รหัสโครงการ SUT1-102-53-36-08

รายงานการวิจัย

การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสในคน

Functional and structural characterization of human chitinases

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-53-36-08

รายงานการวิจัย

การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสในคน

Functional and structural characterization of human chitinases

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์
อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
5 สิงหาคม พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยทำการโคลนยีน human chitinase (huAMCase) isoform 1 โดยใช้ human cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR เข้าสู่ pQETri system vector แล้วทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ hAMCase ในระบบ E. coli โดยโปรตีนที่ผลิตได้มีขนาด 50 kDa ที่มีกรดอะมิโนฮีสทิดีนเกาะอยู่หกตัวด้านปลายซี เอนไซม์ที่ผลิตได้อยู่ในรูป inclusion bodies ที่ละลายใน 8M Urea แล้วทำให้อยู่ในสภาพที่สามารถนำไปศึกษาต่อได้ หลังการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยใช้ Ni2+ NTA agarose resin เป็นตัวจับ พบว่าเอนไซม์มีความบริสทธิ์สูงแต่มีแอคติวิตี้ต่อการสลายไคตินสับสเตรทน้อย การศึกษาต่อมาผู้วิจัยได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการกระตุ้นด้วย hAMCase มีความไวสูงโดยสามารถให้สัญญาณการตรวจวัดที่ระดับความเจือจางถึง 1:25,600 เท่า โดย anti-hAMCase antisera ที่เตรียมได้มีความจำเพาะต่อ hAMCase สูงและไม่ทำปฏิกิริยา cross-reaction กับโปรตีนอื่นที่อยู่ในกลุ่ม GH-18 glycosyl hydrolases ได้แก่ hYKL-39 hYKL-40 และ bacterial chitinase A ส่วนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ที่ผลิตจาก *E. coli* โดยเทคนิค hybridoma โดยทำการสร้าง hybriodoma library จากโคลนทั้งหมด 999 โคลน ได้ทำการคัดกรองหาโมโนโคลนที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ hAMCase ได้ในที่สุดทั้งหมด 4 โคลนคือโคลน 4G1-E5 4G1-D9 6E5-C2 และ 6E5-C9 การทดสอบ isotyping พบว่าโคลนทั้ง 4 เป็นชนิด IgG1 isotype เหมือนกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะสูงโดยทำปฏิกิริยากับ hAMCase antigen อย่างเดียวแต่ไม่ทำปฏิกิริยา cross reactivity กับโปรตีนที่ใกล้เคียงอื่น ๆ นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 4 โคลนสามารถจับได้กับ endogenous hAMCase ที่สร้างจาก monocytic cell line 2 ชนิด คือเซลล์ THP1 และ U937 ได้ โดยเฉพาะโคลน 6E5-C2 และ 6E5-C9 ยังสามารถจับได้กับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 68 kDa ซึ่งเป็น glycosylated form ของ hAMCase อีกด้วย โดยสรุปผลการทดลองที่ได้รับในการศึกษานี้มีความสำคัญในการที่จะนำไปสู่การศึกษาบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ hAMCase ต่อพยาธิสภาพของโรคภูมิแพ้ นอกจากนี้การมีแอนติบอดีที่จำเพาะยังอาจนำมาใช้ในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดหาระดับของเอนไซม์ hAMCase เพื่อทำนายการดำเนินไปของโรคภูมิแพ้โดยวิธีทาง immunosensor ต่อไปในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

In this study, we employed PCR technique to clone *human chitinase (huAMCase) isoform 1* gene, using human cDNA as template, into pQETri system vector. The recombinant hAMCase was highly expressed in *E. coli* system as a 50 kDa polypeptide, with hexahistidine residues tagged at the C-terminus. The enzyme was produced as inclusion bodies, which could be solubilized by 8M Urea. After purification by affinity chromatography using Ni^{2+} NTA agarose resin as a capture, the enzyme was found to have high purity, but its activity towards chitin substrate was very poor. For further study, we produced polyclonal and monoclonal antibodies against hAMCase. Western blot analysis showed that anti-hAMCase polyclonal antibodies had high sensitivity and could detect the specific antigen even at a dilution ratio of 1:25,600. The raised anti-hAMCase antisera was shown to be highly specific only to hAMCase, and did not cross-react with other GH-18 protein homologues, including hYKL-39, hYKL-40, and bacterial chitinase A. Monoclonal antibody was further produced from the E. coli expressed hAMCase antigen, using the standard hybridoma technique. A hybriodoma library, containing 999 monoclones were generated, and screened. Four monoclones, namely 4G1-E5, 4G1-D9, 6E5-C2, and 6E5-C9 were tested to be highly specific for hAMCase, which did not react with other GH-18 immunogens. Isotype mapping showed that all the clones belonged IgG1 isotype. In addition, all the monoclones could react with ehAMCase endogenously expressed in monocytic cell lines: THP1 and U937. Especially, clones 6E5-C2 and 6E5-C9 could detect the high MW protein of 68 kDa protein in the cell lysate of U937 cells. Such protein was shown to be the glycosylated form of hAMCase. In conclusion, the results obtained from this study provide important basis that will pave the way to understand the physiological role of hAMCase in association with the pathogenicity of allergic asthma. The obtained antibodies, which were highly specific to only hAMCase may be suitable to be used for development of an immunosensor for a sensitive detection of hAMCase that will help to predict the progress of the allergic disease in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	13
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	29
ข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	
ก ผลงานเผยแพร่	32
ข ประวัติผู้วิจัย	33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 โครงสร้างสามมิติของ chitinase-like protein Ym1 ที่ประกอบด้วยโดเมนหลัก คือ TIM barrel จับอยู่กับน้ำตาล $GlcNAc_9$ แทรกด้วยโดเมน $\alpha+\beta$ 1

รูปที่ 1.2 ข้อเสนอเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ไคติเนส AMCase ในการกระตุ้นการเกิด hyperresponsiveness และ inflammation 2

รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ huMAcase isoforms 1,2 และ 3 13

รูปที่ 3.2 การเพิ่มปริมาณยีน *hAMCase* โดยเทคนิค PCR 14

รูปที่ 3.3 ผลการตรวจสอบโคลนโดยเทคนิค colony PCR และ double digestion 15

รูปที่ 3.4 การแสดงออกของยีน AMCase ที่อยู่ในพลาสมิด pQE-TriSystem vector (small scale) 15

รูปที่ 3.5 การแสดงออกของยีน AMCase ใน pQE-TriSystem vector (large scale) 16

รูปที่ 3.6 SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีน AMCase ใน pGEX-4T-1 vector 17

รูปที่ 3.7 การทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ni-NTA chromatography 17

รูปที่ 3.8 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ hAMCase ก่อนใช้ฉีดสัตว์ทดลอง 19

รูปที่ 3.9 กราฟแสดงผลของ indirect ELISA เพื่อหาตรวจสอบแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase 19

รูปที่ 3.10 Western blot แสดงการไตเตรทความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase 20

รูปที่ 3.11 SDS-PAGE และ Western blot แสดงความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase 21

รูปที่ 3.12 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิด isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase โดยวิธี capture 22

รูปที่ 3.13 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase 23

รูปที่ 3.14 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase ใน THP-1 cell 24

รูปที่ 3.15 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase จากเซลล์ U937 25

รูปที่ 3.16 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ hAMCase จากเซลล์ THP-1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม Tunicamycin 26

รูปที่ 3.17 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อ hAMCase จากเซลล์ U937 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม Tunicamycin 26

รูปที่ 3.18 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 4G1-D9 27

รูปที่ 3.19 แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-D9 หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatograph 28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR	5
ตารางที่ 2.2 แสดงขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	6
ตารางที่ 2.3 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการย่อยสายดีเอ็นเอต้นแบบและพลาสมิด	7

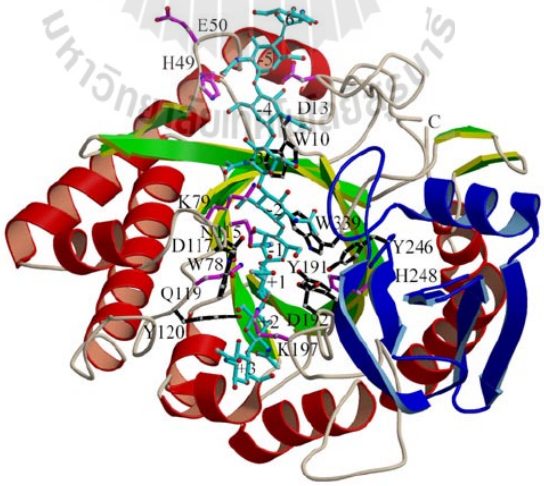
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

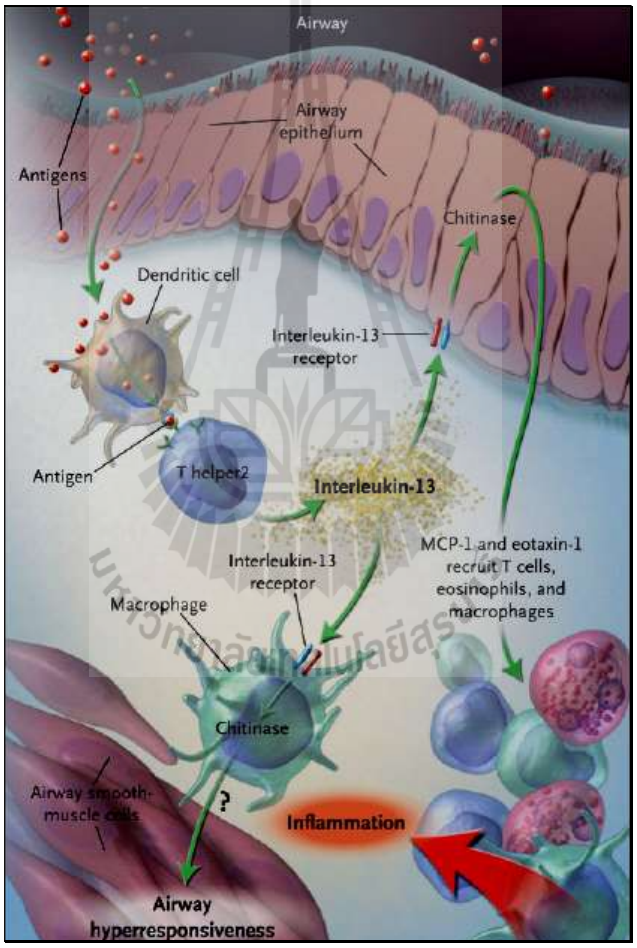
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่าง ๆ ของพืช ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล สัตว์เคี้ยวเอื้อง และมนุษย์ หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เชื้อราผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีเกี่ยวข้องในขบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา (1-3) นอกจากนี้ส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่ (4-5) มีส่วนช่วยในการย่อยสารอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลาทอง ปลาเทร้า ปลาซีบาส เป็นต้น (6-8) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา (9) ในพืชเอนไซม์ไคติเนสมีส่วนร่วมในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช (10-11) และขบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช (12) ในแบคทีเรียที่พบในทะเล (marine bacteria) เอนไซม์ไคติเนสทำหน้าที่สลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของโครงสร้างแข็งแรงเปลือกกุ้ง เปลือกปู แกนของปลาหมึก และไดอะตอม เพื่อให้ไคตินสายสั้นที่เซลล์แบคทีเรียจะนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน (13-15) การศึกษาวิจัยเอนไซม์ไคติเนสในมนุษย์ พบว่าเอนไซม์ไม่ได้ทำหน้าที่สลายไคตินเนื่องจากเซลล์มนุษย์ไม่มีการผลิตไคตินออกมา แต่ได้มีรายงานการวิจัยที่น่าสนใจพบว่า acidic chitinase (EC 3.1.2.14) จัดอยู่ในแฟมิลี 18 ไกลโคซิล ไฮโดเลส เป็นโปรตีนขนาด 50 กิโลดาลตัน จากการทำนายโครงสร้างสามมิติพบว่าคล้ายคลึงกับ human chitinase-like lectins Ym1 (16-18) กล่าวคือโดเมนหลักเป็น $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel ซึ่งสามารถจับกับไคตินโอลิโกแซคคาร์ไรด์ได้ และมีโดเมนเล็กมีลักษณะเป็น $\alpha+\beta$ เชื่อมระหว่างสาย $\beta 7$ กับ $\alpha 7$ ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างสามมิติของ chitinase-like protein Ym1 ที่ประกอบด้วยโดเมนหลักคือ TIM barrel จับอยู่กับน้ำตาล NAG_9 แทรกด้วยโดเมน $\alpha+\beta$ (แหล่งที่มา: Tsai et al., 2004)

ารศึกษาทางอิมมูโนโลยีพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภาวะภูมิแพ้ของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ [18-19) ผลการทดลองในหนูทดลองที่เกิดโรคโดย Zhu et al (20) พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ acidic mammalian chitinase (AMCase) ที่บริเวณเยื่อบุ (airway epithelia) และเซลล์ macrophages ของปอดหนูเพิ่มขึ้นในปริมาณมากผิดปกติ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับในคนโดยพบว่าปริมาณของเอนไซม์ AMCase ที่เพิ่มสูงขึ้นจะขึ้นอยู่กับระดับอาการของป่วยโรคภูมิแพ้ ข้อสรุปของงานวิจัยของ Zhu et al. คือเอนไซม์ไคติเนส AMCase มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับพยาธิสภาพของโรคภูมิแพ้ การศึกษาวิจัยทางอิมมูโนวิทยาพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ไคติเนส AMCase เกิดขึ้นที่บริเวณเซลล์เยื่อบุและถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาเมื่อระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่าง ๆ ผ่านการสร้างสาร interleukin-13 กลไกการของเอนไซม์ AMCase ในการกระตุ้นให้เยื่อบุทางเดินหายใจเกิด hyperresponsiveness และการอักเสบแสดงไว้ในรูปที่ 1.2 (21)



รูปที่ 1.2 ข้อเสนอเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ไคติเนส AMCase ในการกระตุ้นการเกิด hyperresponsiveness และ inflammation ของเยื่อบุทางเดินหายใจของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ (แหล่งที่มา: Wills-Karp & Karp, 2004)

จากรูปที่ 2 จะเห็นว่าเมื่อบริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้สัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ (allergens) ต่าง ๆ สารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นแอนติเจนที่จะไปก่อกวนระบบภูมิคุ้มกันโดยจะเหนี่ยวนำให้ CD4+ dendritic

cells แสดงแอนติเจนกับ T helper2 cells (Th2) ผลคือเซลล์ Th2 จะผลิต cytokine ออกมาหลายชนิด เช่น interleukin-4, interleukin-5, interleukin-9, และ interleukin-13 โดยที่ interleukin-13 จะทำหน้าที่เป็น primary effector ที่จะเหนี่ยวนำให้ airway epithelial cells และ macrophages สร้างเอนไซม์ไคติเนส huACMcase ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจะกระตุ้นการสร้างโปรตีนสองตัวคือ monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) และ eotaxin-1ซึ่งโปรตีนนี้จะทำให้เกิดการ recruit ของเซลล์ eosinophils, T cells, และ macrophages ที่บริเวณเนื้อเยื่อปอดทำให้เกิดอาการอักเสบขึ้นแต่กลไกการกระตุ้นผ่านการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสยังไม่มีการศึกษาวิจัยในรายละเอียด

ส่วนไคติเนสอื่นที่ผลิตในร่างกายมนุษย์คือเอนไซม์ human chitotriosidase มีคุณสมบัติเป็น exo-chitinase ได้มีข้อเสนอแนะว่าเอนไซม์นี้มีหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการป้องกันตัวของเซลล์ที่ถูก infect โดยเซลล์จะผลิตเอนไซม์นี้เพื่อสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบบนผนังเซลล์ของ fungal pathogen (22,23) การศึกษาอื่นพบว่าผู้ป่วยโรค Gaucher ผลิตเอนไซม์นี้ในปริมาณเพิ่มขึ้น 2-3 เท่าเมื่อเทียบกับคนปกติ แต่เอนไซม์ที่ผลิตในผู้ป่วยมีชิ้นส่วนของกรดอะมิโน ขนาด 29 กรดอะมิโนตั้งแต่ Val-344–Gln-372 ขาดหายไป จึงได้มีการใช้เอนไซม์นี้เป็น biomarker เพื่อตรวจหาความผิดปกติจากโรคดังกล่าว โดยเอนไซม์ human chitotriosidase ปกติจะสามารถย่อย colloidal chitin ได้ และถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้ง allosaminidin ในปี 2002 กลุ่มวิจัยของ Professor Daan van Aalten จาก University of Dundee ได้ตีพิมพ์โครงสร้างสามมิติเชิงซ้อนของเอนไซม์ human chitotriosidase กับตัวยับยั้ง allosaminidin และ chitoopentasaccharide ที่ resolution 2.3 - 2.1 อังสตอรม โครงสร้างของบริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะเป็นร่องยาวเหมาะสำหรับการจับกับไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายยาว ข้อมูลจากโครงสร้างพบว่า residues 344–372 ที่โดเมนเร่งปฏิกิริยาโดยเป็นองค์ประกอบของ C-terminal half ของ helix 7 และ strand & loop β8 & α8 เกือบทั้งหมด นอกจากนี้การเปรียบลำดับกรดอะมิโนกับเอนไซม์ไคติเนสอื่น ๆ พบว่ากรดอะมิโน Trp357 ซึ่งหนึ่งในกรดอะมิโนที่หายไป มีลักษณะ conserve ดังนั้นการขาดหายไปของชิ้นส่วนโปรตีนที่พบในผู้ป่วยโรค Gaucher ทำให้เอนไซม์เกิด misfolding ดังนั้นโปรตีนที่ผลิตขึ้นมามีปริมาณมากแต่ทำงานไม่ได้ (24,25)นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยพบโปรตีนคล้ายไคติเนสหรือ chitinase-like proteins (CLPs) เช่น CHI3L1, oviduct-specific glycoprotein16, stabilin-1-interacting chitinase-like protein,YKL40 และ HC-gp39 โปรตีนเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน มีโครงสร้างส่วนที่เป็น TIM barrel catalytic domain เหมือนไคติเนสแต่ไม่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสลายไคตินเนื่องจากขาดโดเมนจับกับไคติน (chitin binding domain) สิ่งที่น่าสนใจคือโปรตีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคที่สำคัญ ๆ หลายโรค เช่น โปรตีน CHI3L1 ในคนปกติจะไม่ผลิตโปรตีนนี้แต่พบมากผิดปกติในซีรัมของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ โรค arthritis cancer, liver fibrosis, rheumatoid arthritis และ colorectal carcinoma (26,27) ในทำนองเดียวกัน การศึกษาในในผู้ป่วยโรคมะเร็งรังไข่และมะเร็งตับอ่อนพบปริมาณไกลโคโปรตีน YKL40 ในระดับสูงผิดปกติ และได้มีการศึกษาวิจัยล่าสุดพบว่าการตรวจหาระดับ YKL40 ร่วมกับการวัดค่า CA-125 จะให้ผลการตรวจหามะเร็งรังไข่ระยะเริ่มแรกได้แม่นยำมากขึ้น (28,29)

1.2.วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำการโคลนและแสดงออกของ human chitinases ในระบบ *E. coli*

2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ human chitinase
3. เพื่อผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human chitinase
4. เพื่อศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ human chitinase

1.3.ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การตรวจหายีน human chitinase ในจีโนมของมนุษย์ ขั้นตอนนี้ทำโดยอาศัยข้อมูลจาก human genome project ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI หลังจากนั้นจะทำการสังเคราะห์ยีนและโคลนยีนโดยเทคนิคทาง PCR ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์นิวคลีไทด์เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของยีนที่ได้ การทดลองในขั้นตอนต่อมาคือการโคลนยีนและการศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนสใน bacteria/insect cell line/human cell line ต่อจากนั้นทำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์และการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตรกราฟฟีแบบต่าง ๆ หลังจากนั้นทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human chitinase และทำการตรวจหาระดับการแสดงออกของเอนไซม์ใน human cell lines ต่าง ๆ โดยวิธีทาง ELISA Assay หรือ Immunoblotting

1.4.ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้มี 4 ประการหลักคือ

1.2.2 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้ใดดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

1.2.3 องค์ความรู้ที่ได้รับในระหว่างการทำงานวิจัยสามารถถ่ายทอดให้นักวิจัยรุ่นเยาว์ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2.4 เป็นการนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์เนื่องจากงานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักคือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสที่มีความสามารถในการย่อยไคตินโดยขบวนการทางชีวภาพดีขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเชิงการค้าและเภสัชกรรมต่อไป

1.2.5 เป็นการส่งเสริมการท่องเที่ยวและการรักษาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกากไคตินเป็นของเสียทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล การใช้ประโยชน์จากไคตินจะช่วยบรรเทาปัญหาสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเล

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. กรมส่งเสริมการการส่งออก กระทรวงพาณิชย์
5. กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
6. หน่วยงานเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากไคติน-ไคโตซาน

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.2 การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์และการเพิ่มปริมาณจำนวนยีน *Acidic mammalian chitinase (hAMCase)* จากมนุษย์ โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

1. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hAMCase* จากมนุษย์ จากฐานข้อมูล NCBI (GenBank: AF290004.1) ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เริ่มต้นจากเบสลำดับที่ 104-1531 (coding sequence) สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีน hAMCase ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 476 ตัว คิดเป็นขนาดโมเลกุลประมาณ 52 กิโลดาลตัน
2. ทำการสังเคราะห์ยีนเพื่อโคลนเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* M15 pREP4 โดยออกแบบ โอลิโกนิวคลีโอไทด์สองเส้น (Biodesign, Bangkok) โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hAMCase* จากมนุษย์ที่มีอยู่แล้ว เส้น sense strand มีลำดับของนิวคลีไทด์เป็น 5'-GCGATATCATATCAACTGACCTGCTAC-3' โดยที่นิวคลีไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ EcoRV cloning site ส่วนเส้น anti-sense strand มีลำดับของ นิวคลีไทด์เป็น 5'-ACTCGAGCGCCCAGTTACAACAGTC-3' โดยที่นิวคลีไทด์ที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งของ XhoI cloning site ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ใช้คือ พลาสมิด pQE-TriSystem vector (ดังแสดงในรูปที่ 1) ที่มียีนของ *hAMCase* จากมนุษย์ที่ถูกปรับลำดับเบสให้เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียดังแสดงในเอกสารแนบท้าย โดยเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA) และ PCR condition แสดงในตารางที่ 2.1 และตาราง 2.2

ตารางที่ 2.1 ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

สารเคมี	ปริมาณ (μl)
1. DNA template (5 ng)	2.4
2. 10X *Pfu* DNA polymerase buffer	2.5
3. 10 mM dNTP mix	0.5
4. 10 μM upstream primer	2.5
5. 10 μM downstream primer	2.5
6. 25 mM $MgCl_2$	2.0
7. *Pfu* DNA Polymerase (2–3u/μl)	0.5
8. Nuclease-free water	12.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.2 แสดงขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hotstart	97	2 นาที	1
2. Denaturation	97	1 นาที	30
3. Annealing	55	1 นาที	30
4. Extension	72	4 นาที	30
5. Final extension	72	5 นาที	1

3. ทำการตรวจสอบเส้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 0.5x TAE บัฟเฟอร์
4. ทำการย้อมดีเอ็นเอเสร็จแล้ว ก็นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวี
5. ทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 1.4 kB แล้ว
6. ทำบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอโดยใช้ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Löhne, Germany)
7. วัดหาปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

2.2. การโคลนยีน hAMCase และการผลิตรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

1. นำพลาสมิด pQE-TriSystem vector เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat shock ที่ 42 °ซ เป็นเวลา 45 วินาที
2. ทำการสกัดพลาสมิด pQE-TriSystem vector โดยการใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดให้ได้ปริมาณมาก
3. ทำการสร้าง cohesive ends ของยีน *AMCase* และ พลาสมิด pQE-TriSystem vector ปริมาณ 1 μg โดยบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRV และ XhoI เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ 37 °ซ (ตารางที่ 2.3)
4. ทำให้บริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยแล้วโดยใช้ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit
5. วัดหาปริมาณดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยการวัดค่า A_{260} เทียบกับค่า A_{280}
6. ทำการเชื่อมสายดีเอ็นเอทั้งสองเข้าด้วยกัน (direct ligation) ที่ตำแหน่ง EcoR V ทางด้าน 5’ และตำแหน่ง XhoI ทางด้าน 3’ ของยีน hAMCase โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 16 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
7. ทำการ transform พลาสมิดทั้งหมด เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α แล้วบ่มเชื้อในอาหารแข็งสูตร LB ที่มี 100 μg/mL ampicillin (LB/Amp) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ
8. ทำการตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด pQE-TriSystem vector-AMCase gene บรรจุอยู่โดยเทคนิค colony PCR และ double digestion
9. ทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์โดย DNA sequencing (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Seri Kembangan, Malaysia)

ตารางที่ 2.3 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการย่อยสายดีเอ็นเอต้นแบบและพลาสมิด

สารเคมี	ปริมาณ (μl)
1. AMCase gene/ pQE-TriSystem vector	7
2. NEBuffer 3	2.5
3. EcoRV	0.5
4. XhoI	0.5
5. 1 mg/ml BSA	2
6. Nuclease-free water	12.5

2.3. การผลิตรีคอมบิแนนท์ hAMCase ใน *E. coli*

1. เมื่อได้โคลนที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ถูกต้องตามที่ต้องการแล้ว ทำการ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE-TriSystem vector-AMCase gene เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 pREP4 เพื่อให้ยีน AMCase มีการแสดงออกภายใต้ T5 promotor
2. ทำการเลี้ยงเชื้อเซลล์แบคทีเรียด้วยอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ 25 μg/ml kanamycin ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนได้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 600 nm ประมาณ 0.6
3. กระตุ้นให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนท์ *AMCase* ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที
4. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังจากนั้นละลายเซลล์ด้วย extraction buffer (20 mM Tris-HCL, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF และ 1 mg/ml lysozyme) แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
5. ทำให้เซลล์แตกโดยใช้ Sonopuls Ultrasonic homogenizer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ probe ประมาณ 6 mm (50% duty cycle; amplitude setting, 30%) เป็นเวลา 30 วินาที 6-8 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ
6. ปั่นเก็บส่วนใส (supernatant) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์หาโปรตีนในส่วนของ supernatant และ cell pellet โดย SDS-PAGE
7. เนื่องจากโปรตีนถูกผลิตในรูปที่ไม่ละลาย (inclusion bodies) จึงทำการละลาย cell pellet ด้วย 8 M ยูเรีย จ

2.4. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟฟีแบบจับจำเพาะ

1. ทำการทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ Ni-NTA agarose resin เป็นตัวจับจำเพาะกับโปรตีน hAMCase ที่มี 8xHis tag ที่ด้าน C-terminus ของสายโพลีเพปไทด์ โดยนำเซลล์ที่ละลายใน 8 M ยูเรีย มาผ่านเข้าคอลัมน์ที่มี Ni-NTA agarose (QIAGEN) แบบ gravity flow
2. ทำการล้างโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ รีคอมบิแนนท์ hAMCase ออกไปด้วย 10 column volume ของ washing buffer I (5 mM imidazole ใน 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl และ 8 M ยู

เรีย) ตามด้วย 5 column volume ของ washing buffer II (20 mM imidazole ใน 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl และ 8 M ยูเรีย)

3. ชะโปรตีน hAMCase ออกจากคอลัมน์ด้วย 10 ml ของ elution buffer (250 mM imidazole ใน 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl และ 8 M ยูเรีย)
4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย coomassie blue
5. นำโปรตีนที่ได้ไปแลกเปลี่ยนในบัฟเฟอร์ที่มีเฉพาะ 2 M ยูเรียใน 20 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 150 mM NaCl โดยวิธี dialysis
6. ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นโดยใช้ Vivaspin-20 ultrafiltration membrane concentrators (M_r 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany)
7. หาความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA โดยใช้โปรตีน BSA สร้างกราฟมาตรฐาน

2.5. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ไคติเนสในคน (hAMCase)

1. เก็บเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดดำบริเวณใบหู เพื่อแยกเก็บซีรั่มก่อนการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง(pre-immune serum) สำหรับใช้เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีที่ได้หลังการฉีดกระตุ้นด้วยเอนไซม์ hAMCase
2. ฉีดกระตุ้นกระต่าย New Zealand White ด้วยเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตโดยระบบแบคทีเรีย ปริมาณ 250 ไมโครกรัมใน 2 M Urea ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยผสมกับ Freund's Complete adjuvant ด้วยอัตราส่วน 1:1 รวมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ฉีด hAMCase antigen เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอ ทำการฉีดซ้ำอีก 2 ครั้งทุก 2 อาทิตย์โดยใช้ปริมาณของเอนไซม์เท่ากันแต่เปลี่ยนเป็นผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ด้วยอัตราส่วนเท่าเดิม
4. เก็บเลือดจากใบหูของกระต่ายทุก 1 อาทิตย์หลังการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง
5. แยกแอนติซีรั่มโดยการตั้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกซีรั่มที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกซีรั่มและเก็บไว้ที่ -40 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

2.6. การตรวจหาระดับของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ในซีรั่มกระต่ายโดยวิธี Western Blot

1. ผสมเอนไซม์ hAMCase ที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลอง หรือโปรตีนที่ใช้เป็นตัวควบคุม ผสมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer ก่อนนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที
2. แยกโปรตีนโดย 10% SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry electroblotting ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimm milk ในสารละลาย PBS
3. นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาย้อมด้วยซีรั่มกระต่ายที่เจือจางด้วย 2% skim milk แล้วที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทียบกับ Pre-immune serum
4. ล้างแอนติบอดีที่ไม่จับและโปรตีนอื่นในซีรั่มออกด้วย 0.1% Tween 20 ในสารละลาย PBS ก่อนที่จะย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulins antibody เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

5. ล้าง membrane 5 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system
6. เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนจำเพาะบนแผ่นฟิล์มเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทำควบคู่ไปด้วย

2.7. การกระตุ้นหนู Balb/c เพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

1. ฉีดเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียปริมาณ 50 ไมโครกรัม ในสารละลายยูเรียความเข้มข้น 2 M เข้าสู่ช่องท้องหนู Balb/c จำนวน 3 ครั้งทุกๆ 2 อาทิตย์

2. เก็บน้ำเลือดหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นทางหางทุกๆ 2 อาทิตย์โดยเริ่มเก็บตัวอย่างน้ำเลือดหนึ่งอาทิตย์หลังการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองในแต่ละครั้ง

3. นำซีรั่มที่เก็บได้แต่ละครั้งมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลองโดยวิธี indirect ELISA ดังอธิบายในหัวข้อ 1.4 เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากน้ำเลือดที่เก็บก่อนการฉีดกระตุ้น (pre-immune serum)

4. เมื่อตรวจพบระดับแอนติบอดีในน้ำเลือดหนูจะทำการฉีดกระตุ้นหนูด้วยเอนไซม์ hAMCase เข้าสู่ช่องท้องหนูในปริมาณเท่ากัน เป็นเวลา 5 วันก่อนฆ่าหนูเพื่อแยกเซลล์จากม้ามเพื่อเตรียม Hybridoma cell ต่อไป

2.8. การตรวจสอบหาแอนติซีรั่มต่อเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตได้จากหนูโดยวิธี indirect ELISA

1. เตรียมเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ความเข้มข้น 20 ไมโคกรัมต่อมิลลิลิตรในcoating buffer (0.1 M Carbonate/bicarbonate, pH9.6) และเติมใน ELISA plate ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บล็อคที่ว่างในหลุมด้วยสารละลาย PBS ที่มี skim milk อยู่ 2% w/v เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
2. ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง เติมแอนติซีรั่มจากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง
3. เติม HRP conjugated rabbit anti-mouse Igs ที่เจือจางใน blocking buffer ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 โดยเติม 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงก่อน ล้างด้วย washing buffer 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม

4. เติม TMB substrate 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งไว้ให้เอนไซม์ horseradish peroxidase ทำงานโดยเก็บ ELISA plate ไว้ในที่มืดจนเกิดสี (ประมาณ 3-5 นาที)
5. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

2.9. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase โดย Hybridroma technique

1. นำเซลล์จากม้ามของหนูที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสในคน (splenocytes) และผสมกับ P3X63Ag8.653 mouse myeloma cells
2. เตรียมเซลล์ลูกผสมโดย standard hybridoma technique โดยการใช้ 50% (v/v) polyethylene glycol (PEG) (30) ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 400xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) 10%BM condimed H1 (Roche) และยาสำหรับเลือกเซลล์ลูกผสม (HAT medium) ใน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหลุม
4. หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วันใน 5% CO_2 incubator เติม HT medium อีก 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ต่อใน5% CO_2 incubator
5. เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เซลล์เจริญเติบโตมาทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase ในคนโดยวิธี indirect ELISA
6. เมื่อตรวจพบเซลล์ในหลุมที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase เซลล์ในหลุมดังกล่าวจะถูกนำไปทำเจือจาง (single cell cloning) อีก 2 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าได้เซลล์ลูกผสมที่มาจากโคลนเดียวเท่านั้น

2.10. การทำ Single cell cloning

1. นำเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่ตรวจพบว่ามีการผลิตแอนติบอดีมานับโดย Neubauer chamber ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้เป็น 192 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM (ที่มี 10%FCS และ 10% BM condimed H1) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
2. แบ่งเซลล์ 4 มิลลิลิตรเพื่อทำการเจือจาง (two-fold dilution) จนถึงอัตราส่วน 1:4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นโดยประมาณของเซลล์เป็น 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ต่อ150 ไมโครลิตร
3. นำเซลล์แต่ละความเข้มข้นมาเติมลงใน 96 well plate โดย แถว A และ B เติม 4 เซลล์ต่อ 150 ไมโครลิตร แถว C และ D เติม 2 เซลล์ต่อ 150 ไมโครลิตร ส่วนแถว E F G และ H เติม 1 เซลล์ต่อ 150 ไมโครลิตร
4. เลี้ยงเซลล์ใน 5% CO_2 incubator ครบหนึ่งอาทิตย์สังเกตหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อโคลนมีขนาดใหญ่พอเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

2.11. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและการเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

1. เลี้ยงเซลล์ลูกผสม (hybridoma cells) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM ที่มี 10% FCS เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

2. นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้จำนวน $1x10^7$ เซลล์ ฉีดเข้าสู่ช่องท้องของหนูเพื่อให้มีการผลิต ascetic fluid เก็บ ascetic fluid จากท้องหนู
3. ทดสอบ activity ของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี indirect ELISA ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นแอนติบอดีที่บริสุทธิ์
4. นำน้ำจากช่องท้องหนู (Ascitic fluid) ที่มีแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสในคนมาแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography โดยนำน้ำที่ได้จากช่องท้องหนูมาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ด้วยอัตราส่วน 1:2
5. ปั่นด้วยที่ความเร็ว 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ ดูดเฉพาะส่วนของเหลวมาผ่านใน Protein G sepharose column โปรตีนอื่นที่ไม่ถูกจับกับเม็ด sepharose ใน column จะถูกล้างออกโดย phosphate buffer
6. เติม eluting buffer (0.1M citric acid buffer pH 3.0) เพื่อแยกแอนติบอดีที่ถูกจับออกจาก column ทำการปรับ pH ของสารที่แยกได้ให้เป็น 7.2 โดยการเติม neutralizing buffer (2M Tris-HCl, pH 8.0)
7. นำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไปแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น PBS วัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และ BCA assay ก่อนเก็บไว้ที่ -40°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.12. การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-PAGE

1. นำแอนติบอดีที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE ทำได้โดยการนำแอนติบอดีที่แยกได้มาผสมกับ non-reducing buffer หรือ reducing bufferต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที
2. ทำการวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE ที่มี 12.5% resolving gel
3. ย้อมแผ่นเจลที่แยกแอนติบอดีที่สนใจด้วยสี Coomassie Brilliant blue ล้างสีส่วนเกินออกโดย destaining solution จนพื้นเจลส่วนที่ไม่มีแถบโปรตีนใสสะอาด เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่แยกได้กับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่แยกควบคู่กันในแผ่นเจลเดียวกัน

2.13. การตรวจสอบ Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Capture ELISA

1. เจือจางแอนติบอดีต่อ isotype แต่ละชนิดของหนู ด้วยสารละลาย 0.1 M carbonate/bicarbonate, pH9.6 สัดส่วน 1:1,000 เติมลงใน ELISA plate 50ไมโครลิตรต่อหลุม
2. ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บล็อคที่ว่างในหลุมด้วยสารละลาย PBS ที่มี skim milk อยู่ 2% w/v เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
3. ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง
4. เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการเลี้ยง hybrid clone ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCaseปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween-20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง

6. เติม HRP conjugated rabbit anti-mouse Igs ที่เจือจางใน blocking buffer ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 โดยเติม 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงก่อน
7. ล้าง plate ด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติม TMB substrate 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งไว้ให้เอนไซม์ horasdish peroxidase ทำงานโดยเก็บ ELISA plate ไว้ในที่มืดจนเกิดสี (ประมาณ 3-5 นาที)
8. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

2.14. การวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะ (glycosylated protein)

1. เลี้ยงเซลล์ monocytic cell line THP-1 หรือ U937 ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ cell/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FCS RPMI-1640 ที่ไม่มี หรือมีการเติมยา tunicamycin ที่ความเข้มข้น 5μg/ml ใน 5% CO_2 incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. เก็บเซลล์มาปั่นล้างด้วย สารละลาย PBS ที่ความเร็ว 400 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 3 ครั้ง
3. นำเซลล์ที่ใช้ในการศึกษามาทำการแตกเซลล์ด้วย lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.02% NaN_3) ที่มี 1% Triton X-100 เป็น detergent และมีส่วนผสมของ protease inhibitors (phenylmethyl-sulphonylfluoride (PMSF), iodoacetamide, aprotinin) โดยทำที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
4. ทำการแยกเก็บ cell lysates โดยวิธี centrifugation จากนั้นนำ cell lysate ที่เตรียมได้มาผสมรวมกับ non-reducing buffer หรือ reducing buffer
5. นำตัวอย่างไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ก่อนแยกโดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry electroblotting
6. ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimm milk ใน PBS นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาย้อมด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase หรือ control mAbs
7. ล้างแอนติบอดีที่จับแบบไม่จำเพาะออกด้วยสารละลาย 0.1% Tween 20 ใน PBS ก่อนที่จะย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody ล้าง membrane
8. ทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system เปรียบเทียบแถบของปฏิกิริยาบนฟิล์มกับ standard molecular weight marker ที่ทำควบคู่ไปด้วย การศึกษานี้จะทำให้ทราบว่าโมเลกุลที่จำเพาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดี WK-C5 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่าไร

บทที่ 3

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

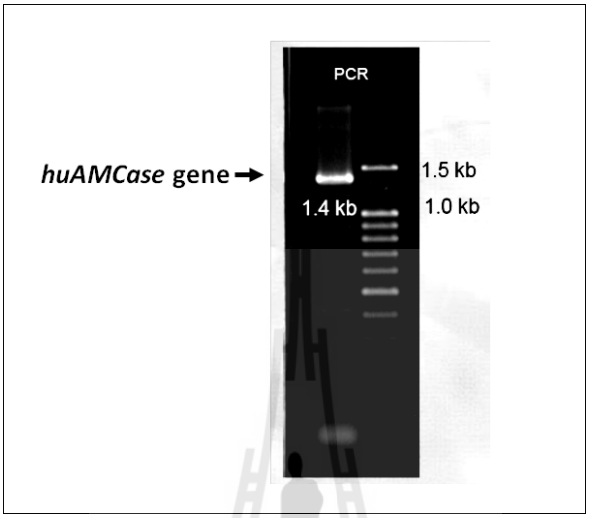
3.1. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและการโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์ hAMCase

จากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน จากฐานข้อมูล NCBI (GenBank: AF290004.1) พบว่า hAMCase มี genetic variants ทำให้เกิดรูปได้ 3 isoforms คือ hAMCase isoforms 1, 2, และ 3 โดยยีนที่สร้าง isoform 1 มีขนาดยาวที่สุดคือประกอบด้วย 1,428 เบส ถอดระหัสให้สายโพลีเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 476 ตัว มีค่า pI เท่ากับ 5.6 มีค่าประจุสุทธิเป็น -6.8 ที่ pH 7.0 และน้ำหนักโมเลกุลเป็น 52.3 kDa เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเอนไซม์ hAMCase ทั้ง 3 isoforms พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 100% แตกต่างกันที่เอนไซม์ hAMCase isoform 2 มีขนาดสั้นกว่า isoform 1 มาก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียง 368 ตัว คิดเป็นน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 40.1 kDa ส่วน hAMCase isoform 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 315 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 33.9 kDa (รูปที่ 3.1) ทั้งนี้คาดว่าเอนไซม์ hAMCase isoforms 2 และ 3 เกิดจาก proteolytic degradation หลังกระบวนการ translation ของ hAMCase isoform 1 มากกว่าเกิดจากที่เอนไซม์ถูกถอดระหัสจากคนละยีนกัน

```
                 *        20         *        40         *        60         *
huchi1 : MTKLILLTGLVLILNLQLGSAYQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNIDPCLCTHLIYAFAGRQNNEITTIE :  70
huchi3 : ------------------------------------------------------------------- :   -
huchi2 : ------------------------------------------------------------------- :   -
         MTKLILLTGLVLILNLQLGSAYQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNIDPCLCTHLIYAFAGRQNNEITTIE

                 80         *       100         *       120         *       140
huchi1 : WNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFDWE : 140
huchi3 : ------------------------------------------------------------------- :   -
huchi2 : ----------------------------------MVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFDWE :  32
         WNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFDWE

                 *       160         *       180         *       200         *
huchi1 : YPGSRGSPPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVM : 210
huchi3 : ----------------------MREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVM :  49
huchi2 : YPGSRGSPPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVM : 102
         YPGSRGSPPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVM

                220         *       240         *       260         *       280
huchi1 : TYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTG : 280
huchi3 : TYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTG : 119
huchi2 : TYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTG : 172
         TYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPAEKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTG

                 *       300         *       320         *       340         *
huchi1 : IGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGWDAPQEVPYAYQGNVWVGYDNIKSFDIKAQWLK : 350
huchi3 : IGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGWDAPQEVPYAYQGNVWVGYDNIKSFDIKAQWLK : 189
huchi2 : IGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGWDAPQEVPYAYQGNVWVGYDNIKSFDIKAQWLK : 242
         IGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQGWDAPQEVPYAYQGNVWVGYDNIKSFDIKAQWLK

                360         *       380         *       400         *       420
huchi1 : HNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS : 420
huchi3 : HNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS : 259
huchi2 : HNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS : 312
         HNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS

                 *       440         *       460         *
huchi1 : GGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA : 476
huchi3 : GGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA : 315
huchi2 : GGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA : 368
         GGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA
```

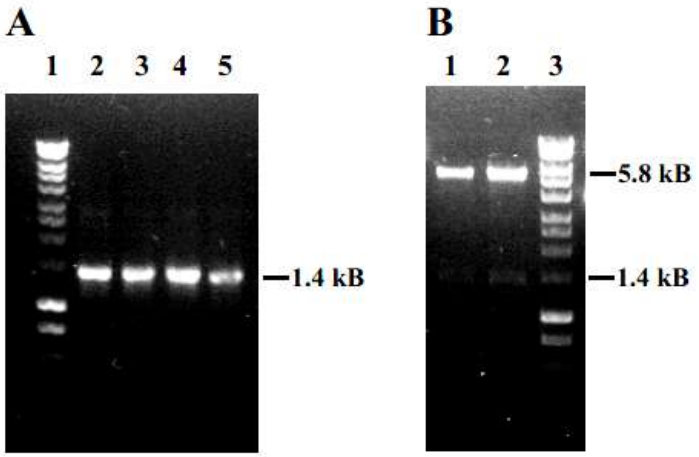
รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ huMAcase isoforms 1,2 และ 3

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกทำการโคลนยีน *hAMCase isoform 1* เนื่องจากมีขนาดยีนที่สมบูรณ์ที่สุด ในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR ให้ PCR product เกิดขึ้นจาก oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อยีน *hAMCase isoform 1* ผลการวิเคราะห์ขนาดและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการทำ agarose gel electrophoresis พบว่า แถบดีเอ็นเอของ AMCase มีขนาดประมาณ 1.4 kB ตามที่คำนวณไว้ (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 การเพิ่มปริมาณยีน *hAMCase* โดยเทคนิค PCR
ดีเอ็นเอต้นแบบคือรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57/*hAMCase* ที่สั่งสังเคราะห์จาก Genscript ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยการแยกดีเอ็นเอบน 1% agarose gel โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ชิ้น PCR product ของยีน *hAMCase* ขนาด 1.4 kB มีตำแหน่งตัดจำเพาะ EcoR V อยู่ที่ปลายทางด้าน 5’ และ XhoI อยู่ที่ปลายทางด้าน 3’ ส่วนพลาสมิด pQE-TriSystem vector ซึ่งมีขนาดประมาณ 5.8 kB จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะ EcoRV และ XhoI ด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงทำการย่อยยีน *hAMCase* และ pQE-TriSystem vector ด้วยเอนไซม์ EcoRV/XhoI จากนั้นก็ทำการตัดแถบดีเอ็นเอของ *hAMCase* แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit หลังจากได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์แล้ว จึงทำการเชื่อม (direct ligation) สายดีเอ็นเอของ *hAMCase* และพลาสมิด pQE-TriSystem vector เข้าด้วยกัน แล้วเลือกโคโลนีบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มี 100 μg/ml ampicillin เป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคลน pQE-TriSystem/*hAMCase* gene บรรจุอยู่โดยเทคนิค colony PCR และ double digestion ดังแสดงในรูปที่ 3.3 จากรูปที่ 3.3A แสดงให้เห็นว่า โคลนที่ 1-4 ให้ผลบวกโดยมีการเพิ่มปริมาณของยีนเมื่อทำ colony PCR โดยขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่น agarose gel มีขนาดเท่ากับ 1.4 kB ซึ่งสอดคล้องกับชิ้นส่วนของยีน *hAMCase isoform 1* เมื่อนำโคลนทั้งสองมาสกัดดีเอ็นเอแล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์ EcoRV และ XhoI ผลการวิเคราะห์พบดีเอ็นเอสองขนาดบนแผ่น agarose gel โดยดีเอ็นเอชิ้นที่หนึ่ง มีขนาดประมาณ 5.8 kB ซึ่งน่าจะเป็นชิ้นส่วนของพลาสมิด pQE-TriSystem vector ส่วนดีเอ็นเอชิ้นที่สองมีขนาดประมาณ 1.4 kB แสดงว่าโคลนที่เลือกมียีน hAMCase อยู่ ดังนั้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าได้มีการนำดีเอ็นเอของ *hAMCase* เข้าสู่ pQE-TriSystem expression vector ได้เป็นผลสำเร็จ

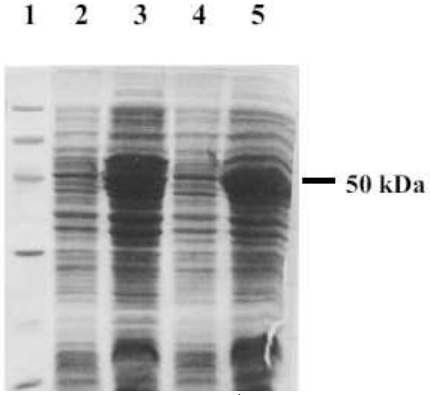


รูปที่ 3.3 ผลการตรวจสอบโคลนโดยเทคนิค colony PCR และ double digestion

รูป 3.3A คือ การตรวจสอบโคลนโดยเทคนิค colony PCR ช่องที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (HyperLadder I DNA marker); 2-5: โคโลนีที่ 1-4 ตามลำดับ รูป 3.3B คือ พลาสมิด pQE-TriSystem/*hAMCase* gene ที่ย่อยด้วย EcoRV/XhoI ช่องที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน (HyperLadder I DNA marker); 2: โคลนที่ 1 และ 3: โคลนที่ 2

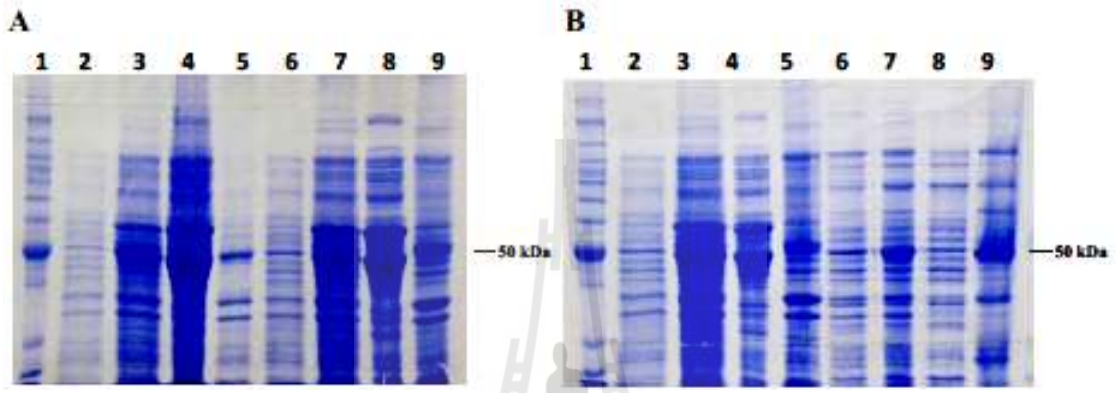
3.2.การผลิตรีคอมบิแนนท์ AMCase และการทำบริสุทธิ์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hAMCase* ที่ใส่เข้าไปในพลาสมิด pQE-TriSystem vector ด้วยการทำ DNA sequencing พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความถูกต้อง สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีน hAMCase ตรงตามฐานข้อมูล NCBI การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของยีน AMCase ที่สภาวะต่างๆ ทั้งการแปรผันอุณหภูมิ บัฟเฟอร์ และชนิดของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโปรตีน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี 100 μg/ml ampicillin และ 25 μg/ml kanamycin ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 600 nm ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นกระตุ้นให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน hAMCase ด้วยการเติม 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 18-25 ° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่า ทุกสภาวะสามารถผลิตโปรตีนได้ดี มีโปรตีนถูกผลิตได้ในปริมาณมาก แต่โปรตีนที่ได้อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย (inclusion bodies) ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีน AMCase ที่อยู่ในพลาสมิด pQE-TriSystem vector (small scale) ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน; 2: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 3: หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 4: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2; 5 หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2

จากผลการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE แสดงการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน AMCase (รูปที่ 5A-B) พบว่าทุกโคโลนีที่มีพลาสมิด pQE-TriSystem/*hAMCase* gene อยู่ สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน hAMCase ได้โดยสังเกตุจากแถบเข้มของโปรตีนบนแผ่นเจล SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (expression host) ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน และทำการแปรผันอุณหภูมิและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของยีน ก็ยังพบว่า เซลล์ยังคงสามารถผลิตโปรตีนได้เป็นจำนวนมาก แต่อยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion bodies)

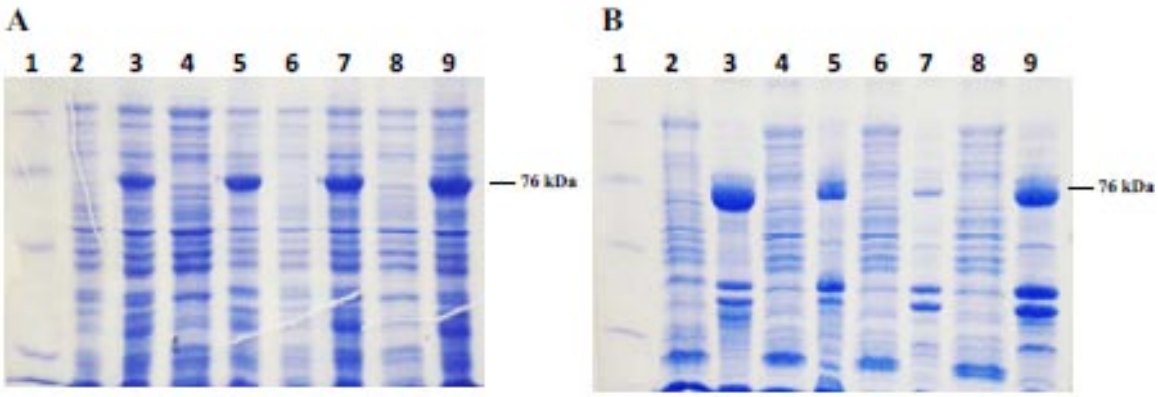


รูปที่ 3.5 SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีน AMCase-pQE-TriSystem vector (large scale)

รูป 3.5A คือ การตรวจสอบบริเวณที่มีการผลิตโปรตีนของยีน AMCase-pQE-TriSystem vector ในเซลล์ *E. coli* M15 pREP4 ของโคลนที่ 1 และ 2 ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (BenchMark™ protein standard); 2: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 3: หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 4: supernatant ของโคลนที่ 1; 5: cell pellet ของโคลนที่ 1; 6: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2; 7: หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2; 8: supernatant ของโคลนที่ 2 และ 9: cell pellet ของโคลนที่ 2

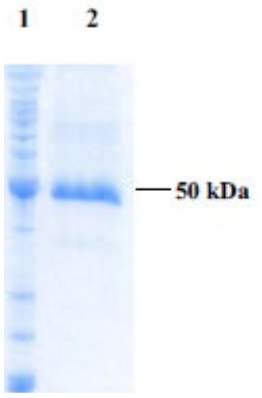
รูป 3.5B คือ การตรวจสอบบริเวณที่มีการผลิตโปรตีนของยีน AMCase-pQE-TriSystem vector (เฉพาะโคลนที่ 1) ในเซลล์ E. coli M15 pREP4 (ช่องที่ 2-5) ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (BenchMark™ protein standard); 2: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG; 3: หลังกระตุ้นด้วย IPTG; 4: supernatant; 5: cell pellet และเซลล์ E. coli BL21 Origami (DE3) (ช่องที่ 6-9) ช่องที่ 6: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG; 7: หลังกระตุ้นด้วย IPTG; 8: supernatant และ 9: cell pellet

จากนั้นได้ลองเปลี่ยนมาใช้ pGEX-4T-1 expression vector เนื่องจากภายในพลาสมิดชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีน glutathione S-transferase (GST) (ขนาดโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดาลตัน) ซึ่งอาจช่วยในการม้วนพับของโปรตีนแล้วทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน AMCase อยู่ในรูปที่ละลายได้ ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน pGEX-4T-1/hAMCase ในเซลล์แบคทีเรียถูกแสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 SDS-PAGE แสดงการแสดงออกของยีน AMCase ใน pGEX-4T-1 vector
รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สร้างโดยเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* M15 pREP4 (รูป 6A) และ E. coli BL21 Rosetta (DE3) (รูป 6B) ของโคลนที่ 1 และ 2 ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (Low MW protein standard); 2: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 3: หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 1; 4: supernatant ของโคลนที่ 1; 5: cell pellet ของโคลนที่ 1; 6: ก่อนกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2; 7: หลังกระตุ้นด้วย IPTG ของโคลนที่ 2; 8: supernatant ของโคลนที่ 2 และ 9: cell pellet ของโคลนที่ 2

จากผลการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hAMCase ดังแสดงในรูปที่ 3.6A-B พบว่า ทุกโคโลนีที่มีพลาสมิด pGEX-4T-1/*hAMCase* อยู่ สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน hAMCase ได้ดีเนื่องจากสามารถเห็นแถบเข้มของโปรตีนที่ต้องการบนแผ่นเจล SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดประมาณ 76 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นผลรวมของ โปรตีน GST (26 กิโลดาลตัน) และ AMCase (50 กิโลดาลตัน) แม้ว่าจะเปลี่ยนพลาสมิด (expression vector) และชนิดของเซลล์แบคทีเรีย (expression host) ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนแล้ว แต่โปรตีนยังอยู่ในรูปที่ไม่สามารถละลายได้ (inclusion bodies) สำหรับขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ เนื่องจากรีคอมบิแนนท์โปรตีน AMCase ได้ถูกออกแบบให้มีกรดอะมิโนฮิสทิดีนจำนวน 8 ตัว (8xHis tag) ติดอยู่ทางด้าน C-terminus ซึ่งสามารถจับแบบจำเพาะกับไอออนที่มีประจุบวกอย่างเช่นโคบอลต์หรือนิกเกิล จึงใช้หลักการนี้ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA agarose ดังแสดงในรูปที่ 3.7



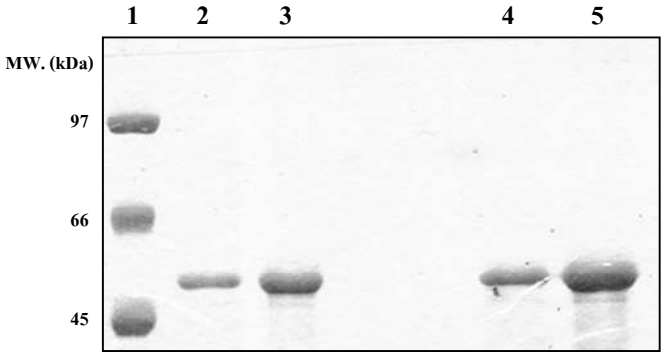
รูปที่ 3.7 การทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ni-NTA chromatography
ช่องที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (BenchMark™ protein standard) และ 2: โปรตีน AMCase ที่บริสุทธิ์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน AMCase สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ สามารถเห็นแถบของโปรตีนที่ต้องการ ซึ่งมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตันบนแผ่นเจล SDS-PAGE หลังจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิค affinity chromatogprahy โดยใช้ Ni^{2+} NTA agarose resin เป็นตัวจับเอนไซม์มีความบริสทธิ์สูงโดยเห็นเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนแผนเจลที่ทำการแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค SDS-PAGE การตรวจหาแคติวิตี้โดยใช้ pNP-GlcNAc2 เป็นสับสเตรทพยว่าเอนไซม์ hAMCase บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากระบบ E. coli มีแอคติวิตี้น้อยมากทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์อาจอยู่ในโครงรูปที่ไม่เหมาะสม ซึ่งในการศึกษาต่อไปจะต้องเปลี่ยนระบบการแสดงออกในระบบ mammalian cell line อย่างไรก็ตามโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้สามารถใช้เป็น immunogen เพื่อการผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ต่อไปได้

3.3. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

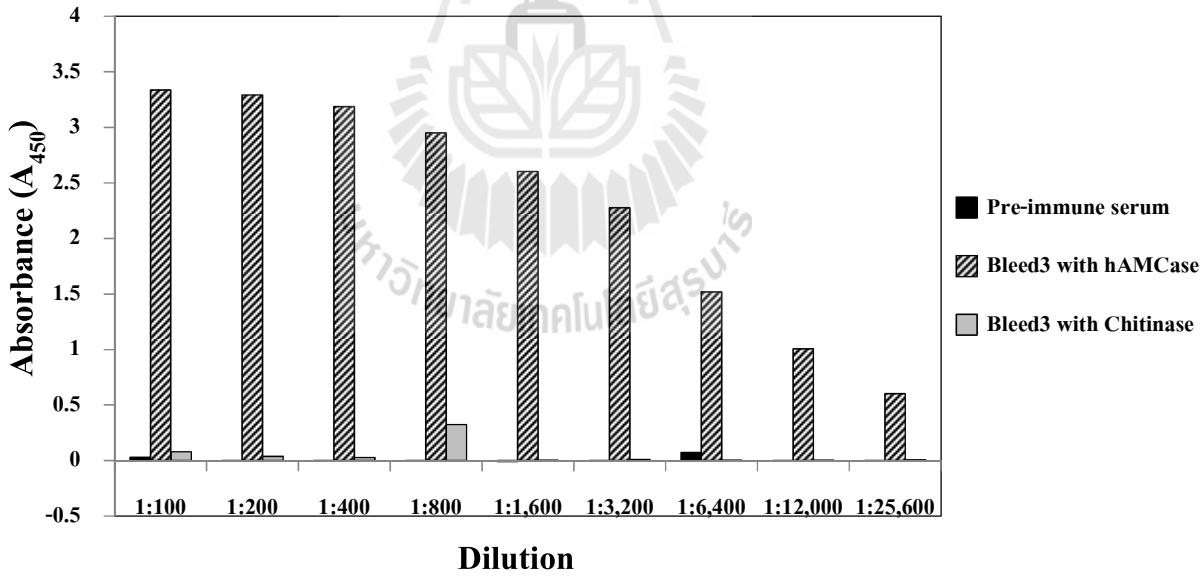
ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้มีการสร้าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการนั้น แอนติเจนที่เตรียมมีความจำเป็นต้องเป็นแอนติเจนที่บริสุทธิ์ ในงานวิจัยนี้กลุ่มผู้วิจัยได้เตรียมเอนไซม์ hAMCase ซึ่งได้จากการเตรียมโดยระบบของแบคทีเรียดังที่กล่าวไว้ในส่วนของการเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวเป็นแอนติเจนสำหรับใช้กระตุ้นสัตว์ทดลอง เนื่องจากเอนไซม์ที่เตรียมได้อยู่ในรูป inclusion body คือไม่ละลายแต่อยู่ในรูปที่เกาะกันเป็นตะกอน ผู้วิจัยจึงได้ละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้ดังกล่าวด้วยสารละลาย 8M Urea และเพื่อป้องกันความเป็นพิษของยูเรียที่จะมีต่อสัตว์ทดลอง ก่อนการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองเอนไซม์ได้มีการทำ dialysis เพื่อลดความเข้มข้นของสารละลายยูเรียเป็น 2 M ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่เอนไซม์ไม่สามารถตกตะกอนก่อนนำไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ซึ่งในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เป็นสัตว์ทดลอง โดยความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ hAMCase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มาก ดังแสดงในรูปที่ 3.8 พบว่าเอนไซม์มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 50 kDa และพบว่ามีความบริสุทธิ์เพียงพอหลังการเปลี่ยนความเข้มข้นของยูเรีย ในการผลิตแอนติบอดี ได้นำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นซึ่งการนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทำให้เข้มข้นขึ้นเป็นการลดปริมาตรของตัวอย่างที่จะใช้ฉีดสัตว์ทดลองซึ่งไม่ควรเกิน 1 มิลลิลิตร ในที่นี้ผู้วิจัยได้ฉีดเอนไซม์ที่เตรียมได้ 250 μg ต่อครั้งโดยวิธีการฉีดกระตุ้นได้อธิบายไว้ในส่วนของวิธีดำเนินการวิจัย

หลังฉีดกระต่ายด้วยเอนไซม์ไคติเนสครบสามครั้ง ทำการเก็บเลือดครั้งสุดท้าย และนำมาตรวจวัดการสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสในคนเทียบกับน้ำเลือดก่อนการฉีดกระตุ้นโดยวิธี indirect ELISA เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้จากระบบของแบคทีเรียนี้มีกรดอะมิโน histidine ติดอยู่ที่ปลายคาร์บอกซิลเพื่อความสะดวกสำหรับการแยกบริสุทธิ์โปรตีน ดังนั้นเพื่อป้องกันว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นจำเพาะต่อเอนไซม์ที่ฉีดให้แก่กระต่าย และไม่จับกับสายของกรดอะมิโน Histidine ผู้วิจัยจึงได้ใช้เอนไซม์ bacterial chitinase-His มาใช้เป็นเปรียบเทียบด้วย ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 3.9 ซึ่งพบว่ากระต่ายมีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณสูงซึ่งเมื่อเจือจางแอนติซีรั่มกระต่ายไปจนถึง 1:25,600 ยังสามารถวัดระดับของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสในคนได้สูงเมื่อเทียบกับ pre-immune serum และไม่จับกับโปรตีน Histidine tag เนื่องจากไม่สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แสดงว่ากระต่ายมีการตอบสนองต่อเอนไซม์ที่ฉีดกระตุ้นและผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ได้



รูปที่ 3.8 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ hAMCase ก่อนใช้ฉีดสัตว์ทดลอง

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ hAMCase หลังเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายตัวกลายเป็น 2 M Urea โดย 10% SDS-PAGE ในสภาวะ reducing ช่องที่ 1 และ 2 เป็นเอนไซม์ไคติเนสในคนปริมาณ 5 μg และ 10 μg ตามลำดับ หลังการเปลี่ยนความเข้มข้นของยูเรีย และช่องที่ 3 และ 4 เป็นเอนไซม์ hAMCase ปริมาณ 5 μg และ 10 μg ตามลำดับ หลังการเปลี่ยนความเข้มข้นของยูเรีย และนำมาทำให้เข้มข้นขึ้น ส่วนช่องที่หนึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบขนาดของเอนไซม์

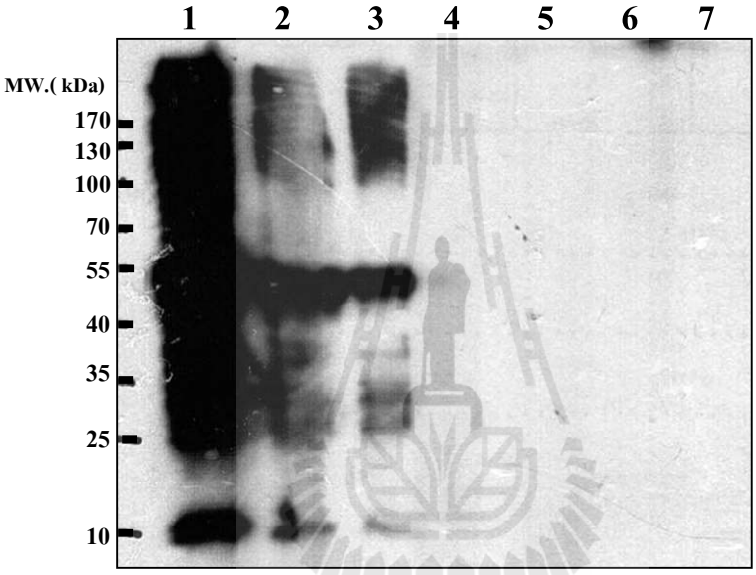


รูปที่ 3.9 กราฟแสดงผลของ indirect ELISA เพื่อหาตรวจสอบแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

ซีรั่มจากเลือดกระต่ายที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วยเอนไซม์ hAMCase จากการเจาะเก็บครั้งที่ 3 เจือจางด้วยสารละลาย PBS ที่ความเข้มข้นต่างๆ และวัดระดับการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

3.4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากโพลีโคลนอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงมาก ซึ่งสามารถสังเกตได้จากผลของการวัดหาระดับของแอนติบอดีในซีรั่มโดยวิธี indirect ELISA ในหัวข้อ 3.3 คณะผู้วิจัยจึงทำการไตเตรทหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานจริงโดยวิธี Western blot จากผลการทดลองในรูปที่ 3.10 ได้เจือจางซีรั่มทั้งหมด 3 ความเข้มข้น คือ ที่ 1:20,000 1:40,000 และ 1:80,000 พบว่าการเจือจางโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยอัตราส่วน 1:80,000 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อมติดเอนไซม์ไคติเนสในคน (hAMCase) ในขณะที่การย้อมด้วย pre-immune serum ที่ความเข้มข้นเดียวกันนั้นไม่พบแถบโปรตีนใด ๆ เกิดขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นนี้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สำหรับวิธี Western blot ต่อไป

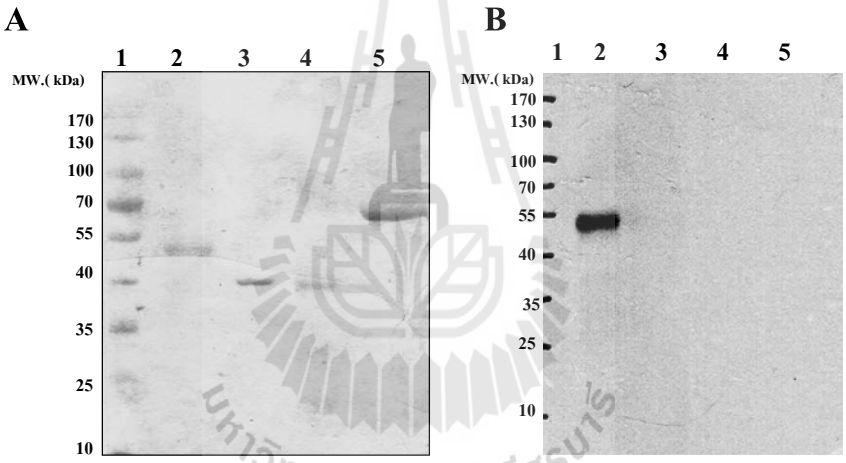


รูปที่ 3.10 Western blot แสดงการไตเตรทความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

เอนไซม์ hAMCase (2 μg/lane) ถูกแยกโดย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing ย้ายโปรตีนลงบน nitrocellulose membrane ก่อนย้อมด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase โดย lane 1 2 และ 3 เป็นการย้อมด้วยแอนติซีรั่มที่เจือจางด้วย blocking buffer ด้วยอัตราส่วน 1:20,000 1:40,000 และ 1:80,000 ตามลำดับ ส่วน lane 4-6 เป็นการย้อมด้วย pre-immune serum ด้วยอัตราส่วนเช่นเดียวกัน lane 1-3 ส่วน lane 7 เป็น conjugate control ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody ด้วยอัตราส่วน 1:20,000 และก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system (n=2)

3.5. การทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีต่อเอนไซม์ hAMCase

จากหัวข้อที่ 3.4 เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase สำหรับใช้วิเคราะห์โดยวิธี Western blot ในการตรวจสอบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase หรือไม่ จึงได้ทำการทดสอบโดยนำเอาเอนไซม์ และโปรตีนเหมือนไคติเนสเอนไซม์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ family 18 glycosyl hydrolase (GH-18) คือ เอนไซม์ bacteria chitinase A โปรตีน YKL-39 และโปรตีน YKL-40 มาแยกด้วย SDS-PAGE เทียบกับเอนไซม์ hAMCase ซึ่งโปรตีนทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นโปรตีนที่ได้จากการแสดงออกในระบบของแบคทีเรียทั้งสิ้น จากนั้นทำ Western blot โดยการย้อมโปรตีนดังกล่าวมาข้างต้นด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตได้ที่เจือจางแล้วที่ความเข้มข้น 1:80,000 โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.11 พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase จับกับเอนไซม์ hAMCase ในช่องที่ 2 เท่านั้น ดังสังเกตได้จากแถบโปรตีนที่ปรากฏขึ้นโดยมีขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งเป็นขนาดของเอนไซม์ hAMCase และไม่มีแถบโปรตีนอื่นๆ ปรากฏขึ้น ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase เท่านั้นและสามารถนำไปศึกษาและใช้งานได้



รูปที่ 3.11 SDS-PAGE และ Western blot แสดงความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

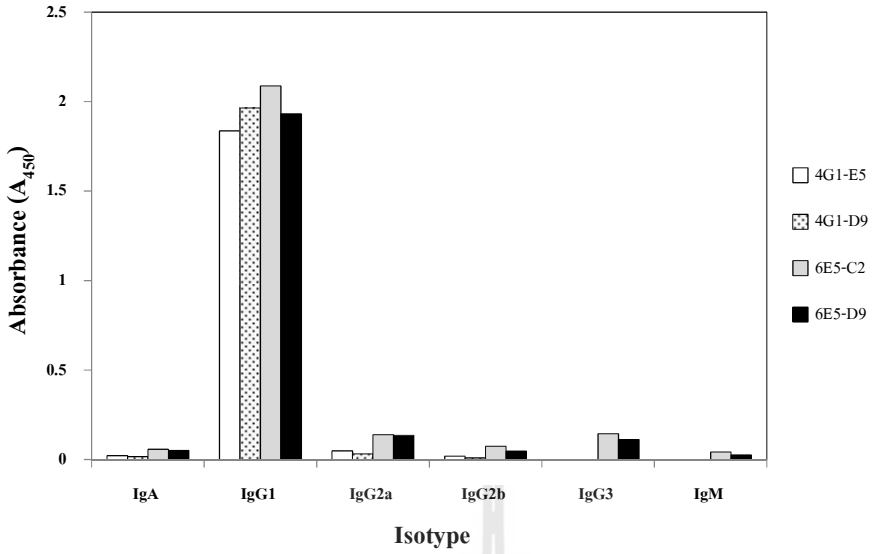
รูป A แสดงการแยกโปรตีนโดย 10% SDS-PAGE รูป B คือ Western blot แสดงการย้อมโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase ที่ความเข้มข้น 1:80,000 ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody ด้วยอัตราส่วน 1:20,000 และก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system ช่องที่ 1 เป็นโปรตีนมาตรฐาน ช่องที่ 2 คือ hAMCase ช่องที่ 3 คือ YKL-39 ช่องที่ 4 YKL-40 และช่องที่ 5 คือ bacterial chitinase A โดยแต่ละช่องมีปริมาณโปรตีน 2 μg (n=2)

3.6. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase

ผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสของคน โดยการกระตุ้นหนู Balb/cMlac โดยใช้ recombinant hAMCase ที่สร้างโดยระบบของแบคทีเรียเป็นแอนติเจน จากแหล่งเดียวกันกับการสร้างโพลีโคลนอล

แอนติบอดี นำหนูที่ผลิตแอนติบอดีในซีรั่มแล้วมาฆ่าและแยกเอาเฉพาะ ม้ามซึ่งมีส่วนของบีลิมโฟไซต์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไคติเนสของคน หลังจากนำเซลล์ดังกล่าวมาผสมและเชื่อมเข้ากับ myeloma cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของหนูโดยวิธี Hybridroma technique (31) ซึ่งใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นสารที่เชื่อมผิวเซลล์ทั้งสองชนิดเพื่อให้เป็นเซลล์เดียวกัน นำเซลล์ลูกผสมที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา Aminopterine ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งกระบวนการสังเคาะห์สารนิวคลีโอไทด์แบบ de novo pathway ซึ่งเป็นวิถีหลักที่ Myeloma cell ใช้ในการสังเคราะห์สารนิวคลีโอไทด์เพื่อการเจริญ เนื่องจาก Myeloma cell ไม่มีระบบของ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ myeloma ที่ไม่ได้เชื่อมติดกับ spleenocytes จะตาย ส่วน spleenocyte ที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดกับ myeloma cell นั้น ถึงแม้จะมีการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งแบบ de novo pathway และ salvage pathway แต่เนื่องจากเป็นเซลล์ธรรมดาที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งจึงมีอายุได้ไม่นานและตายไปในที่สุด ดังนั้นเซลล์ที่จะอยู่ได้และมีการเจริญเติบโตในหลุม คือเซลล์ที่มีการเชื่อมกันระหว่าง spleenocytes และ mouse myeloma เรียกเซลล์กลุ่มนี้ว่า เซลล์ลูกผสม (hybridoma cells)

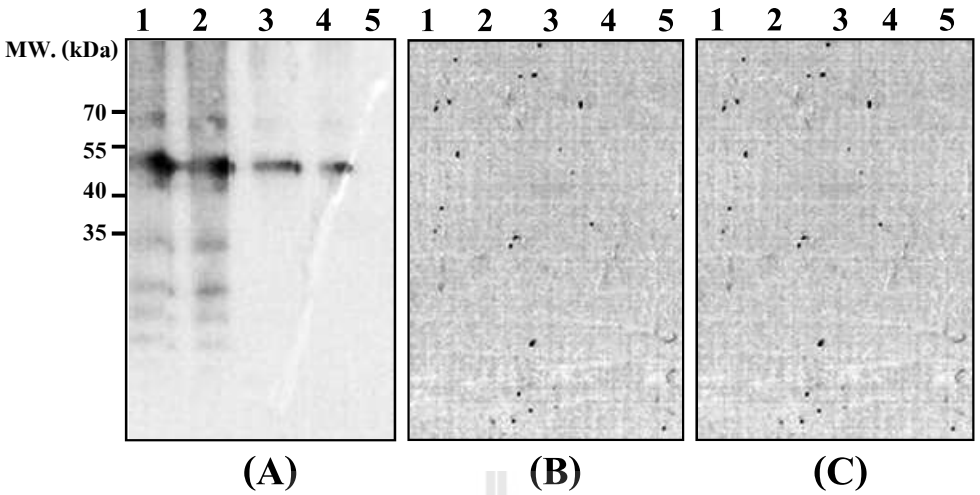
หลังจากปล่อยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตพบว่าจากการเติมเซลล์เริ่มต้นหลังการทำ fusion จำนวนทั้งสิ้น 999 หลุม หลังคัดเลือกโดยการเติมยา Aminopterine ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีจำนวนหลุมที่มีเซลล์เจริญเติมโตทั้งสิ้น 209 หลุม คิดเป็น 20.9% ของเซลล์เริ่มต้นทั้งหมด (% fusion) และเนื่องจากเซลล์ที่เจริญเติบโตเป็นเซลล์ที่เกิดจากการนำเอา spleenocyte ทั้งหมดของหนูมาเตรียมเซลล์ลูกผสม ดังนั้นอาจมีเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีชนิดอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการคัดเลือก hybridoma cells ที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase เท่านั้นโดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมที่มีเซลล์เจริญเติบโตอยู่มาตรวจวัดหาแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA เมื่อเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมเซลล์ลูกผสมมาตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase โดยวิธี indirect ELISA ตามที่ได้อธิบายไว้ในวิธีดำเนินการวิจัย พบว่ามีเพียง 24 หลุมที่พบมีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase ซึ่งคิดเป็น 11.5% ของจำนวนเซลล์ลูกผสมที่ได้ นำเซลล์แต่ละหลุมมาแยกเลี้ยงโดยวิธี single cell cloning เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ลูกผสมที่ได้นั้นมาจาก spleenocytes โคลนเดียวเท่านั้น ซึ่งหลังจากทำการทำ single cell cloning คณะผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะได้จำนวน 4 โคลน คือ 4G1-E5 4G1-D9 6E5-C2 และ 6E5-C9 โดยทุกโคลนเป็นชนิด IgG1 isotype หลังการตรวจวิเคราะห์ด้วย capture ELISA ผลแสดงดังรูปที่ 3.12



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงผลการตรวจหาชนิด isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase โดยวิธี capture ELISA อาหารเลี้ยงเซลล์ลูกผสมทั้งโคลน 4G1-E5 4G1-D9 6E5-C2 และ 6E5-C9 ที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase มาทดสอบหา isotype โดยวิธี capture ELISA

3.7. การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีต่อเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตจาก *E. coli*

จากผลการตรวจหาโคลนของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase ในเบื้องต้นโดยวิธี indirect ELISA นั้นผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ได้ จำนวน 4 โคลน แต่ไม่ทราบว่าแอนติบอดีดังกล่าวนั้นสามารถจับได้กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ด้วยหรือไม่ โดยเฉพาะโปรตีนในกลุ่มใกล้เคียงกันเช่นในกลุ่มของ family 18 glycosyl hydrolase วิจัยจึงได้ทำหารตรวจสอบเช่นเดียวกับกรณีของการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ hAMCase โดยวิธี Western blot โดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกปล่อยออกมาโดยเซลล์แต่ละโคลนมาย้อมแผ่นแมมแบรนที่มีโปรตีน YKL-39 Chitinase A และ hAMCase ผลการทดลองในรูปที่ 3.13 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน คือ 4G1-E5 4G1-D9 6E5-C2 และ 6E5-C9 จับได้เฉพาะเอนไซม์ hAMCase โดยสังเกตได้จากการปรากฏแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 kda เกิดขึ้นบนแผ่นแมมแบรนที่มี hAMCaseในขณะที่แผ่นแมมแบรนที่มีโปรตีน YKL-39 และ chitinase A ไม่พบแถบโปรตีนใดๆ เกิดขึ้น จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 โคลนนี้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase เท่านั้น และสามารถนำแอนติบอดีดังกล่าวไปใช้งานต่อไปได้



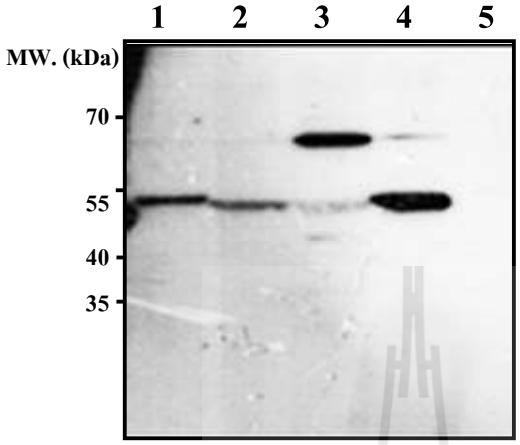
รูปที่ 3.13 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase

เอนไซม์ hAMCase (A) โปรตีน YKL-39 (B) และ เอนไซม์ Chitinase A (C) ปริมาณ 2μg ถูกนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing ถ่ายโปรตีนบนแผ่น nitrocellulose membrane และย้อมโปรตีนด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G1-E5 (1) 4G1-D9 (2) 6E5-C2 (3) 6E5-C9 (4) และบัฟเฟอร์สำหรับเป็น conjugated control (5) ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 และก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system

3.8. การตรวจหาความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase ที่แสดงออกใน mammalian cell

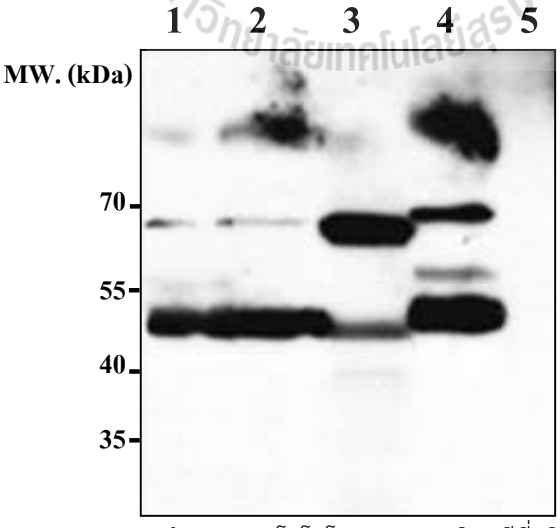
ในขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase นั้นคณะผู้วิจัยได้ใช้ recombinant hAMCase ซึ่งผลิตโดยระบบแบคทีเรีย เนื่องจากง่ายต่อการผลิตแอนติเจนเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง โดยข้อจำกัดของการใช้โปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียเป็นสารอิมมูโนเจนคือในระบบแบคทีเรียไม่มีขั้นตอน posttranslational modification ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้อาจไม่สามารถจับได้กับเอนไซม์ที่พบในเซลล์คนจริงๆ เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถจับได้กับเอนไซม์ hAMCase ที่พบในเซลล์คนจริงๆ จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่าพบเอนไซม์ hAMCase ในเซลล์ macrophage คณะผู้วิจัยจึงได้นำ monocytic cell line 2 ชนิด คือเซลล์ THP1 และ U937 ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในกลุ่มของ macrophage มาใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ hAMCase ผลการทดลองในการศึกษาในเซลล์ THP-1 แสดงดังรูปที่ 3.14 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 4 โคลนสามารถจับได้กับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 kDa เช่นเดียวกับ hAMCase ที่ได้จากแบคทีเรีย และเป็นที่น่าสนใจว่าโคลน 6E5-C2 และ 6E5-C9 สามารถจับได้กับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 68 kDa โดยเฉพาะ โคลน 6E5-C2 มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าที่แถบโปรตีนขนาด 50 kDa และเมื่อใช้เซลล์ U937 สำหรับเตรียม cell lysate พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนสามารถย้อมติดโปรตีนที่ขนาดประมาณ 68 kDa เช่นเดียวกับกรณีของ

เซลล์ THP-1 ดังแสดงในรูปที่ 3.15 สันนิษฐานว่าโปรตีนที่ขนาด 68 kDa อาจจะเป็นเอนไซม์ในรูปที่มีน้ำตาลมาเกาะอยู่ ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในยาปฏิชีวนะ Tunicamycin ซึ่งเป็นยาที่ยับยั้งการเติมน้ำตาลให้แก่โปรตีนที่สร้างใหม่ใน endoplasmic reticulum ดังนั้นโปรตีนทุกชนิดในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของยานี้จะไม่สามารถเติมน้ำตาลได้



รูปที่ 3.14 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase ใน THP-1 cell

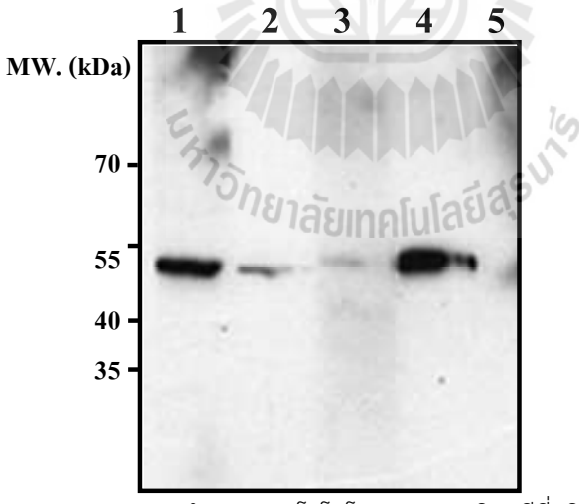
THP-1 cell lysate ถูกนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing และWestern blot ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-E5 (1) 4G1-D9 (2) 6E5-C2 (3) 6E5-C9 (4) และบัฟเฟอร์สำหรับเป็น conjugated control (5) ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 และก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system



รูปที่ 3.15 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase จากเซลล์ U937

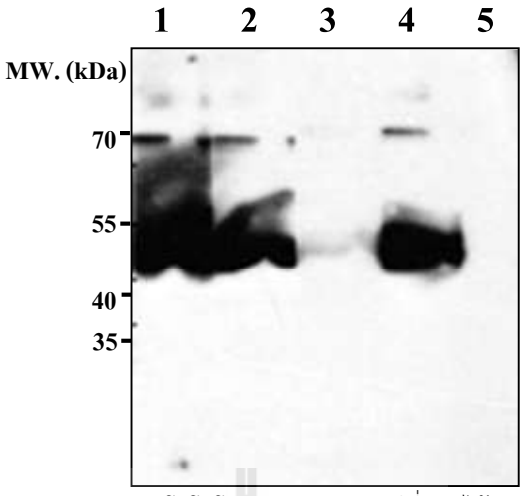
U937 cell lysate ถูกนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing และWestern blot ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-E5 (1) 4G1-D9 (2) 6E5-C2 (3) 6E5-C9 (4) และบัฟเฟอร์สำหรับเป็น conjugated control (5) ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 และก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system

โดยในการทดลองแสดงในรูปที่ 3.15 หลังจากที่มีการเติม Tunicamycin ให้แก่เซลล์แล้วนำเซลล์ดังกล่าวมาเตรียม cell lysates สำหรับทำ Western blot กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนพบว่าแถบโปรตีนขนาด 68 kDa ที่เคยปรากฏหลังการย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6E5-C2 และ 6E5-C9 หายไปดังแสดงในรูปที่ 3.16 และในรูปที่ 3.17 ซึ่งโดยเฉพาะโคลน 6E9-C2 ไม่สามารถตรวจหาแถบโปรตีนที่มีขนาด 68 kDa และ แถบจางๆ ที่ขนาด 50 kDa สันนิษฐานว่าโคลน 6E5-C2 จับได้ดีในรูปที่มีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะอยู่ จากผลการทดลองที่ได้ สามารถสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนที่ผลิตได้สามารถจับกับเอนไซม์ hAMCase ในรูปที่อยู่ในธรรมชาติได้จริง และสามารถพิสูจน์ได้ว่าเอนไซม์ hAMCase ที่ได้จากเซลล์ THP-1 และ U937 นั้นอยู่ในรูปที่มีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะอยู่ (glycosylated form) ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกที่ยังไม่มีผลงานใดๆ ได้รายงานไว้ก่อน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดที่ผลิตได้นี้จึงมีคุณค่าและสามารถนำไปใช้ศึกษาหน้าที่และคุณสมบัติของเอนไซม์ hAMCase ในเซลล์ได้จริง อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวจำเป็นต้องทำซ้ำ และผู้วิจัยจะใช้เอนไซม์ N-glycosidase F ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดโมเลกุลของน้ำตาลที่เกาะอยู่กับโปรตีนแบบ N-glycosylation เพื่อยืนยันว่าเอนไซม์ hAMCase ในรูปธรรมชาติมีโมเลกุลของน้ำตาลเกาะอยู่ ซึ่งในส่วนนี้จะทำในการศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 3.16 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase จากเซลล์ THP-1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม Tunicamycin

เลี้ยงเซลล์ THP-1ในภาวะที่มี Tunicamycin 5 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาเตรียมเป็น cell lysate และนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing และ Western blot ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-E5 (1) 4G1-D9 (2) 6E5-C2 (3) 6E5-C9 (4) และบัฟเฟอร์สำหรับเป็น conjugated control (5) ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000

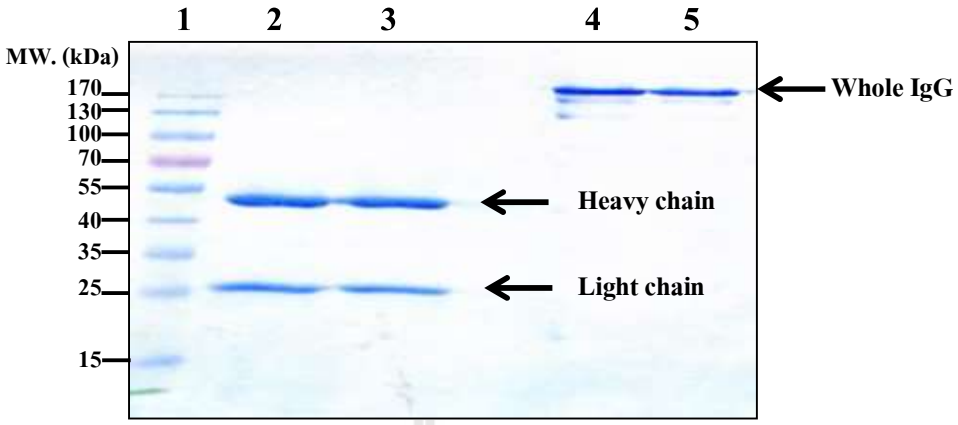


รูปที่ 3.17 Western blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อเอนไซม์ hAMCase จากเซลล์ U937 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการเติม Tunicamycin

เลี้ยงเซลล์ U937ในภาวะที่มี Tunicamycin 5 μg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนนำมาเตรียมเป็น cell lysate และนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing และWestern blot ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-E5 (1) 4G1-D9 (2) 6E5-C2 (3) 6E5-C9 (4) และบัฟเฟอร์สำหรับเป็น conjugated control (5) ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000

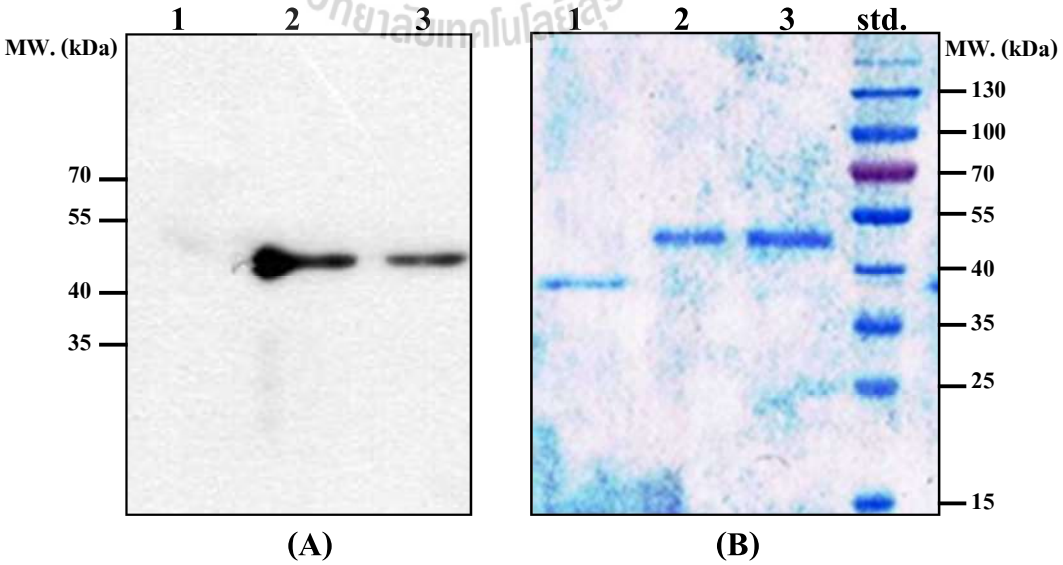
3.9. การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-D9

หลังจากที่ทราบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase ทั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียและจาก mammalian เซลล์ ผู้วิจัยได้เลือกเอาโมโนโคลนนอลโคลน 4G1-D9 มาทำการแยกบริสุทธิ์เพื่อนำจะเอาไว้ใช้งานในการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของเอนไซม์ hAMCase ต่อไป โดยหลังจากทำการแยกบริสุทธิ์โดย Protein G affinity chromatography ดังอธิบายในวิธีดำเนินการวิจัย โดยหลังการแยกบริสุทธิ์และวัดระดับปริมาณแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี BCA assay พบว่าจากปริมาณ Ascitic fluid เริ่มต้นปริมาตร 300 ไมโครลิตรสามารถแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ปริมาณรวมจาก 2 fraction ทั้งสิ้น 1.043 มิลลิกรัม ซึ่งถือว่าได้ปริมาณมากพอสำหรับเก็บไว้ใช้ศึกษาต่อ โดยเมื่อนำทั้ง 2 fraction มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing และ non reducing ดังแสดงในรูปที่ 3.18 พบว่าแอนติบอดีที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูงโดยในภาวะ reducing จะปรากฏแถบโปรตีนของ heavy chain ของ immunoglobulin ที่ขนาดประมาณ 55 kDa และ light chain ของ immunoglobulin ที่ขนาดประมาณ 25 kDa ตามลำดับ ส่วนในภาวะ non reducing พบเฉพาะแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 150 kDa ซึ่งเป็นขนาดของ immunoglobulin ทั้งโมเลกุล



รูปที่ 3.18 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 4G1-D9
วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G1-D9 ปริมาณ 5 μg ต่อหลุม หลังการแยกบริสุทธิ์ ด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing (1:fraction 1, 2: fraction 2) และภาวะ non reducing (3: fraction 1, 4: fraction 2) และทำการย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilant blue

เมื่อได้แอนติบอดีที่บริสุทธิ์และ คณะผู้วิจัยได้นำแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบว่า แอนติบอดีดังกล่าวยังสามารถจับกับเอนไซม์ hAMCase ได้อยู่หรือไม่โดยการทำ Western blot และรียบเทียบกับการจับกับโปรตีน YKL-40 โดยจากผลการทดลองใน**รูปที่ 3.19** พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แยกบริสุทธิ์แล้วสามารถจับได้จำเพาะกับเอนไซม์ hAMCase แต่ไม่จับกับโปรตีน YKL-40 ดังนั้นจากผลการแยกบริสุทธิ์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ hAMCase โคลน 4G1-D9 ผู้วิจัยสามารถแยกแอนติบอดีได้บริสุทธิ์ในปริมาณมาก และสามารถนำไปใช้ติดตามศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ hAMCase ในเซลล์ต่อไปในอนาคตได้



รูปที่ 3.19 แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4G1-D9 หลังผ่านการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatograph

โปรตีน YKL-40 (1) เอนไซม์ hAMCase ใน 2M urea (2) และ เอนไซม์ hAMCase ในสารละลาย PBS (3) ปริมาณ 2 μg ถูกนำมาแยกด้วย 10%SDS-PAGE ในภาวะ reducing แสดงในรูป A โปรตีนถูกนำไปไว้บนแผ่น nitrocellulose membrane และย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4G1-D9 ย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody ด้วยอัตราส่วน 1:5,000

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

4.1. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการแยกยีน human chitinase (huAMCase) isoform 1 โดยใช้ human cDNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ต่อมาทำการแยกยีนที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิค PCR ขนาด 1.4 kb เข้าสู่ pQETri system vector แล้วทำการผลิตเอนไซม์ hAMCase ในระบบ *E. coli* M14 PREP ได้สำเร็จ โปรตีนที่ผลิตได้ใน E. coli มีขนาด 50 kDa ซึ่งตรงตามน้ำหนักโมเลกุลที่ทำนายไว้ เอนไซม์ที่ผลิตได้อยู่ในรูป inclusion body ที่ต้องละลายด้วย 8M Urea แล้วทำให้อยู่ในสภาพที่สามารถนำไปศึกษาต่อได้

โดยการลดความเข้มข้นของยูเรียลงเป็น 2M หลังจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยเทคนิค affinity chromatography โดยใช้ Ni^{2+} NTA agarose resin เป็นตัวจับ หลังการทำบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์มีความบริสทธิ์สูงโดยสังเกตุจากแถบโปรตีนเดี่ยวเท่านั้นบนแผนเจลที่ทำการแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค SDS-PAGE การตรวจหาแอคติวิตี้พบว่าเอนไซม์ hAMCase ที่ผลิตจาก *E. coli* มีแอคติวิตี้น้อยแต่มีความเหมาะสมในการนำเตรียมเป็น immunogen ในการผลิตแอนติบอดี

การศึกษาต่อมาผู้วิจัยได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ hAMCase ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายพบว่า antisera ที่ได้จากการกระตุ้นด้วย hAMCase มีความไวสูงโดยสามารถให้สัญญาณการตรวจวัดที่ระดับความเจือจางถึง 1:25,600 เท่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะต่อ hAMCase สูงและไม่ทำปฏิกิริยา cross-reaction กับโปรตีนอื่นที่อยู่ในกลุ่ม GH-18 glycosyl hydrolases เหมือนกันและมีลำดับของกรดอะมิโนใกล้เคียงกัน เช่น hYKL-39 hYKL-40 และ bacterial chitinase A

ในการวางแผนการศึกษาบทบาทของเอนไซม์ hAMCase ในผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ในอนาคตมีความจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์ที่ผลิตจาก *E. coli* โดยเทคนิค hybridoma โดยทำการสร้าง hybriodoma library จากโคลนทั้งหมด 999 โคลน ได้ทำการคัดกรองหาโมโนโคลนที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ hAMCase ได้ในที่สุดทั้งหมด 4 โคลนคือโคลน 4G1-E5 4G1-D9 6E5-C2 และ 6E5-C9 การทดสอบ isotyping พบว่าโคลนทั้ง 4 เป็นชนิด IgG1 isotype เหมือนกัน โมโนโคลนทั้ง 4 มีความจำเพาะสูงโดยทำปฏิกิริยากับ hAMCase antigen อย่างเดียวแต่ไม่ทำปฏิกิริยา cross reactivity กับโปรตีนที่ใกล้เคียงอื่น ๆ ได้แก่ YKL-39 YKL-40 และ bacterial chitinase นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ทั้ง 4 โคลนสามารถจับได้กับ endogenous hAMCase ที่สร้างจาก monocytic cell line 2 ชนิด คือเซลล์ THP1 และ U937 ได้ โดยเฉพาะโคลน 6E5-C2 และ 6E5-C9 ยังสามารถจับได้กับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 68 kDa ซึ่งเป็น glycosylated form ของ hAMCase อีกด้วย โดยสรุป ผลการทดลองที่ได้รับในการศึกษานี้มีความสำคัญในการที่จะนำไปสู่การศึกษาบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ hAMCase ต่อพยาธิสภาพของโรคภูมิแพ้หรือการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดหาระดับของเอนไซม์ hAMCase เพื่อทำนายการดำเนินไปของโรคโดยวิธีทาง immunosensor ต่อไป

4.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

บรรณานุกรม

1. Papavizas CG. (1985) Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23, 23-54.

2. Cabib E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol. 59-101.

3. Kuranda M, and Robbins PW. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 266, 19758-19767.

4. Srivastava AK, Defago G, and Boller T. (1985) Secretion of chiti-. nase by Aphanocladium album, a hyperparsite of wheat. Experientia. 41, 1612-1613.

5. Sivan A, and Chet I. (1989) Degradation of fungal cell walls by lyric. enzymes of Trichoderma harzianum. J. Gen. Microbiol. 135, 675-682.

6. Jeuniaux C. (1966) Chitinases. Methods Enzymol. 8, 644-650.

7. Okutani K. (1977) Int. Confer. Chitin/Chitosan, Boston MA (USA), April11th-13th, 1977, 554-562.

8. Okutani K, Sawada T, and Kimata M. (1967) Studies on chitinolytic enzyme present in aquatic animals-VI. The chitinolytic enzyme present in rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 33, 952-955.

9. Spindler-Barth, M. (1993) Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Chitin Enzymology (Muzzarelli, RAA, ed.), European Chitin Society, Italy, 75-82.

10. Boller T, Gehri A, Mauch F, and Vogeli U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. Planta 157, 22-31.

11. Pleban S, Chernin L, and Chet I. (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of Bacillus cereus. Lett Appl. Microbiol. 25, 284-288.

12. de Jong AJ, Cordewener J, lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerchhove J, van Kammen A, and de Vries SC. (1992) A Carrot Somatic Embryo Mutant Is Rescued by Chitinase. Plant Cell 4, 425-433.

13. Keyhani NO, and Roseman S. (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 1473, 108-122.

14. Hirono I, Yamashita M, and Aoki T. (1998) Note: molecular cloning of chitinase genes from Vibrio anguillarum and V. parahaemolyticus. J. Appl. Microbiol. 84, 1175-1178.

15. Suginta W, Robertson PA, Austin B, Fry SC, and Fothergill-Gilmore LA. (2000) Chitinases from Vibrios: activity screening and purification of chi A from Vibrio carchariae. J. Appl. Microbiol. 289, 76-84.

16. Tsai ML, Liaw SH, and Chang NC. (2004) The crystal structure of Ym1 at 1.31 A resolution. J Struct Biol. 148, 290-296.

17. Sun YJ, Chang NC, Hung SI, Chang AC, Chou CC, Hsiao CD. (2001) The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. J Biol Chem. 276, 17507-17514.

18. Donnelly LE, and Barnes PJ. (2004) TRENDS in Pharmacological Sci. 25, 509-511.

19. Chatterjee R, Batra J, Das S, Sharma SK, and Ghosh B. (2008) Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. J Allergy Clin Immunol. 122, 202-208.

20. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, Hamid Q, and Elias JA. (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. Science. 304, 1678-16782.

21. Wills-Karp M, and Karp CL. (2004) Chitin checking -- novel insights into asthma. N. Engl. J. Med. 351, 1455-1457.

22. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Bliek J, de Meulemeester TMAMO, Mannens, MMAM, and Aerts JMFG. (1998) The human chitotriosidase gene. J. Biol. Chem. 273, 25680–25685.

23. Boot RG, Blommaart EFC, Swart E, van der Vlugt KG, Bijl N, Moe C, Place A, and Aerts JMFG. (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase276, 6770–6778.

24. Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM, and van Aalten DM. (2002) Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. J Biol Chem. 277, 25537-25544.

25. Barone R, Sotgiu S, and Musumeci S. (2007) Plasma chitotriosidase in health and pathology. Clin Lab. 53, 321-333. Review.

26. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, and Mizoguchi E. (2007) Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions Keio J Med. 56, 21-27. Review.

27. Mizoguchi E, and Mizoguchi A. (2007) Is the sugar always sweet in intestinal inflammation? Immunol Res. 37, 47-60. Review.

28. Dupont J, Tanwar MK, Thaler HT, Fleisher M, Kauff N, Hensley ML, Sabbatini P, Anderson S, Aghajanian C, Holland EC, and Spriggs DR. (2004) Early detection and prognosis of ovarian cancer using serum YKL-40. J Clin Oncol. 22, 3330-3339.

29. Dehn H, Høgdall EV, Johansen JS, Jørgensen M, Price PA, Engelholm SA, and Høgdall CK. (2003) Plasma YKL-40, as a prognostic tumor marker in recurrent ovarian cancer. Acta Obstet Gynecol Scand. 82, 287-293.

30. Khunkaewla P, S. Chiampanichayakul, et al. (2007) "Production, characterization, and functional analysis of newly established CD99 monoclonal antibodies MT99/1 and MT99/2." Hybridoma (Larchmt) 26, 241-250.

31. Kohler G, and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.

ภาคผนวก ก

ผลงานเผยแพร่

1. ผลงานนำเสนอในรูปโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 2 ผลงาน

- Lowhalidanon K, Meekrathok P, Thongsom S, **Suginta W**, **Khunkaewla P**. Molecular cloning, expression, and production of monoclonal antibody against acidic mammalian chitinase (AMCase). 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology - Discovery of Life Process: From Biomolecules to Systems Biology, 25-29 November 25-29, 2012, BITECH, Bangkok, Thailand
- Lowhalidanon K, Meekrathok P, Thongsom S, **Suginta W, Khunkaewla P**. Human acidic mammalian chitinase (AMCase); molecular cloning, protein expression, and production of monoclonal antibody. The 8th International Symposium of the Protein Spcoety of Thailand, 5-7 August, 2013, Chulabhorn Research Institute Convention Center, Thailand, P48

2. ผลงานที่กำลังรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน

Lowhalidanon K, Meekrathok P, Thongsom S, Suginta W, Khunkaewla P. Molecular Cloning, Expression, and Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies against Acidic Mammalian Chitinase. Manuscript in preparation to submit to Antib Immunodiagn Immunother.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข
ประวัติผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง วิภา นามสกุล สุจินต์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Wipa Suginta

2. หมายเลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2201 00491 912

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร. ด้าน ชีวเคมี

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม.เทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 44 223968 โทรสาร 44 223195 e-mail wipa@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

2541-2543 ปฏิบัติงานวิจัยหลังปริญญาเอก โดยรับทุนวิจัย Wellcome Trust ณ ภาควิชา Biomedical Sciences มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ เป็นเวลา 18 เดือน

2538-2541 ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัย Edinburgh ประเทศอังกฤษ

2533-2536 ปริญญามหาบัณฑิต (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

2530-2533 ปริญญาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของเอนไซม์และโปรตีนที่เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

7.3 รางวัลผลงานวิจัยระดับชาติ/นานาชาติ

2014 “**2014 Prof. MR. Jisnuson Svasti BMB Award**” from The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King

2013 “**2013 TRF-CHE-Scopus Researcher Award**” from The Thailand Research Fund

2009-2012 “**Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers**” from The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany.

2010 “**Outstanding Research Award**” from Suranaree University of Technology.

2006 Suranaree University of Technology Award for “**Outstanding Academic Performance in Science**”

2005 “**For Women in Science Fellowship**” from L’OREAL/UNESCO Thailand.

2003 “**Visiting Scientist Fellowship**” from the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany.

1999-2000 “**Wellcome Trust fellowship**” for Postdoctoral Research Study at The Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

1995-1999 “**Royal Thai Government Ph.D. Scholarship**” from the Royal Thai Government to carry out a Ph.D. study in United Kingdom.

7.4 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. **Suginta W***, Schulte A, Mahendran KR, Aunkham A, Chumjan W, Winterhalter M (2014) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: Effects of transmembrane voltage and N-acetyl functionality on translocation of chitin oligosaccharides. Under revisions for **Biophys J.**
2. Chaocharoen W, **Suginta W**, Ranok A, Limbut W, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A***** (2014) Electrochemical immunosensing of human YKL-40, a mammalian chitinase-like protein and disease marker. **Bioelectrochem.** In Press.
3. Sirimontree P, **Suginta W***, Sritho N, Kanda Y, Shinya S, Ohnuma T, and Fukamzo T*. (2014) Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of a family GH18 chitinase. **Biosci Biotech Biochem**. In press.
4. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W*** (2014) *Bps*Omp38 porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. **PLos One.** 9:e95918.
5. Ranok A, Khunkaewla P, **Suginta W*** (2013) Human cartilage chitinase 3-like protein 2: Cloning, expression, production of polyclonal and monoclonal antibodies for osteoarthritis detection and identification of potential binding partners. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother (formerly Hybridoma)**. 32, 317-325.
6. **Suginta W**, Smith MF* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. **Phys Rev Lett.** 110, 238102.
7. **Suginta W**, Khunkaewla P, Schulte A* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **Chem Rev.** 113, 5458-5479.
8. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Chitoporin from *Vibrio harveyi*: A Channel with Exceptional Sugar Specificity. **J Biol Chem.** 288, 11038-11046.
9. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Janning P, Schulte A, Winterhalter M. (2013) Molecular uptake of chitooligosaccharides through chitoporin from the marine bacterium *Vibrio harveyi*. **PLoS One.** 8:e55126.
10. **Suginta W***, Sritho N. (2012) Multiple roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. **Biosci Biotech Biochem.** 76, 2275-2281.
11. Sritho N & **Suginta W*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. **App Biochem Biotech.** 166, 1192–1202.
12. Pantoom S, Vetter I*, Prinz, H*, **Suginta W*** (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. **J Biol Chem.** 286, 24312-24323.

13. **Suginta W*,** Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *Bps*Omp38 from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. **BBA-Biomembr.** 1808, 1552-1559.
14. **Suginta W***, Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T (2010) Novel β-N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification. **BMC Biochem.** 11:40. (Highly accessed)
15. Schulte A, Ruamchan S, Khunkaewla P, **Suginta W*** (2009) The outer membrane protein VhOmp from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. **J Membr Biol.** 230, 101-111.
16. **Suginta W***, Pantoom S, Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **J Chem Biol**. 2, 191-202.
17. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, **Suginta W*** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. **J Struct Biol**. 162, 491-499.
18. Pantoom S, Songsiriritthigul C, **Suginta W*** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. **BMC-Biochem.** 9:2.
19. **Suginta W***, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A**. BBA-General Subjects.** 1770, 1151-1160.
20. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme Microb Tech.** 41, 212-220.
21. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H, **Suginta W*** (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. **Acta Cryst. Section F.** 61, 895-898.
22. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J, Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. **FEBS J.** 272, 3376-3386.
23. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, **Suginta W*** (2004) Expression, refolding of Omp38 from Burkholderia pseudomallei and B. thailandensis, and its function as a diffusion porin. **Biochem J.** 384, 609–617.
24. **Suginta W***, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation,

modelled structure topology, cloning and functional expression. **Arch Biochem Biophys.** 424, 171-180.

25. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, **Suginta W*** (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. **Biochem J.** 377, 579-587.
26. **Suginta W**, Karoulias N, Aitkin A, Ashley RH* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. **Biochem J**. 359, 55-64.
27. **Suginta W**, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA* (2000) Chitinases from Vibrio: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. **J Appl Microbiol.** 89, 76-84.
28. Svasti J*, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S, Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In Protein Structure-Function Relationship (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
29. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, **Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.
30. **Suginta W**, Svasti MRJ* (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. **ScienceAsia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 183-186.
31. **Suginta W**, Svasti J* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
32. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C**, Suginta W**, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P, Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. **ScienceAsia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 293-**303.**

หมายเหตุ *Corresponding author