นก่อนการแยกจึงได้ทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

การศึกษาหาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการแยก AFP โดยวิธี เกรเดียนท์เส้นตรง (salt gradient) ด้วย HPLC

สารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยก ได้จากขั้นตอนการแยกสารโมเลกุลใหญ่ ออกไปแล้ว (3.5.1 ค) ซึ่งมีโปรตีนเข้มข้น 1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี AFP 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารตัวอย่างปริมาตร 60 ไมโครลิตร ฝานลงในคอลัมน์ ชะโปรตีนที่ติดกับคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ได้ทดลองแปรใน

ช่วงตั้งแต่ 0-1.0 , 0-0.5 , 0-0.35 และ 0-0.3 โมลาร์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ไตรเอทาโนลามีน (triethanolamine : TEA) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 เวลาที่ใช้ในการชะ อยู่ระหว่าง 50-60 นาที อัตราเร็วในการชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วนๆ ละ 1 มิลลิลิตร ตรวจหา AFP จาก peak ที่แยกได้ เลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่สามารถแยก AFP ได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการแยก AFP ในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแยก AFP ด้วย HPLC

โดยทำการเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ แอล-ฮีสติดีน (L-histidine) ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6 และ TEA เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 สารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการแยก ได้จากขั้นตอน (3.5.1 ค) ชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 50 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหา AFP จาก peak ที่แยกได้ เปรียบเทียบกราฟโปรตีนที่แยกได้ จากการใช้บัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด

3.5.2.2 การแยก F- AFP และ H- AFP โดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

สารตัวอย่างได้จากขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส (ขั้นตอน 3.5.1 ง) ซึ่งแยกสารตัวอย่างได้เป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 คาดว่ามี F-AFP (ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส) ส่วนที่ 2 คาดว่ามี F-AFP ผสมกับ AFP ชนิดที่ทำปฏิกริยากับ lentil lectin ได้คือ H-AFP และส่วนที่ 3 คือส่วนที่จับกับคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส ซึ่งคาดว่าควรเป็น H-AFP ตามที่ Sell (1990) รายงานไว้

นำสารตัวอย่างแต่ละส่วนที่แยกได้มาแยกผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 และชะคอลัมน์ด้วยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์

I17430094

ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ TEA เข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.0 ชะคอลัมน์เป็นเวลา 50 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหา peak AFP ที่แยกได้ ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.1

3..5.2.3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง (เริ่มต้น) ต่อความบริสุทธิ์ และ ปริมาณ H-AFP ที่สกัดแยกได้

ทำการแยก H-AFP เพื่อให้ได้สารปริมาณมาก โดยทำการเพิ่มปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างที่นำมาแยก โดยนำสารละลายส่วนที่ 3 (โปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส) ที่มีโปรตีน 100 , 250 , 460 และ 920 ไมโครกรัมมาผ่านในคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ตามลำดับ หลังจากชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.3 โมลาร์ ในบัฟเฟอร์ TEA เป็นเวลา 50 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เปรียบเทียบกราฟโปรตีนที่แยกได้ เพื่อหาข้อมูลในการกำหนดความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการสกัดแยก AFP ทำการสะสม H-AFP ที่แยกได้ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน ตรวจหาปริมาณโปรตีนและ AFP

3.5.2.4 การแยก H-AFP ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธี HPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 โดยชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์แอล-ฮีสติดีน

นำสารละลาย H-AFP ที่ได้จากการเก็บสะสมจากขั้นตอน 3.5.2.3 มาทำการแยก H-AFP ซ้ำอีกครั้ง โดยปรับสารละลายตัวอย่าง AFP ที่ใช้สกัดให้ละลายอยู่ในแอล-ฮีสติดีน บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.6 ด้วยวิธีไดอะไลซีส จากนั้นนำ AFP ตัวอย่างมาผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 ชะคอลัมน์โดยวิธีเกรเดียนท์เส้นตรง ใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.2 โมลาร์ ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ แอล-ฮีสติดีน เป็นเวลา 60 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจหา peak AFP

3.6 การทดสอบความบริสุทธิ์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของสารต่างๆในสารตัวอย่าง ซึ่งได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำ AFP ให้บริสุทธิ์

วิธีที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างขั้นตอนการทำ AFP ให้บริสุทธิ์ ใช้ 2 วิธี คือ วิธีแรกใช้วิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟลิซิสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacryamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) วิธีที่สอง อาศัยการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ AFP ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

3.6.1 โดยวิธีโพลีอะคริละไมด์ เจล อิเลคโตรโฟลิซิสแบบเอสดีเอส

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้แต่ละขั้นตอน ปรับให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานผสมกับสารละลาย sample buffer (การเตรียม sample buffer ดังในภาคผนวกที่ 9) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปใช้เพื่อการตรวจสอบโดยหยดลงในช่องเจล ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตรต่อ 1 ช่อง

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight) ได้แก่ thyroglobulin (M.W. 669,000) , ferritin (M.W. 440,000) , catalase (M.W. 232,000) , lactate dehydrogenase (M.W.140,000) และ albumin (M.W. 67,000 ดาลตัน) กลุ่มที่ 2 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) ได้แก่ phosphorylase 6 (M.W. 94,000) , albumin (M.W. 67,000) , ovalbumin (M.W.43,000) , carbonic anhydrase (M.W. 30,000) , trypsin inhibitor (M.W. 20,100) และ lactalbumin (M.W. 14,400)

การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

การเตรียมเจลใช้กระจก 2 แผ่นขนาด กว้าง 8 ยาว 10 เซนติเมตร และกว้าง 7 ยาว 10 เซนติเมตร มีแผ่นพลาสติก (spacer) ขนาดกว้าง 0.9 ยาว 8.5 หนา 0.1 เซนติเมตร วางเป็นกรอบแม่พิมพ์ นำ separating gel (วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 6) ชนิดที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์ เทลงในกระจกแม่พิมพ์อย่างช้าๆ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ให้เจลมีความสูง 5 เซนติเมตร ปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่นหรือสารละลายเอ็สดีเอส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็งตัว (ประมาณ 1-2 ชั่วโมง) เทน้ำส่วนบนทิ้ง และล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นเททับด้วยสารละลาย stacking gel ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 4 เปอร์เซ็นต์ (วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 7) ใส่แม่พิมพ์ช่องเจล (comb) ทิ้งให้เจลแข็งตัว (ประมาณ $^{1}/_{2}$-1 ชั่วโมง)

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

นำแผ่นเจลที่เตรียมได้ประกอบเข้ากับชุดทำอิเลคโตรโฟรีซีส บรรจุลงในอ่างบัฟเฟอร์ที่มี running buffer (ทริส-เอสดีเอสไกลซีส pH 8.3 วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 8) ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านบน ผ่านกระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ 80 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งแถบสีของโบรโมฟีนอลบลู (bromophenal blue ; ใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีน) เคลื่อนที่ไปจนกระทั่งเกือบถึงปลายล่างของแผ่นเจลประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ใช้เวลาประมาณ 50 นาที) จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

การย้อมสีโปรตีนในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล

นำแผ่นเจลที่ผ่านขั้นตอนการทำอิเลคโตรโฟรีซีส ไปย้อมในสารละลายโคแมสซี บริลเลียนท์ บลู อาร์ 250 (coomasie brilliant blue R 250 ; วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 10) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปขจัดสีส่วนเกิน โดยแช่ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution : วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 11) จนกระทั่งส่วนที่เป็นโปรตีนบนเจลปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินชัดเจน

3.6.2 โดยวิธีแมสสเปกโตรเมทรี

การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของ AFP ที่สกัดได้ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ทำการวิเคราะห์โดยบริษัท Perseptive Biosystems ด้วยเครื่อง Time-of-fleight Mass spectrometer รุ่น Voyager-DE ที่มีกระบวนการทำให้สารกลายเป็นอิออนด้วยเทคนิค Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ที่ทำงานในสภาวะ Linear mode และมี Delay Extraction เป็นเวลา 300 μ sec ข้อมูลปรับแต่งด้วย Savitsky-Golay funtion เมตริกซ์ที่ใช้คือ Sinapenic acid (SA) โดยมีสัดส่วนของ AFP : SA เท่ากับ 1 : 9

3.7 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของ AFP ที่แยกได้

เพื่อศึกษาว่า AFP ที่สกัดได้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนหรือไม่ ด้วยการติดตามดูค่าของแอนติบอดีต่อ AFP (anti-AFP) ที่สร้างขึ้นในซีรัมหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย AFP ที่แยกได้ (จากขั้นตอน 3.5.2.3) ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

3.7.1 การกระตุ้นหนูให้สร้าง anti-AFP

นำสารละลายที่คาดว่ามี H-AFP (เตรียมได้จากขั้นตอน 3.5.2.3) มาปรับให้อยู่ในสารละลาย normal saline โดยวิธีไดอะไลซีส ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำสารละลาย AFP ที่ได้ 20 ไมโครกรัม ผสม complete freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร หลังจากผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปฉีดกระตุ้นหนูสายพันธุ์ BALB/c อายุประมาณ1 $^{1}/_{2}$ เดือน โดยฉีดเข้าช่องท้องหนู (intraperitonum ; IP) หลังจากหนูได้รับการกระตุ้นครั้งแรกนาน 20 วัน ทำการฉีดกระตุ้นครั้งที่สองโดยทำการผสมสารละลาย AFP 20 ไมโครกรัม กับ incomplete freund's adjuvant หลังจากนั้น 5 วัน จึงทำการเจาะเลือดหนูเพื่อตรวจหา anti-AFP ในซีรัม

3.7.2 วิธีทดสอบแอนติบอดีต่อ AFP ในซีรัมหนูโดยวิธี เอนไซม์ ลิงค์ อิมมูโนซอยเบนท์ เอสเสย์ (enzyme linked immunoabsorbent assay ; ELISA)

การเคลือบแอนติเจน (สารที่มี AFP) ลงบนหลุมทดสอบ

นำสารละลาย AFP ที่แยกได้จากขั้นตอน 3.5.2.3 และ AFP มาตรฐาน แยกได้จากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (บริษัท Dako) และจากน้ำคร่ำ (บริษัท Morinaga) เจือจางให้มีความเข้มข้นของ AFP 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PBS ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.4 เติมสารละลาย AFP ที่เตรียมได้ลงในอิมมูโนเพลต ชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างหลุมปฏิกิริยาด้วย PBS จำนวน 3-4 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายใน PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที

การตรวจหา anti-AFP ในซีรัมหนู

ภายหลังการล้างหลุมปฏิกิริยาด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง นำซีรัมหนูที่ต้องการตรวจหา anti-AFP มาเจือจางด้วยสารละลาย BSA (เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 1:250 , 1:500 , 1:1000 , 1:2000 และ 1:4000 จากนั้นเติมซีรัมหนูที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เคลือบแอนติเจนไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างหลุมปฏิกริยาด้วย PBS แล้วเติม แอนติบอดีตัวที่สอง คือ monoclonal rat anti mouse IgG peroxidase conjugate ที่เจือจางด้วยสารละลาย BSA (เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 1:2000 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 $^{1}/_{2}$ ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายซับสเตรต O-phenylenediamine (OPD) (วิธีเตรียมดังภาคผนวกที่ 13) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ปล่อยให้เกิดปฏิกริยาในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.8 การศึกษาการทำปฏิกริยาของ anti-AFP กับสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นตอนของการสกัดแยก AFP

นำแอนติบอดีต่อ AFP ที่เตรียมได้ มาทดสอบการทำปฏิกิริยากับสารที่ได้จากแต่ละขั้นตอน ของการสกัดแยก AFP สารตัวอย่างที่ใช้เป็นแอนติเจนเพื่อทดสอบปฏิกิริยา มีดังนี้คือ

1. ซีรัมผู้ป่วยมะเร็ง (ซึ่งได้รับการตรวจสอบแล้วว่ามี AFP)
2. ซีรัมผู้ป่วยที่ได้รับการแยกอัลบูมินออกแล้ว (จากขั้นตอน 3.5.1 ข)
3. สารตัวอย่างที่ได้รับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออก (จาก 3.5.1 ค)

4. สารตัวอย่างที่ได้รับการแยกด้วยคอลัมน์คอน เอ เซฟาโรส (จากขั้นตอน 3.5.1 ง)

5. สารตัวอย่างที่ได้รับการแยกด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (จากขั้นตอน 3.5.2.3)

6. AFP มาตรฐาน เตรียมจากน้ำในช่องท้องผู้ป่วยมะเร็งตับ (Ascites) จากบริษัท Dako ประเทศสหรัฐอเมริกา

7. AFP มาตรฐาน เตรียมจากน้ำคร่ำ ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Morinaga ประเทศญี่ปุ่น

การทดสอบปฏิกริยาของ anti-AFP กับสารตัวอย่างข้างต้นด้วยวิธี ELISA (ตามขั้นตอน 3.7.2) โดยเคลือบ AFP และสารตัวอย่างชนิดต่างๆ ลงบนอิมมูโนเพลตชนิด 96 หลุม แอนติบอดีที่นำมาทดสอบได้มาจากน้ำอาหารเลี้ยงเซลไฮบริโดมา ที่ผลิต anti-AFP ซึ่งเลี้ยงเซลไว้ 3-4 วัน และจากซีรัมหนูซึ่งเจือจาง 500 เท่า จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาทดสอบกับสารตัวอย่างที่เตรียมไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย