

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

(1 ธันวาคม 2537 - 30 พฤศจิกายน 2540)

การเตรียมเลคตินบริสุทธิ์จากปูทะเลไทย และการพัฒนาเทคนิค และการประยุกต์ใช้เพื่อ
การตรวจสอบ และการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

The purification of lectin from Thai marine crabs and its technical
development for application in screening and diagnosis of cancer

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีชญา คงทวีเลิศ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
(๑ ธันวาคม 2537 - 30 พฤศจิกายน 2540)

การเตรียมเลคตินบริสุทธิ์จากปูทะเลไทย และการพัฒนาเทคนิค และการประยุกต์ใช้เพื่อ
การตรวจสอบ และการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

The purification of lectin from Thai marine crabs and its technical
development for application in screening and diagnosis of cancer

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2540

REA 3280028

สารบัญ (Content)		
เรื่อง		หน้า
สารบัญรูปภาพ		3
สารบัญตาราง		5
บทคัดย่อ		6
Abstract		7
บทนำ (Introduction)		8
วัตถุประสงค์ของโครงการที่เสนอ (Objectives)		11
ตารางเวลาการทำงาน (Time Table)		11
ระเบียบวิธีการวิจัย (Materials and Methods)		12
ผลการศึกษาค้นคว้า (Results)		17
วิจารณ์และสรุปผล (Discussion and Summary)		31
เอกสารอ้างอิง (References)		34
ผลงานการวิจัย (Research Output)		36
ดัชนี (Index)		38

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้าง ของ N-acetylneuraminic acid (NANA) หรือ sialic acid	9
รูปที่ 2 ภาพวาดแสดงโครงสร้าง และส่วนประกอบต่าง ๆ ของ เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น lipid bilayer, integral protein, glycoprotein และ glycolipid	10
รูปที่ 3 แสดงรูปถ่ายของปูทะเลไทย (<i>Scylla serrata</i>) และ ตำแหน่งของการเจาะ hemolymph ซึ่งแสดงให้เห็นตำแหน่ง ถูกตรึงแล้ว	12
รูปที่ 4 แสดงรูปภาพที่ ได้จากการแยกแยกดินให้บริสุทธิ์ โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ BSM-Sepharose	17
รูปที่ 5 แสดงภาพ electrophoresis pattern ของ hemolymph และ purified materials ที่ แยกได้จาก affinity chromatography ซึ่งได้จากการ run PAGE บน 8-15% gradient gel และทำการย้อมสีด้วย Coomassie Blue-R	18
รูปที่ 6 รูปภาพแสดงคุณสมบัติของสารดินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ โดยวิธีที่เขียนแบบ ELISA โดยใช้ biotinylated lectin และ enzyme conjugated anti-biotin antibody ในการศึกษา	19
รูปที่ 7 กราฟแท่งแสดงค่าการดูดกลืนแสง กับส่วนของ BSM ที่ เกล็ดขึ้น microcapsules ที่ถูก และ ไม่ถูกเขย่าใน neuraminidase buffer	20
รูปที่ 8 แสดงรูปภาพมาตรฐานขั้นต้น ที่ ได้จากการตรวจวัดโดย วิธีที่พัฒนาขึ้น โดยใช้สารดินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้	
รูปที่ 9 แสดงกราฟแท่งของปริมาณ sialoglycoconjugates ระหว่าง คนปกติ และคนที่เป็นมะเร็ง ที่ ได้จากการตรวจ โดยใช้สารดิน บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ และ biotinylation และ enzyme conjugated anti-biotin antibody	21
รูปที่ 10 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จาก Sandwich technique ที่ ได้พัฒนาขึ้น	22
รูปที่ 11 รูปภาพที่แสดง isotype ของ monoclonal antibody ต่อ purified lectin ที่เตรียมได้	23
รูปที่ 12 แสดงรูปที่ได้จากการทำ Western Blotting โดยใช้ purified lectin (preparation #1 และ #2) run บน 8-15% gel PAGE และ electroblot ลงบน nitrocellulose และ	

ตรวจหาสาร (probe) ด้วย undiluted tissue culture media ที่ได้จากเซลล์ hybridoma cell line ชนิดหนึ่ง	24
รูปที่ 13 แสดงรูปที่ได้จากการทำ Western blotting โดยใช้ purified lectin (preparation #1, #2 และ #3) run บน 8-15% gel-PAGE และ electroblot ลงบน nitrocellulose และ ตรวจหาสาร (probe) ด้วย rabbit polyclonal antibody	25
รูปที่ 14 รูปกราฟมาตรฐาน จากวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบ sialoglycoconjugates โดยการใช้ BSM เป็นสารมาตรฐาน และใช้ polyclonal antibody เป็นตัวตรวจสอบ	26
รูปที่ 15 แสดงกราฟ electrophoretic pattern ของ hemolymph และ purified lectin ที่แยกได้จาก affinity chromatography และ mini-preparative gel electrophoresis โดยการ run PAGE บน 8-15% gradient gel และทำการย้อมด้วย silver staining	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1

แสดงปริมาณ และส่วนประกอบของกรดอะมิโน ของเลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จาก affinity chromatography, minipreparative PAGE และ electroblotting บน PVDF membrane

29

ตารางที่ 2

แสดงกรดอะมิโนที่ N-terminal ของเลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จาก affinity chromatography, minipreparative PAGE และ electroblotting บน PVDF membrane

30

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัย แยก และทำให้บริสุทธิ์ของสารชีวโมเลกุลชนิดเลคติน (lectin) จากปูทะเลไทย (*Scylla serrata*) และนำไปพัฒนาใช้เพื่อการตรวจวัดสารบ่งชี้โรคมะเร็ง (tumor marker) เพื่อเป็นการตรวจเบื้องต้น จากการศึกษาพบว่า มีเลคตินที่มีแยกได้โดยวิธี affinity chromatography มีขนาดประมาณ 70 kDa มีความจำเพาะที่จับได้กับสารชีวโมเลกุลชนิด sialoglycoconjugates เช่น bovine submaxillary mucin (BSM) และ colominic acid แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ๆ ที่มีประจุลบเช่นเดียวกัน โดยวิธี biotin labelling technique จากสารเลคตินที่บริสุทธิ์ที่ แยกได้นี้สามารถนำไปศึกษา และพัฒนาวิธีการตรวจวัด sialoglycoconjugates ในซีรัม ทั้งคนปกติ และคนที่เป็นมะเร็ง ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังได้นำสารเลคตินที่เตรียมได้ มาทำการแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม โดยวิธี mini-preparative gel electrophoresis และ electroblotting บน PVDF membrane และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโน และการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ N-terminal ทำให้ทราบถึงโครงสร้างบางส่วนของเลคตินนี้ได้

Abstract

This is a report for a isolation and purification of lectin from Thai marine crab (*Scylla serrata*) and its use for the development as a tumor marker for screening test for cancer. It was found that the purified lectin by affinity column chromatography using bovine submaxillary mucin shows the molecular weight of 70 kDa. The specific activity of this purified lectin by dot blot labelling technique has been studied. It reacts against sialoglycoconjugates such as BSM, fetuin and colominic acid but does not react with other negative charge containing biomolecules. This purified lectin has been used to develop the assay for quantitation of sialoglycoconjugates in serum of normal healthy person and cancer which has been found statistically significantly difference. The ultrapurification was further evaluated by using technique of minipreparative gel electrophoresis and electroblotting on PVDF membrane for analysis of amino acid composition and N-terminal sequence. The amino acid composition and 10 amino acid residues of the N-terminal has also been deduced and reported.

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

sialic acid มีความสำคัญและศักยภาพในการนำไปใช้เป็นทิวเมอร์มาร์คเกอร์ในโรคมะเร็งได้หลายชนิด โดยที่ปริมาณของ sialic acid เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งทั่วไป โดยเฉพาะในส่วน antigen ที่เป็น glycoconjugates ที่อยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ ระหว่างที่เซลล์ขยายตัวมากขึ้น จะมีการหลั่งออกของ glycoconjugates ออกมาสู่สิ่งแวดล้อมเซลล์ และส่วนหนึ่งเข้าสู่กระแสเลือด จึงมีการเพิ่มระดับของ sialic acid ในซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิด พบได้ทั้งในสัตว์ทดลอง และในคนป่วยโรคมะเร็ง โดยที่เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการกระจายตัว (metastasis) หลังการรักษามีประสิทธิภาพ ระดับของ sialic acid จะลดลงเป็นปกติ ไม่ว่าโดยวิธีการผ่าตัด การฉายรังสี หรือการได้รับสารรังสี

ในปัจจุบันมีการศึกษาต่างๆ มากมาย (Ozben, 1991; Bhavanandan and Sheykhnazari, 1993; Lagakos et al., 1993) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยขั้นต้นใช้โรคมะเร็งระยะแรกให้ได้เร็วที่สุด วิธีการที่ง่ายและสะดวกรวดเร็วคือการตรวจวัดระดับของ tumor markers ชนิดต่าง ๆ เช่น CEA, AFP, enzymes รวมทั้ง antigens ต่าง ๆ ในเลือด แต่วิธีการทดสอบ ELISA เพื่อหาระดับ CEA, AFP, enzymes และ antigens ต่าง ๆ มีความจำเพาะต่อชนิดของมะเร็งต้องใช้หลายชนิด ที่มีราคาแพง และต้องซื้อจากต่างประเทศ

การเพิ่มของ sialic acid ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของมะเร็ง ดังนั้น sialic acid จึงเหมาะสมที่จะเป็นทิวเมอร์มาร์คเกอร์ที่ใช้ตรวจระบบ (screening tumor marker) ระบบกลุ่ม มะเร็งทั่วไปหลายชนิด ในผู้ที่สงสัยว่าจะเป็นหรือเสี่ยงเป็นโรคมะเร็งได้ดีกว่าทิวเมอร์มาร์คเกอร์ที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น carcinoembryonic antigen ซึ่งมีความจำเพาะจำเพาะเฉพาะ colon cancer และ G. I. cancer เท่านั้น

จากรายงานเบื้องต้น (Pongthawong, 1989) พบว่า ระดับ sialic acid เพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็งทางเดินอาหาร ลำไส้ ปอด ซึ่งสูงประมาณ 60-90% และพบว่า สารเคลือบใน hemolytroph ของอนุภาคไขมันชนิดต่าง ๆ มีคุณสมบัติทำปฏิกิริยาได้จำเพาะต่อกลัยโคโปรตีน ที่ประกอบด้วย sialic acid (sialoglycoproteins) สารเคลือบดังกล่าว สามารถนำมาใช้พัฒนาเพื่อการศึกษาวิเคราะห์ทิวเมอร์มาร์คเกอร์ได้ โดยวิธีทาง hemagglutination และการเชื่อมเนื้อเยื่อที่สงสัยว่าจะเป็นมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจระพอลูปได้ว่า sialic acid หรืออีกนัยหนึ่ง sialoglycoconjugates ใช้เป็น screening tumor marker ได้ดีกว่า tumor markers อื่น ๆ ดังกล่าวมาแล้ว

อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวข้างต้น เป็นเพียงการตรวจวัดแบบ semiquantitative เท่านั้น การวิจัยโครงการนี้ ต้องการศึกษาระยะระดับโมเลกุล (molecular characterization) ของเทคนิคนี้ และทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้มีลักษณะเป็นแบบ quantitative โดยอาศัยความรู้และความชำนาญที่ได้ศึกษามาเกี่ยวกับเทคนิคทาง labeled lectin-antibody technique และ monoclonal antibody รวมทั้ง enzyme-labelling technique ซึ่งจากการตรวจสอบทางเอกสาร พบว่า ยังไม่มีรายงานมาก่อนเลย

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature reviews)

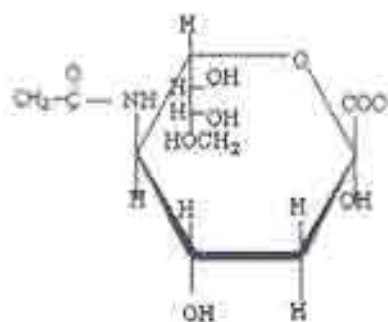
ความหมายของเลคติน (Lectin) จาก The nomenclature committee of the International Union of Biochemistry กล่าวว่า lectin คือ protein หรือ glycoprotein ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบ immune ซึ่งสามารถ

เกิด agglutination กับเซลล์และเกิดอาการตกตะกอนเป็น complex กับ carbohydrates ซึ่ง lectin ประกอบไปด้วยตำแหน่งที่ใช้จับกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง โดยในรูปสารละลาย หรือที่จับกับ membrane lectin นี้สามารถพบได้ใน พืช, สัตว์ และแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ตามพื้นฐานการจับแบบจำเพาะกับ carbohydrate ดังนี้

1. glucose / mannose group
2. N-acetylglucosamine group
3. galactose / N-acetylgalactosamine group
4. L-fucose group
5. sialic acid or N-acetylneuraminic acid group

hemolymph ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด ซึ่งมี lectin เป็นส่วนประกอบสามารถทำให้ เม็ดเลือดแดง ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเกิดการ agglutination ได้ เลือดดินที่จับกับ sialic acid สามารถแยกได้จาก hemolymph ของ American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), Indian (*Carcinoscorpius Rotondecauda*) อย่างไรก็ตาม บางชนิดจับกับน้ำตาลตัวอื่นได้เช่นกัน เช่น Asian crab จับกับ N-acetylglucosamine, siloglycoproteins มีส่วนประกอบหลักของ sialic acid ซึ่งเป็น oligosaccharide คือ N-acetylneuraminic acid ซึ่งเกาะอยู่กับ glycoprotein และ gangliosides ที่ membrane ของสัตว์ชั้นสูง โดยเกาะอยู่ที่ตำแหน่งส่วนปลาย (2-6) ใน saccharide chains ของ glycoprotein

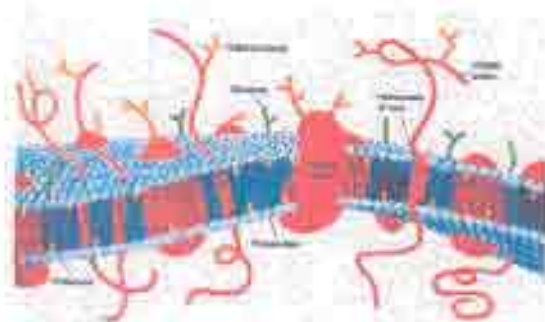
sialic acid เป็นสารประกอบน้ำตาลที่มี carbon 9 อะตอม อาจถือว่าคุณตรงโครงสร้างได้มาจาก pyruvic acid ทำปฏิกิริยา aldol condensation กับ N-acetyl mannosamine สามารถแยก sialic acid เป็นผลิตภัณฑ์จาก mucin จากต่อมน้ำลายวัว และตั้งชื่อ ว่า Neuraminic acid (NANA) มีชื่อทางเคมีว่า N-acetyl-5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ N-acetyl neuraminic acid (NANA) หรือ sialic acid

สามารถพบ sialic acid บนเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง, โกลโคโปรตีนรวมทั้งโปรตีนในซีรัม สามารถพบเยื่อหุ้มในน้ำลาย ตลอดจนถึง gonadotropin และฮอร์โมนอื่น ๆ บางตัว พวกไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหวัดในมนุษย์บางชนิด แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ neuraminidase สามารถตัด sialic acid ออกจากตำแหน่งที่มันอยู่ซึ่งจับด้วย glycosidic bond

sialic acid ที่พบในอวัยวะมีหน้าที่หลายอย่างด้วยกันโดยพบอยู่ในรูป oligosaccharide ที่ติดกับโปรตีนหรือ ไขมัน โดยคุณสมบัติต่าง ๆ ที่แสดงออกมาขึ้นกับปริมาณของ sialic acid ในโมเลกุล ซึ่งจะไม่มียาลต่อพฤติกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ หรือประจุไฟฟ้าของเซลล์ เป็นต้น ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ภาพวาดแสดงโครงสร้าง และส่วนประกอบต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น lipid bilayer, integral protein, glycoprotein และ glycolipid

การที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์นี้ จึงมีผลต่อการกำหนดคุณสมบัติของเซลล์ เช่น จากคุณสมบัติที่ตัว sialic acid เองมีประจุลบ ดังนั้น เซลล์ที่มี sialic acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์มาก จึงทำให้เกิดประจุลบขึ้นมาก ๆ ของเซลล์มีฤทธิ์ขับน้ำให้เห็นได้ชัดเจนในกรณีโรคไตเรื้อรัง ซึ่งมี sialic acid มากกว่า 10^7 ต่อเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ทั่วไปเกิด potential ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเซลล์จะไม่มีโอกาสเข้าจับกลุ่ม (agglutination) กับสลายของเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ถึงพบว่า sialic acid เป็นส่วนประกอบของ blood group substances ร่วมกับ fucose อีกด้วย โดยที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงขึ้นลงมีมาของ fucose โดยเฉพาะในระบบ Lea พบว่ามีปริมาณ sialic acid สูงถึง 3.0-18%

glycoproteins หรือ glycolipids เป็นสารชีวโมเลกุลที่พบได้มาก โดยมีกลไกเป็นส่วนประกอบของ cell surfaces โดยมีน้ำตาล sialic acid หรือ N-acetylneuraminic acid (MANA) เป็นน้ำตาลที่เป็นหน่วยสุดท้ายของสาย oligosaccharides ที่เป็นส่วนประกอบของ glycoconjugates ดังนั้น การตรวจวัดระดับของ sialic acid ที่ถูก hydrolyzed ออกมาจาก glycoconjugates แล้ว เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจวัดระดับของ glycoconjugates ได้ ซึ่ง sialoglycoconjugates เหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาจากส่วน cell surfaces เข้าไปมีชีวิต ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ turn over, secretion และ shedding ของ cell surfaces จึงทำให้ sialoglycoconjugates หรือ total sialic acid มีแนวโน้มให้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค หรือติดตามความรุนแรงของโรคบางชนิดได้ เช่น โรคมะเร็ง

เนื่องจาก sialic acid เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารพวก glycoconjugates บน cell surfaces ดังกล่าวมาแล้วนั้น ทำให้มีผู้สนใจทำการศึกษาวิจัยถึงระดับของ sialic acid ในชีวิตของคนไข้โรคต่าง ๆ (Erbil et al., 1986; Kishore et al., 1983; Fluchsky et al., 1986; Stefanelli et al., 1985; Schamberger, 1984; Silver et al., 1979; Schwartz et al., 1987; Ozben, 1991; Joshi et al., 1989; Patel et al., 1989)

	ปีที่ 1			ปีที่ 2			ปีที่ 3					
กิจกรรม	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
7. รายงานผลการดำเนินงาน ของงานวิจัย (ทุก 6 เดือน)	x		x		x		x		x			
8. วิจารณ์ผลและรายงาน งานสุดท้าย											x	
9. Publications						x						xx

ระเบียบวิธีการวิจัย (Materials and Methods)

การสกัดสารเจลตินจากปูทะเลเพื่อให้นิพฐิติ

การเตรียมเจลตินจากปูทะเลไทย :

ใช้เริ่มทดลองในสำานองปูและขาปูปูนี้ ซึ่งปูได้ 3 โดยตัดไว้รังด้ตามขนาดสำานองหัวใจ นำมาล้างปูให้
ได้ใส่น้ำสะอาดตลอด ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการจับตัวกันเป็นก้อน นำไปปั่นแยกที่ 10,000g เป็นเวลา 30 นาทีที่
อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเอาชิ้น ส่วนของเซลล์และก้น เสร็จจากนั้นนำส่วนใสของเหลวมาให้เป็นส่วนที่ -20°C จน
กว่าจะสามารถใช้ได้



รูปที่ 3 ภาพแสดงรูปปูทะเลไทย (*Scylla serrata*) และตำแหน่งของการเจาะ hemolymph ซึ่งแสดง
ไว้ที่ตำแหน่งถูกการทดลอง

การเตรียม bovine submaxillary mucin (BSM) Sepharose 4B column

นำเอาสารเจลตินของ Sepharose 4B ปริมาณ 20ml มาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 200ml ด้วยวิธีการ
กรอง จากนั้นล้างด้วย 20ml ของ 2M potassium phosphate, pH 12 เติม potassium-phosphate buffer,
pH 12 อีกจำนวน 20ml เติม cyanogen bromide ปริมาณ 1 กรัม ในขณะเติม Sepharose 4B ในอ่างน้ำแข็ง
นำไปยังห้องที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 400ml เติมสารละลาย BSM ซึ่งมีความ
เข้มข้น 2.5mg/ml ใน 1 M sodium chloride ปริมาณ 10ml จากนั้นเติม 10ml ของ 0.2M bicarbonate buffer

pH 9.0 และนำสารละลายไปเคลือบที่ อุลตรามิโกลีของข้ามคืน น้ำ BSM-Sepharose 4B ที่เตรียมได้มาล้างด้วย 500 ml ของ bicarbonate buffer pH 8.3 ปริมาณ 500ml เติมนำสารละลาย glycine buffer ที่ความเข้มข้น 0.2M แล้วนำไปเคลือบข้ามคืนที่อุณหภูมิต่ำของ น้ำ BSM-Sepharose 4B ที่เตรียมได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นและ 0.05M Tris-HCl buffer pH 8.5 ซึ่งมี 0.1M sodium chloride และ 0.01M calcium chloride จากนั้นเก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าต้องการใช้

การแยกเลือดดินจากปูทะเลชนิด *Scylla serrata* และทำการแยกให้บริสุทธิ์

นำสารละลายอีโมลิฟิ์ปริมาณ 10 มล. ถูกนำมาใส่ BSM-Sepharose column ขนาด 1.1 x 22 ซม. ซึ่งถูกแช่ไว้ในบัฟเฟอร์ชนิด 0.05M Tris-HCl, pH 8.5 ที่ประกอบด้วย 0.1M NaCl และ 0.01M CaCl₂ สารตัวอย่างจะถูกแช่ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิต่ำ 4°C จากนั้นถูกล้างด้วยบัฟเฟอร์ดังกล่าวข้างต้น จนกระทั่งการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280nm มีค่าน้อยกว่า 0.02 คอลัมน์จะถูกล้างอีกครั้งหนึ่งด้วย 0.05M Tris-HCl, pH 8.5 ที่ประกอบด้วย 1.0M NaCl และ 0.01M CaCl₂ การล้างครั้งสุดท้ายเพื่อทำการแยกสารเลือดดินทำได้โดยการใช้บัฟเฟอร์ชนิด 50mM Tris-HCl pH 3.0 ที่ประกอบด้วย 1M NaCl และ 25mM EDTA ไม่เกินที่แยกได้ครั้งสุดท้าย ถูกนำมาทำการ dialysis กับน้ำกลั่น แล้วนำไปทำ lyophilization จนแห้ง นำมาเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

การตรวจวัดปริมาณของเลือดดินด้วยวิธีการวัดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination)

ทำการเจือจางเลือดดิน two fold dilution โดยใช้ lectin 50 μ l รวมกับ 50mM Tris - HCl buffer, pH 7.5 ใน microplate จากหลุมที่ 2 ถึงที่ 11 แล้วจากทำ two fold dilution จากหลุมที่ 2 ถึงหลุมที่ 11 โดยใช้ หลุมที่ 1 เป็นเลือดดินที่ไม่ถูกเจือจาง จำนวน 50 μ l และหลุมที่ 12 เป็น 50mM Tris - HCl buffer, pH 7.5 จำนวน 50 μ l เติมน้ำ 0.3% ของเม็ดเลือดแดงหนูโธโม 50mM Tris - HCl buffer, pH 7.5 จำนวน 50 μ l ต่อหลุม เขย่าส่วนผสมทั้งหมดด้วยมือ ตั้งหลอดหลอดในอุณหภูมิต่ำของนาน 1 ชั่วโมง และทำการอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และ ผลของสารละลายเลือดดินที่เจือจาง

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

นำ Ready gel (8-15% : BioRad[®]) มาถอด comb ออก และใช้กระดาษกรองซับแต่ละหลุมที่จะหยด sample ไว้แห้ง แล้วจึงนำไปประกอบเข้ากับ sandwich clamp assemblies และ inner cooling core ของ Mini-Protein II electrophoresis cell จากนั้นเติม running buffer ให้ท่วมแผ่น ready gel พร้อมทั้งใส่ฟองอากาศที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกที่ประกบ gel อยู่ด้วย นำ molecular marker และ samples ที่ต้องการตรวจลงบน มา dilute กับ sample buffer ที่มีหรือไม่มี mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:4 สำหรับ molecular weight marker และ 1:1 สำหรับ samples แล้วนำใส่ คัมที่ 100°C เป็นเวลา 4 นาที นำ LMW marker ไปหยดลงใน หลุมละ 3 μ l และ sample หลุมละ 5 μ l ปิดฝา chamber และต่อขั้วสายไฟฟ้า เข้ากับ power supply เริ่ม run ได้โดยใช้ไฟฟ้า 150 volts นานประมาณ 45 นาที - 1 ชม. และเอา gel ออก นำไปแช่ใน staining buffer นาน 3 ชม. เมื่อครบกำหนดแล้วย้ายไปแช่ใน destaining buffer จนกระทั่ง background ใสแถมมองเห็น band ของโปรตีนที่ถูกจับด้วย Coomassie blue ชัดเจน

การจับยิด biotin กับสารเลคตินที่เตรียมได้

การทำปฏิกิริยา biotinylation สามารถกระทำได้โดยนำสารเลคตินมาละลายใน sodium bicarbonate buffer, pH 9.6 แล้วมาผสมกับสารละลาย biotin ที่ละลายใน DMSO (3-4, 1mg/ml) โดยให้มีอัตราส่วน 3:1 (w/w) นำไปแช่ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาทำ dialysis กับ phosphate buffer saline, pH 7.4 แล้วนำไปแบ่งส่วนเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าต้องการจะใช้

การพัฒนาวิธีการตรวจวัด sialoglycoconjugates โดยการติดฉลากด้วย biotin และตรวจวัดด้วย enzyme conjugated monoclonal anti-biotin antibody

เคลือบ microtiter plate (Maxisorp, Nunc) ด้วย BSM 2 µg/ml ที่ละลายใน bicarbonate buffer, pH 9.6 แล้วนำไปชุบที่ 37°C ใน incubator นาน 60 นาที หรือ 4°C ค้างคืนจากนั้น ล้างส่วนเกินด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง block ส่วนที่เคลือบด้วย 1% BSA (150 µl/well) แล้วนำไปชุบที่ 37°C นาน 60 นาที ล้างส่วนเกินด้วย PBS-Tween20 3 ครั้ง ในขณะที่มีการ incubate ทำการเตรียมส่วนผสมระหว่าง BSM ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน รวมกับ Biotinylated -lectin ใน PBS-Tween อัตรา 1 ต่อ 1 นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 4°C ชั่วครู่ แล้วนำมาเติมส่วนผสมในหลอดที่เตรียมไว้แล้ว แล้วนำมาชุบที่ 37°C นาน 60 นาที ล้างส่วนเกินด้วย PBS-Tween20 3 ครั้ง ทำการเตรียม conjugates ซึ่งใช้ peroxidase-conjugate monoclonal anti-biotin เจือจางใน PBS-1 ต่อ 1000 เติมนลงในหลอด โดยการเติมนลงในทุก well (100 µl /well) แล้วนำไป incubate และล้างเหมือนกับที่ได้ทำมาแล้ว จากนั้นนำมาเติม substrate ด้วย o-phenylenediamine ใน citric phosphate buffer, pH 5.5 และ 30% H₂O₂ ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4M H₂SO₄ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490/630nm นำค่าการดูดกลืนแสงนี้มาคำนวณหา % inhibition โดยการใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \left[\frac{A(\text{Biotinylated-lectin} + \text{Sample}) - A(6\% \text{ BSA})}{A(\text{Biotinylated-lectin}) - A(6\% \text{ BSA})} \right] \times 100$$

หรือจะใช้ computer programme (DeltaSoft II) ทำกราฟที่สามารถคำนวณหาปริมาณของสารด้วยค่า โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ได้จากการ plot ของ absorbance และ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ในส่วนของการศึกษาการใช้ inhibitors อื่น ๆ นั้นจะใช้สารมาตรฐานเช่น colominic acid, free sialic acid, hyaluronan, chondroitin sulphate ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งสารหรือยาจำพวก polysulphated polysaccharides เช่น pentosan polysulphate, และ dextran sulphate เป็นสาร competitive inhibitors แทน BSM เพื่อดูว่ามี inhibition pattern หรือไม่อย่างไร โดยการวัดค่ามาตรฐานที่ได้ศึกษาไว้ก่อนแล้ว

การตรวจวัดปริมาณ sialoglycoconjugates ในซีรัมของคนปกติ และคนที่ เป็นมะเร็ง

จากผลการต่าง ๆ ที่ได้จากการพัฒนาขึ้นโดยวิธีการติดฉลากด้วย biotin และใช้ enzyme conjugated anti-biotin antibody เป็นตัวตรวจวัด นำไปใช้ทดสอบตรวจวัดสาร sialoglycoconjugates ในซีรัมของคนปกติ และคนที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็ง เช่น มะเร็งที่ลำไส้ใหญ่ มะเร็งที่ปอด มะเร็งที่ตับ เป็นต้น โดยที่ตัวอย่างพวกนี้ได้จาก (tumour marker laboratory ของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โดยตัวอย่างที่เรียกว่า เป็นมะเร็งจะเป็นตัวอย่างที่แพทย์ได้วินิจฉัยแล้ว และมีค่า CEA เป็น positive ส่วนซีรัมของ คนปกติ จะได้จากธนาคารเลือด และผู้ที่มีโรคสุภาพประจำปี โดยจะมีค่าทางเคมีคลินิกเป็นปกติ

การติดฉลากเลคตินที่เตรียมได้ด้วยเอนไซม์ peroxidase

ทำการละลาย peroxidase (Sigma) จำนวน 5mg ด้วย 1ml ของ 0.3M NaHCO₃, pH 8.1 จากน้ำแข็ง 1% FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene) ที่ละลายใน absolute ethanol ปริมาณ 0.1ml และคนให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำ 80mM sodium periodate ในน้ำกลั่นปริมาณ 1ml และคนที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 0.16M ethylene glycol ในน้ำกลั่นปริมาณ 1ml พร้อมทั้งคนที่ อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 1 ชม. นำสารที่เตรียมได้มาทำ dialysis กับน้ำกลั่นจำนวน 2L ของ 0.1M sodium bicarbonate, pH 9.5 ที่ 4°C โดยทำการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้ง

นำเอา HRP-aldehyde solution ที่เตรียมได้จำนวน 3ml เติมน้ำกลั่นปริมาณ 5mg แล้วคนที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม. เติมน้ำ sodium periodate จำนวน 5mg และคนที่ 4°C อย่างช้า ๆ แล้วนำเอา complex ที่ได้ไปทำ dialysis กับ PBS pH 7.4 เพื่อนำไปใช้ต่อไป

การเตรียม polyclonal antibody ต่อเลคตินที่เตรียมได้

การเตรียม polyclonal antibody ต่อเลคตินที่เตรียมได้นั้น ได้ทำการฉีดกระตุ้นกระต่าย New Zealand White rabbit โดยทำการจะเลือกก่อนการกระตุ้นเพื่อเก็บให้ทำเป็น pre-immune antiserum จากนั้นนำเลคติน (1mg/ml-PBS) ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปฉีดเข้ากับกระต่ายทาง subcutaneous หลังจากนั้นอีกสองสัปดาห์ทำการฉีดกระตุ้นด้วยเลคติน ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant และทำการเจาะเลือดเพื่อทำการทดสอบหา antibody titer ต่อเลคตินที่เตรียมได้ในช่วงเวลา 5-8 สัปดาห์ เลือดกระต่ายที่จะได้ จะถูกนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ coag และนำไปปั่นแยกซีรัมเพื่อเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อการใช้งานต่อไป

การเตรียม monoclonal antibody ต่อเลคตินที่เตรียมได้

การผลิต Monoclonal antibodies

1. หนู Balb/c เพศเมียอายุ 6-8 สัปดาห์จำนวน 3 ตัวถูกนำมาทำการศึกษาโดยการฉีด antigen-adjuvant (complete) emulsion (1mg/ml ของ antigen รวมกับ adjuvant ในปริมาตรที่เท่ากัน) เข้าทางรู้งูเห่าน้ำจำนวน 50-100µl และ subcutaneous (SC) จำนวน 2-3 ที่
2. วันที่ 14 หลังจาก primary immunization ฉีดด้วย antigen-adjuvant (incomplete) emulsion ทาง SC ปริมาตร 50-100µl
3. วันที่ 35 ฉีดซ้ำด้วย antigen-adjuvant emulsion ทาง SC ปริมาตร 50-100 µl
4. วันที่ 59 ฉีดสารละลายของ antigen 1mg/ml-PBS ปริมาตร 500 µl ทาง intraperitoneal
5. วันที่ 62 แยกเอา spleen cells มาทำ cell fusion ร่วมกับ myeloma cells (X63 Ag8.653)

การทำ cell fusion ระหว่าง spleen cells และ myeloma cells

1. นำ spleen cells มารวมกับ myeloma cells ในอัตราส่วน 1:5
2. เติมน้ำ 50% ของสารละลาย polyethylene glycol แล้วนำไป incubate ที่ 37°C

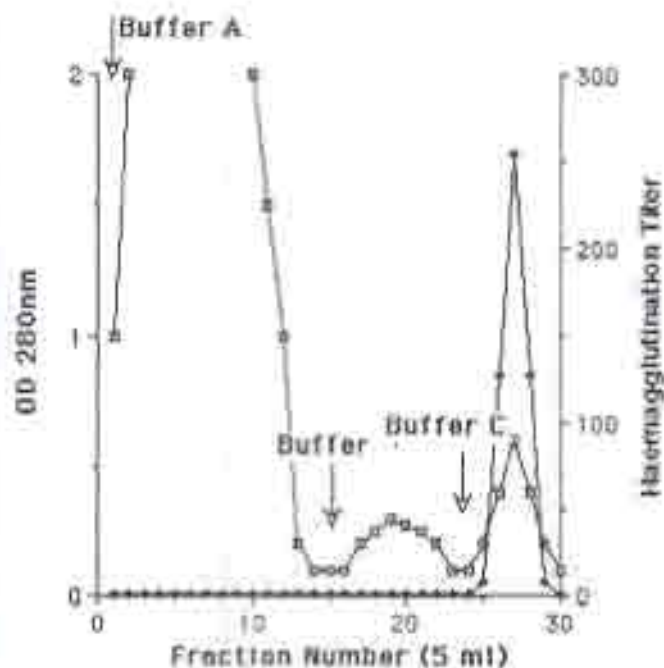
3. ค่อยเติม serum-free medium จำนวน 5ml
4. เติม serum-free medium อีกจำนวน 10ml
5. เป็นแยกเซลล์
6. เติม 10% fetal calf serum medium จำนวน 60ml แล้วนำไปเลี้ยงใน 96well plate จำนวน 8 plates (100ul/well) โดยที่ medium ที่ใช้มี hypoxanthine, aminopterin และ thymine เป็นเวลา 1 สัปดาห์
7. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่มี hypoxanthine และ thymine (HT-medium) เลี้ยงใน 5% CO₂ incubator สังเกตดูการเจริญเติบโต
8. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดที่มีการเจริญ มาทำการทดสอบหาการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธีการทาง ELISA
9. เติมปริมาณเซลล์ที่ได้ผสมรวมโดยการเลี้ยงในอาหาร จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูเพื่อการกระตุ้นให้เกิด ascites เพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากๆ

การตรวจหา antibody activity โดยวิธี Western Blotting

การตรวจหา antibody activity สามารถกระทำได้โดยการใช้ เทคนิคที่เรียกว่า Western Blotting โดย การนำเอา polyacrylamide gel ที่ run ได้จาก PAGE นั้นมา transfer ไปยังแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electro blotting จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ที่ได้นี้มา block ด้วย 1%BSA-PBS และตรวจสอบด้วย polyclonal หรือ monoclonal antibody ที่ผลิตได้ การทำโอบิเกลิตทำได้โดยการใช้ enzyme conjugated anti-rabbit หรือ anti-mouse antibody และ insoluble substrate ซึ่งจะเห็นมีจุดนั้น ๆ

ผลการศึกษาวิจัย (Results)

จากการเจาะเลือก ดังรูปที่ 3 จะได้เลือดปฏีประมาณ ตัวละ 2-5 mL. นำเอา BSM-Sepharose ที่สามารถนำไปใช้งานทางด้าน affinity chromatography เพื่อนำไปใช้งานในการทำให้เลือดตีนบริสุทธิ ซึ่ง BSM-Sepharose นี้สามารถเก็บไว้ใช้งานได้หลายครั้งโดยเก็บไว้ใน สารละลาย 0.05% sodium azide และเมื่อเราเลือดปฏีเจาะได้มา 600 โดยใช้ BSM-Sepharose ที่เตรียมได้ ทำให้ได้ผลดังรูปที่ 4 ทำให้ได้สารเลือดตีนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนต่อไป และนำมาทดสอบดูความบริสุทธิ์โดยวิธี PAGE-electrophoresis



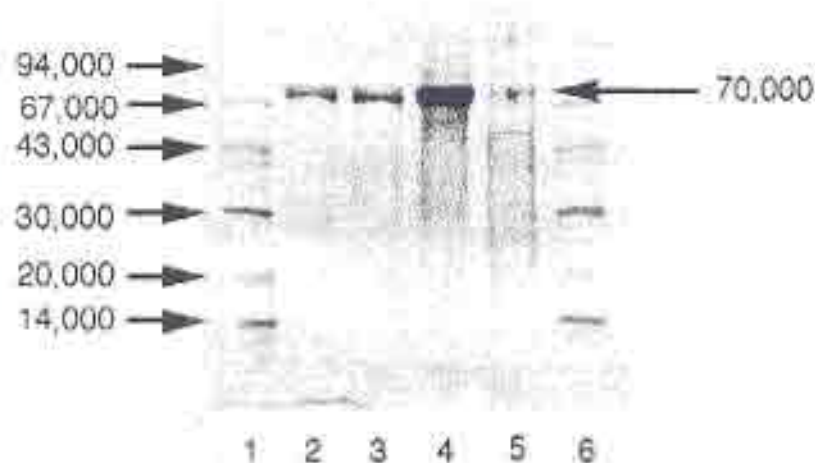
รูปที่ 4 แสดงรูปภาพที่ได้จากการแยกเลือดตีนบริสุทธิ โดยวิธี affinity column chromatography ด้วย BSM-Sepharose โดยที่

Buffer A : 0.1M NaCl, 10mM CaCl₂ และ 50mM Tris-HCl, pH 8.5

Buffer B : 1M NaCl, 10mM CaCl₂ และ 50mM Tris-HCl, pH 8.5

Buffer C : 1M NaCl, 25mM EDTA และ 50mM Tris-HCl, pH 3.0

นอกจาก run PAGE-electrophoresis เพื่อพิสูจน์ดูความบริสุทธิ์ และขนาดของ lectin ที่เตรียมได้ ได้ดังรูปที่ 5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเลือดตีนที่ได้จากการเตรียมโดยวิธี affinity chromatography บน BSM-Sepharose มีเพียง 1 band ที่มีขนาดใหญ่อประมาณ 70kDa โดยไม่มี 1 band ที่มีปริมาณน้อยกว่ามากและอยู่ติด กันที่มีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย ซึ่งเข้าใจว่าเป็น glycosylated form ของเลือดตีนที่เตรียมได้นั่นเอง

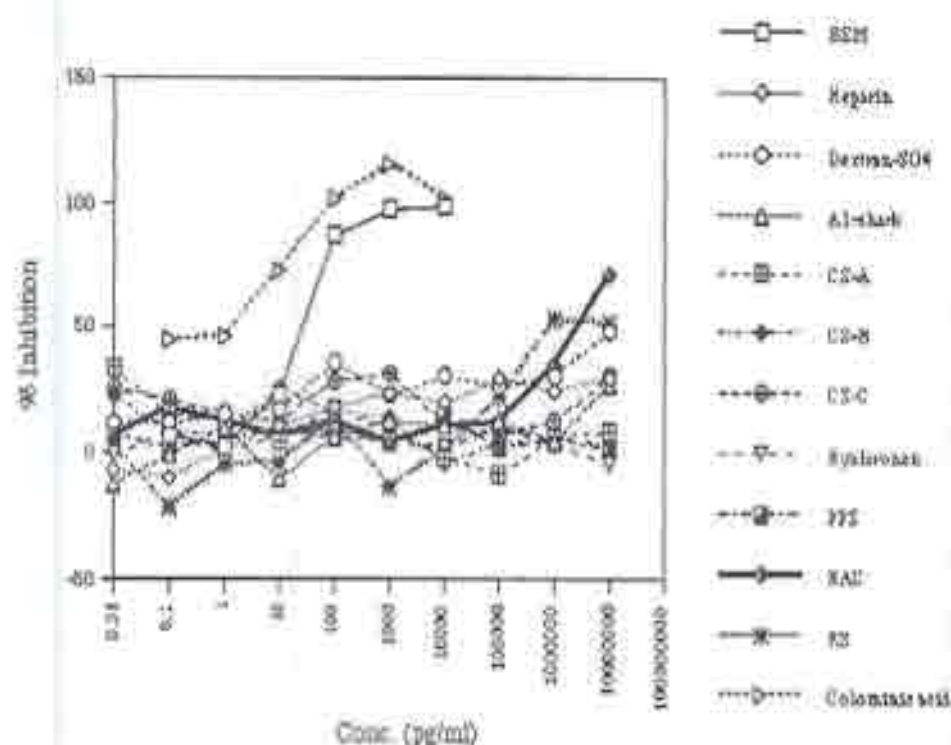


รูปที่ 5 แสดงรูปภาพของ electrophoretic pattern ของ hemolymph และ purified materials ที่แยกได้จาก affinity chromatography โดยได้จากการ run PAGE ซึ่งใช้ 8-15% gradient gel และทำการย้อมสีด้วย Coomassie Blue-R โดยที่

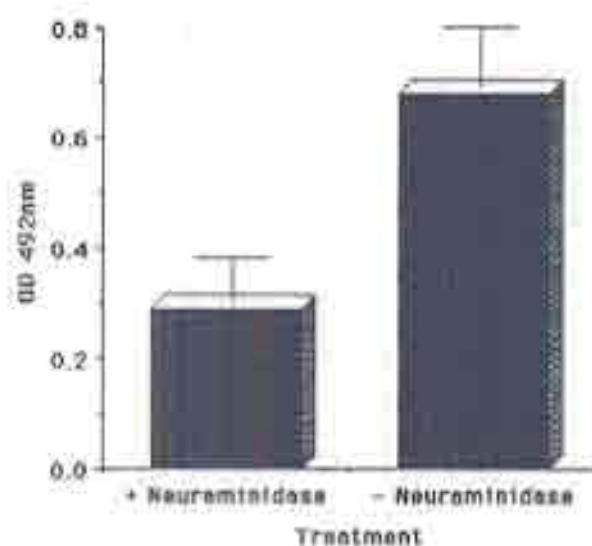
- lane 1 & 6 : low molecular weight markers
- lane 4 & 5 : hemolymph และ diluted hemolymph
- lane 2 & 3 : purified materials จาก affinity chromatography.

จากรูปที่ 5 และจากการศึกษาวิจัย พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเลคตินทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เสถียรภาพและไม่เสถียรภาพมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับคือ 70kDa

ผลจากการพัฒนาวิธีการทาง isolated biotin technique ได้นำสภาวะเหล่านั้นมาศึกษาหาคุณสมบัติ หรือ specificity ของเลคตินที่เตรียมได้ ซึ่งจะได้ผลทั้งรูปที่ 6 และ 7 โดยที่รูปที่ 8 เป็นการให้ inhibitors ต่าง ๆ ทำหน้าที่ในการยับยั้งการจับของ biotinylated lectin บน plate รูปที่ 7 เป็นการให้เอนไซม์ neuraminidase ย่อย BSM บน microtiter plate พบว่ามีปริมาณการจับของ biotinylated lectin ลดลง

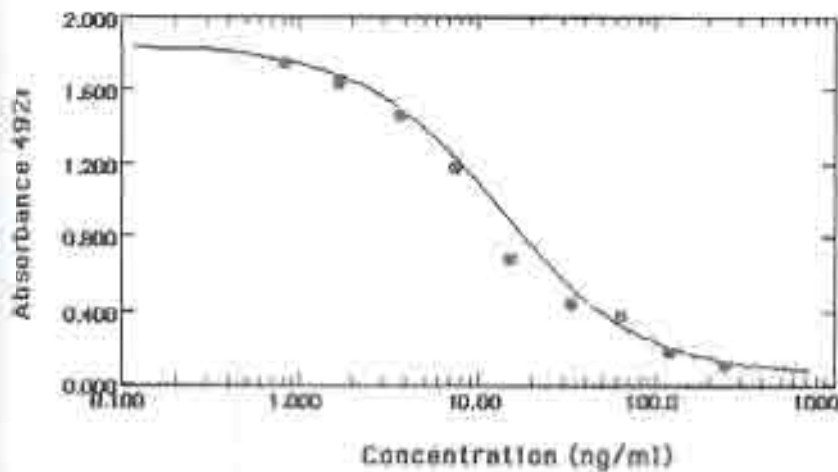


รูปที่ 5 กราฟการยับยั้งของภูมิต้านทานต่อสารที่มีฤทธิ์ที่เตรียมได้ โดยวิธีที่เขียนแบบ ELISA โดยใช้ biotinylated lectin และ enzym conjugated anti-biotin antibody ในการศึกษา (BSM : bovine submaxillary mucin; Heparin; Dextran sulphate; A1-shark : proteoglycans from shark cartilage; CS-A : chondroitin sulphate A; CS-B : chondroitin sulphate B; CS-C : chondroitin sulphate C; Hyaluronan; PPS : pentosan polysulphate; HAC : human articular cartilage proteoglycans; KS : keratan sulphate; colominic acid)



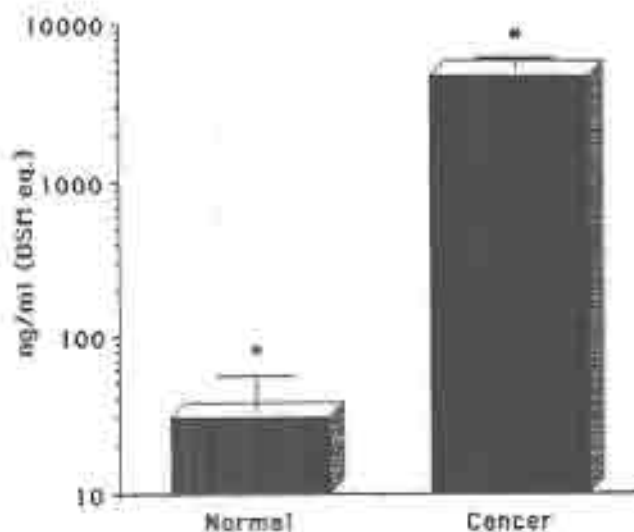
รูปที่ 7 กราฟแท่งแสดงค่าการดูดกลืนแสงกับส่วนของ BSM ที่เคลือบ microtiter plate ที่ถูก และไม่ถูกเอ็นไซม์ *neuraminidase* มีอยู่ BSM ซึ่งเป็น substrate ถูกนำมาระสีบน microtiter plate จากนั้นนำเอ็นไซม์ *neuraminidase* ใน buffer ที่เหมาะสมมา incubate และตรวจสอบค่าที่เปลี่ยนหลังจากการล้าง microtiter plate แล้วด้วย biotinylated lectin และ enzyme conjugated anti-biotin antibody

รูปที่ 8 แสดงให้เห็นตัวอย่างของกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ได้จากการใช้เทคนิคทาง biotinylation และ enzyme conjugated anti-biotin antibody โดยการใช้ BSM เป็นสารมาตรฐาน และเปรียบเทียบกับหน่วยออกมาเป็น BSM equivalent (BSM eq.)



รูปที่ 8 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากเทคนิค biotinylation และ enzyme conjugated anti-biotin antibody โดยการใช้ BSM เป็นสารมาตรฐาน

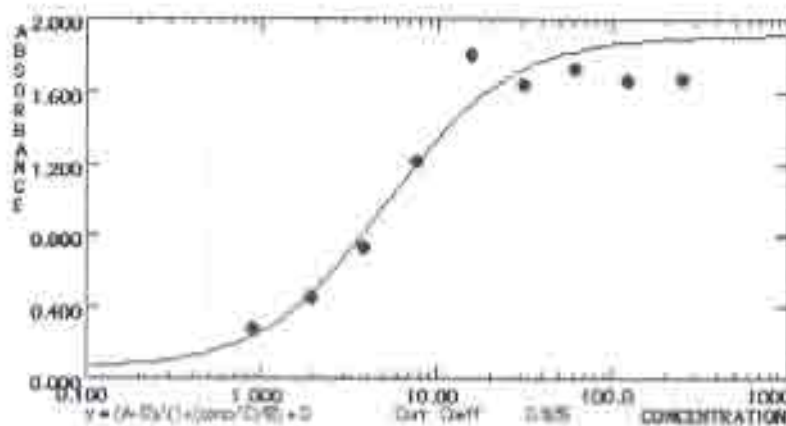
เมื่อนำวิธีการนี้ไปทดสอบการตรวจวัด sialoglycoconjugates ในสิริกของคนปกติ และคนที่เป็มะเร็ง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ ในคนปกติจำนวน 471 ราย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 31.7 ± 10.2 ng-BSM eq./ml และในคนที่เป็มะเร็ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $4,482 \pm 661.26$ ng-BSM eq./ml ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงกราฟแท่งของปริมาณ sialoglycoconjugates ระหว่างคนปกติ และคนที่เป็มะเร็ง ที่ได้จากการตรวจวัด โดยใช้เทคนิค biotinylation และ enzyme conjugated anti-biotin antibody

การนำเอา enzyme conjugated lectin มาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยเทคนิค Sandwich technique

สามารถจัดเตรียม enzyme conjugated lectin ได้ และได้นำมาพัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยเทคนิคทาง Sandwich technique ได้เช่นกัน ดังรูปที่ 10 แต่วิธีการนี้เป็นการสิ้นเปลือง purified lectin จำนวนมากจึงเป็นสารที่หาเตรียมได้ยากมาก จึงคิดว่าไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งานจริง



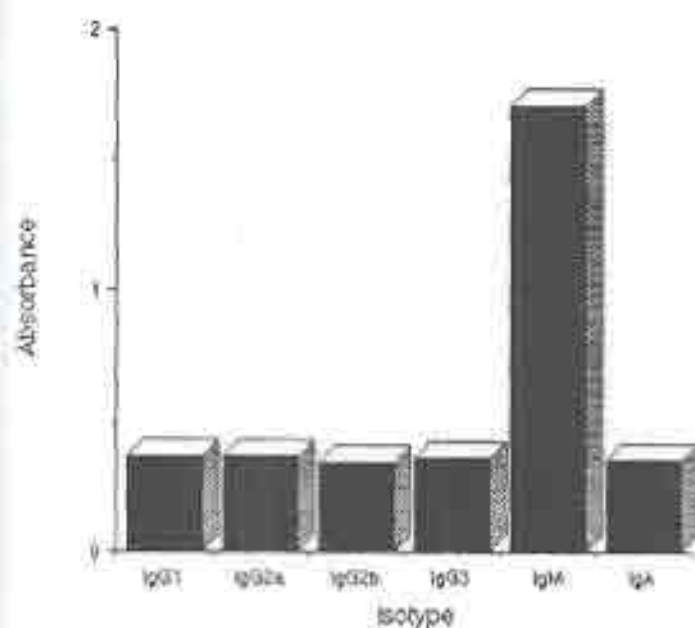
รูปที่ 10 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จาก Sandwich technique ที่ได้พัฒนาขึ้น

การผลิต monoclonal antibodies

จากการศึกษาคุณสมบัติของ lectin ที่พบว่าสามารถจับได้กับ colominic acid ซึ่งเป็น polymer ของ silicic acid จึงทำให้มีความคิดว่าจะนำการศึกษาผลิต antibody ต่อ colominic acid ด้วย แต่พบจำไม่สามารถเพาะเลี้ยงจนสำเร็จได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะ colominic acid เป็น immunogen ที่ไม่ดี

การผลิต monoclonal antibodies ต่อ purified lectin ที่เตรียมได้ เพื่อนำมาทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัด sialoglycoconjugates ต่อไปในอนาคต โดยไม่ต้องใช้ monoclonal antibodies จากการศึกษาวิจัยพบว่าให้ใช้ hybridoma cell lines ที่มีคุณสมบัติผลิต antibodies ต่อ purified lectin โดยมี reactivity แตกต่างกันออกไป ดังนั้น จึงคัดเลือกเอา clones ที่มี reactivity มากที่สุดจำนวน 6 clones เก็บไว้ที่ -80°C และนำเอา clone ที่มี reactivity โดย ELISA มาทำ limiting dilution เพื่อให้ได้เป็น monoclonal และนำเอา monoclonal antibody ที่ได้นำมาศึกษาถึงคุณสมบัติต่อไป

เมื่อนำเอา monoclonal antibody ที่ผลิตได้จาก hybridoma cell line มานำมาทำการศึกษาค้น เพื่อที่จะได้รู้ว่าเป็นชนิดใด และมีคุณสมบัติอย่างไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการตรวจวัดต่อไป จากวิธีการที่ให้ทาง ELISA และ specific antibody ต่อ immunoglobulin isotype พบว่า monoclonal antibody ที่ได้จาก clones เป็นชนิด IgM ดังตัวอย่างรูปที่ 11



รูปที่ 1.1 กราฟที่แสดง isotype ของ monoclonal antibody ที่ purified lectin ที่เตรียมได้ โดยที่ purified lectin ที่เคลือบอยู่บน microtiter plate ถูกทำปฏิกิริยากับ tissue culture medium และตรวจหา isotype ของ monoclonal antibody โดยใช้ specific antibody และ enzyme conjugates

การทดสอบ specificity ของ monoclonal antibody ต่อ purified lectin ที่เตรียมได้

ดังรูปที่ 12 พบว่า monoclonal antibody ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยาได้กับ purified lectin ทั้ง และ ได้ทำผลตรงกับตำแหน่งที่ได้จากภาพทำ PAGE ซึ่งทำการย้อมด้วย Coomassie blue



รูปที่ 12 แสดงรูปที่ได้จากการทำ Western blotting โดยใช้ purified lectin (preparation 1 และ 2) run ใน 8-15% gel PAGE และ electroblot ลงบน nitrocellulose และตรวจพบด้วย undiluted tissue culture media ที่ได้จากการเลี้ยง hybridoma cell line ชนิดนี้

ได้นำเอา monoclonal antibody ที่ผลิตได้มาทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัด sialoglycoconjugates โดยใช้ bovine submaxillary mucin เป็นสารมาตรฐานในการทำ standard curve ใน 0.1% BSA-PBS อย่างไรก็ดี จากการศึกษาค้นพบว่าไม่สามารถตรวจวัด หรือ set up standard curve ได้ หรือได้ผลการทดสอบที่ไม่แน่นอน จึงหาจะเป็นไปได้ว่า monoclonal antibody ที่ผลิตได้มี มี epitope บน lectin ซึ่งเป็นที่ศึกษาในบริเวณที่ให้มีปฏิกิริยากับ sialic acid บน sialoglycoconjugates

การผลิต polyclonal antibodies และการศึกษาคุณสมบัติ

การผลิต polyclonal antibodies จากการกระตุ้นกระต่ายด้วย purified lectin ที่เตรียมได้ โดยการใช้ กระต่าย 2 ตัว ทำให้ได้ polyclonal antibodies ที่มี titer ประมาณ 1:500 - 1:1000 โดยวิธีทาง ELISA ซึ่งนำ จากกระต่ายสองตัวนี้เก็บไว้ -20°C เพื่อการใช้งานต่อไป

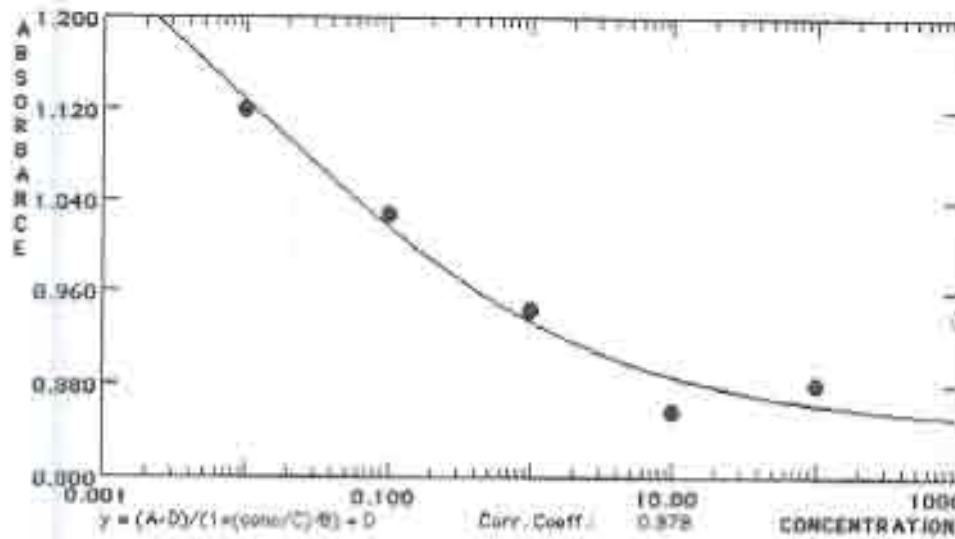
จากรูปที่ 13 แสดงให้เห็นถึงผลของการทำ Western blotting โดยนำตัวอย่าง purified lectin บน nitrocellulose ด้วย polyclonal antibody ที่ผลิตได้จากกระต่าย



รูปที่ 13 แสดงรูป ที่ได้จากทำการทำ Western blotting โดยใช้ purified lectin (preparation #1, #2 และ #3) run บน 8-15% gel PAGE และ electroblot ลงบน nitrocellulose และตรวจหาผล (probe) ด้วย rabbit polyclonal antibody

จากการทดสอบพบว่า มีปรากฏการณ์หลาย อย่าง มากกว่าการเชื่อมแบบไม่คืน ด้วยวิธีแบบ Coomassie blue และพบว่า purified lectin ที่แยกได้โดยวิธี angle stop affinity chromatography นั้น มีความแตกต่างกัน

เมื่อนำเขาซึ่งมาจากกระต่าย มาทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัด sialoglycoconjugates โดยการให้ bovine submaxillary mucin (BSM) เป็นสารมาตรฐานซึ่งทำให้ได้ standard curve ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดงกราฟมาตรฐานจากวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้น เพื่อการตรวจวัด sialoglycoconjugates โดยการให้ BSM เป็นสารมาตรฐาน และใช้ polyclonal antibody เป็นตัวตรวจลง

พบว่าสามารถได้ standard curve อยู่ในระดับ pg/ml (BSM equivalent) และควรมีค่า background สูงมาก ซึ่งต้องทำการพัฒนาวิจัย ต่อไปอีก

การเตรียมเลือดโดยใช้ affinity column อย่างเดียวอาจจะยังไม่บริสุทธิ์ ควรเพิ่มขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ถ้ายังไม่บริสุทธิ์จริง ๆ การศึกษาคุณสมบัติอาจได้ผลที่ไม่เชื่อมั่น

จึงได้ทำการแยกเลือดเพิ่มเติม ตามขั้นตอนการผู้ทรงคุณวุฒิเสนอ โดยนำเอาผลผลิตที่ได้จาก affinity column มาทำการแยกเพิ่มเติมโดยได้คิดตามเลือดโดยดูได้จากคุณสมบัติที่ทำให้เกิด hemagglutination โดยได้ใช้วิธีการศึกษาวิจัย 2 วิธีตามเครื่องหมายคือในให้ปฏิบัติการคือ mini-preparative gel electrophoresis และ Hydroxyapatite HPLC column chromatography ซึ่งทั้งสองวิธีได้ทำการศึกษาแล้วพบว่า เพื่อให้ได้ ultra purified lectin เพื่อนำมาทำการตรวจหาส่วนประกอบของ amino acid นั้นการใช้วิธี mini-preparative gel electrophoresis ซึ่งเมื่อนำเอาผลผลิตที่แยกได้โดยวิธีนี้มาทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย PAGE และ silver staining พบว่าได้ major band เดียวเท่านั้น ดังรูปที่ 15 โดยแถบที่อยู่วัดกันและมีขนาดเล็กกว่านั้น น่าจะเป็น degrading product



รูปที่ 15 แสดงภาพ electrophoretic pattern ของ hemolymph และ purified lectin ที่แยกได้จาก affinity chromatography และ mini-preparative gel electrophoresis โดยทำการ run PAGE บน 8-15% gradient gel และทำควอเตอร์นิตีด้วย silver staining

การศึกษาหา N-terminal amino acid sequence และ amino acid composition

ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากฤทธิ์ได้ข้อมูลดังกล่าวมาแล้วทั้งหมด ซึ่งพบว่า purified lectin ที่แยกได้จาก affinity chromatography ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ N-terminal ด้วยการทำ electro transfer blot ลงบน PVDF membrane และส่งไปวิเคราะห์นั้น สามารถเกิด N-terminal blocking ได้ซึ่งคิดว่าเป็น acetylated N-terminal block จึงได้ทำการแก้ปัญหาด้วยการใช้ buffer ที่ไม่มี acetic acid ในกระบวนการ electroblotting และการย้อม และเมื่อทำการพัฒนา band ที่อยู่บน PVDF membrane ด้วยวิธีการนี้ส่งไปวิเคราะห์หา N-terminal amino acid sequence และ amino acid composition อีกครั้งหนึ่ง พบว่าประสบความสำเร็จในการทำคือ พบว่าตัวอย่างที่ได้นั้นเป็นโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มาก และไม่น่าจะมีสิ่งปนเปื้อน และสามารถทราบถึงการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ N-terminal ได้จำนวน 10 ตำแหน่ง และปริมาณของกรดอะมิโนในสารละลายนี้ได้ดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและส่วนประกอบของกรดอะมิโนของเลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ จาก affinity chromatography, mini-preparative PAGE และ electroblotting บน PVDF membrane.

