รหัสโครงการ SUT1-102-57-36-25

รายงานการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนไคติเนสชนิด YKL-39 และการศึกษาหน้าที่ของ YKL-39 ในกระบวนการเกิดโรคข้อเสื่อม

(Production of monoclonal antibody against chitinase-like protein, YKL-39 and functional analysis of YKL-39 protein in progression of osteoarthritis)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-102-57-36-25

รายงานการวิจัย

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนไคติเนสชนิด YKL-39 และการศึกษาหน้าที่ของ YKL-39 ในกระบวนการเกิดโรคข้อเสื่อม (Production of monoclonal antibody against chitinase-like protein, YKL-39 and functional analysis of YKL-39 protein in progression of osteoarthritis)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2563

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือและการสนับสนุน จากทั้งบุคคลและหน่วยงานต่างๆ โดยผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์ ในการอนุเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 และ ดร. อารยา รานอก ในการเตรียมโปรตีนดังกล่าวให้ในปริมาณมากพอที่จะใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือดำเนินความสะดวกในด้านต่างๆ ทั้งการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และ การจัดทำเอกสาร โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557-2559

พนิดา ขันแก้วหล้า

กันยายน 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

โปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคน YKL-39 หรือ chittinase3-like2, CHI3L2 ค้นพบครั้งแรก โดยการแยกจากโปรตีนที่หลั่งออกมาจากน้ำเลี้ยงเซลล์ articular chondrocytes ของมนุษย์ จากงานวิจัยหลายงานที่ผ่านมา ได้พยายามตรวจหาโมเลกุลที่บ่งชี้ภาวะที่เป็นโรคข้อเสื่อม โดยหนึ่งในนั้นพบว่ามีโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนส YKL-39 ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลือดทั้งในช่วงแรกของการเกิดโรคและมีปริมาณที่สูงขึ้นในระยะสุดท้ายของการเกิดโรค บ่งบอกถึงความสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งโปรตีน YKL-39 แม้ว่ามีการศึกษาเกี่ยวโปรตีนชนิดนี้อย่างต่อเนื่องแต่ปัจจุบันยังไม่มีผลงานวิจัยใดที่สามารถอธิบายหน้าที่หรือบทบาทของ YKL-39 ที่มีต่อกระบวนการเกิดโรคข้ออักเสบได้ ในการวิจัยนี้ ต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 เพื่อใช้มาศึกษาบทบาทของโปรตีนดังกล่าวในการเกิดโรคข้อเสื่อม ผู้วิจัยได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนส YKL-39 โดยใช้รีคอมบิแนนท์ YKL-39 ของมนุษย์ที่ผลิตโดยเซลล์แบคทีเรียเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่หนู Balb/C และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีไฮบริโดมา จากการวิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคน YKL-39 ได้ทั้งสิ้น 8 โคลน คือ 1A4-B6, 1A4-F11, 1C1-A3, 1C1-D10, 2A4-B9, 2D1-B6, 2D1-H7 และ 2F4-D3 โดยทุกโคลนเป็นชนิด IgM โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 และไม่จับกับเอนไซม์ acidic mammalian chitinase ของคน (huAMCase) อย่างไรก็ตามเมื่อนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้มาตรวจหา โปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคน YKL-39 ในเซลล์ต้นแบบตามที่มีรายงานการแสดงออกของโปรตีน YKL-39 คือแมกโครฟาจ ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนนี้ได้ จึงไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่จับกับโปรตีน YKL-39 ในเซลล์ต้นแบบ หรือเซลล์ต้นแบบนั้นไม่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-39 จึงยังไม่สามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปมาใช้ตรวจสอบปริมาณของ YKL-39 ตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ในการวิจัยนี้ แต่อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้น ถือว่ามีคุณค่าต่อการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน YKL-39 รวมทั้งจะใช้เพื่อทดสอบหาโปรตีน YKL-39 ในเซลล์อื่นๆ ต่อไปในอนาคตได้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Human chitinase-like protein YKL-39 also known as chittinase3-like2 (CHI3L2) was fisrsly discoved by isolation of culture medium of human articular chondrocytes. Several studies have been attempted to identify the marker molecules of osteoarthritis. Among those moleules, YKL-39 was found to secrete in the serum of both early state and high amount in the late state of disease. These evidences indicate the relation of the amount of YKL-39 and osteoarthritis. However, role of YKL-39 in progression of osteoarthritis is yet disclosure. The objectives of this study is to produce monoclonal antibody (mAb) against human YKL-39 and use for study the role of YKL-39 in osteoarthritis. To generate mAb to YKL-39, recombinant human YKL-39 expressed by bacteria system was used as immunogen to immunized a Balb/c mouse. Using the standard hybridoma technique, eight clones of mAb against YKL-9 named as 1A4-B6, 1A4-F11, 1C1-A3, 1C1-D10, 2A4-B9, 2D1-B6, 2D1-H7 and 2F4-D3 were produced. All clones belong to IgM isotype. The generated mAbs were specifically bound to YKL-39 but not human acidic mammalian chitinase (huAMCase). However, the generated mAbs to human YKL-39 were unable to detect the human YKL-39 expressing in the studied cell models, macrophages. Hence, we can conclude that neither the generated mAbs bound to human YKL-39 of the study cells nor the the study cells expressed human YKL-39. At the moment, the generated mAbs to human YKL-39 are unable to use for detection of YKL-39 as the objective of this work. Though, the generated mAbs are the valuable tool that we can use for future work about YKL-39 and screen for more cells that express YKL-39.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... **ก**

