Thesis Title	Development of Enzyme Immunoassay for Alpha-fetoprotein
Author	Mr.Wisut Kungwantrakul
M.Sc.	Biochemistry
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Maitree Suttajit.... Chairman
	Assist. Prof. Dr. Vichai Wongchai..... Member
	Assoc. Prof. Dr. Kannika Phornphutkul.. Member
	Assoc. Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon.. Member

Abstract

Alpha-fetoprotein (AFP) has been increasingly employed as an important tumor marker in clinical treatment and follow-ups of liver cancer diseases. The aim of this research was to develop an enzyme immunoassay(EIA) for AFP by using home-made reagents such as purified AFP, anti-AFP, and peroxidase-conjugated anti-AFP.

AFP was purified from human cord serum by techniques based on the physicochemical properties of AFP molecule and followed by sequential purification steps: ammonium sulfate precipitation, chromatography on DEAE-cellulose, gel-filtration on Sephadex G-200, affinity chromatography on Con A-Sepharose 4B and chromatography on CM-cellulose respectively. Analyses of the prepared AFP by polyacrylamide gel electrophoresis and immunodiffusion indicated that AFP polymers and a traced amount of albumin were found in the preparation. However, it

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

could be further used for anti-AFP production.

EIA based on sandwich principle was developed by using locally made reagents, such as anti-AFP coated beads, and horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated anti-AFP. In the assay system, sample were incubated with anti-AFP coated beads for 3 hours at 37°C. After washing the beads, they were incubated with the conjugated anti-AFP for 18 hours at 37°C. The activity of conjugated peroxidase bound on the beads was colorimetrically determined and found to be proportional to the concentration of serum AFP, using hydrogen peroxide (H_2O_2) and o-phenylenediamine(OPD) as substrate and chromogen respectively.

The dose-reponse curve was suitable for AFP concentration up to 100 IU/ml with a sensitivity of 3 IU/ml. Within-assay and between-assay reproducibilities of the method were demonstrated with coefficients of variation ranging from 9.6 to 12.9 and 12.5 to 24.5 % respectively. The recoveries were 90 to 100 %. AFP values obtained by the developed method and those by a commercial AFP-EIA (Roche) kit were well-correlated (r=0.996).

The method was tested with serum samples from 98 healthy subjects, 20 patients with primary hepatocellular carcinoma (PHC) and 5 cirrhotic patients. The results were acceptable and encouraging. The developed method was economical and should be introduced into routine laboratory work.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อ เรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์สำหรับแอลฟาฟีโตโปรตีน

ชื่อ ผู้เขียน นาย วิสุทธิ์ กังวานตระกูล

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ไมตรี สุทธจิตต์..... ประธานกรรมการ

ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย..... กรรมการ

รศ.พ.ญ. กรรนิการ์ พรพัฒน์กุล..... กรรมการ

รศ.ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร..... กรรมการ

บทคัดย่อ

สารแอลฟาฟีโตโปรตีน (AFP) เป็นทูเมอร์มาร์กเกอร์ที่สำคัญ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการรักษาและติดตามการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษา และ พัฒนาการเตรียมน้ำยาใช้เองที่จำเป็นในการตรวจวัดปริมาณแอลฟา-ฟีโตโปรตีน โดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (EIA) ได้แก่ แอลฟาฟีโตโปรตีนแอนติบอดีต่อแอลฟาฟีโตโปรตีน และสารคอนจูเกตระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อแอลฟาฟีโตโปรตีน

การเตรียมแอลฟาฟีโตโปรตีนจากเซรุ่มของเลือดที่ได้จากสายสะดือ เด็กแรกคลอด อาศัยคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารดังกล่าว วิธีการเตรียมประกอบด้วย การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วจึงแยกด้วยคอลัมน์ของ ดี อี เอ อี-เซลลูโลส เซฟฟาเดกซ์ จี-200 คอนเอ-เซฟฟาโรส 4 บี และซี เอม-เซลลูโลส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สารที่เตรียมได้ด้วยวิธีโพลิอะครีลลาไมด์ เจล อีเลคโตโฟรีซีส และอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่า แอลฟาฟีโตโปรตีนที่เตรียมได้มีการเกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นโฟลีเมอร์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีอัลบูมินปนเปื้อนมาเล็กน้อย แต่ถึงกระนั้น สารที่เตรียมได้สามารถนำไปใช้ในการเตรียม แอนติบอดีต่อแอลฟาฟีโตโปรตีนได้

ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่เตรียมขึ้น ได้อาศัยหลักการของเอนไซม์อิมมูโน-แอสเสย์ แบบ "แซนด์วิช" ในการตรวจวัด แอลฟาฟีโตโปรตีนในสารตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดีต่อแอลฟาฟีโตโปรตีน ซึ่งเคลือบติดอยู่บนผิวของเม็ดพลาสติกชนิดโพลิสไตรีน หลังจากล้างเอาส่วนที่แอนติบอดีไม่จับออกไป แล้วเติมสารคอนจูเกตระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อแอลฟาฟีโตโปรตีนลงไป สารดังกล่าวจะทำปฏิกริยากับแอลฟาฟีโตโปรตีน ซึ่งเกาะอยู่บนเม็ดพลาสติก เมื่อล้างเอาส่วนที่ไม่เกาะออกไป แล้ววัดกัมมันตภาพของเอนไซม์โดยวิธีการทำให้เกิดสี ซึ่งใช้ไฮโดร-เจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรทและใช้ โอ-เฟนนิลลีนไดแอมมีนเป็นสารก่อให้เกิดสี กัมมันตภาพของเอนไซม์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอลฟาฟีโตโปรตีน ที่มีอยู่ในเซรุ่ม

เมื่อวิเคราะห์คุณภาพของชุดน้ำยาดังกล่าว พบว่า เส้นกราฟมาตรฐานสำหรับอ่านระดับแอลฟาฟีโตโปรตีนใช้ได้ตั้งแต่ 0 ถึง 100 หน่วยมาตรฐานต่อ มล. และให้ความไวในการตรวจวัด เท่ากับ 3 หน่วยมาตรฐาน ต่อ มล. สัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบนของการตรวจวัดภายในชุดเดียวกัน อยู่ระหว่าง 9.6 ถึง 12.9 เปอร์เซนต์ และสำหรับการตรวจวัดระหว่างชุด อยู่ระหว่าง 12.5 ถึง 24.5 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบระดับแอลฟาฟีโตโปรตีนที่ได้จากการตรวจด้วยชุดน้ำยาดังกล่าว กับ ชุดน้ำยาของบริษัทโรช (Roche) พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.996 ซึ่งแสดงว่า ค่าที่ได้จากทั้งสองชุดมีความสัมพันธ์กันดี

เมื่อใช้น้ำยาชุดนี้ตรวจหาระดับ แอลฟาฟีโตโปรตีน ในเซรุ่มของคนที่มีสุขภาพดี จำนวน 98 คน ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ จำนวน 20 คน และผู้ป่วยโรคตับแข็ง จำนวน 5 คน พบว่า ได้ผลเป็นที่เชื่อถือได้ ดังนั้น น้ำยาชุดดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved