Thesis Tittle	The Development of Methods for Quantitation of Serum Total Sialic Acid and Hyaluronan
Author	Miss Damratsamon Surangkul
M.Sc.	Biochemistry

Examining Committee :

Assistant Professor Dr. Phraya Kongtawelert	Chairman
Associate Professor Dr. Maitree Suttajit	Member
Associate Professor Rujapa Nimsung	Member
Associate Professor Nantaya Chanarat	Member

ABSTRACT

In this thesis, the quantitation methods of serum total sialic acid (TSA) and hyaluronan (HA) in cancer patients and normal healthy persons were developed. TSA is an important biomolecule that can be used in diagnosing and monitoring disease during treatment such as Salla disease, sialuria and neoplasm. One of methods which have been developed for the measurement of TSA is a periodate-resorcinol microassay. In this thesis, appropiate modifications of this method by

quantitating sialic acid in serum such as the concentration of periodate, resorcinol, incubation time and human serum volume were optimized. For the sialic acid determination, it was found that the optimal concentrations of periodic acid and resorcinol reagent for 40 µl of N-acetylneuraminic acid were 1.3 mM (50 µl) and 0.6 g/dl (100 µl), respectively. An incubation time of 60 minutes for the reaction of periodic acid and resorcinol with samples was found to give the highest absorbance. It was also found that only 5 µl of serum samples were needed to give a coefficient of variation of the intra- and inter- assay of 0.79% and 4.68%, respectively.

HA is another biological marker for various diseases which now can be assessed by several immunometric assays. An ELISA-like assay using biotinylated hyaluronan binding protein (B-HABP) for quantitation of HA was developed. The principle of the method depends on the specific binding of HA to the HABP. HA was immobilized on maxisorp microtiter plates. The samples or HA standards together with excess B-HABP (inhibition mixture) were then added. The B-HABP that bound to the immobilized HA was then incubated with enzyme-conjugated mouse anti-biotin and the color which developed. The previous ELISA-like assay takes a very long time because there are two steps (37 °C 2 hrs and 4 °C overnight) for incubating the inhibition mixture and each step needs to be incubated at 37 °C. The conditions for

incubation of the inhibition mixture and temperature for each step of the experiment were optimized. In the ELISA-like assay for hyaluronan, at room temperature for 1 hour was likely to be more suitable for incubating the inhibition mixture. One step instead of two steps for the incubation of the inhibition mixture was performed for this experiment. It was found that the results using incubation temperatures for each step at room temperature and at 37 °C were not different. Although protein concentration slightly interferes in the assay, but protein concentration in the biological fluid should be controlled before determining HA concentration. The coefficient of variation of the intra- and inter- assay was 3.35% and 6.02%, respectively.

Both the modified methods can be used to quantitate TSA and HA in the serum of normal healthy persons (n=100) and cancer patients (n=50). The results showed that serum TSA levels (49.4 $\pm$ 4.6 mg/dl) and HA levels (64.55 $\pm$ 32.76 ng/ml) in normal persons differed significantly ($p < 0.0001$) from those (TSA, 74.93 $\pm$ 12.8 mg/dl) and (HA, 417.22 $\pm$ 344.28 ng/ml) respectively, in cancer patients.

In conclusion, both the developed periodate-resorcinol microassay and ELISA-like assay could be useful to determine TSA and HA, respectively in neoplasm. These methods are simpler, faster, require less chemical reagents and sample volume and may be further applied for

the quantitation of TSA and HA in biological fluids and tissue extraction samples.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณกรดไซอาลิค และไฮยาลูโรแนนในซีรั่ม
ชื่อผู้เขียน	นางสาวดามรัศมน สุรางกูร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	กรรมการ
รศ. รุจาภา นิ่มสังข์	กรรมการ
รศ. นันทยา ชนะรัตน์	กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวัด Total sialic acid (TSA) และ Hyaluronan (HA) ในซีรั่มผู้ป่วยโรคมะเร็งเปรียบเทียบกับคนสุขภาพดี TSA เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญในการวินิจฉัยโรค และติดตามความรุนแรงของโรคบางชนิด เช่น Salla disease, sialuria รวมทั้งโรคมะเร็งด้วย ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัด TSA ขึ้นมากมาย periodate-resorcinol microassay เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวัด การวิจัยนี้ได้ปรับปรุงเทคนิคดังกล่าว โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด TSA ในซีรั่ม โดยการหาความเข้มข้นของ periodic acid และ resorcinol, เวลาในการทำปฏิกริยาแต่ละขั้นตอนและปริมาตรของซีรั่มที่

เหมาะสม จากการวิจัยพบว่าความเข้มข้นของ periodic acid และ resorcinol reagent ที่เหมาะสมสำหรับการวัดปริมาณกรดไซอาลิค 40 ไมโครลิตร คือ 1.3 มิลลิโมลาร์ (50 ไมโครลิตร) และ 0.6 กรัมต่อเดซิลิตร (100 ไมโครลิตร) ตามลำดับ เวลาที่เหมาะสมสำหรับแต่ละขั้นตอนคือ 60 นาที และพบว่าต้องการปริมาณของซีรั่มเพียง 5 ไมโครลิตร ซึ่งหาค่า %CV จากการทดลอง intra- และ inter-assay ได้ 0.79% และ 4.68% ตามลำดับ

นอกจาก TSA แล้วการวิจัยนี้ยังได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญ คือ hyaluronan (HA) โดยใช้ ELISA-like assay ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยความจำเพาะเจาะจงของ HA กับ biotinylated hyaluronan binding protein (B-HABP) ซึ่งทำการทดลองโดยเคลือบ HA ลงบนเพลตและเตรียม inhibition mixture (ซีรั่มหรือ HA standard ผสมกับ B-HABP) ในหลอดพลาสติกจากนั้นเติม ลงไปในเพลต B-HABP ที่เหลือจะจับกับ HA บนเพลต หลังจากนั้นสามารถติดตาม B-HABP โดยใช้ enzyme-conjugate mouse anti-biotin แล้วตรวจหาปริมาณแอนติไบโอตินที่จับอยู่บนเพลต โดยการวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ซึ่งวิธีการเดิมในการตรวจวัด มีขั้นตอนการเตรียม inhibition mixture เป็นแบบใช้ 2 ขั้นตอน ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก และทุกขั้นตอนของปฏิกริยาต้องทำที่ 37 °C ด้วย ในการวิจัยนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ inhibition mixture และอุณหภูมิสำหรับการทดลอง ในแต่ละขั้นตอนของ ELISA-like assay จากการวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ inhibition mixture คือเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ 2 ขั้นตอนในการเตรียมและพบว่าสามารถทำการทดลองทุกขั้นตอนได้ที่อุณหภูมิห้อง ผลการ

ทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากทำการทดลองที่ 37 °C นอกจากนี้พบว่าปริมาณโปรตีนมีผลรบกวนการทดลองเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ผลการทดลองออกมาถูกต้อง ในการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจวัด biological fluids อื่นๆจึงควรทราบปริมาณโปรตีนเพื่อควบคุมปริมาณโปรตีนใน standard ให้ใกล้เคียงกับใน biological fluids นั้นก่อนทำการตรวจวัด วิธีนี้มีค่า %CV จาก intra- และ inter-assay ได้ 3.35% และ 6.02% ตามลำดับ จากการศึกษาระดับ TSA (49.4 ± 4.6 mg/dl) และ HA (64.55 ± 32.76 ng/ml) ในซีรั่มคนสุขภาพดี พบว่ามีระดับต่ำกว่าระดับ (TSA, 74.93 ± 32.76 mg/dl) และ (HA, 417.22 ± 344.28 ng/ml) ในผู้ป่วยโรคมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$)

จากการทดลองสรุปได้ว่าเทคนิค periodate - resorcinol microassay และ ELISA-like assay สามารถใช้เพื่อตรวจวัดสารบ่งชี้โรคมะเร็งบางชนิดได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้สารเคมีรวมทั้งซีรั่มในปริมาณน้อย จึงน่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ตรวจวัด TSA และ HA ใน biological fluids และ tissue extract