

การพัฒนาการตรวจสอบสารเครื่องหมายมะเร็ง
โดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา

นายณัฐวุฒิ เจริญไทย
นางสาวนวมินทร์ อู่ภิรมย์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ปีการศึกษา พ.ศ.2539

**Development of Immunoassay
for Tumor Markers**

MR. NATTAWUT CHAROENTHAI
MISS NAVAMIN U-APIROM

**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of
the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science in Pharmacy
Faculty of Pharmacy
Mahidol University**

1996

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพบว่าโรคมะเร็งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญยิ่งเนื่องจากที่ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากต้องเสียชีวิตลง สาเหตุสำคัญส่วนหนึ่งคือผู้ป่วยเข้ารับการรักษาเมื่อมีอาการของโรคมามากแล้วทำให้การรักษาไม่ได้ผล แต่หากสามารถตรวจพบการเป็นโรครไ้ตั้งแต่ระยะต้นๆได้ก็จะสามารถรักษามะเร็งหลายชนิดให้หายขาดหรือยืดชีวิตผู้ป่วยได้นานขึ้น ปัจจุบันได้มีวิธีที่ช่วยตรวจวินิจฉัย โดยตรวจสารที่หลั่งมาในซีรัมและสามารถตรวจพบการเป็นมะเร็งชนิดต่างๆได้อย่างแม่นยำ เรียกสารนี้ว่าเครื่องหมายก่อมะเร็ง (Tumor markers) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาหาเครื่องหมายก่อมะเร็งที่เป็นนอคมติ คือสามารถตรวจพบโรคไ้ก่อนที่จะเริ่มมีอาการหรือตอนระยะเริ่มต้นของอาการ ซึ่งจะสามารถช่วยชีวิตผู้ป่วยได้

โครงการพิเศษนี้ได้ศึกษาเครื่องหมายก่อมะเร็งชื่อว่า Alpha fetoprotein (AFP) โดยวิธี Immunoassay โดยใช้เทคนิค ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) แบบ Sandwich Method โดยใช้ monoclonal antibodies (MAb) ที่ผลิตเองในประเทศที่มีความจำเพาะต่อ AFP ซึ่ง AFP นี้มีคุณสมบัติเป็น single polypeptide chain น้ำหนักโมเลกุล 69,000 dalton พบได้ปริมาณต่ำมากหรือไม่พบเลยในคนปกติ แต่จะพบปริมาณสูงในผู้ป่วยมะเร็งตับ มะเร็งรังไข่ และมะเร็งไข เป็นต้น ดังนั้นจึงสามารถใช้ตรวจกรองหารอยโรค หรือช่วยติดตามผลการรักษาหรือการตรวจการกลับมาเป็นซ้ำของโรคไ้ภายหลังการรักษาแล้ว

การทดลองสามารถตรวจสอบ AFP ได้โดยการแยกทดสอบกับ MAb 3 ตัว และปรับความเหมาะสมต่างๆที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ

MAb ที่เคลือบหลุมทดสอบ	1	มก/หลุม
Serum, dilution 10^{-3} - 10^{-4}	50	มกล/หลุม
Rabbit anti AFP, dilution 10^{-3}	50	มกล/หลุม
Goat anti rabbit IgG Peroxidase conjugated, dilution 4×10^{-3}	50	มกล/หลุม
Substrate	50	มกล/หลุม

การทดลองสามารถวัดค่า AFP ในซีรัมมาตรฐานได้ ตรวจพบ AFP ในซีรัมผู้ป่วยและมีกลุ่มควบคุมที่ให้ผลถูกต้องในการตรวจสอบโดยสามารถจัดทำกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจสอบหา AFP ได้ในอนาคต

ABSTRACT

Cancer is now the leading cause of health problem all over the world. The harassment cancer increase high rate of death due to late diagnosis and treatment. The earlier the disease is detected, the better the prognosis, and thus would prolong the patient's life. At present, scientists discovered a number of substances excreted in the serum of the patients and traced to a certain type of cancers. They were called " Tumor markers ". The scientists have been studied and search for the ideal tumor markers, which could identify the very specific disease prior any signs and symptoms and at the very early beginning stage. Thus save the patient's life .

This special project has studied the tumor marker , AFP (Alfa Feto protien), by immunoassay, using ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technic in Sandwich Method. By using monoclonal antibodies (MAb), those were established specifically to AFP in Thailand. AFP is a single polypeptide chain with the molecular weight of 69,000 dalton. Traces or undetected amount are found in normal serum. On the contrary, high amount were detected in patients with cancer of liver, testis, and ovaries, Therefore, AFP is useful for the screening, diagnosis, prognosis , and monitoring of the diseases in the patients. In the experiments we found that : AFP was detected with 3 MAb , with the following suitable adjustments of the test.

MAb coated well

1

µg/well

Serum dilution	$10^{-3} - 2 \times 10^{-4}$	50	$\mu\text{l/well}$
Rabbit anti AFP, dilution	10^{-3}	50	$\mu\text{l/well}$
Goat anti rabbit IgG peroxidase conjugated , dilution	4×10^{-3}	50	$\mu\text{l/well}$
Substrate		50	$\mu\text{l/well}$

The result indicated that our established MAbs and method developed can detect AFP in the standard serum and patient's sera with negative to the normal sera. The standard curve could set up and applied in the AFP diagnostic kit.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยคำแนะนำจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา
รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีมเจเนียน มุ่งการดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอขอบคุณ แพทย์หญิง กิ่งกาญจน์ เลหาทัย สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ ซึ่งให้ความช่วยเหลือในการหาซื้อวัสดุ
ผู้ป้อน เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิศุตา สุวิทย์วัฒน์
ภาควิชาชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งช่วยทำให้ข้อมูลสำหรับการ
การวิจัยครั้งนี้สมบูรณ์ขึ้น

ขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอื่น ที่ยังมีได้กล่าวถึงมา ณ โอกาสนี้ ที่มี
ส่วนทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี