ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาระบบมินิคอลัมน์โฟลอินเจคชันเพื่อการหาปริมาณสารโปรติโอไกลแคนบางตัวในซีรัม

ผู้เขียน นางสาวกนกพรรณ ปทานนท์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. สุภาภรณ์ ครัดทัพ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์แบบใหม่ที่ง่าย รวดเร็ว และ ให้สภาพไวที่ดีในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีกแบบมินิคอลัมน์ร่วมกับเทคนิคการไหลอย่างต่อเนื่อง ในการแยกแบบขั้นตอนเดียวและวิเคราะห์สารโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะจากตัวอย่างซีรัม สำหรับคอลัมน์ขนาดเล็กจะถูกบรรจุด้วยเจลที่ติดกับแอนติบอดีชนิดดับเบิลยูเอฟหก ซึ่งจะใช้ในการจับสารโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะที่สอาจใช้เป็นสารบ่งชี้โรคมะเร็งไว้บนเจลนี้ สารละลายบัพเฟอร์ที่พีเอชต่างกันถูกนำมาใช้ในการแยกสารโปรติโอไกลแคนจากซีรัมออกเป็น 2 กลุ่ม โดยขั้นแรกสารละลายทริสบัพเฟอร์ที่พีเอช 7.4 ถูกใช้ในการชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับบนเจลหรือโปรติโอไกลแคนที่ไม่มีความจำเพาะ จากนั้นสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ที่พีเอช 2.0 ถูกใช้ในการแยกโปรตีนส่วนที่ถูกจับอยู่บนเจลหรือโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะ หลังจากผ่านการแยกแล้วสารโปรตีนในโปรติโอไกลแคนทั้งส่วนโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะและไม่จำเพาะจะถูกตรวจวัดด้วยวิธีของแบรดฟอร์ซึ่งเกิดสารประกอบมีสี และสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรเมตรีที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ช่วงของน้ำหนักโมเลกุลและแอคทิวิตีของสารโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะถูกแสดงโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตโฟริซิส เทคนิคเวสเทอร์นบลอทติง และเทคนิคเอ็นไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์พเบนท์แอสเสย์ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ระบบการไหลอย่างต่อเนื่องได้ศึกษาและปรับให้เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีที่สุด คอลัมน์ขนาดเล็กนี้สามารถใช้ซ้ำได้มากกว่า 90 ครั้ง เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ประมาณ 2.32 เปอร์เซนต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบนี้มีประโยชน์ในการลดปริมาณการใช้สารตัวอย่างที่หายากและสารอื่น ๆ ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งด้วย

ระบบการไหลอย่างต่อเนื่องที่พัฒนาร่วมกับคอลัมน์ขนาดเล็กได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัม 6 กลุ่ม คือคนปกติ ซีอีเอ พีเอสเอ ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปากมดลูก และ มะเร็งรังไข่ ปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ของสารโปรติโอไกลแคนที่มีความจำเพาะสามารถคำนวณได้จากค่าพื้นที่ใต้พีกที่หาได้จากการทดลอง พบว่าปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ของสารโปริโอไกลแคนจำเพาะในกลุ่มซีอีเอ พีเอสเอ ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปากมดลูก และ มะเร็งรังไข่มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ (ที่ $P < 0.05$) ในบรรดากลุ่มตัวอย่างทั้งหมด กลุ่มมะเร็งรังไข่มีปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ของสารโปรติโอไกลแคนจำเพาะสูงที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้ใช้บอกความแตกต่างของคนที่เป็นโรคมะเร็งรังไข่กับคนปกติได้ ดังนั้นเทคนิคนี้มีศักยภาพที่ใช้ตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งรังไข่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Development of Minicolumn Flow Injection System for Determination of Some Proteoglycans in Serum

Author Ms. Kanokphan Pathanon

Degree Master of Science (Chemistry)

Thesis Advisor Dr. Supaporn Kradtap

ABSTRACT

The objective of this work is to develop a novel technique that is simple, rapid and has good sensitivity for analysis of the biomolecules. A combination of affinity chromatographic minicolumn with flow injection (FI) technique was successfully applied for one step isolation and complete analysis of specific proteoglycans from the serum samples. The minicolumn was packed with antibody (WF6)-coupled gel that was used to retain the specific proteoglycans, a potential biomarker for cancer. The different pH buffers were used to elute proteoglycans into 2 portions; tris buffer pH 7.4 was used to first elute the unbound portion (unspecific proteoglycans) and acetate buffer pH 2.0 was then used to elute the bound portion (specific proteoglycans). Following the isolation, Bradford dye binding assay was used to determine the amount of protein in proteoglycans both of the specific and unspecific portions by forming a color complex that can be detected with a spectrophotometer at 590 nm. The molecular weight (MW) range and the activity of the specific proteoglycans was shown by using electrophoresis, Western blotting and enzyme

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

linked immunosorbent assay techniques. The analysis conditions were optimized for the best results. The minicolumn can be used repeatedly over 90 times. The system offers short analysis time with the percentage of relative standard deviation (%RSD) of 2.32 %. It is also useful for reducing the amount of rare samples and reagents that are needed for each run.

The on-line minicolumn with FI technique was used to analyze 6 groups of serum samples: normal, CEA and PSA, prostate cancer, cervix cancer and ovarian cancer. The relative amount of protein in specific proteoglycans could be calculated from the peak area. The amount of specific proteoglycans found in CEA, PSA, prostate cancer, cervix cancer and ovarian cancer samples were significantly higher than in normal serum (all with $p < 0.05$). Among all the groups, ovarian cancer showed the highest level of specific proteoglycans, which indicates that the proposed technique can differentiate ovarian cancer patients from normal persons. Therefore, this technique has the potential of being used to screen for ovarian cancer.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved