Thesis Title	Development of Enzyme Immunoassay for Carcino-embryonic Antigen
Author	Mr.Somkiat Srisataporn
M.S.	Biochemistry
Examining Committee	Assoc.Prof.Dr.Maitree Suttajit.....Chairman
	Assoc.Prof.Dr.Kannika Phornphutkul.....Member
	Assist.Prof.Dr.Vichai Wongchai.....Member

Abstract

The important goal of this reseach is to develop a simplified and economical enzyme immunoassay (EIA) for CEA by using home-made reagents e.g. peroxidase, reference CEA standard and peroxidase-conjugated-anti CEA.

Peroxidase was purified from an aqueous extract of local horseradish roots by several steps including ammonium sulphate precipitation, column chromatography on BioGel P-10, Sephadex G-75 and Con A-Sepharose 4B. Purified peroxidase with R.Z. of about 2.8 and specific activity of 286.3 units/mg protein was obtained. Three heterogeneous bands comprising of one major with a molecular weight of 41,000 and two minor ones were observed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The major component was proved to be peroxidase by substrate-chromogen staining and its electrophoretic mobility was identical with known peroxidase. The prepared peroxidase was maximally active at pH 5.2 and 25°C using o-phenylenediamine (OPD) as chromogen. From substrate concentration study, it showed that Km of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

peroxidase for H_2O_2 was 0.9 mM at 15 mM OPD and hydrogen peroxide, at concentration higher than 10 mM, inhibited peroxidase. The cost of purified peroxidase preparation was 1/12 of the commercial peroxidase which abtained from Sigma®. Its purity was enough to be used for the conjugation with anti-CEA.

By periodate oxidation method, about 24% of added peroxidase was linked to anti-CEA. This prepared conjugate retained its immunological as well as enzymatic activity.

Carcinoembryonic antigen was isolated from colon cancer tissues by the following steps: perchloric acid extraction, column chromatography on Sepharose 4B, Sephadex G-200 and Con A-Sepharose 4B. CEA with specific immunological activity of 0.18 mg/mg protein was obtained. This CEA was further prepared as a reference standard in EIA technique.

Enzyme immunoassay for CEA based on the "sandwich" system was developed using the prepared reagents. CEA in the serum sample was incubated with a polystyrene bead previously coated with anti-CEA. Bound CEA was then reacted with anti-CEA conjugated-peroxidase and the activity of anti-CEA-conjugated-peroxidase bound to the bead was quantified by adding the substrate-chromogen. The enzymic activity was proportional to the concentration of CEA in the sample. A calibration curve obtained was suitable for CEA concentration up to 100 ng/ml with a sensitivity of 2.0 ng/ml. Within-assay precision had coefficient of variation (CVs) ranging from 2.6 to 13.1% and between-assay had CVs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ranging from 5.0 to 16.0%. An analytical recovery was 97.1% to 108.9% for addition test and 95.4 to 107.7% for dilution test. Comparison of the developed assay with a commercial EIA kit (Roche) yielded the following equation : $Y = 0.96X + 3.04, r = 0.985$ (n=70). The mean value $\pm$ S.D. for 60 serum samples from normal healthy adults was 4.05 $\pm$ 1.16 ng/ml.

In conclusion, the developed EIA method is well appropriate for an estimation of serum CEA. It can be useful in clinical diagnosis and follow-up of patients with different types of carcinoma.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ สำหรับ คาร์ซิโน-เอ็มบริโอนิค แอนติเจน

ชื่อผู้เขียน นายสมเกียรติ ศรีสถาพร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

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

รศ.พญ. กรรณิการ์ พรพัฒน์กุล ..... กรรมการ

ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย ..... กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาวิธีการ และเตรียมน้ำยาบางอย่างที่จำเป็นต่อการผลิตวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ (EIA) ได้แก่ เปอร์ออกซิเดส สารมาตรฐานเปรียบเทียบของคาร์ซิโนเอ็มบริโอนิค แอนติเจน (CEA) และสารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อ CEA เพื่อจะนำไปเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดปริมาณ CEA.

เปอร์ออกซิเดสที่ได้เตรียมจากหัวฮอร์สแรดิชที่ปลูกในท้องถิ่นด้วยการตั้นแล้วนำส่วนน้ำสกัดมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำการแยกบนคอลัมน์ของ Biogel P-10, Sephadex G-75 และCon A-Sepharose 4B ตามลำดับ เปอร์ออกซิเดสที่ได้มีค่า R.Z. ประมาณ 2.8 และ กัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 286.3 ยูนิตต่อ มก. ของโปรตีน เมื่อทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ปรากฏว่าตัวอย่างบนเจลมีโปรตีนอยู่ 3 แถบ ซึ่งประกอบด้วยหนึ่งแถบหนาที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 41,000 ดาลตัน และ สองแถบบางเล็กสามารถพิสูจน์ยืนยันว่าโปรตีนส่วนใหญ่เกือบทั้งหมด เป็นเปอร์ออกซิเดสเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์ออกซิเดสมาตรฐาน และทดสอบโดยการย้อมเจลด้วย สับสเตรท ร่วม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับสารเกิดสี OPD เปอร์ออกซิเดสนี้ทำงานได้ดีที่สุดคือที่ pH 5.2 และอุณหภูมิ 25°C และมีค่า Km เท่ากับ 0.9 mM ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อใช้ OPD เท่ากับ 15 mM กัมมันตภาพของเปอร์ออกซิเดสจะลดลงเมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 mM เปอร์ออกซิเดสที่เตรียมได้มีราคาถูกกว่าประมาณ 1/12 ของที่ซื้อจากต่างประเทศ และมีความบริสุทธิ์ และกัมมันตภาพมากเพียงพอที่จะนำไปเตรียมสารคอนจูเกตกับแอนติบอดีต่อ CEA เพื่อใช้ในเทคนิค EIA ต่อไป

สารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อ CEA เตรียมโดยวิธี periodate oxidation พบว่า ประมาณ 24% ของเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการคอนจูเกต สามารถเชื่อมต่อกับแอนติบอดีต่อ CEA สารคอนจูเกตที่เตรียมได้ยังคงแสดงคุณสมบัติของทั้งแอนติบอดี และเอนไซม์ได้

CEA เตรียมโดยวิธีการสกัดจากเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยกรดเปอร์คลอริคและแยกบนคอลัมน์ของ Sepharose 4B, Sephadex G-200 และ Con A-Sepharose 4B ตามลำดับ พบว่าได้ CEA ที่มีกัมมันตภาพจำเพาะทางภูมิคุ้มกันเท่ากับ 0.18 มก. ของ CEA ต่อ มก. ของโปรตีน สารนี้จะนำไปเตรียมเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบเพื่อใช้ในวิธี EIA ต่อไป

ผู้วิจัยได้เตรียมชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดปริมาณ CEA ขึ้นจากสารดังกล่าว ข้างต้น อาศัยวิธี เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ แบบ "แซนด์วิช" ซึ่งมีหลักการดังนี้ CEA ที่อยู่ในเซรุ่มจะจับกับแอนติบอดีต่อ CEA ที่เคลือบอยู่บนผิวของเม็ดพลาสติกโพลีสตัยรีน หลังจากนั้นล้างเอาส่วนที่แอนติบอดีไม่จับออกไป แล้วเติมสารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อ CEA ลงไป แอนติบอดีต่อ CEA ที่อยู่กับสารคอนจูเกตก็จะจับกับ CEA ที่ติดอยู่บนเม็ดพลาสติก ล้างเอาส่วนที่ไม่จับออกไปอีกครั้ง แล้ววัดกัมมันตภาพของเอนไซม์โดย เติมสับสเตรทและสารเกิดสี กัมมันตภาพของเอนไซม์ที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ CEA ในเซรุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการวิเคราะห์ทางคุณภาพการตรวจวัดของน้ำยาชุดนี้พบว่าได้ค่า CV ของ within-assay เท่ากับ 2.6 ถึง 13.1% (จำนวน 20 ราย) และ CV ของ between-assay มีค่าเท่ากับ 5.0 ถึง 16.0% (จำนวน 20 ราย) ค่า recovery โดยวิธีการเติมลงไปเท่ากับ 97.1 ถึง 108.9% และโดย วิธีเจือจาง เท่ากับ 95.4 ถึง 107.7% เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น CEA ที่วัดโดยชุดน้ำยาที่เตรียมกับวิธีของ Roche (CEA-EIA) ในเซรุ่มของคนปกติและผู้ป่วยมะเร็ง จำนวน 70 ราย พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.985 และสมการเส้นตรงคือ $Y = 0.96X + 3.04$ กราฟมาตรฐานของน้ำยาชุดนี้วัดได้ตั้งแต่ 0 ถึง 100 นก. ของ CEA ต่อ มล.และความไวในการตรวจวัดเท่ากับ 2.0 นก. ต่อ มล. ค่าความเข้มข้นของ CEA ที่วัดในเซรุ่มของคนไทยปกติ 60 รายมีค่าเฉลี่ย 4.05 นก. ต่อ มล. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 1.16 นก. ต่อ มล.

ชุดน้ำยาที่เตรียมขึ้นนี้ใช้ง่าย รวดเร็ว ราคาถูก และมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Roche ในการตรวจวัด CEA ในเซรุ่ม ดังนั้น น้ำยาชุดนี้มีความเหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัด CEA ทางคลินิคในการวินิจฉัยและติดตามโรคมะเร็งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved