ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเอนไซม์อิมมูโนเอสเสย์ สำหรับ โคริโอนิคโกนาโดโทรปินของคน

ชื่อผู้เขียน นายประคอง สาคร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

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

ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย .....กรรมการ

ดร.สุกัญญา ลินพิศาล .....กรรมการ

ผศ. ปกรณ์ ไทยานันท์ .....กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ มุ่งศึกษาวิธีการและเตรียมน้ำยาสำหรับรูปเช่น แอนติ-บอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของโคริโอนิคโกนาโดโทรปินของคน (HCG) สารมาตรฐานเปรียบเทียบของ HCG และ สารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดส กับ แอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของ HCG เพื่อใช้ในเอนไซม์อิมมูโนเอสเสย์สำหรับการตรวจวัดปริมาณ HCG

HCG ที่เตรียมได้จาก ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคมะเร็งโคริโอคาร์ซิโนมา โดยสกัดด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟต และ เอทธิลอัลกอฮอล์ แล้วทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ DEAE Sephadex A.50 และ Biogel P-60 ตามลำดับ HCG ที่เตรียมได้ มีภูมิ-คุ้มกันต่อภาพจำเพาะทางภูมิคุ้มกันวิทยาเท่ากับ 9,250 ไอ อาร์ พี ยูนิต ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ได้ yield เท่ากับ 28 เปอร์เซนต์ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย native - polyacryla-mide gel electrophoresis ปรากฏแถบโปรตีนใหญ่ 1 แถบ ตรงกับ แถบโปรตีนของสารมาตร-ฐาน HCG ที่ทำเปรียบเทียบและยังปรากฏ แถบโปรตีนเล็ก 1 แถบ ซึ่งอาจเป็นสารเจือปน มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า HCG HCG ที่เตรียมได้นี้ นำไปเตรียมสารหน่วยย่อย เบตาของ HCG โดยแยก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยการผ่านคอลัมน์ 8 M urea - DEAE Sephadex A.25 สารหน่วยย่อยเบตาของ HCG ที่เตรียมได้ มีกัมมันตภาพจำเพาะทางภูมิคุ้มกันวิทยาเท่ากับ 14,350 ไอ.อาร์.พี. ยูนิต ต่อ มิลลิกรัมของโปรตีน ได้ yield เท่ากับ 12 เปอร์เซนต์ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS - polyacrylamide gel electrophoresis ปรากฏแถบโปรตีน เพียง 1 แถบเท่านั้น ซึ่งตรงกับ หน่วยย่อยเบต้าของ HCG ของสารมาตรฐาน HCG ที่ทำเปรียบเทียบ สารหน่วยย่อยเบต้าของ HCG ที่เตรียมได้ มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่ายขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ เพื่อผลิตแอนติบอดี ต่อหน่วยย่อยเบต้าของ HCG

แอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบต้าของ HCG เตรียมได้จาก เซรุ่มของกระต่ายดังกล่าว โดยสกัดด้วย การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 33% แล้วทำการแยกด้วยคอลัมน์ HCG - Sepharose 4 B และ normal human serum protein - Sepharose 4 B ตามลำดับ สารแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบต้า ของ HCG ที่เตรียมได้ มีกัมมันตภาพจำเพาะเท่ากับ 1111 Ouchterlony's titer ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ได้ yield เท่ากับ 15 เปอร์เซนต์ และเมื่อตรวจสอบด้วย immunoelectrophoresis ไม่ปรากฏ ปฏิกิริยาข้างเคียงต่อ โปรตีนในเซรุ่มของคนปกติ

สารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดสกับแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของ HCG เตรียมโดยวิธี periodate oxidation และแยกสารคอนจูเกตด้วยการผ่านคอลัมน์ SephadexG.150 พบว่า เปอร์ออกซิเดส จำนวน 27%จากเริ่มต้นเชื่อมติดกับสารแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของ HCG

สาร HCG ที่เตรียมได้จะนำไปเตรียมเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบเพื่อใช้ในเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณ HCG

ผู้วิจัยได้เตรียมน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจวัดปริมาณ HCG ขึ้นจากสารที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยอาศัยหลักการเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์แบบ "แซนด์วิช" คือในปฏิกิริยาแรก HCG ในเซรุ่มของผู้ป่วยจะจับกับแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของ HCG ที่เคลือบอยู่บนผนังของหลอดพลาสติกโพลีสตรัยรีน จากนั้นล้างส่วนที่ไม่จับออกไป ในปฏิกิริยาที่สองสารคอนจูเกตระหว่างเปอร์ออกซิเดส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับแอนติบอดีต่อหน่วยย่อยเบตาของ HCG ที่เติมลงไปใหม่ จะไปจับกับ HCG ที่ติดอยู่ที่ผนังหลอดพลาสติก แล้วล้างส่วนที่ไม่จับออกไปอีกครั้ง จากนั้น วัดกัมมันตภาพของเปอร์ออกซิเดสที่ติดกับผนังหลอดพลาสติก โดยเติม สับสเตรท และสารเกิดสี กัมมันตภาพของเปอร์ออกซิเดสที่วัดได้ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ HCG ในเซรุม

จากการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของ เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ สำหรับ HCG พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ Within assay เท่ากับ 5.8-8.1% และของ between assay เท่ากับ 7.3 ถึง 11.1% ค่า sensitivity เท่ากับ 4.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่า recovery โดยวิธีเจือจาง เท่ากับ 101.6 - 111.1% ฮอร์โมน LH และ FSH มีปฏิกิริยาข้างเคียงเท่ากับ 24 และ 15% ที่ความเข้มข้น 100 และ 75 มิลลิยูนิต ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ HCG ในเซรุม ของ ชายและหญิงปกติเท่ากับ 5.0 และ 9.5 มิลลิยูนิต ต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ ของบริษัท โรช (Roche) ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.945 และสมการเส้นตรงถดถอย Y = 1.01X + 3.34

โดยสรุป เอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ สำหรับการตรวจวัดปริมาณ HCG ที่ผลิตขึ้นครั้งนี้มีราคาถูก และเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณ HCG ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง โดยเฉพาะการตั้งครรภ์ไข่ปลาอุ และโคริโอคาร์ซิโนมา ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับ การวินิจฉัย ติดตามการรักษาและพยากรณ์โรค.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT	iv
LIST OF FIGURES	xvi
LIST OF TABLES	ixx
LIST OF CHARTS	xxi
ABBREVIATIONS	xxii
DEFINITION OF UNITS OF HCG	xxiv
CHAPTER I: Introduction	1
I.1 Historical Review of Human Chorionic Gonadotropin.....	8
I.2 Physicochemical Properties of HCG	
I.2.1 Isolation and Purification of HCG and Molecular Weight Studies.....	11
I.2.2 Amino Acid Composition and Sequence of HCG.....	13
I.2.3 Carbohydrate Composition and Structure of HCG.....	19
I.3 Metabolism of HCG	
I.3.1 Biosynthesis and Secretion.....	27
I.3.2 Role of Sialic Acid Involved Biological and Immunological Activity.....	28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Page

I.4 Immunological Methods for the Determination of HCG. 29

I.4.1 Agglutination Test for HCG..... 29

I.4.2 Complement Fixation Test for HCG..... 30

I.4.3 Radioimmunoassay for HCG..... 31

I.4.4 Enzyme Immunoassay for HCG..... 34

I.5 Clinical Application of HCG

I.5.1 Pregnancy Diagnosis..... 38

I.5.2 Screening and Diagnosis of Cancer..... 40

I.5.3 Monitoring and Prognosis..... 41

I.6 Direction for Study..... 45

I.7 Purpose of the Study..... 48

CHAPTER II Materials and Methods

II.1 Chemicals..... 49

II.2 Materials..... 50

II.3 Experimental Instruments..... 50

II.4 General Methods

II.4.1 Analysis of Protein Concentration by Lowry's Method..... 52

II.4.2 Analysis of Protein Purity by Polyacrylamide Gel Electrophoresis.... 54

II.4.3 Detection of HCG Activity by Agglu-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Page

tination Assay..... 57

II.4.4 Detection of HCG Activity by Commercial β-HCG EIA Kit (Roche)..... 58

II.4.5 Preparation of HCG-Sepharose 4 B and Normal Human Serum Protein - Sepharose 4 B 61

II.4.6 Analysis of Anti-β-HCG Titer by Ouchterlony's Method..... 63

II.4.7 Detection of Cross - Reactive Contaminant in Anti - β - HCG Preparation by Immunoelectrophoresis.. 64

II.5 Experimental Methods

II.5.1 Isolation and Purification of HCG and β-HCG Subunit..... 66

II.5.2 Production and Preparation of Rabbit Anti - β - HCG..... 71

II.5.3 Preparation and Isolation of Anti - β - HCG Horseradish Peroxidase Conjugate..... 74

II.5.4 Preparation of Reference Standard HCG Using in Enzyme Immunoassay 75

II.5.5 Development of Enzyme Immunoassay

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Page

for HCG..... 76

CHAPTER III Results

III.1 Isolation and Purification of HCG and β - HCG Subunit 79

III.2 Production and Preparation of Rabbit Anti - β - HCG 88

III.3 Preparation and Isolation of Anti - β - HCG - Horseradish Peroxidase Conjugate 96

III.4 Optimization Study on ELISA Technique

III.4.1 Optimal Dilution of Anti - β - HCG for Coating 99

III.4.2 Optimal Dilution of Anti - β - HCG - HRP Conjugate for Test 99

III.4.3 Effect of Incubation Periods of the First Reaction 100

III.4.4 Effect of Incubation Periods of the Second Reaction 100

III.4.5 Effect of Non - Specific Protien Added in Anti - β - HCG - HRP Conjugate 101

III.5 Sensitivity of the Test 108

III.6 Effect of Serum Dilution 108

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Page

III.7 Cross - Reaction Effect of LH and FSH 108

III.8 The Precision Test 109

III.9 The Accuracy Test 109

III.10 Stability of Reagents of Local - Made ELISA. 110

CHAPTER IV Discussion

IV.1 Isolation and Purification of HCG and β - HCG Subunit from Choriocarcinoma Urine .. 120

IV.2 Production and Preparation of Rabbit Anti - β - HCG..... 125

IV.3 Development of Enzyme Immunoassay for HCG ... 127

IV.4 Further Study 134

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIST OF FIGURES

Figure		Page
I.1	Amino Acid Sequence of the Alpha subunit.....	18
I.2	Amino Acid Sequence of the Beta Subunits of HCG and LH.....	20
I.3	Structure of O - Serine Linked Oligosaccharide Chains of Both Pregnant and Hydatidiform Mole HCG....	23
I.4	Structure of N - Asparagine Linked Oligosaccharide chain of Both Pregnant and Hydatidiform Mole HCG.....	25
I.5	Structure of N - Asparagine Linked Oligosaccharide Chains of Choriocarcinoma HCG.....	26
I.6	Mean Serum HCG Levels throughout Normal Pregnancy.....	29
I.7	Approximate Relation between Size of Trophoblastic Mass and Serum HCG Level.....	42
I.8	Serum HCG Levels during Chemotherapy and Radiotherapy of Choriocarcinoma Patient.....	44
II.1	Standard Protein Curve by Lowry's Method.....	53
II.2	Calibration Curve of Commercial β - HCG ELISA. (Roche).....	60
III.1	DEAE Sephadex A.50 Chromatography of Crude HCG Solution.....	83

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure		Page
III.2	Biogel P-60 Chromatography of Patially Purified HCG.....	84
III.3	8 M Urea - DEAE Sephadex A.25 Chromatography of Highly Purified HCG.....	85
III.4	Native -Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Isolation and Purification of HCG.....	86
III.5	SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Isolation and Purification of β-HCG Subunit.....	87
III.6	HCG - Sepharose 4 B Chromatography of Rabbit IgG.....	91
III.7	Normal Human Serum Protein - Sepharose 4 B Chromatography of Rabbit Anti - β - HCG.....	92
III.8	Rabbit Anti - β - HCG Titer Detected by Ouchterlony's Method (I).....	93
III.9	Rabbit Anti - β - HCG Titer Detected by Ouchterlony's Method (II).....	94
III.10	Cross - Reactive Antibody Detected by Immunoelectrophoresis.....	95
III.11	Sephadex G.150 Chromatography of Anti - β - HCG - HRP Conjugate.....	98
III.12	Comparison of ELISA Technique Using Dilution of Anti - β - HCG for Coating Polystyrene Tubes.....	102
III.13	Comparison of Dilutions of Anti - β - HCG - HRP	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure		Page
	Conjugate Used in ELISA Technique.....	103
III.14	Comparison of Incubation Periods for the First Reaction of Solid Phase Anti - β - HCG with HCG in ELISA Technique.....	104
III.15	Comparison of Incubation Periods for the Second Reaction of Solid Phase Bound HCG with Anti - β - HCG with Anti - β - HCG - HRP Conjugate in ELISA Technique.....	105
III.16	Effect of Different Concentrations of Chicken Serum Added into the Conjugate.....	106
III.17	Calibration Curve and Sensitivity of Local - Made β - HCG ELISA.....	112
III.18	Cross - Reaction Effect of LH and FSH on HCG Determination by Local - Made ELISA Technique.....	114
III.19	Correlation Curve of Commercial β - HCG ELISA (Roche) and Local - Made ELISA.....	116
III.20	Frequent Distribution of Serum HCG Levels in Normal Healthy Men (Left) and women(Right) Measured by Local - Made ELISA.....	118
III.21	Stability of Reagents of Local - Made β - HCG ELISA.....	119

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIST OF TABLES

Table		Page
I.1	The Top Ten Leading Sites of Cancer in 1980 in Thailand by Sex.....	2
I.2	Tumor Associated Oncofetal Antigens.....	5
I.3	Tumor Assosicated Enzymes.....	6
I.4	Ectopic Hormones as Tumor Marker.....	7
I.5	Different Purification Methods for Urinary HCG and its Biologically and Immunologically Specific Activities.....	12
I.6	Biological Activity of Subunits of HCG.....	14
I.7	Amino Acid Composition of Highly Purified HCG Preparations from Different Sources.....	16
I.8	Amino Acid Composition of Each Subunit of HCG.....	17
I.9	Carbohydrate Composition of Urinary HCG Preparations from Different Sources.....	21
I.10	Comparison of Incubation Period and Temperature, Type of First Antibody and Type of Label of RIA for HCG from Different Manufacturers Produced.....	35
I.11	Comparison of Incubation Period and Temperature, Sensitivity, Type of Solid Phase and Conjugate Antibody, Type of Enzyme of Two - Site Sandwich	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table		Page
	EIA for HCG.....	37
I.12	Comparison of Agglutination Assay, EIA and RIA for HCG.....	47
III.1	Isolation and Purification of HCG and β - HCG Subunit.....	82
III.2	Production and Purification of Rabbit Anti - β - HCG.....	90
III.3	Preparation and Isolation of Anti - β - HCG - HRP Conjugate.....	97
III.4	Effect of Serum Dilution in ELISA Technique for β - HCG Determination.....	113
III.5	Precision Test Local - Made ELISA Technique for β - HCG Determination.....	115
III.6	Range and Mean Serum HCG Level of Each Group of Patients Measured Both Commercial β - HCG ELISA (Roche) and Local - Made β - HCG ELISA.....	117
IV.1	Comparison of Characteristics and Procedure Steps Performed in Both the Developed and Commercial β - HCG EIA Kit.....	133

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIST OF CHATRS

Chart		Page
II.1	Scheme for Isolation and Purification of HCG and β - HCG Subunit from Choriocarcinoma Urine.	70
II.2	Procedure Steps of Enzyme Immunoassay of HCG.....	78
III.1	Flow Diagram of the Procedure of Local - Made ELISA for HCG.....	107

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ABBREVIATIONS

α	alpha
β	beta
°C	degree Celcius
cm	centrimeter
CV, CVs	coefficient of variation
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FSH	follicle stimulating hormone
Fuc	fucose
g	gram
Gal	galactose
Gal NAc	N - acetylgalactosamine
Glc NAc	N - acetylglucosamine
HCG	human chorionic gonadotropin
hr	hour
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
I.R.P., 1^{st}	International Reference Preparation, first
I.S., 2^{nd}	International Standard, second
i.u.	international unit
Kg	kilogram

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

LH	luteinizing hormone
M	molar
Man	mannose
mg	milligram
min	minute
mi.u.	milli international unit
ml	milliliter
mM	millimolar
M.W.	molecular weight
µl	microliter
NANA	N - acetylneuraminic acid
ng	nanogram
R.Z.	Reinheitszahl, the ratio of optical densitiy at 403 nm (due to hemin group) to that at 280 nm (due to protein)
r	coefficient of correlation
RIA	radioimmunoassay
S.D.	standard deivation
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TSH	thyroid stimulating hormone
$\overline{X}$	mean

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DEFINITION OF UNITS OF HCG

International unit (i.u.) of HCG is defined as the biological or immunological activities contained in 0.001279 mg of the second International Standard (2^{nd} I.S.) for HCG. (WHO Expert Comittee on Biological Standardization, 1964)

International unit (i.u.), the first International Referance Preparation (1^{st} I.R.P) for immunoassayis defined as the immunological activities of HCG Lot No. 75/537 which equivalent to the international unit of the second International Standard for bioassay. (WHO Expert Comittee on Biological Standardization, 1976)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved