การเตรียมสารอัลฟ่า-ฟีโตโปรตีนให้บริสุทธิ์ *

ปกรณ์ ไทยานันท์ วท.ม.**
สนิท มกรแก้วเกยูร Ph.D.**

บทคัดย่อ

เมื่อทำการแยกสารอัลฟ่า-ฟีโตโปรตีนออกจากซีรั่มของเด็กแรกเกิดปกติ 50 มล. โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, blue dextran absorption และ Sephadex G-200 chromatography ผลสุดท้ายได้โปรตีนออกมา 20 มก. โปรตีนนี้เมื่อนำไปทดสอบความบริสุทธิ์ โดยวิธี immunodouble diffusion และimmunoelectrophoresis พบว่าไม่เกิดเส้นตะกอนกับ anti-human serum แต่เกิดเส้นตะกอนเพียงเส้นเดียวกับ anti-AFP serum และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี disc electrophoresis ได้เส้นโปรตีนเพียงเส้นเดียว แสดงว่าสารที่เตรียมได้นี้เป็นสารอัลฟ่า-ฟีโตโปรตีนจริงและมีความบริสุทธิ์ด้วย

บทนำ

Alpha-fetoprotein (AFP) เป็นโปรตีนชนิด globulin มีขนาดโครงสร้างและส่วนประกอบของกรดอะมิโนเหมือนกับ albumin ในซีรั่ม ยกเว้นคุณสมบัติทางด้าน immunology ซึ่งต่างกัน[1] AFP ตรวจพบได้น้อยมากในซีรั่มของคนผู้ใหญ่ปกติ แต่พบได้สูงมากในกระแสเลือดของเด็กที่อยู่ในครรภ์เมื่อคลอดออกมาแล้ว ระดับของ AFP จะลดลงอย่างรวดเร็วประมาณหนึ่งเดือนจะลดลงมาเท่ากับระดับในผู้ใหญ่[2] อย่างไรก็ตาม ในผู้ใหญ่พบได้สูงในผู้ที่ได้รับ hepatotoxic agents หรือ hepatocarcinogens[3,4,5] และในผู้ที่เป็นเนื้องอกของ hepatocellular หรือ yolk sac[2]

ในระหว่างที่เด็กอยู่ในครรภ์ AFP ถูกสร้างขึ้นโดย fetal liver และ yolk sac (6,7) ซึ่งในระยะนี้นอกจากจะพบในซีรั่มของลูกแล้วยังพบได้ในซีรั่มของแม่ด้วย[8,9,10] เชื่อว่าเกิดจากการส่งผ่านจากลูกไปสู่แม่ การสร้าง AFP มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ตับด้วย ในคนพบ AFP ได้สูงสุดในระยะที่เด็กอยู่ในครรภ์ อายุ 15 สัปดาห์ ซึ่งสูงถึง 3,000 µg/ml ในขณะที่คลอดลดลงเหลือ 20 µg/ml แล้วลดลงจนถึงระดับของผู้ใหญ่ปกติคือ 0.02 µg/ml (2,11,12) ซึ่งตับหยุดการเจริญเติบโตแล้ว การผ่าตัดตับ, การฉีดสารเคมีที่ทำให้เซลล์ตับตาย หรือโรคไวรัสบางอย่าง เช่น viral hepatitis ซึ่งทำให้เซลล์ตับเกิดการแบ่งตัว มีการสร้าง

---

* ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เซลล์อ่อนขึ้นมาใหม่ ก็จะทำให้เซลล์อ่อนนี้สร้าง AFP ขึ้นมาได้ การสร้าง AFP นี้ ยังมีความสัมพันธ์กับอายุด้วย ในคนหนุ่มสาวจะสร้าง AFP ได้ดีกว่าในคนชรา

การศึกษาเกี่ยวกับ AFP จำเป็นต้องเตรียม AFP ให้ได้บริสุทธิ์เสียก่อน วิธีการทำให้ AFP บริสุทธิ์มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่น Alpert และคณะ[13] แยก AFP ออกจากซีรั่มด้วยเทคนิค 3 ขั้นตอน คือ starch block electrophoresis, sephadex gel filtration และ isoelectric focusing ซึ่งผลที่ได้ก็ยังมี albumin ปนอยู่ด้วย Gold และคณะ[14] แยก AFP จาก ascites fluid จากผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับ ด้วยวิธี chromatography 5 ชนิดด้วยกัน ซึ่งให้ผลมีโปรตีนเพียงชนิดเดียวทำทดสอบด้วยวิธี polyacrylamide gel electroresis. งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้วิธีทาง physical และ chemical โดยการตกตะกอนAFP ออกจาก globulin ก่อน แล้วจึงแยก AFP ออกจาก albumin โดยทำให้ albumin มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยให้จับกับ blue dextran แล้วแยกออกจาก AFP ด้วยวิธี gel filtration ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีง่าย ๆ และสามารถทำได้ตามห้องทดลองทั่ว ๆ ไป

วัสดุและวิธีการ

ซีรั่ม : ได้จากเลือดสายสะดือเด็กแรกคลอด (cord blood) เมื่อแยกซีรั่มออกจากเม็ดเลือดแล้ว นำมารวมกันแล้วเก็บไว้ที่ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

การตกตะกอน AFP : นำซีรั่มของเด็กแรกคลอดมา 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 1 ส่วน แล้วค่อย ๆ เติม satulated ammonium sulfate (SAS) ลงไปอย่างช้า ๆ 2 ส่วน พร้อมกับกวนส่วนผสมให้เข้ากันให้ดี เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. เพื่อให้ globulin ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ นำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นความแรง 5,000 g, 15 นาที, ที่ 0°ซ. แยกน้ำใส ๆ ส่วนบนไว้และทิ้งตะกอนไป นำส่วนใส ๆ มาทำให้เป็นกรดด้วยส่วนผสมของ 0.5 M acetic acid 1 ส่วน กับ SAS 1 ส่วน จนกระทั่ง pH เท่ากับ 4.9 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 1 คืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเอาตะกอนโปรตีนมาล้าง 3 ครั้งด้วยส่วนผสมของ 1 M sodium acetate 6 ส่วน กับ 1 M acetic acid 4 ส่วน และ SAS 10 ส่วน เมื่อล้างครบ 3 ครั้งแล้ว ละลายตะกอนด้วยส่วนผสมของน้ำกลั่น 50 ส่วน กับ 1 M sodium acetate 8 ส่วน จากนั้นเติมสารละลาย SAS ลงไปให้มากเกินพอ แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.9 ด้วยส่วนผสมของ 1 M acetic acid 1 ส่วน กับ SAS 1 ส่วน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน นำมาปั่นแยกตะกอน ล้างและละลายตะกอนตามกรรมวิธีเดิมจนครบ 3 ครั้ง สุดท้ายนำสารละลายโปรตีนไปทำ dialysis กับน้ำกลั่น 1 คืน แล้วทำให้แห้งเป็นผงด้วยวิธี lyophilization

Blue dextran absorption : เพื่อแยก albumin ออกจาก AFP จากการทดลองใช้ blue dextran ผสมกับโปรตีนในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน คือ 1:5, 1:10, 1:15 และ

1:20 พบว่าที่อัตราส่วน 1:10 ให้ผลการ absorb ได้ดีที่สุด จึงได้ใช้ blue dextran ความเข้มข้นนี้สำหรับการทดลองต่อไป ละลาย blue dextran 1 มก. ใน 0.5 มล. PBS, pH 7.4 ผสมกับ 10 มก. ของ lyophilized protein ที่ละลายอยู่ใน 1 มล. PBS ผสมให้เข้ากันให้ดีแล้วนำไปใส่ไว้ที่ 37° ซ นาน 60 นาที โดยเขย่าหลอดทุก ๆ 15 นาที แล้วนำไปผ่าน Sephadex column