Amino acid	Concentration (n.mole/sample)*
Asp	18
Thr	7.8
Ser	11
Glu	14
Pro	8.4
Gly	13
Ala	9.0
Val	9.0
Met	2.5
Ile	5.2
Leu	11
Tyr	5.1
Phe	8.3
His	9.1
Lys	5.0
Arg	6.4
Cys	-

*Note about amino acid analysis:- Asn and Gln are completely converted to Asp and Glu during the acid hydrolysis of the protein. The value for Thr and Ser have been corrected for hydrolysis losses of 5% and 10% respectively. Trp usually suffers complete loss during acid hydrolysis and is not normally quantified. In proteins, Cys is usually observed as cystine. The recovery of Cys is variable when using standard hydrolysis conditions. Values are reported to two significant figures.

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของกรดอะมิโนที่ N-terminal ของเลคตินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จาก affinity chromatography, mino-preparative PAGE และ electroblotting บน PVDF membrane

Residue	Amino acid
1	Asp
2	Ser
3	Pro
4	Gly
5	His
6	Ala
7	Ser
8	Asp
9	Ala
10	Gln

วิจารณ์และสรุปผล (Discussion and Summary)

การตรวจสอบเกี่ยวกับประเทศไทยที่นำมาใช้ว่าเป็น *Scylla serrata* จริง การตรวจสอบให้ชัดเจนว่าปูทะเลไทยนี้มีปริมาณเลือดที่เปลี่ยนแปลงตามอายุและฤดูกาลหรือไม่ จะได้ในช่วงระยะเวลาที่มีเลือดมากที่สุดเป็นจุดเริ่มต้น

ผู้ทำการวิจัยได้ทำการปรึกษา และขอเรียนเชิญ ศาสตราจารย์ ดร. ไพบูลย์ ฉัยเนตรให้คำปรึกษาโครงการ และการ identify ปู *Scylla serrata* โดยพบว่าปูที่มีในท้องตลาดที่มีลักษณะตัวเขียวและนำมาบริโภคทานนั้นคือ species คือ *Scylla serrata* เท่านั้น โดยยังไม่มีผู้ทำการศึกษาวิจัยถึงความหลากหลายทางชีวภาพแบ่งแยกออกไปอีก ลักษณะที่สำคัญของ *Scylla serrata* คือนอกจากจะมีสีเขียวเข้มแล้ว (มีปูบางชนิดทางภาคใต้ที่มีสีดำและนำมาทานกัน แต่จะเป็นที่แพร่หลาย) พื้นที่อยู่ระหว่างตาจะมีลักษณะแหลม

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเลือดในปูนั้น ไม่ได้เป็นวัตถุประสงค์ของโครงการนี้จริง ๆ เพราะการทำการศึกษาเรื่องนี้ต้องใช้เวลาตลอดทั้งปี และต้องเลี้ยงปูประมาณมาก ขาดทั้งยังมีผลข้างเคียงอีกมากมายซึ่งจะกล่าวต่อไป อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการศึกษาดำเนินการตามขั้นตอนการได้แนะนำเท่าที่เวลาจะอำนวยโดยได้ผลดังต่อไปนี้

๑. การเปลี่ยนแปลงปริมาณของเลือด (โดยดูจากคุณสมบัติของเลือดที่ทำให้เกิด hemagglutination) ได้ผลดังต่อไปนี้

ปูช่วงเดือน สิงหาคม 2539 มี hemagglutination activity titer = 1:64 - 1:128

ปูช่วงเดือน กุมภาพันธ์ 2540 มี hemagglutination activity titer = 1:2

ปูช่วงเดือน เมษายน 2540 มี hemagglutination activity titer = 1:64 - 1:128

= การเปลี่ยนแปลงตามขนาด (อายุ?)

ตัวที่	ขนาด (กว้าง x ยาว) cm	เลือดที่เก็บได้ (ml)	Lactin Activity (HA titer)
1	10.5 x 9.0	10	64
2	10.5 x 7.5	7	128
3	10.0 x 7.5	7	64
4	10.0 x 7.0	4	64
5	11.0 x 8.0	8	128
6	11.5 x 8.5	10	128
7	11.5 x 8.0	7	64
8	11.0 x 8.0	8	64
9	11.0 x 8.0	10	32
10	11.0 x 7.5	10	2

โดยสรุปจากผลการทดลอง ขนาด (อายุ?) ของปูไม่ให้ผลแตกต่างกันสำหรับ hemagglutination activity อย่างไรก็ดีตามมีข้อที่ควรพิจารณาดังต่อไปนี้

1.1. ปริมาณ hemolymph น่าจะขึ้นอยู่กับ ความสดของปู หมายถึงระยะเวลาที่จับปูขึ้นมาจากบ่อเลี้ยง หรือทะเล ซึ่งไม่สามารถหาข้อมูลนี้ได้ แม้แต่คนขายเองก็บอกว่าเป็นปูสดทุกตัว และมีชั่งน้ำหนักแล้วก็มี การนำไปแช่อยู่ในน้ำธรรมดา (น้ำจืด) เพื่อไม่ให้ปูตาย

1.2. อายุของปูควรศึกษาจากลักษณะการมีไข่ หรือไม่มี ซึ่งแสดงถึงวัยของปูอย่างแท้จริง แต่การทดลองนี้ใช้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และไม่ได้ทำการแยกศึกษาไว้ อย่างไรก็ตามต้องให้ผู้ที่มีความชำนาญอย่างแท้จริงในการบอกอายุและการเจริญพันธุ์ของปู

1.3. แหล่งที่จับ แหล่งที่เลี้ยง และตลอดจนอาหารการเลี้ยงของปูซึ่งจะมีผลต่อลักษณะของปูด้วย ดังนั้น อาจสรุปได้ว่าการศึกษาหาปริมาณของเลคตินในปูนั้น ทำได้ยากมาก ต้องมีการศึกษาวิจัยถึงความหลากหลายทางชีวภาพของปูทะเลไทยเสียก่อน ซึ่งต้องใช้เวลา และงบประมาณตลอดจนบุคคลที่มีความชำนาญมาทำการศึกษา

การทดสอบความจำเพาะของเลคตินให้ละเอียด ซึ่งปูนี้จะเป็นตัวกำหนดว่าเลคตินที่ได้มา มีคุณสมบัติพิเศษต่างจากเลคตินอื่น ๆ อย่างไร และเป็นตัวกำหนดว่าเลคตินนี้จะใช้ประโยชน์อะไรได้บ้าง

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา จะพบว่า เลคตินที่แยกได้น่าจะมีคุณสมบัติที่จำเพาะ อย่างน้อยต่อ sialoglycoconjugates อย่างไรก็ดี จากการศึกษาทางเอกสาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาวินิจฉัยทางด้านนี้พบว่าควรจะต้องมีการสังเคราะห์ oligosaccharides ที่มี sialic acid จับกับน้ำตาลตัวอื่น ๆ หรือจับกันเองตามพันธะที่แตกต่างกันออกไปเช่น 2,3-, 2,4- และ 2,6-glycoconjugate bond แล้วไปจับกับโปรตีน แล้วนำมาทดสอบกับเลคตินที่เราแยกได้ แต่นั่นเนื่องจากข้อจำกัดทางด้านงบประมาณ และการสังเคราะห์ glycoconjugates ของผู้วิจัยเองจึงยังไม่สามารถทำการศึกษาเรื่องนี้ได้

การศึกษาระยะกึ่งอยู่ในและกึ่งอยู่ในภาวะจับกับน้ำตาล เช่น ค่า pH ที่เหมาะสม ที่ต้องการ metal ion หรือไม่เป็นสิ่งจำเป็นก็ตาม

ได้ทำการแยกเลคตินให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการดังกล่าว คือใช้วิธีการทาง affinity chromatography และ preparative gel electrophoresis จากนั้นนำไปทำ electroblotting ลงบน PVDF membrane แล้วตัดเอาส่วนของแถบเลคติน (70kDa) ไปทำการทดสอบหา N-terminal sequence และ amino acid analysis ที่บริษัทที่ UK ซึ่งครั้งนี้ได้ผลการทดลอง (ตารางที่ 1 และ 2) ที่แตกต่างไปจากครั้งแรก ๆ คือพบว่า ไม่สามารถหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้ เนื่องจากจากเขาจะมีการ block ที่ N-terminal amino acid อย่างไรก็ดี เมื่อทำการหลีกเลี่ยงการใช้ acidic acid ใน buffer ที่ใช้ run electrophoresis, staining และ destaining ทำให้สามารถหาส่วนประกอบของ amino acids และการเรียงตัวของกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal ได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เราสามารถแยกเลคตินให้บริสุทธิ์ได้ เพราะถ้าแยกได้ไม่บริสุทธิ์ก็น่าจะพบ N-terminal จาก contamination ได้เหมือนกันแรก ๆ

ในส่วนของการเลือกการจับกับน้ำตาของเลขดินตัวนี้ ได้ทำการศึกษาวิจัยแล้ว และได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

สำหรับค่า pH ที่เหมาะสม : ได้นำเอาเลขดินมาทำ dialysis กับ buffer (0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.15M NaCl, และ 0.01M CaCl_2) ที่ pH ต่าง ๆ กันและนำมาทำการทดสอบหา hemagglutination activity ซึ่งได้ผลดังนี้

Buffer pH	Hemagglutination activity (Titer)
4.0	32
6.5	128
7.5	128
8.2	256
9.6	128

ซึ่งพอจะสรุปได้ว่า optimal pH ควรจะเป็นที่ 8.2

สำหรับความต้องการ cation : ได้ทำการทดลองนำเอาตัวรับอย่างมาทำ dialysis กับ buffer ที่มี EDTA เพื่อกำจัดเอา cation ที่มีอยู่ในโพรบไปซึ่งเมื่อนำมาทำการทดสอบดูอีกครั้งหนึ่งพบว่าไม่มี hemagglutination activity เกิดอยู่เลย แสดงว่าเลขดินมีต้องการ cation อย่างแน่นอน

ตัวอย่างที่ได้จากการทำ dialysis กับ buffer ที่มี EDTA แล้วนำมาเจือจางด้วย buffer ที่มี cation ที่ต้องการตรวจวัดความจำเป็น โดยใช้ cation ในรูปของเกลืออยู่ 3 ชนิดคือ CaCl_2 , MnCl_2 และ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.01M ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

Buffer containing cation	HA Titer
0.01M CaCl_2	128
0.01M MnCl_2	512
0.01M MgCl_2	256

มีข้อควรสังเกต:

Mn^{2+} และ Mg^{2+} มีผลทำให้เกิด hemagglutination ได้ดี แต่ก็มีผลทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงบางส่วนแตก (hemolysis) ได้ และเม็ดเลือดแดงสำหรับ negative control ของ buffer ที่มีเกลือทั้งสองชนิดนี้ก็เกิด hemolysis บางส่วน และเม็ดเลือดแดงเองก็ตกลงที่ก้นหลอดไม่จับกัน

ในส่วนของ Ca^{2+} เกิด hemagglutination ได้ดีมากทั้ง positive และ negative control ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่า cation มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเกิดปฏิกิริยาของเลขดินตัวนี้ และ Ca^{2+} น่าจะเป็นตัวที่เหมาะสมที่สุด

เอกสารอ้างอิง (References)

- Pinitglang, S., Biochemistry study of lectin from marine crabs, M. Sc. Thesis, Department of Biochemistry, Chiang Mai University, 1989.
- Pinitglang, S., Bunjerdpongchai, R., Apiwattakakul, K., and Suttajit, M. Clinical significance of increased serum sialic acid in cancer. *เอกสารประชุมวิชาการวชิรมนสิกุล ครั้งที่ 15, 24 กันยายน 2534 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.*
- Kongswasert, P., and Ghosh, P. A new sandwich ELISA method for the determination of keratan sulphate peptides in biological fluids employing a monoclonal antibody and labeled avidin-biotin technique. *Clinica Chimica Acta*, 195: 17-26, 1990.
- Erbil, K. M., Sen, S.E., Zineke, H., and Jones, J. D. Significance of serum protein and lipid-bound sialic acid as a marker for genitourinary malignancies. *Cancer*, 57:1389-94, 1986.
- Kishore, B. K., Arakawa, M., and Geyo, F. Altered glycosylation and sialylation of serum proteins and lipid-bound sialic acids in chronic renal failure. *Prostgrad Med J.*, 59: 551-5, 1983.
- Pludrnsky, M. C. Riley, W.M., Prorok, J.J. and Alhadeff, J. A. Total and lipid-associated serum sialic acid levels in cancer patients with different primary sites and differing degrees of metastatic involvement. *Cancer*, 59: 2680-5, 1985.
- Stefanelli, N., Klotz, H., Engel, A., and Bauer, P. Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections, and chronic liver diseases. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 109: 55-9, 1985.
- Schamberger, R. J. Serum sialic acid in normals and in cancer patients. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 22: 847-51, 1984.
- Silver, H. K. B., Karim, A. K., Archibald, E. L., and Salinas, F. A. Serum sialic acid and sialyltransferase as monitors of tumor burden in malignant melanoma patients. *Cancer Res.*, 39: 5036-42, 1979.
- Lagana, A., Manno, A., Fago, G., and Martinez, B. P. A hydrolysis method using microwaves: determination of N-acetyl- and N-Glycolylneuraminic acids in biological systems by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 215: 266-272, 1993.
- Bhavanandan, V., and Sheykhnazari, M. Adaptation of the periodate-resorcinol method for determination of sialic acids to a microassay using microtiter plate reader. *Anal Biochem.*, 213: 438-440, 1993.
- Schwartz, P. E., Chambers, S. K., Chambers, J. T., Gutmann, J., Katopodis, N., and Foemmel, R. Circulation tumor markers in the monitoring of gynecologic malignancies. *Cancer*, 60: 353-361, 1987.
- Ozben, T., Elevated serum and urine sialic acid levels in renal diseases. *Ann Clin Biochem.*, 28: 44-48, 1991.

- Joshi, B. H., Joshi, M. B., Patel, P. S., Chienis, K. E., and Balar, D. B. Efficacy of serum sialoglycoproteins as a biomarker of the disease activity and treatment monitoring in patients with base tongue malignancy. *Indian J Med Res.*, 90: 17-21, 1989.
- Patel, P. S., Saxi, B. R., and Balar, D. B. Significance of serum sialoglycoproteins in patients with lung cancer. *Neoplasia*, 36(1): 53-59, 1989.
- Nakane, P. K., and Kawaoi, A., *J Histochem Cytochem.*, 22:1084, 1974.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
Research Output ของโครงการวิจัยที่เสร็จสมบูรณ์
ของทุนพัฒนานักวิจัย

ผู้ทำการวิจัย

ชื่อ-สกุล ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

ชื่อโครงการ การเตรียมแลคตินบริสุทธิ์จากปูทะเลไทย และการพัฒนาเทคนิคและการประยุกต์ใช้
เพื่อการตรวจสอบ และการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

สถาบัน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยคั่นสังกัดตลอดโครงการ

บาท

1. Publication ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1.1 Kongtaweeert, P.*, Surangkul, D., and Suttajit, M. A periodate-resorcinol microassay for the
quantitation of total sialic acid in human serum. Submitted to the Journal of Clinical
Biochemistry, เอกสารประกอบหมายเลขที่ 1

1.2 Kongtaweeert, P. Isolation and characterization of sialic acid specific lectin from Thai marine
crab (*Scylla serrata*) and its application for the determination of sialoglycoconjugates in human
serum. Submitted to the Journal of Molecular Marine Biology and Biotechnology เอกสารประกอบ
หมายเลขที่ 2

2. หากยังไม่มี publication ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ โปรดระบุชื่อเรื่องที่กำลังจะตีพิมพ์ได้ วารสารที่
คาดว่าจะตีพิมพ์ และจะ submit เมื่อใด

3. ภาวะตทะเขียนสิทธิบัตร

4. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 4.1 เสนอในที่ประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย จัดโดยสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2549 เรื่องการประยุกต์ใช้แอนติบอดี ในเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตในภาคเหนือ

5. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

6. ผลงานอื่น ๆ

- 6.1 กำลังจะนำวิธีการตรวจวัดปริมาณ total sialic acid ในซีรัมของคนโดยวิธี micromethod และ periodate-resorcinol มาใช้เพื่อเป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ tumor marker
- 6.2 การสร้างนักวิจัยใหม่ : จำนวนนักศึกษาที่จบระดับปริญญาโท 1 คน วิทยานิพนธ์ที่ได้ชื่อว่า The development of methods for quantitation of serum total sialic acid and hyaluronan, The M.Sc. Thesis, Department of Biochemistry, Chiang Mai University, 1997 (หมายเหตุ : จำนวนนักศึกษาปริญญาโทที่จบจากห้องปฏิบัติการนี้ ในระยะเวลาที่ได้เงินทุนนี้ทั้งหมด 5 คน ซึ่งได้ใช้เครื่องมือ และ สารเคมีบางอย่างจากโครงการนี้ด้วย)
- 6.3 ได้มีการนำconsumables และเครื่องมือบางอย่างไปใช้ในการวิจัย ที่ดำเนินการอยู่ในห้องปฏิบัติการนี้ด้วย และผลงานนั้นได้ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ ซึ่งได้เขียน Acknowledgement ด้วย
 ลกว. ให้ด้วย : Kongtaweert, P. and Kulapongs, P. A method for quantitation of heparin and heparin like substances using monoclonal antibody and labeled avidin-biotin technique, Clin Chem., 1997; (เอกสารประกอบหมายเลข 3)

7. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นเกี่ยวกับทุนพัฒนานักวิจัยภายใต้การดูแลของ ลกว.

- 7.1 การประกาศและการรับสมัครทุน : ดีมากอยู่แล้ว และเหมาะสม
- 7.2 การเสนอผลงานประจำปี และการประเมินโครงการวิจัย : เหมาะสม
- 7.3 ท่านคิดว่าโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก ลกว. สามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ได้เสนอไว้หรือไม่
- ตามที่ได้เสนอไว้ในโครงการวิจัยเริ่มต้น น่าจะตีพิมพ์ผลงานวิจัยในช่วงปีที่ 2 ของโครงการ แต่ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากขาดข้อมูลที่สำคัญบางประการ ที่จำเป็น
 - ตามที่เสนอไว้ในโครงการ และในช่วงแรกคิดว่าน่าจะขอสิทธิบัตรได้ แต่เมื่อค้นหาในเอกสารต่าง ๆ พบว่าการศึกษาแบบนี้ มีผู้ทำมาบ้างแล้ว และอยู่ในลักษณะที่ obvious จึงไม่สามารถทำได้
 - น่าจะได้รับการตีพิมพ์ จำนวน 2 เรื่องตามที่เสนอไว้
 - ได้รับการตีพิมพ์จากเรื่องอื่น ๆ อีก 1 เรื่อง
 - วิทยานิพนธ์ 1 เรื่องในส่วนที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย

จากที่กล่าวมานี้ สามารถสรุปได้ว่า บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ได้เสนอไว้

ดัชนี (Index)

ประวัติของผู้ทำการวิจัย

ชื่อและนามสกุล (ภาษาไทย) นายปรัชญา คงทวีเลิศ
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Prachya Kongtawelert
เพศ ชาย
วัน เดือน ปีเกิด 14 กุมภาพันธ์ 2502
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7
ที่อยู่
ที่ทำงาน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50202
โทรศัพท์ (053) 894188, 945325 โทรสาร (053) 894188, 217144
e-mail address : pkongtaw@suanok01.medicine.cmu.ac.th
ที่บ้าน 181/22 หมู่ที่ 2 ต. ช้างเมืง อ. เมือง
จังหวัด เชียงใหม่ รหัสไปรษณีย์ 50300
โทรศัพท์ (053) 218130 โทรสาร -

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขา เทคนิคการแพทย์ สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีจบ พ.ศ. 2524 GPA 2.67
ปริญญาโท สาขา ชีวเคมี สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีจบ พ.ศ. 2527 GPA 3.91
ปริญญาเอก สาขา Medicine สถาบัน มหาวิทยาลัยชิคาโก ประเทศสหรัฐอเมริกา
ปีจบ พ.ศ. 2535

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

- ชีวเคมีของ polysulphated polysaccharides
- ชีวเคมีภูมิคุ้มกันวิทยาและการวินิจฉัยโรคข้อกระดูก (Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis)
- ผลิต, พัฒนา และประยุกต์ใช้ monoclonal antibody
- พัฒนาวิธีการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลโดยวิธี Elisa & Elisa-like technique

ผลงานวิจัยใน 5 ปีที่ผ่านมา

Kongtawelert, P. and Ghosh, P. An enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay for quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids. Anal. Biochem. 178:367-372, 1989.
Kongtawelert, P. Brooks, P. and Ghosh, P. Pentosan polysulphate (Cartrophen) prevents the hydrocortisone induced loss of hyaluronic acid and proteoglycans from cartilage of rabbit joints as well as normalises the keratan sulphate levels in their serum. J. Rheumatol. 16(11):1454-1459, 1989.

- Kongtawelert, P., Francis, D.-J., Brooks, P.M., and Ghosh, P. Application of an enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay to quantitate the release of KS-peptides into fluids of the rat subcutaneous air-pouch model and the effects of chondroprotective drugs on the release process. *Rheumatol. Int.*, 9:77-83, 1989.
- Kongtawelert, P. and Ghosh, P. A method for quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) using labelled avidin-biotin technique. *Anal. Biochem.* 185: 313-318, 1990.
- Kongtawelert, P. and Ghosh, P. A monoclonal antibody that recognizes 2,3-, 2,6-, and 4,6-disulphate ester ring substitution in pyranose-containing polysaccharides. Its production, characterization and application for the quantitation of pentosan polysulphate, dextran sulphate, glycosaminoglycan polysulphate and chondroitin sulphate E. *J. Immunol. Methods*, 126: 39-49, 1990.
- Kongtawelert, P. and Ghosh, P. A new sandwich-ELISA method for the determination of keratan sulphate peptides in biological fluids employing a monoclonal antibody and labelled avidin-biotin technique. *Clin. Chimica. Acta*, 195: 17-26, 1990.

ผลงานวิชาการอื่น ๆ

- แต่งและเรียบเรียงหนังสือเรื่อง วิศวกรรมพันธุศาสตร์ 1
- แต่งและเรียบเรียงหนังสือเรื่อง ตามชอบชีวเคมีเบื้องต้น เล่มที่ 1
- แต่งและเรียบเรียงหนังสือเรื่อง ชีวเคมีประยุกต์ วิศวกรรมพันธุศาสตร์

รางวัลหรือทุนที่เคสได้รับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย

- ทุนวิจัยที่ได้รับ - กองทุนพัฒนาวิทยาศาสตร์ ส่วนส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เรื่อง The development of diagnostic test for heparin and heparin-like substances in human plasma
- สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เรื่อง การเตรียม และศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ยึด chondroitin sulphate เพื่อการวินิจฉัยโรคกระดูกอ่อนและข้อ
 - Commission of the European Communities เรื่อง The development of tests for diagnostic markers of joint diseases.

งบประมาณที่ได้รับ และที่ใช้ตลอดโครงการ

ชื่อโครงการ การเตรียมเลคตินบริสุทธิ์จากปูทะเลไทย และการพัฒนาเทคนิคและการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจคัดกรอง และการวินิจฉัยโรคมะเร็ง

The purification of lectin from Thai marine crabs and its technical development for application in screening and diagnosis of cancer.

ชื่อหัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

รายงานในช่วงวันที่ 31 พฤษภาคม 2540

ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2540

รายจ่ายประจำงวดปัจจุบัน

หมวด (ตามเอกสารโครงการ)	รายจ่าย จากรายงาน ครึ่งก่อน	รายจ่าย คราวนี้	รวมสะสม
1. ค่าจ้าง	327,500.-	54,000.-	381,500.-
2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย	450,000.-	-	450,000.-
3. ค่าตอบแทนอื่นๆ			
4. ค่าใช้สอย			
5. ค่าวัสดุ	226,574.28	70,000.-	296,574.28
6. ค่าอุปกรณ์	145,110.-		145,110.-
7.....			
8.....			
รวม	1,148,184.28	124,000.-	1,272,184.28

จำนวนเงินที่ได้รับและเงินคงเหลือ

งวดที่ 1	ได้รับจาก สกส.	360,000.- + 140,000.- = 500,000.-	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	ไม่ได้รับ	บาท
	อื่นๆ (เช่น ดอกเบี้ย)	3,077.88	บาท
	รวม	503,077.88	บาท
	รายจ่าย	500,035.60	บาท
	เหลือ	503,077.88 - 500,035.60 = 3,042.28	บาท
งวดที่ 2	ได้รับจาก สกส.	426,000.00	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	0	บาท
	อื่นๆ (เช่น ดอกเบี้ย)	3,042.28	บาท

	รวม	429,042.28	บาท
	รายจ่าย	225,148.68	บาท
	เหลือ	203,893.60	บาท
งวดที่ 3	ได้รับจาก สกร.	336,000.00	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	0	บาท
	อื่น ๆ (เช่น ดอกเบี้ย)	7,565.33	บาท
	รวม	343,565.33	บาท
	รายจ่าย	222,000.00	บาท
	เหลือ	121,565.33	บาท
งวดที่ 4	ได้รับจาก สกร. (บอกลบมา จากงวดที่แล้ว)	121,565.33	บาท
	ได้รับจากมหาวิทยาลัย	-	บาท
	อื่น ๆ (เช่น ดอกเบี้ย)	2,498.32	บาท
	รวม	124,063.65	บาท
	รายจ่าย	124,000.00	บาท
	เหลือ	63.65	บาท

เอกสารประกอบหมายเลข 1

A periodate-resorcinol microassay for the
quantitation of total sialic acid in human serum.

By

Kongtawelert, P.^{*}, Surangkul, D., and Suttajit, M.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai,
Thailand 50202

Correspondence to : P. Kongtawelert, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

THAILAND

TEL : 66-53-894188, 217144; FAX : 66-53-894188, 217144

email : pkongtaw@suandok01.medicine.cmu.ac.th

A periodate-resorcinol microassay for the quantitation of total sialic acid in human serum.

Sialic acid, a class of important ketoses that contain nine carbon atoms, are acetylated derivatives of neuraminic acid (2-keto-5-amino-3,5-dideoxy-D-nonulosonic acid) (1). The unique structural features of this molecule, which includes a negative charge owing to a carboxyl group, enable it to play an important role in cellular functions, such as cell-to-cell repulsion, recognition, transportation of positively charge compounds and tumor cell metastasis (2). Sialic acid is a common terminal sugar unit of the oligosaccharide of glycoproteins and glycolipids which are cell surface constituents. These sialic acids apparently enter the circulation by either shedding or cell lysis and are of considerable interest because of their potential diagnostic value (2). Elevated levels of serum sialic acids have been reported in patients with lymphoma, malignant melanoma and lung cancer as well as cancers of the prostate, colon, brain, stomach, bladder and gastrointestinal system (3, 4, 5, 6).

A widely used technique for quantitation of free sialic acid is the periodate-thiobabituric acid method. The periodate-resorcinol assay is used for total sialic acid (TSA)(1). Bhavanandan and Sheykhnazari (1) reported a convenient microassay for simultaneously measuring sialic acid in a large number of samples and specifically for monitoring fractions during factionation of biological samples.

This present paper reports a modification and optimization of periodate-resorcinol method (1) which is more suitable for biological fluids such as human serum samples.

A 96-well microtiter plate format was used as a single reagent mixing well. The principle of this newly-developed assay is the periodate-resorcinol procedure. Conditions for the quantitation of sialic acid in serum, such as the concentration of periodate, resorcinol, incubation time and human serum volume, were optimized. It was found that the optimal

concentration of periodic acid and resorcinol reagent were 1.3mM and 0.6%, respectively.

An incubation time of 60 minutes for the reaction of periodic acid and resorcinol with samples was found to give the highest absorbance. These new procedures were used for the quantitation of sialic acid in human serum. It was found that only 5 μ l samples were needed to give a coefficient of variation of the intra- and inter-assay of 0.79% and 4.68%, respectively. The percentage of recovery which was studied by the addition of a known amount of pure sialic acid was found at 94.25% (ranged between 76.23 - 105.23%).

The result of the comparison between the newly-developed periodate-resorcinol microassay for TSA with the previous standard Ehrlich method (7) is shown in Figure 1. The two methods was found to be correlated with each other at the coefficient of correlation of 0.70 ($p < 0.0001$).

This method has been used to quantitate TSA in normal healthy and cancer serum and a significant difference between these two groups ($p < 0.0001$) was found (Figure 2). These results suggest that the periodate-resorcinol microassay is sensitive, reliable, economical, requires less sample volume and is suitable for the quantitation of total sialic acid in biological fluid and tissue extraction samples.

Sialic acid levels in serum and urine have been investigated and reported as diagnostic markers for patients with inflammatory disorders, cancer, sialuria, and many other diseases (8). A variety of methods are available for the detection and estimation of free and glycosidically-bound sialic acids. These can be broadly classified as colorimetric, fluorometric, enzymatic methods and the highly sensitive high performance liquid chromatographic (HPLC) method (2). The most widely used procedures are the colorimetric method including the Ehrlich method (7), the periodate-thiobabituric acid method (9), and the periodate-resorcinol assay (10). The procedure described by Warren (8) is typical of the periodic and thiobabituric acid procedure, which measures only free sialic acid that is

released after an initial hydrolysis step. The procedure is reported to have an assay coefficient of variation of approximately 3% (11). A significant rise in total sialic acid was found in patients with cancer of the stomach, breast, colorectal region and gall bladder (6). The periodate-resorcinol microassay presented in this report has several advantages over the original one, including the use of smaller samples (5 ml) and the larger number of samples that can be simultaneously analyzed, the fast addition of reagents with multichannel or repeating pipetter, the greater speed in measuring absorbance by microtiter plate spectrophotometer and the direct transfer of data to a computer (1) or even adaptation to an automated system in the future.

ACKNOWLEDGEMENT

P. Kongtawelert is a TRF Research Scholar and this work is supported by The Thailand Research Fund (TRF) (contract no. RSA/24/2537). Associate Professor Maitree Suttajit provided valuable technical advice and Peter Lange helped in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

1. Bhavanandan VP, Sheykhmazari M. Adaptation of the periodate-resorcinol method for determination of sialic acid to a microassay using microtiter plate reader. *Anal Biochem* 1993; 213, 438-440.
2. Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 1994; 24, 376-384.
3. Dabrowska B, Krasnodebski IW, Tadeusiak W. Sialic acid and carcinoembryonic antigen (CEA) as marker of colon cancer. *Pol-Tyk-Lek* 1991; 46, 890-891.
4. Kokoglu E, Sonmez H, Uslu E, Uslu I. Sialic acid levels in various types of cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1992; 13, 57-64.
5. Polivkova J, Vosmikova K, Horak L. Utilization of determination lipid-bound sialic acid for the diagnosis and further prognosis of cancer. *Neoplasma* 1992; 39, 233-236.
6. Tewaoson SL, Mittal VP, Singh M, Gupta GP. Serum sialic acid - an important cancer marker. *Indian J Cancer* 1993; 30, 125-131.
7. Werner L, Odin L. On the presence of sialic acid in certain glycoproteins and in gangliosides. *Acta Soc Med Ups* 1952; 57, 230-241.
8. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J Biol Chem* 1959; 234, 1971-1975.
9. Waters PJ, Lewry E, Pennock CA. Measurement of sialic acid in serum and urine : clinical applications and limitations. *Ann Clin Biochem* 1992; 29, 265-237.
10. Jourdian GW, Dean LD, Roseman S. The sialic acids (XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides). *J Biol Chem* 1971; 246, 430-435.
11. Crook M. The determination of plasma a serum sialic acid. *Clin Biochem* 1993; 26, 31-38.

Legend to the Figure

Figure 1. The correlation curve between a developed periodate-resorcinol microassay and Ehrlich method for TSA. The same sample was divided to two separated aliquot and subjected to both method for TSA as described in materials and methods section above.

Figure 2. Demonstration of the bar-graph of the quantity of total sialic acid (TSA) of both normal healthy and cancer human serum samples by periodate-resorcinol microassay (p value less than 0.0001).

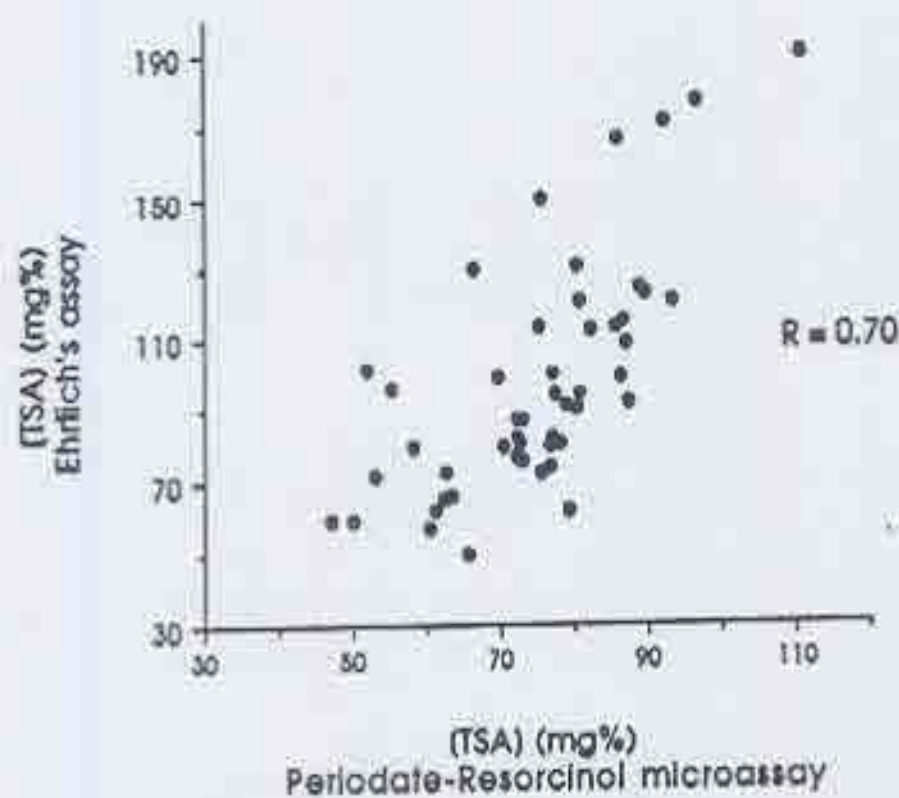


Figure 1

Prachya KONGTAWELERT

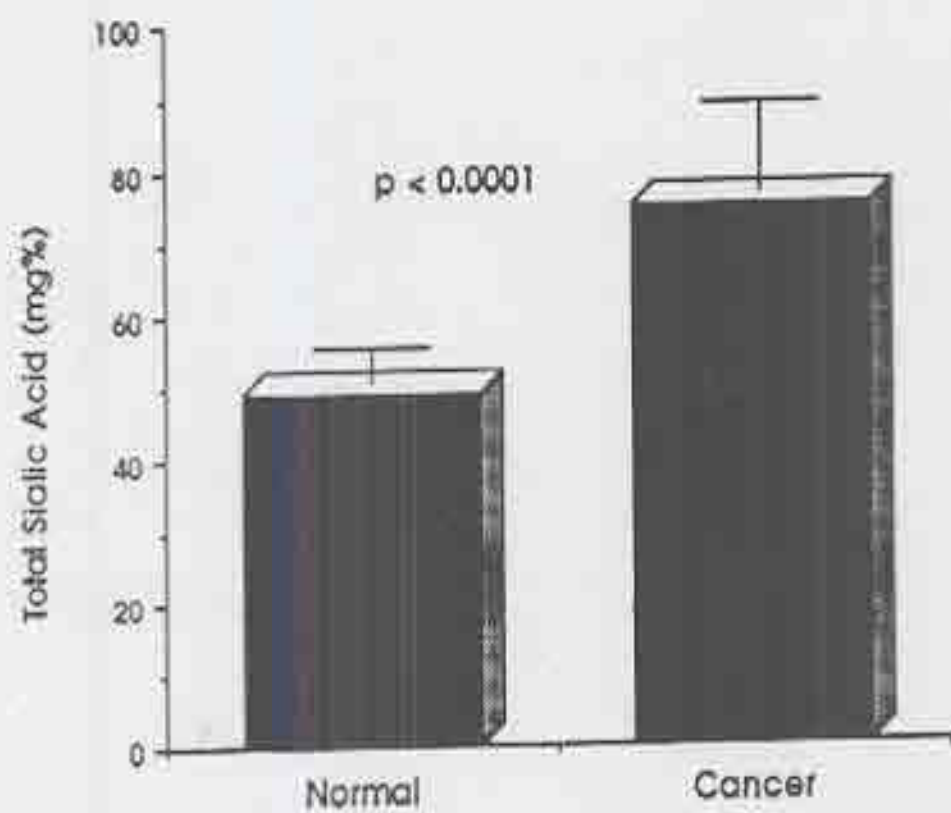


Figure 2

Prachya KONGTAWELERT

เอกสารประกอบหน่วยที่ 2

๙๙

๑๐

Isolation and characterization of sialic acid specific lectin from Thai marine crab (*Scylla serrata*) and its application for the determination of sialoglycoconjugates in human serum.

By

Prachya Kongtawelert

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

THAILAND

Correspondence to : P. Kongtawelert, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200 Thailand. TEL : 66-53-894188; FAX : 66-53-894188, 217144

email : pkongtaw@suandok01.medicine.cmu.ac.th

Abbreviations : NANA, N-acetyl-neuraminic acid; BSM, bovine submaxillary mucin; CEA, carcinoembryonic antigen; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay

ABSTRACT

A lectin from Thai marine crab (*Scylla serrata*) hemolymph has been isolated by affinity column chromatography and preparative electrophoresis. Ten amino acid residues from N-terminal has been deduced and its reactivities has been studied by using biotin labeling technique. A method for the determination of sialoglycoconjugates in human serum is described using this lectin. The principle is based on the reaction between the sialoglycoconjugates and biotinylated lectin. The bovine submaxillary mucin (BSM) is immobilized on polystyrene microplate. The unknown sample or sialoglycoconjugates (BSM equivalent) standards together with excess biotinylated purified lectin (B-lectin) are then added. The B-lectin that binds to the immobilized BSM is then incubated with the peroxidase conjugated monoclonal anti-biotin antibody, and the color developed after the addition of enzyme substrate is determined by light absorption using a microplate reader. The assay is not only convenient and reliable but also capable of measuring sialoglycoconjugates in solution at the submicrogram level. The assay was used in determining the sialoglycoconjugates in human serum from normal subjects and carcinoembryonic antigen (CEA) positive samples.

Keywords: Lectin, Sialic acid, NANA, *Scylla serrata*, Biotin, ELISA, sialoglycoconjugates.

INTRODUCTION

Lectin is a group of protein that often demonstrate high binding specificity to oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids. They have proven invaluable in the study of glycoproteins of cell surfaces as well as the modifications they undergo during cell differentiation and malignant transformation. Many diverse biological functions are associated with the presence of sialoglycoconjugates at or near the cell surface in mammals. It has been shown, for example, that the metastasis of malignant cells may be a direct function of an excessive release by the malignant cells, or by other cells, of sialoglycoconjugates into circulation (Buck *et al.*, 1979; Dawson *et al.*, 1978; Gaffar *et al.*, 1979; Moss *et al.*, 1979). The comparison of serum levels of carcinoembryonic antigen (CEA) with total sialic acid/total protein (TSA/TP) ration and phosphohexose isomerase (PHI) has been studied in untreated lung cancer patients. It was found that all the biomarkers were significantly elevated ($p < 0.001$) in untreated lung cancer patients as compared to the controls and the results indicated that TSA/TP and PHI are superior tumor markers than CEA for lung cancer patients (Patel *et al.*, 1995). Lipid bound sialic acid (LSA) has been used as a marker cancer which has been showed a statistically significant different between patients with chronic non-tumor diseases and healthy individuals ($p < 0.001$) and also between cancer patients and healthy individuals ($p > 0.001$), but not between cancer patients and patients with chronic non-tumor diseases ($p > 0.05$) (Lopez-Saez *et al.*, 1995). Pinitglang (1989) has isolated and purified the lectin specific to sialic acid and used it for testing the sialic acid level in serum by hemagglutination inhibition technique. It was found that the purified lectin from *Scylla serrata* could be used to distinguish the amount of glycoproteins which are components of serum and cell membrane between cancer and normal cells. The present paper is a study of an isolation, purification,

and characterization of this kind of lectin and its uses for developing a method for quantitation of sialoglycoconjugates by employing the enzyme linked anti-biotinylated lectin assay which has been tested in human serum from both normal subjects and carcinoembryonic antigen positive serum.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Purification of lectin from hemolymph of Thai marine crab (*Scylla serrata*).

The method of isolation and purification of lectin from hemolymph was modified from Pinitglang (1989). Hemolymph from Thai marine crabs (*Scylla serrata*) was collected from their aspiration hearts and allowed to clot at 37°C, then centrifuged at 10,000 g for 15-30 min at room temperature in order to remove clots and cell debris. The supernatant was aliquoted and kept at -20°C until used. The hemolymph was applied to an affinity column of BSM-Sepharose 4B (1 x 15 cm) which has been equilibrated with the 0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.5 containing 0.1M NaCl and 0.01M CaCl₂. The column was allowed overnight at 4°C and then washed with the same buffer until the absorbance at 280nm was less than 0.02. The column was then eluted with 0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.5, 1.0M NaCl and 0.01M CaCl₂. The lectin was finally eluted with 0.05M Tris-HCl buffer, pH 3.0 containing 1.0M NaCl and 0.025M EDTA. All the fractions were monitored for absorbance at 280nm and hemagglutination activity. The fractions containing protein and hemagglutination activity were pooled and dialyzed against distilled water and then lyophilized as a powder. The isolated lectin was further purified by mini-preparative polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad) using gradient (8-12%) native gel electrophoresis using the method according to the manual of the manufacturer. The fractions containing protein and hemagglutination activity were collected and tested the purity by PAGE. The positive band has been transferred to the PVDF membrane

and out for amino acid deduction and sequencing using automated peptide sequencer.

Biotinylation of purified lectin

Biotinylation of purified lectin was done by a standard method. Briefly, purified lectin powder from affinity chromatography which had been prepared as above was dissolved in 0.1M sodium hydrogen carbonate buffer pH 8.5 and mixed 3:1 (w/w) with N-hydroxysuccinimidobiotin (34.1mg/ml in dimethylsulfoxide) at room temperature for 1-2 hours. The mixture was dialyzed against PBS. Then aliquoted and stored at -20°C as a stock solution of biotinylated lectin (B-lectin).

Human serum samples.

The serum samples were prepared from venous blood. The subjects were healthy hospitalised and non hospitalised individuals aged between 18-47 years. The blood samples were collected and allowed to clot and then centrifuged at 3,500 rpm for 10 minutes, and serum samples were separated.

The enzyme linked anti-biotinylated lectin assay for quantitation of sialoglycoconjugates.

The polystyrene microtiter plate was added with 100µl/well of 100µg/ml of PSM in PBS, pH 7.4 to all wells except blank wells and incubated overnight at 4°C. The plate was flicked out and air-dried with warm air. The 150µl/well of 1%BSA in PBS, pH 7.4 was added to everywell and incubated at 37°C for 90 minutes, then washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (washing buffer) (150µl/well). The inhibition mixture which containing variation amount of BSM in 6%BSA or serum samples and optimal dilution of B-lectin which has been incubated overnight at 4°C and 3 hours at 37°C was added to the well. After incubation at 37°C

for 90 minutes, the solution was flicked out and washed three times with washing buffer, then 100 μ l/well of peroxidase conjugated anti-biotin antibody (dilution 1:2000-1:4000 in PBS, pH 7.4) was added and incubated for 90 minutes at 37°C. The plate was washed three times with washing buffer and enzyme substrate (O-phenylenediamine with H₂O₂) was added 100 μ l/well and the color was allowed to developed at room temperature in the dark for 5-10 minutes. The reaction was stopped with 25 μ l/well of 4M H₂SO₄ and the absorbance was read with microtiter plate reader. The concentration of BSM was plotted against absorbance of standard or samples and the samples' absorbance was read for the concentration of sialoglycoconjugates standard curve.

RESULTS

The isolation and purification of lectin from Thai marine crabs (*Scylla serrata*)

The lectin from hemolymph of Thai marine crabs was successfully purified by using affinity column chromatography which used BSM-Sepharose as solid support as shown in Figure 1. It was found that the bound peak which has been eluted by acidic buffer without CaCl_2 containing the hemagglutination activity. It was pooled and then lyophilized as a powder for further step of purification using mini-preparative electrophoresis or biotinylation. It was showed a molecular weight about 70 kDa on PAGE by silver staining (Figure 2).

The characteristics of the purified lectin.

The purified lectin from mini-preparative electrophoresis was transferred by electroblotting to PVDF membrane (Figure 2), then the positive band was cut and sent to the BioScience Service, Birmingham, UK for analysis of amino acid composition and N-terminal sequence as shown in Table 1 and Table 2

Biotinylated form of lectin was used for characterization by competitive technique using enzyme linked anti-biotinylated lectin assay. Figure 3 showed typical inhibition curves against various inhibitors. It was found that this purified lectin demonstrated strong binding just only bovine submaxillary mucin (BSM) and colominic acid. Neuraminidase was used to digest immobilized BSM on microplate and then probed with B-lectin and enzyme conjugated anti-biotin antibody for this confirmation of specific activity as shown in Figure 4.

The determination of optimal conditions for the standard method for quantitation of sialoglycoconjugates in human serum samples.

It was found that the optimal dilution of the above biotinylation technique was 1:50 to 1:100 and enzyme conjugated anti-biotin antibody was 1:1000-1:2000 dilution.

When the above conditions were used to evaluate the precision of the absorbance obtained from the assay, it was found that the coefficient of variation of well to well and different plates were 12.85% and 9.46%, respectively.

The quantitation of sialoglycoconjugates in normal human serum samples and cancer serum samples.

The developed enzyme linked anti-biotinylated lectin assay was used to determine the quantity of sialoglycoconjugates in both normal and pathological human serum samples. It was found that the amount of sialoglycoconjugates in normal human serum samples ($N = 471$) was which a significant difference ($p < 0.0001$) from the pathological (cancers) ones ($N = 35$) which was as shown in Figure 6.

DISCUSSION

The purified lectin from the Thai marine crab has showed its size differ from a previous study (Pinitglang, 1989) which showed the size of 100 kDa. It was found that it showed reactivities against sialoglycoconjugates such as BSM and colominic acid. The fetuin which is another sialoglycoconjugates found in fetal serum show a strong reactivity with this lectin (data not showed). Colominic acid is a polymer of N-acetyl neuraminic acid found in bacteria showed inhibitory activity as we expected. On the other hand, free N-acetyl neuraminic acid showed no reactivity against this lectin. Furthermore, other polyanion substances such as heparin, dextran sulphate, proteoglycans, chondroitin sulphate, keratan sulphate, and pentosan polysulphate have showed no reactivity. It has been suggested that this lectin is specific to a

sialoglycoconjugates although the sialoglycolipid has not been tested in this study which need to be investigated including the linkage specificity of sialic acid to other sugars.

The newly developed method described here can be used for quantitation of sialoglycoconjugates in human serum. The cancer serum samples were selected from tumor marker laboratory in our department which has performed the detection of CEA. They were subjected to be parallel quantify for sialoglycoconjugates by developed assay with normal healthy serum. It was found that there were significantly difference in both groups (Figure 6).

ACKNOWLEDGEMENT

P. Kongtawelert is a TRF Research Scholar and this work is supported by The Thailand Research Fund (TRF) (contract no. RSA/24/2537). Associate Professor Maitree Suttajit provided valuable technical advice and Peter Lange helped in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- Buck et al., Sialoglycoprotein differences between xenotransplantable and nonxenotransplantable ascites sublines of the 13762 rat mammary adenocarcinoma. *Arch Biochem and Biophys.*, 198: 12-21, 1979.
- Dawson et al., Variations in sialomucins in the mucosa of the large intestine in malignancy: a quantitative and statistical analysis. *Biochem Journal*, 10: 559, 1978.
- Gaffar et al., Further studies on an human lung tumor-associated antigen. *J Biol Chem.*, 254: 2097-2120, 1979.
- Lopez-Saez, J.J., and Senra-Varela, A. Evaluation of lipid-bound sialic acid (LSA) as a tumor marker. *Int J Biol Markers*, 10(3): 174-9, 1995.
- Moss et al., Significance of protein-bound neuraminic acid levels in patients with and bladder carcinoma. *Urology*, 13: 182, 1979.
- Patel, P.S., Raval, G.N., Rawal, R.M., Patel, G.H., Balar, D.B., Shah, P.M., and Patel, D.D. Comparison between serum levels of carcinoembryonic antigen, sialic acid and phosphohexose isomerase in lung cancer. *Neoplasia*, 42(5): 271-4, 1995.
- Pinitglang, S. Biochemical study of lectin from marine crabs. M. Sc. Thesis, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 1989.

Table 1 Demonstration of the concentration of amino acid composition of the purified lectin obtained from the affinity chromatography, mini-preparative PAGE and electro-blotting onto PVDF membrane.

Amino acid	Concentration (n.mole/sample)*
Asp	18
Thr	7.8
Ser	11
Glu	14
Pro	6.4
Gly	13
Ala	9.0
Val	9.0
Met	2.5
Ile	5.2
Leu	11
Tyr	5.1
Phe	8.3
His	9.1
Lys	5.0
Arg	6.4
Cys	-

*Note about amino acid analysis:- Asn and Gln are completely converted to Asp and Glu during the acid hydrolysis of the protein. The value for Thr and Ser have been corrected for hydrolysis losses of 5% and 10% respectively. Trp usually suffers complete loss during acid hydrolysis and is not normally quantified. In proteins, Cys is usually observed as cystine. The recovery of Cys is variable when using standard hydrolysis conditions. Values are reported to two significant figures.

Table 2 Demonstration of the N-terminal amino acid sequence of the purified lectin obtained from the affinity chromatography, mini-preparative PAGE and electro-blotting onto PVDF membrane.

Residue	Amino acid
1	Asp
2	Ser
3	Pro
4	Gly
5	His
6	Ala
7	Ser
8	Asp
9	Ala
10	Gln

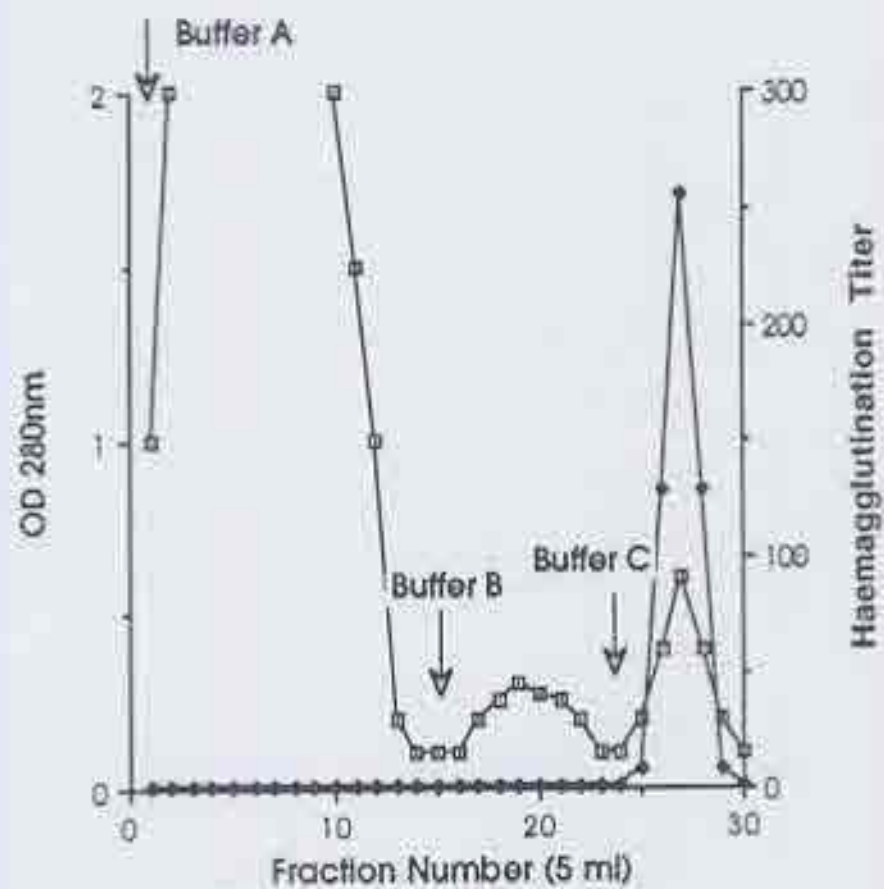


Figure 1
Prachya KONGTAWELERT

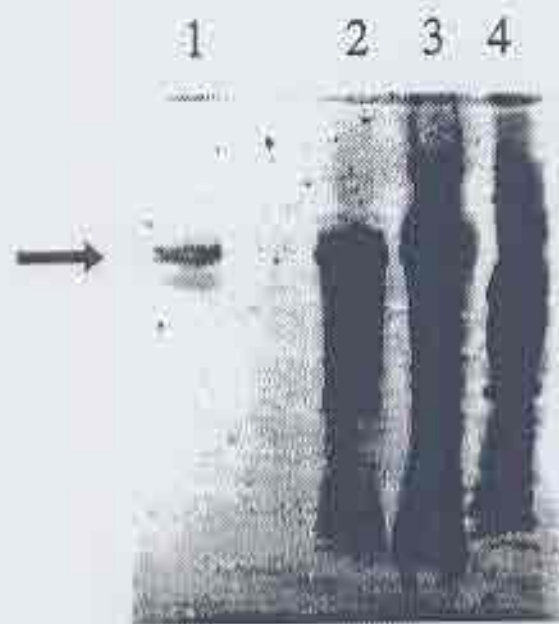


Figure 2 Electrophoretic pattern by silver staining on PAGE (8-25%) of

1. mini-preparative purified sample
2. affinity purified sample
3. hemolymph from *Scylla serrata*
4. low MW marker.