Sephadex G-200 column chromatography : นำส่วนผสมที่ได้จากการ absorb ด้วย blue dextran มาผ่าน sephadex G-200 column (2.5 x 55 ซม.,Pharmacia, Sweden) ที่ equilibrate ไว้ก่อนแล้วด้วย PBS, pH 7.4 ปรับอัตราการไหลของน้ำให้ได้ 20 มล./ชม. เก็บน้ำที่ออกมา (eluate) หลอดละ 2.5 มล. วัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 280 nm นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละส่วนไปทำให้เข้มข้นขึ้น และนำไปทอสอบความบริสุทธิ์ของ AFP ด้วยวิธี double immunodiffusion (DID), immunoelectrophoresis (IEP) และ disc electrophoresis

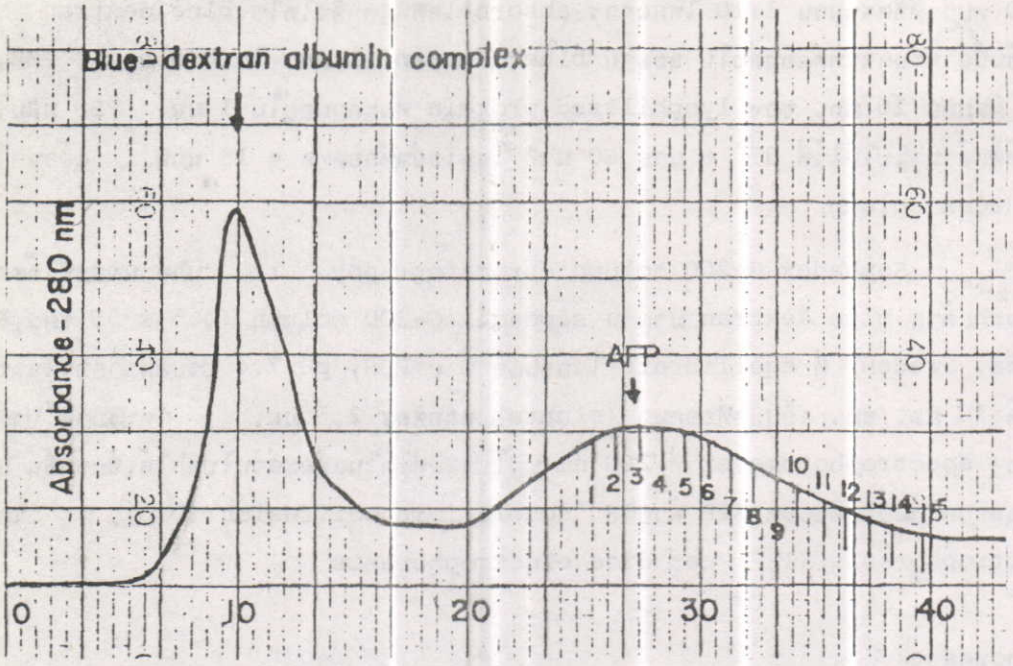
ผลการทดลอง

การตกตะกอน AFP จาก cord serum 50 มล. ซึ่งมีโปรตีนรวม 3,000 มก.ประกอบด้วย albumin 1,950 มก. และ globulin 1,050 มก. หลังจากตกตะกอน 3 ครั้งแล้วเหลือโปรตีนทั้งหมด 300 มก. เป็น albumin 200 มก. และ globulin 100 มก. และเมื่อนำไป absorb ด้วย blue dextran และผ่าน sephadex G-200 แล้ว สุดท้ายได้โปรตีน 20 มก.

ผลจากการนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนและ absorb แล้ว ไปผ่าน sephadex G-200 column สามารถแยกโปรตีนออก 2 ส่วน (รูปที่ 1) ส่วนแรกเป็นส่วนผสมของ albumin blue dextran ให้ผลลบต่อ specific anti-AFP serum และส่วนที่สองเป็นส่วนของ AFP ซึ่งให้ผลบวกต่อ specific anti-AFP serum ตั้งแต่หลอดที่ 26-40 (รูปที่ 2) เมื่อนำโปรตีนในหลอดที่ 26-34 รวมกัน (No. 1-9) แล้วไปทดสอบกับ anti-human serum พบว่าไม่เกิดเส้นตะกอนเลย (รูปที่ 3. หลุมที่ 5) และเมื่อนำไปทำ disc electrophoresis ได้เส้นของโปรตีนเพียงเส้นเดียว (รูปที่ 4)

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง blue dextran กับโปรตีนพบว่าเมื่ออัตราส่วนของ blue dextran ต่อโปรตีนเป็น 1:5 ไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้ (รูปที่ 4) เมื่ออัตราส่วนเป็น 1:10, 1:15,และ 1:20 สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้เป็น 2 ส่วน และที่ 1:10 แยกโปรตีนออกได้ชัดเจนที่สุด

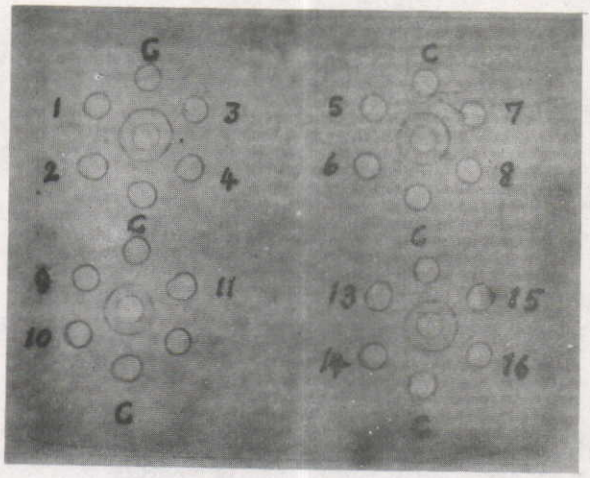
Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 2, May 1983.



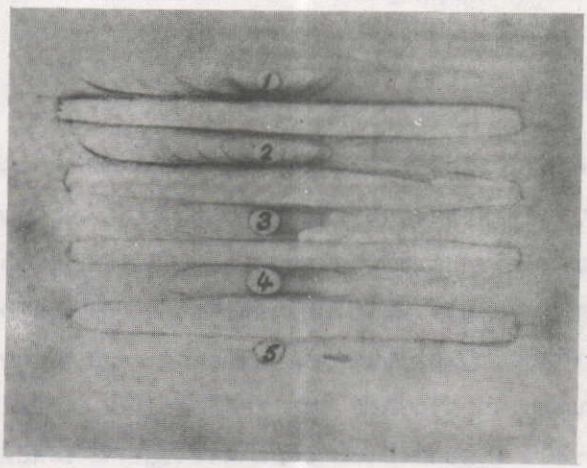
รูปที่ 1 แสดงผลของการแยก AFP ออกจาก blue-dextran albumin complex โดยผ่าน sephadex G-200 column ส่วนแรก (first peak) เป็น blue-dextran blaumin complex ส่วนที่สองเป็น AFP หลอดที่ 1 ถึง 9 นำมารวมกันสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

วิจารณ์

วิธีการที่ใช้เตรียม AFP ให้บริสุทธิ์ในงานวิจัยนี้ โดยอาศัยคุณสมบัติทางด้านเคมีฟิสิกส์ของ AFP ขั้นตอนการ purification ประกอบด้วย salting out, absorption และ molecular sieving เนื่องจาก AFP มีคุณสมบัติในด้านการตกตะกอนเหมือนกับ albumin คือมี isoclectric point และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นเมื่อตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ทั้ง AFP และ albumin จึงตกตะกอนมาด้วยกัน Travis and Pannell[13] พบว่า blue dextran มีคุณสมบัติจับได้กับ albumin เป็นอย่างดี (96 %) และจับกับโปรตีนอื่นได้บ้างเล็กน้อย (2-6%) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ blue dextran มาเป็นตัวแยก albumin ออกจากAFP จากผลการทดลองจะเห็นว่า blue dextran ที่ความเข้มข้นสูง ๆ นอกจากจะจับกับ albumin แล้ว ยังจับกับ AFPได้ด้วย จึงจำเป็นต้อง titrate เพื่อให้ได้อัตราส่วนที่พอเหมาะเพื่อจะได้ไม่มาจับกับ AFP พบว่าที่อัตราส่วนของ blue dextran ต่อโปรตีนเป็น 1 : 10 เป็น

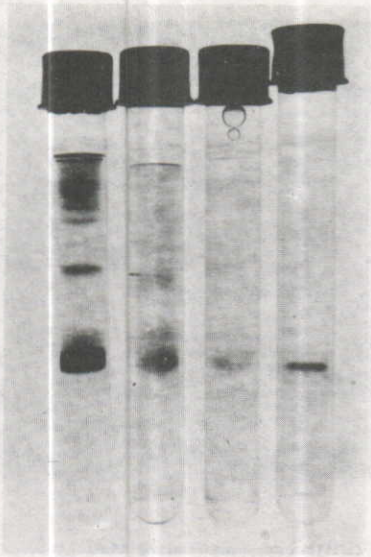


รูปที่ 2 แสดง double immunodiffusion pattern ของ AFP ที่เตรียมได้ในหลอดที่ 1 ถึง 16 (จากรูป 1) C = AFP control และหลุมกลางของแต่ละชุดใส่ specific anti-AFP serum จะเห็นว่าทุกหลอดให้ผล identity กับ control



รูปที่ 3 แสดง immunoelectrophoresis pattern ของ normal adult serum (1) cord serum (2) albumin-AFP complex (3) pooled peak 1 (4) และ pooled peak 2 (5) ในร่องกลางแต่ละร่องใส่ antihuman serum จะเห็นว่า antihuman serum ไม่เกิดเส้นตะกอนกับ pooled peak 2

Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 2, May 1983.



A B C D

รูปที่ 4 แสดง disc electrophoresis pattern. cord serum (A) albumin-AFP complex (B) โปรตีนจาก peak 1 (C) และ โปรตีนจาก peah 2 (D) จะเห็น AFP ที่เตรียมได้มีโปรตีนอยู่เพียงชนิดเดียว (D)

อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด และได้ศึกษาถึงเวลาที่ให้ blue dextran จับกับ albumin และอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วย พบว่าที่เวลาของการ incubate 60 นาที และที่อุณหภูมิ 37°C เหมาะสมที่สุด blue dextran มีคุณสมบัติจับกับโปรตีนบางอย่างได้เช่นเดียวกับ Evan blue อาจเป็นไปได้ว่าการจับของ blue dextran อาจเป็นไปในทำนองเดียวกันก็ได้ เมื่อ blue dextran จับกับ albumin แล้วทำให้เกิด complex ขนาดใหญ่ blue dextran มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2ล้าน จึงสามารถแยก albumin ออกจาก AFP ได้ โดยวิธี molecular-sieving chromatography, sephadex G-200 เป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้แยกสารผสมดังกล่าว เคยมีผู้ทดลองเตรียม AFP จาก ascitic fluid จากผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ[14] โดยผ่าน ascitic fluid เข้าไปใน sepharose blue dextran column เลย ซึ่งใน ascitic fluid มีโปรตีนอยู่หลายชนิด ฉะนั้นการ purify จึงยังไม่ค่อยดีนัก แต่งานวิจัยนี้ใช้ cord serum นำมาตกตะกอนเอาโปรตีนชนิดอื่น ๆ ออกไปก่อน ให้เหลือเฉพาะ albumin-AFP แล้วจึงนำมา absorb ด้วย blue dextran ซึ่งน่าจะได้ผลดีกว่า

จากผลการทดลองใช้ซีรั่มของเด็กแรกคลอด 50 มล. เตรียม AFP ออกมาได้ 20 มก. ซึ่งนับว่าได้ผลออกมาน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้ซีรั่มจากเด็กแรกคลอด ซึ่งมีระดับของ AFP ต่ำมากแล้ว เมื่อเทียบกับตอนที่อยู่ในครรภ์ (อายุ 15 สัปดาห์) ฉะนั้นถ้าเป็นไปได้ จึงน่าจะใช้ซีรั่มของเด็กที่อยู่ในครรภ์อายุ 15 สัปดาห์ เนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่สามารถหาซีรั่มของเด็กอยู่ในครรภ์ได้จึงต้องเลือกใช้ซีรั่มของเด็กแรกคลอด

เอกสารอ้างอิง

1. Jalanko, H., Engvall, E and Ruoslahti, E. : Immunochemical properties of alpha-fetoprotein (AFP) and antibodies to autologous AFP. Imm. Comm. 7 (2) : 209 - 222, 1978.

2. Sell, S. : Alpha-fetoprotein. J. Natl. Cancer Inst. 60 (1) : 19-26, 1978.

3. Becker, F.F., Sell, S. : Early elevation of α_1-fetoprotein in N-2-flurenylacetamide hepatocarcinogenesis. Can. Res. 34 : 2489 - 2494, 1974.

4. Becker, F.F., Horland, A.A. and Shurgin, A. : A study of α_1 - fetoprotein levels during exposure to 3'-methyl-4- dimethylaminoazobenzene and its analogs. Cancer. Res. 35 : 1510 - 1513, 1975.

5. Watanabe, A., Miyazaki, M., and Taketa, K. : Prompt elevation of rat serum fetoprotein by acute liver injury following a single injection of ethionine. Int. J. Cancer. 17 : 518 - 524, 1976.

6. Gitlin, D., and Boesman, M. : Sites of serum α-fetoprotein synthesis in the human and in the rat. J. Clin. Invest. 46 : 1010, 1967.

7. Gitlin, D., Perricelli, A., and Gitlin, G. : Synthesis of α-fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. Cancer Res. 32 : 979 - 982, 1972.

8. Sell, S. and Skelly, H. : Tissue sites of synthesis of alpha$_1$-fetoprotein by the rat during pregnancy and hepatoma growth. J. Natl. Cancer Inst. 56 : 645 - 648, 1976.

9. Sell, S. and Alexander, D. : Rat alpha-fetoprotein. IV. Catobolism and fetal - maternal distribution. J. Natl. Cancer Inst 52 : 1483-1489, 1974.

10. Sell, S., Nichols, M., and Becker, F.P. : Hepotocyte proliferation and α_1-fetoprotein in pregnant, neonatal and partially hepatectomized rats. Cancer Res. 34 : 865 - 871, 1974.

11. Waldman, T.A., and Mc Intire, K.R., : The use of radioimmunoassay of alpha fetoprotein in the diagnosis of malignancy. Cancer Res. 34 : 1510 - 1515, 1974.

12. Purves, L.R., Branch, W.R., and Geddes, E.W. : Serum alpha - fetoprotein. VII. The range of apparent serum values in normal people, pregnant women, and primary liver cancer high risk populations. Cancer 31 : 578 - 587, 1973.

13. Alpert, E., Drysdale, J.W., Isselbacher, K.J., and Schur, P.H. : Human alpha-fetoprotein : Isolation, characterization, and demonstration of microheterogeneity. J. Biol. chem. 247 (12) : 3792 - 3798, 1972.

14. Gold, P., Labitan, A., Wong, G., Freeman, S.O., Krupey, J., and Shuster, J. : Physicochemical approach to the purification of human α_1-fetoprotein from the ascites fluid of a hepatoma - bearing patient. Cances Res. 38 : 6 - 12, 1978.

A B S T R A C T

PURIFICATION OF ALPHA - FETOPROTEIN*

PaKorn Thaiyanan, M.Sc.**
Sanit Makonkawkeyoon, Ph.D.**

Serum alpha-fetoprotein (AFP) was purified from 50 ml of pooled cord serum by means of ammonium sulfate salting-out, blue dextran absorption and Sephadex G-200 chromatography. The final yiel of 20 mg protein was abtained. The purity tests for this isolated protein were done by immunodouble diffusion, immunoelectrophoresis and disc electrophoresis. The result of the first two tests showed that no precipitin line was seen when reacted with anti-human serum, where as only one line occured with anti-AFP serum. The latter test one single band of protein was seen. These tests indicated that the isolated protein was AFP and highly purified.

---

* This study was received fund from Chiang Mai University.

** Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.