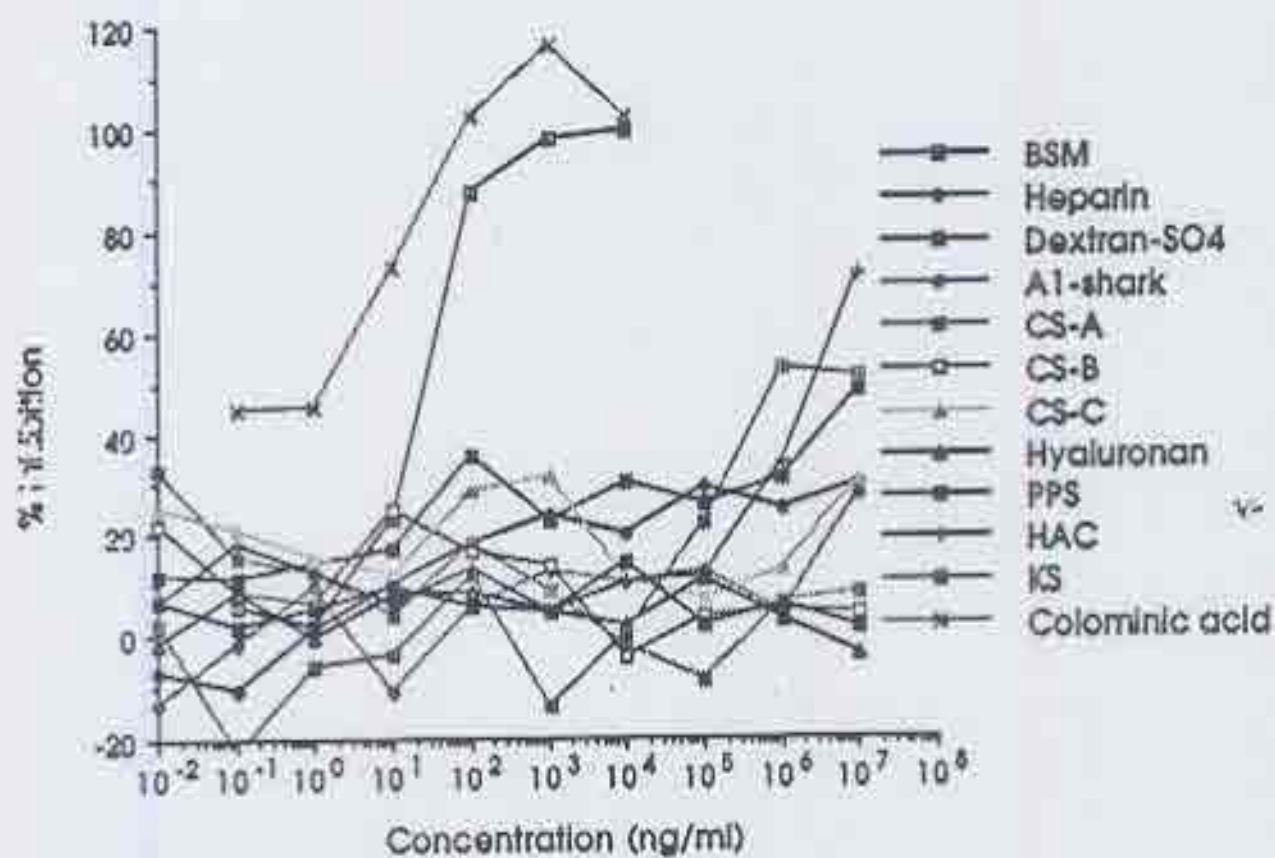


Figure 3
Prachya KONGTAWELERT

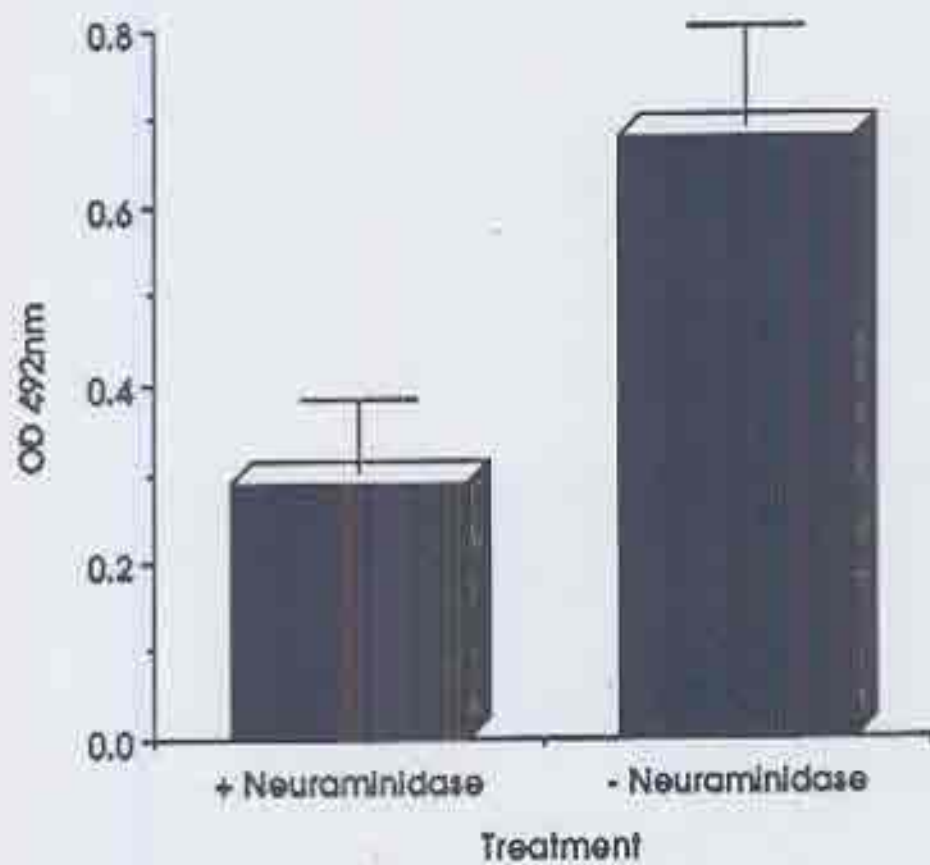


Figure 4
Prachya KONGTAWELERT

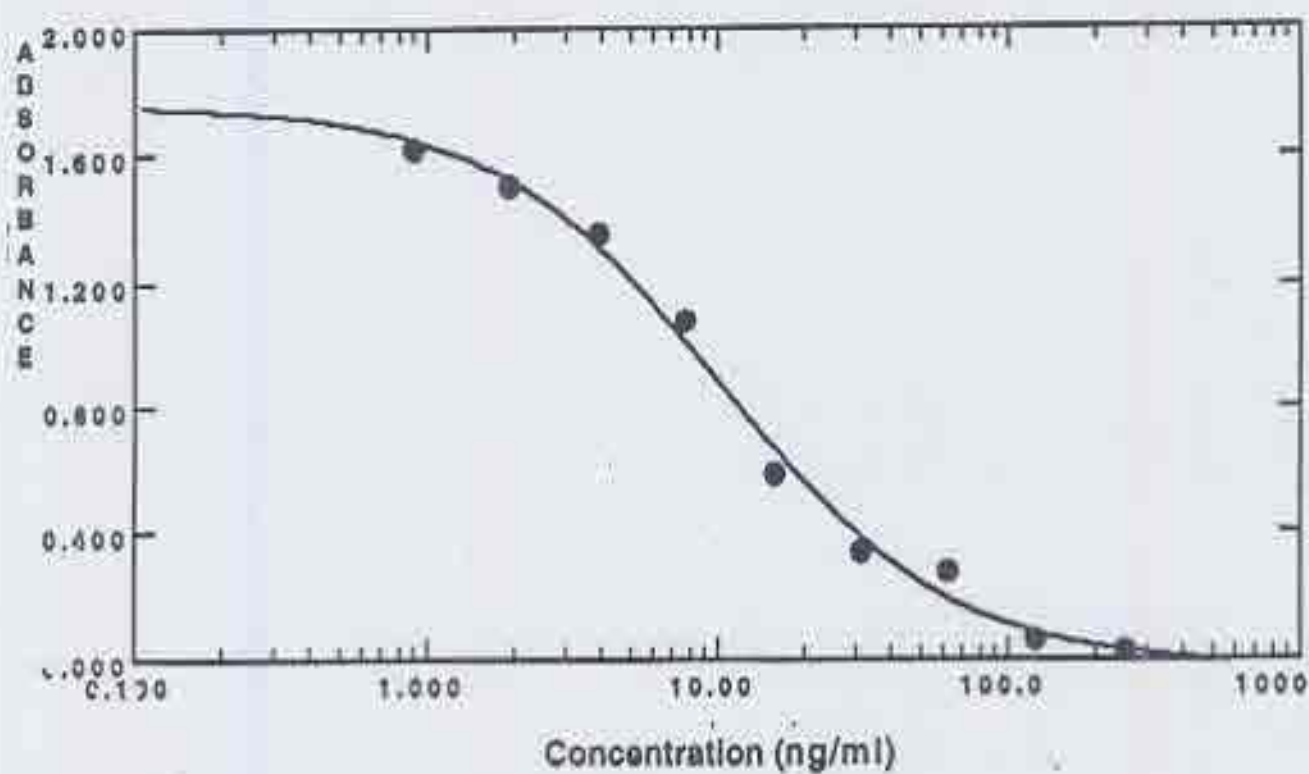


Figure 5

Prachya KONGTAWELERT

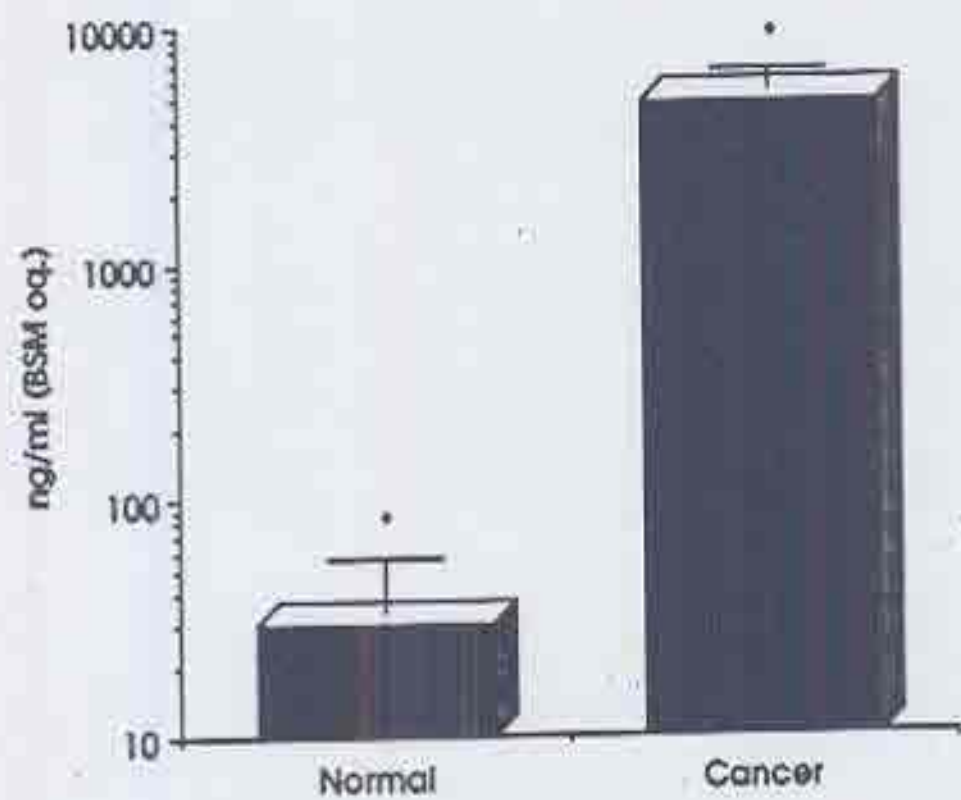


Figure 6

Prachya KONGTAWELERT

**A Method for the Determination of Heparin and Heparin like
Substances in Human Plasma Using a Monoclonal Antibody**

By

Prachya Kongtawelert* and Panja Kulapongs**

***Department of Biochemistry, and **Department of Pediatrics,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200
THAILAND**

**Correspondence to : P. Kongtawelert, Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200,
THAILAND**

TEL : 66-53-894188, 945322; FAX : 66-53-894188, 217144

email : pkongtaw@suandok01.medicine.cmu.ac.th

Abstract

A characterization of a monoclonal antibody to polysulphated polysaccharides and a method for the determination of heparin and heparin like substances in human plasma are described. The antibody shows specific reactivity against heparin and semisynthetic heparin like substances such as dextran sulphate, pentosan polysulphate, and glycosaminoglycan polysulphate. The principle of the method is based on the reaction between the heparin and a biotin-labelled monoclonal antibody against polysulphated polysaccharides. Protamine sulphate complex is immobilized on an activated polyvinyl chloride microplate. The unknown samples containing heparin and heparin like substances or standards are added in the presence of excess biotinylated monoclonal antibody (B-Mab). The B-Mab that binds to the immobilized antigen is then incubated with enzyme conjugated streptavidin, after the addition of enzyme substrate absorbance is measured using a microplate reader. The assay is convenient, compatible with the accepted method and suitable for the laboratory equipped with the ELISA instruments and is also capable of measuring heparin and heparin like substances in solution at the submicrogram or milliunit (mU) level which could be applied for the kinetic studies for such substances. The assay was used in determining

the heparin in human plasma from normal subjects and thelaseemia patients with and without epitaxis.

Abbreviations

DS	dextran sulphate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay
LAB	labeled avidin biotin
MAb	monoclonal antibody
POPS	polyolpolysulphate
PPS	pentosan polysulphate
T-gel	Thiophilic-gel

INTRODUCTION

Heparin is an alternating copolymer of a uronic acid and an amino sugar, and its structure is commonly represented by its prevalent disaccharide sequences of α -1,4-linked L-iduronic acid 2-sulphate \rightarrow D-glucosamine N,6-disulphate (IduA-2S \rightarrow GlcNSO₃-6S) (1). The anticoagulant effect of heparin is to a large extent a direct consequence of its catalytic action of thrombin inhibition by antithrombin III. Most of sensitive techniques for heparin assay are based on either on its overall anticoagulant activity (2) or on more specific properties such as the inactivation of thrombin (3) or Factor Xa (4,5). The competitive binding assay for heparin and other therapeutic sulphated polysaccharides in plasma, serum and urine was reported by Dawes and coworkers (6) using radioactive heparin competed with sample for binding to polybene-solid phase.

We describe the characterization of a monoclonal antibody against protamine sulphate, heparin and heparin like substances. In addition, we have developed a method for determining of heparin and heparin like substances by testing this antibody tested in human plasma from both normal subjects and thalassemia subjects to evaluate the possible causes of patient with abnormal bleeding.

MATERIALS AND METHODS

Immunization in Balb/c mice and hybridoma development

Female Balb/c mice aged 6-8 weeks were immunized with a complex made from protamine sulphate and polyolpolysulphate from Luitpold-Werk, Munich, Germany (POPS) in a ration of 1:3 by weight. Each mouse was given 500 μ l of antigen complex solution mixed with 500 μ l of complete Freund's adjuvant, injected subcutaneously. After 14 days, the same complex mixed in the incomplete Freund's adjuvant was injected intraperitoneally into all mice (500 μ l each). They were then injected intraperitoneal with the antigen complex in an incomplete Freund's adjuvant, on day 35 and receive 100 μ l of antigen complex without adjuvant on day 56. On day 59 their spleenocytes were fused with the myeloma cell line (X63 Ag 8.653) using polyethylene glycol as fusing agent. Tissue culture media from individual hybridoma cell lines were screened against POPS and protamine sulphate complex by using an ELISA technique. Positive wells were cloned as monoclonal by limiting dilution technique, expanded in bulked cell-culture and grown in serum-free media for production of monoclonal antibody.

Purification of monoclonal antibody from serum-free medium

Monoclonal antibody (Mab) was purified by thiophilic adsorption (T-gel) column chromatography as described elsewhere (7, 8). Briefly, hybridomas were separated from tissue culture serum-free media by centrifugation. Potassium sulphate was added to the media to a final concentration of 0.5M which before applied to a T-gel column (a gift from Dr Jan Carlsson, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with washing buffer (50mM phosphate and 0.5M potassium sulphate, pH 8.0). After samples were applied to the column, unbound protein was eluted from column with washing buffer. The monoclonal antibody which bound to the column was eluted by buffer (50mM phosphate buffer, pH 8.0). Fractions were pooled, dialyzed against double distilled water and lyophilized to provide purified Mab for testing.

Biotinylation of monoclonal antibody

Biotinylation of Mab was done by a standard method. Briefly, Mab which had been prepared as described above, was dissolved in 0.1 sodium hydrogen carbonate buffer pH 8.5 and mixed 3:1 (w/w) with N-hydroxysuccinimidobiotin (Sigma, St. Louis, MO, USA) (34.1 mg/ml in DMSO) at room temperature for 1-2 hours. The mixture was applied to a Sephadex G-25 column and eluted with PBS, pH 7.4. The excluded

protein peak was collected, aliquoted and store at -20°C as a stock solution of biotinylated monoclonal antibody (B-Mab).

Enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay (ELISIA) for characterization of monoclonal antibody obtained using the labeled avidin-biotin (LAB) technique.

Characterization of the Mab obtained from the hybridoma was performed by using an ELISIA-LAB technique. Various concentrations of the preparations of DS, xylan, heparin, heparan sulphate, keratan sulphate, dermatan sulphate, hyaluronan, chondroitin sulphates (-4- and -6-sulphate and -4,6-disulphate), or calf thymus DNA in 6% BSA-PBS were incubated with appropriate dilutions of B-Mab in PBS-Tween 20 (0.05% v/v) at room temperature for at least 1 hour. The reaction mixtures were applied to plates in which the protamine sulphate-POPS was bound and BSA-blocked, the level of B-Mab which bound to the wells was determined by the addition of peroxidase conjugated streptavidin (Amersham, UK; 1:1000 in PBS) followed by peroxidase substrate and the absorbance at 492/690nm was determined by microplate reader. For this assay, triplicate results were averaged and the percentage inhibition was calculated from the means. Inhibition curves were constructed from these data using log/linear co-ordinates.

Human plasma samples

The plasma samples were prepared from venous blood using 3.8% trisodium citrate in normal saline solution as anticoagulant (at 10% v/v). The subjects were healthy and non-hospitalised individuals aged between 18-47 years who no abnormal bleeding. The thalassemia patients with repeated episodes of epistaxis and without abnormal bleeding were selected from OPD # 29, Maharaj Nakorn Chiangmai Hospital. All of the subjects were in accordance with the current revision of the Helsinki Declaration of 1975. The blood samples were centrifuged at 3,5000 rpm for 10 minutes, and plasma samples were separated. An equal volume of pronase solution (1mg/ml) was added to each plasma samples and then incubated at 37°C overnight (more than 12 hours). The digested samples were boiled for 3 minutes and centrifuged as described above, and the resulting supernatant fluids were collected as pretreated samples for further assay.

The quantitation of heparin in human plasma samples by HEPTEST®

The HEPTEST® kit was purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. The assay procedure consists of incubating an undiluted test plasma sample with an equal volume of Factor Xa for 120 seconds at 37°C, thereafter this reaction mixture is

recalcified by the addition of RECALMIX[®]. The time required for the plasma mixture to clot is converted to heparin units/ml using a standard calibration curve. This assay kit for heparin is used to quantitate the amount of heparin in the plasma sample, and compare with the amount from the method as described above.

RESULTS

The production of a monoclonal antibody

Several hybridomas were obtained from the fusion of spleen cells and myeloma using polyethylene glycol as fusing agent. Hybridomas from the highest titer of ELISA-positive wells were expanded and cloned by the limiting dilution technique. Some of them showed a strong reactivity with pure protamine sulphate, others showed a stronger reactivity with the complex between protamine sulphate and POPS or heparin. One of the later clones was selected to produce monoclonal antibody for further evaluation. The supernatants were successfully characterized by sub-typing of the immunoglobulins by specific antibodies and the immunoblotting technique. It was found that this clone produces IgM immunoglobulins and κ -light chains.

The characteristics of the monoclonal antibody

The monoclonal antibody was successfully purified by using T-gel column chromatography. Biotinylated form was used for characterization of the antibody by ELISIA-LAB technique. Figure 1 shows typical inhibition curves against various inhibitors. It was found that this antibody demonstrated strong binding to polyolpolysulphate and heparin but interacted relatively weakly with heparan sulphate. Heparinase was used to digested heparin for this confirmation (Figure 2)

and shows no cross-reaction with naturally occurring sulphated polysaccharides such as human keratan sulphate, bovine nasal cartilage proteoglycan, and DNA (Figure 3). However, it showed a strongly reaction against naturally occurring polysulphated polysaccharides such as chondroitin sulphate E, fucoidan, and carrageenan type IV as shown in Table 1 as a concentration at 50% inhibition (IC_{50}). Furthermore, it reacts with semi synthetic polysulphated polysaccharides like pentosan polysulphate, dextran sulphate, and glycosaminoglycan polysulphate but does not react with their precursors.

The determination of optimal conditions for the standard method for quantitation of heparin and heparin like substances in plasma samples.

The optimal concentration and dilution of B-MAb were determined by performing the titration chequerboard of various concentration of antigen and dilutions of B-MAb. It was found that the optimal of antigen complex for coating plate is $100\mu\text{g/ml}$ and dilution of 1:2000 in for B-MAb was used in a competitive inhibition mixture.

When the above conditions were used to evaluate the precision of the absorbance obtained from the assay, it was found that the coefficient of variation of well to well and the average absorbance from three wells were 12.85% and 9.46%, respectively.

The above conditions were used as the standard method for quantitation of heparin in human plasma samples. Normal human plasma samples were used for the evaluation of precision as intra- and inter-assay. It was found that the coefficient of variation are 3.60% and 13.67%, respectively. Accuracy was determined by spiking a known amount of porcine heparin ranged between 20-10,000ng/ml which has been diluted in 1% BSA to the pooled human plasma samples. The true values were determined by using a standard method as described above and recovery was $138.86 \pm 16.51\%$.

The quantitation of heparin in normal human plasma samples.

A typical standard curves for quantitation of heparin plasma is shown in Figure 4. The plasma samples were obtained from normal healthy volunteers aged 18-47 years without history of bleeding problem. It was found that the normal value ranged from $4.54\mu\text{g/ml}$ to $9.16\mu\text{g/ml}$ (mean \pm S.D. = $6.50 \pm 1.56\mu\text{g/ml}$).

The comparison of the developed method and HEPTEST®

Two methods have been used to quantitate heparin in a parallel manner using the same human plasma samples at various quantities of added heparin. And the results from both assays were compared as correlation scatter graph. It was found that both methods shown the correlation coefficient of 0.97 as in Figure 5.

The quantitation of heparin in the Thalassemia patients.

Fifty two plasma samples from thalassemia patients with and without history of abnormal bleeding were subjected to determined heparin by the same method. The degree of abnormal bleeding is based on the frequency of repeated epistaxis, ranging from 0 (no epistaxis) to +4 (epistaxis occurs every 1-2 weeks). There was no significantly difference and correlation in the plasma heparin levels between normal individual ($6.50 \pm 1.56 \mu\text{g/ml}$) and thalassemia patients with and without epistaxis ($6.18 \pm 1.92 \mu\text{g/ml}$; $p > 0.05$) as shown in Figure 6.

DISCUSSION

The monoclonal antibody has shown its reactivities against both natural occurring and semisynthetic polysulphated polysaccharides like fucoidan, carraggeenan (both found in sea algae), chondroitin sulphate E (found in squid cartilage and the granule of mast cells), pentosan polysulphate (from sulphatation of xylan), dextran sulphate (from sulphatation of dextran), and glycosaminoglycan polysulphate (from oversulphatation of chondroitin sulphate). This antibody did not react with xylan, a precursor of pentosan polysulphate, or with dextran, a precursor of dextran sulphate, or various types of chondroitin sulphate which are precursors of glycosaminoglycan polysulphate. The only naturally occurring polysulphate polysaccharides in plasma are heparin and heparan sulphate which the latter shows less sulphatation. However, heparan sulphate was weakly recognized by this antibody which its level could not affect this method. The enzyme which digested heparin was used to confirm its specific activity as shown in Figure 2.

The newly developed method described here can be used for quantitation of heparin in human plasma. In the separated experiments, it was found that there is no significant difference in plasma samples from EDTA or citrate blood. Since EDTA is used as a routine anticoagulant in hematological laboratory evaluation, it would more convenient to add

heparin quantitation to many hematological tests. The most appropriate amount of EDTA for sample preparation needs further investigation due to its possible effect on enzyme digestion. The quantitation was set up for plasma samples because heparin binds to some coagulation factors such as fibrinogen or even fibrin and they could be incorporated into the blood clot. The blood coagulation is a process that cause the releasing of some biological substances such as thrombospondin from platelets which make serum containing this substance more than plasma nearly 200 times more coagulable. Thrombospondin has binding site for heparin and could affect the assay.

The plasma samples must be digested with broad spectrum proteolytic enzymes like pronase since proteins in serum or plasma could bind to protamine sulphate complex used for coating plate in this method. The enzyme is not only can remove the non-specific binding proteins but also degraded the protein core which covalently bind to heparin. The contamination of heparinase in this pronase was confirmed from the studies of the percentage of recovery. If there was a contamination of heparinase in pronase, it should deplete the amount of heparin that has been added to the samples in those studies. A high percentage of recovery could be due to the contamination of heparin in bovine serum albumin. Most of the high percentage of recovery was in

the range of submicrogram level which could not affect much in the level in plasma samples which contained heparin in the level of microgram level. The protein contents of samples after digestion, boiling, and centrifugation were about 1 g% and this value was used to dilute the heparin in the assay which make the conditions of the standards similar to the sample ones.

The containing heparin in digested samples were confirmed by performing the repeated digestion with heparinase specific for heparin. It was found that it has no inhibition activities against this antibody while the samples without digestion still contain this activity. The levels of normal human plasma heparin substances obtained from our assay are compatible to previous report by extraction and electrophoresis technique (9).

The ability of endothelial cells to synthesize heparan sulphate has been demonstrated (10, 11) and it has been suggested that one might look these same cells as the source of the plasma "heparinoid" constituent. And additional potential source of a circulating heparinoid molecules is the platelet itself. Adhesion-dependent synthesis of heparin by platelets was reported in 1982 (12). Further investigation should be addressed to the difference in sex and age. The comparison of this method and others such as coagulation based assays (activated partial thromboplastin

time:APTT test), HEPTEST[®], synthetic enzyme substrate, competitive binding assay and inactivation of thrombin is of particular interest especially in term of the structure, chemical and function relationship to the immunological activity. The HEPTEST[®] is based on the inhibition of Factor Xa by antithrombin III is accelerated by heparin. Under optimum conditions the amount of Xa activity neutralized during a predetermined time period is directly proportional the concentration of heparin in the reaction mixture. It was found that both developed method and HEPTEST[®] showed the compatibility with the correlation coefficient of 0.97, which confirmed that this method is comparable with the previous one in quantitation of heparin. Furthermore, this method could be used for the kinetic studies of polysulphated polysaccharide drugs (13) which has been used in HIV infection.

There is no significant difference in heparin level between healthy and thalassemia subjects. Furthermore, there was no correlation between the level of heparin in thalassemia patients and the severity of repeated epistaxis (Figure 6). This could lead us to understand and explain the cause of epistaxis in thalassemia patients which may be from the vitamin deficiency or other factors which remain to be investigated.

ACKNOWLEDGEMENT

The investigators wish to thank the Faculty of Medicine for research endowment committee and the Thailand Research Fund (TRF) for financial support. Some parts of this work (the production of monoclonal antibody) has been supported by the Raymond Purves Research Laboratories, Australia; Luitpold-Werk, Munich, Germany; and Pharmacia Diagnostics AB; Kabi-Pharmacia AB, Sweden. We would like to thank Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan for a generous gift of heparinase and heparitinase. A preparation of this manuscript from Peter Lange is also acknowledge.

REFERENCES

1. Casu B. Structure of heparin and heparin fragments. *Ann New York Acad Sci* 1989; 556:1-7.
2. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GEC. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Throm Res* 1976; 9: 575-583.
3. Eika C, Godal HC, Kierulf P. Detection of small amount of heparin by the thrombin clotting time. *Lancet* 1985; ii: 376.
4. Teien AN, Lie M, Abilgaard U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X. *Thromb Res* 1976; 8: 413-416.
5. Yin ET, Wessler S, Butler JV. Plasma heparin: a unique, practical, submicrogram-sensitive assay. *J Lab Clin Med* 1973; 81: 298-310.
6. Dawes J, Prowse CV, Pepper DS. Absorption of heparin LMW heparin and SP54 after subcutaneous injection, assessed by competitive binding assay. *Throm Res* 1986; 44: 683-693.
7. Belew M, Junti N, Larsson A, Porath J. A one-step purification method for monoclonal antibodies based on sal-promoted adsorption chromatography on a 'thiophilic' adsorbent. *J Immunol Methods* 1987; 102: 173-182.

8. Oscarsson S, Porath, J. Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption. *Anal Biochem* 1989; 176: 330-337.
9. Snow AD, Kesilevsky R, Stephens C, Anastassiades T.
Electrophoresis of glycosaminoglycans isolated from normal human plasma. Direct evidence for the presence of heparin-like molecule.
Biomed Biochim Acta 1987; 46(7): 537-546.
10. Ganes G, Fromme HG, Kresse H, Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in cultured endothelial cells and smooth muscle cells from bovine aorta. *Biochim Biophys Acta* 1978; 544: 514-528.
11. Atkins FM, Friedman MM, Metcalfe DD. Biochemical and microscopic evidence for the internalization and degradation of heparin-containing mast cell granules by bovine endothelial cells. *Lab Invest* 1985; 52: 278-286.
12. Vannucchi S, Fibbi G, Pasquali F, del Rosso M, Capelletti R, Chiarug V. Adhesion-dependent heparin production by platelets.
Nature 1982; 296: 352-353.
13. Kongtawelert P, Ghosh P. A monoclonal antibody that recognizes 2,3-, 2,6-, and 4,6-disulphate ester substitution in pyranose-containing polysaccharides. Its production, characterization and application for the quantitation of pentosan polysulphate, dextran sulphate,

glycosaminoglycan polysulphate and chondroitin sulphate E. J

Immunol Methods 1990; 126: 39-49.

Legend to the figures

- Figure 1 An inhibition curve for biotinylated monoclonal antibody and heparin, heparan sulphate and polyolpolysulphate (POPS). The inhibitor were incubated with optimal dilution of antibody and then added to the protamine complex coated plate. The enzyme conjugated streptavidin was used as a probe which demonstrated by enzyme substrate, and absorbance was determined by microtiter plate reader
- Figure 2 An inhibition curve for demonstrating of the effects of heparinase. The samples were subjected to digest with heparinase boiled prior to add to be a sample in the competitive inhibition mixture with biotinylated monoclonal antibody and then added to the coated plate followed by the standard procedure as described in the method section.
- Figure 3 An inhibition curve to demonstrating of the reactivity of biotinylated monoclonal antibody against proteoglycans fragments and calf thymus DNA comparison with standard heparin. The various concentration of individual inhibitor

was incubated with optimal dilution of biotinylated monoclonal antibody, and then added to the coated plate, followed by enzyme conjugated streptavidin and substrate according to the standard ELISA method.

Figure 4 A typical standard inhibition curve obtained for the quantitation of heparin in human plasma using biotinylated monoclonal antibody, as described in the materials and methods.

Figure 5 A correlation curve between developed method (ELISIA-LAB technique) and HEPTEST[®] test for quantitation of heparin in plasma.

Figure 6 A scatter graph of the level of heparin and the degree of repeated epistaxis in thalassemia patients using the developed method.

Legend to the table

Table 1 A table showing the various type of inhibitors and their concentration at 50% inhibition of antibody activity using competitive assay.

Table 1

Inhibitors	IC50 (ng/ml)
POPS	60
Glycosaminoglycan polysulphate	220
Heparin	300
Pentosan polysulphate	300
Dextran sulphate	300
Chondroitin sulphate E (4,6-disulphate)	600
Carrageenan	1000
Fucoidan	1050
Heparan sulphate	1050
Calf thymus DNA	6000

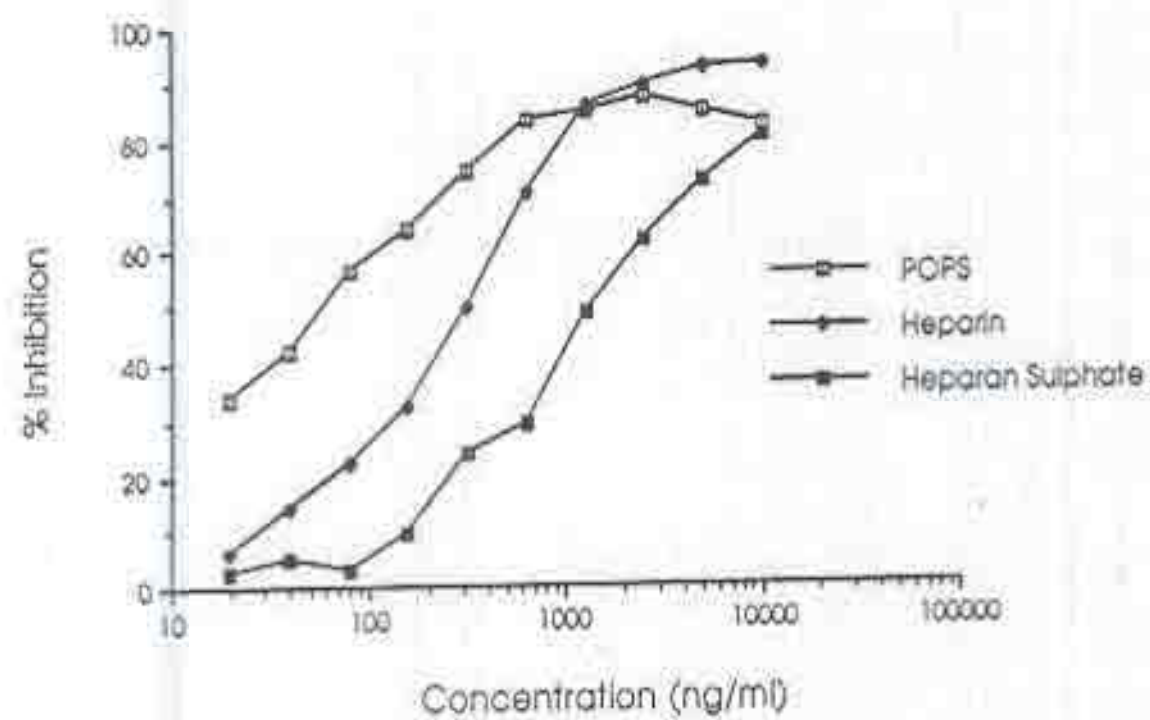


Figure 1

Prachya KONGTAWELERT

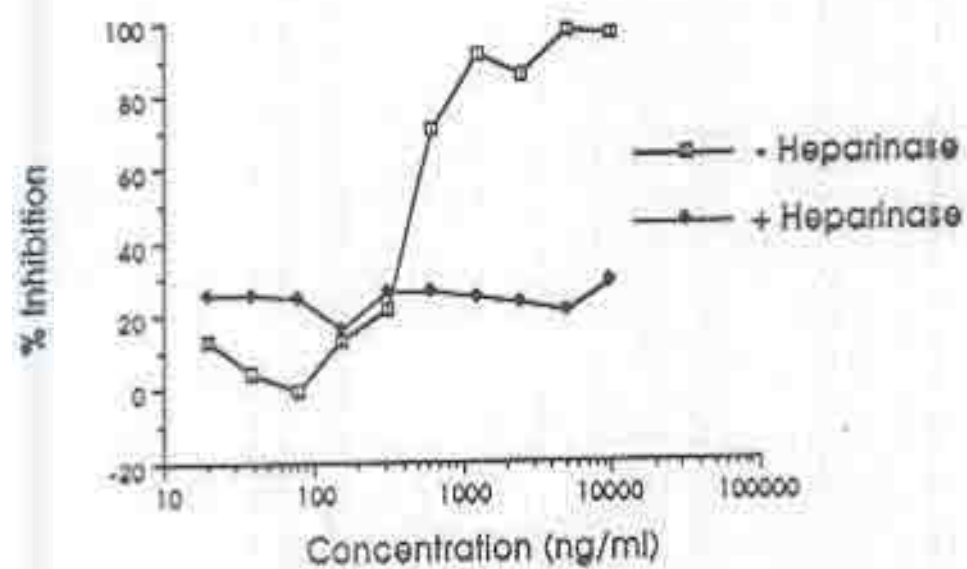


Figure 2

Prachya KONGTAWELERT

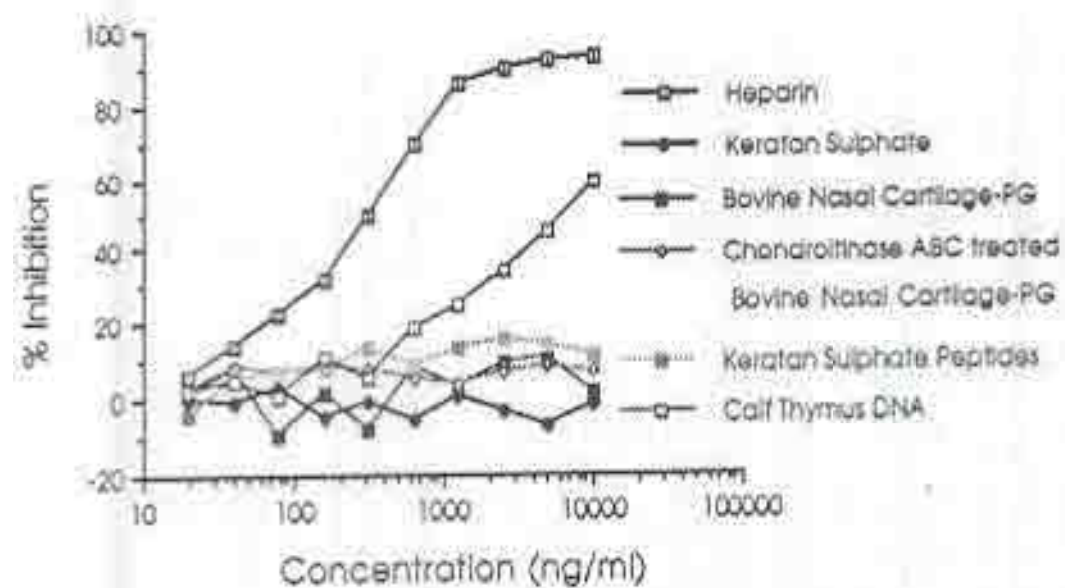


Figure 3

Prachya KONGTAWELERT

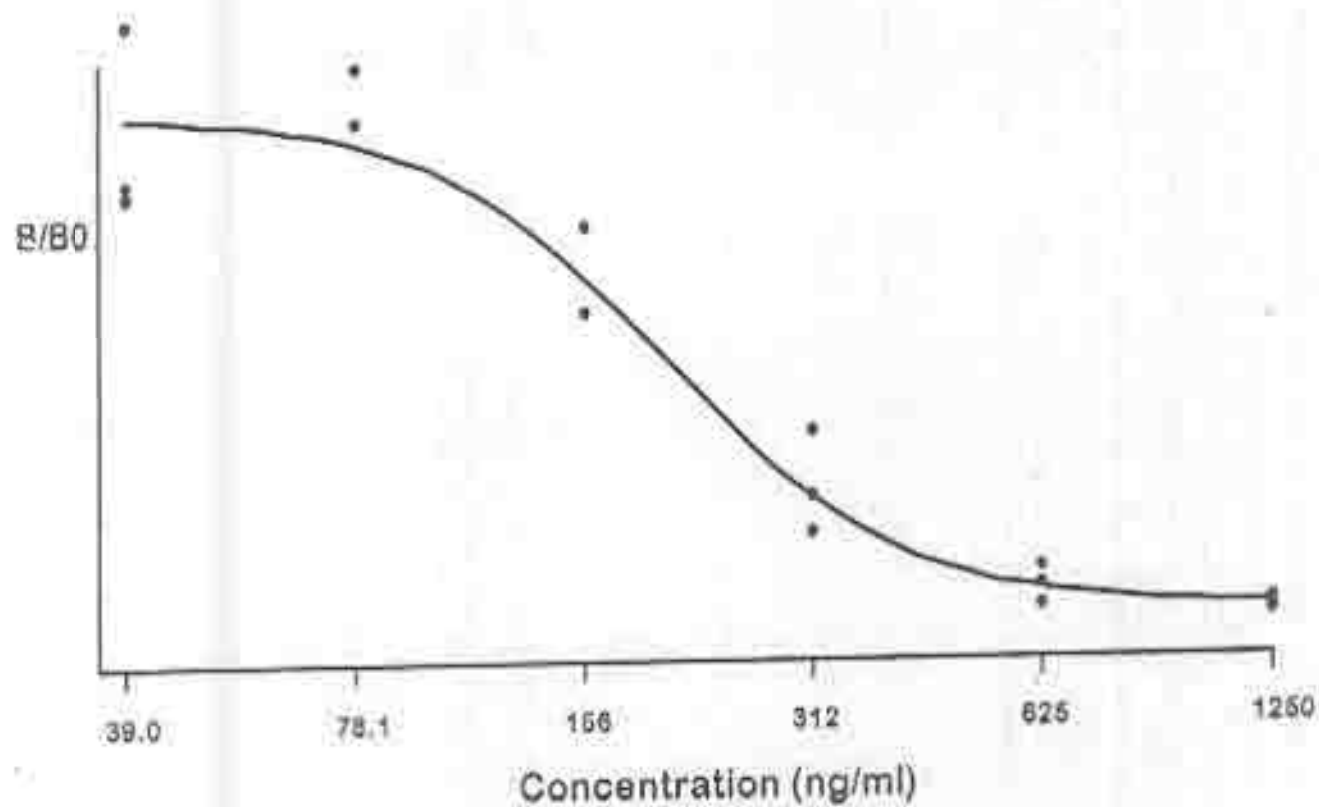


Figure 4

Prachya KONGTAWELERT

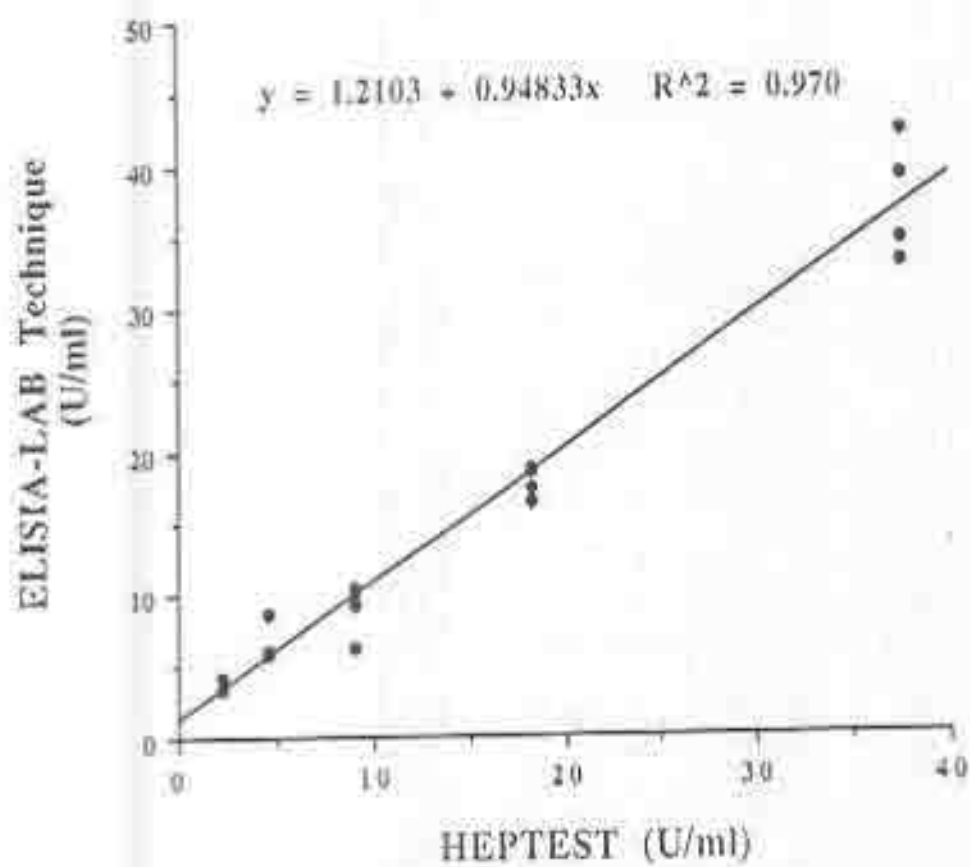


Figure 5

Prachya Kongtawelert

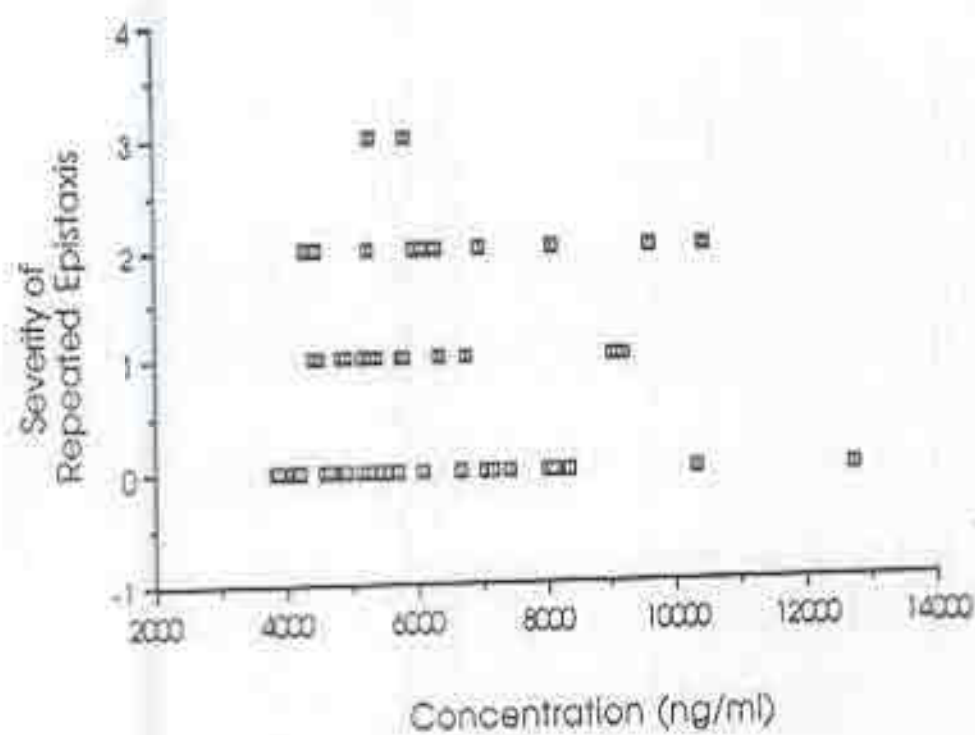


Figure 6

Prachya Kongtawelert