บทคัดย่อภาษาไทย ..... **ข**

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... **ค**

สารบัญ ..... **ง**

สารบัญภาพ ..... **ฉ**

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ข้อตกลงเบื้องต้น 2

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **3**

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย **10**

3.1 การกระตุ้นหนู Balb/c เผื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ human YKL-39 10

3.2 การตรวจสอบหาแอนติซีรั่มต่อโปรตีน YKL-39 ที่ผลิตได้จากหนูโดยวิธี indirect ELISA 10

3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดย Hybridoma technique 11

3.4 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก 11

3.5 การตรวจสอบ Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี capture ELISA 11

3.6 การการเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH4)_2SO_4$ ... 12

3.7 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography 12

3.8 การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 13

3.9 การทำ Western blotting 13

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย **14**

4.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 14

4.2 การแยกบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YLK-39 16

4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 มีความจำเพาะต่อ YKL-39 และไม่จับกับเอนไซม์ human acidic mammalian chitinase (huAMCase) 18

4.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน YKL-39 ใน human monocytic cell line U937, THP-1 และ human macrophages 19

บทที่ 5 บทสรุป **22**

บรรณานุกรม **24**

ภาคผนวก **27**

ประวัติผู้วิจัย **28**

เอกสารรับรองการใช้สัตว์ทดลอง **29**

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานวิชาการ **31**

หลักฐานการตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ **33**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 SDS-PAGE เปรียบเทียบขนาดของ YKL-39 และ YKL-40 4
รูปที่ 2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน YKL-39 4
รูปที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน YKL-39 เทียบกับของโปรตีน YKL-40 5
รูปที่ 4 กราฟแสดงการแสดงออกของ mRNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน YKL-39 โปรตีน YKL-40 และ human oesophageal cancer related protein 4 gene (ECRG4) ในผู้ป่วย (osteoarthritis; OA) เทียบกับคนปกติ (normal; N) 7
รูปที่ 5 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างของโปรตีน YKL-39 และ YKL-40 โดยวิธี cDNA-array 8
รูปที่ 6 โปรตีน YKL-39 เหนี่ยวนำให้ข้อเท้าของหนู *BALB/c* อักเสบ 9
รูปที่ 7 กราฟแสดง isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 15
รูปที่ 8 Western blotting แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 16
รูปที่ 9 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ที่แยกโดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ 17
รูปที่ 10 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ที่แยกโดยวิธี affinity chromatography 18
รูปที่ 11 Dot blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 19
รูปที่ 12 การแสดงออกของโปรตีน YKL-39 ใน U937 cell line และ macrophages 20
รูปที่ 13 การแสดงออกของโปรตีน YKL-39 ใน THP-1 cell line และ macrophages 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่พบได้ บ่อยมากในผู้สูงอายุ จากสถิติขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่า ผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 70 ปี จำนวนสูงถึง 40 % ของประชากรโลก ต้องเผชิญกับ โรคข้อเสื่อม โดยเฉพาะข้อเข่าและข้อสะโพก ในประเทศไทยพบว่าประมาณ 6 ล้านคน (10% จาก 60 ล้านคน) เป็นโรคโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งลักษณะของโรคเกิดจากการสึกของกระดูกอ่อน หรือหมอนรองกระดูกบริเวณปลายข้อ ผู้ที่ป่วยเป็นโรคข้อเสื่อม แต่ละคนมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการรักษาอาการข้อเสื่อม ซึ่งเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงมาก โรคข้อเข่าเสื่อม ทั่วไปแล้วไม่ได้มีผลทำให้คนเสียชีวิตได้ แต่จะส่งผลให้คุณภาพชีวิตลดลงเท่านั้น ดังนั้นหากสามารถติดตามภาวะของโรคและทราบกลไกการเกิดโรค จะเป็นผลดีในการรักษาอาการข้อเสื่อมในผู้สูงอายุให้ลดน้อยลง หรือสามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาให้น้อยลงได้

ผลงานวิจัยหลายชิ้นได้พยายามตรวจหาโมเลกุลที่บ่งชี้ภาวะที่เป็นโรคข้อเสื่อม โดยหนึ่งในนั้นพบว่ามีโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนส YKL-39 ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลือดทั้งในช่วงแรกของการเกิดโรคและมีปริมาณที่สูงขึ้นในระยะสุดท้ายของการเกิดโรค แสดงว่าอาการของโรคน่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งโปรตีน YKL-39 แม้ว่ามีการศึกษาเกี่ยวโปรตีนชนิดนี้อย่างต่อเนื่องแต่ปัจจุบันยังไม่มีผลงานวิจัยใดที่สามารถอธิบายหน้าที่หรือบทบาทของ YKL-39 ที่มีต่อกระบวนการเกิดโรคข้ออักเสบ นอกจากนี้ยังไม่มีใครสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ YKL-39 มาวางขายในท้องตลาด แต่จะมีเฉพาะโพลีโคลนอลแอนติบอดีเท่านั้น อีกทั้งยังมีราคาที่แพงมาก ดังนั้นจึงเป็นที่มาว่าผู้วิจัยต้องการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินติดตามการหลั่งโปรตีน YKL-39 เทียบกับภาวะของโรค นอกจากนี้จะใช้ศึกษาหาโมเลกุลหรือลิแกนด์ที่จับกับโปรตีนนี้ รวมทั้งนำไปช่วยในการศึกษาหน้าที่ของ YKL-39 ต่อกลไกการเกิดการอักเสบของเซลล์ โดยผลที่ได้น่าจะสามารถนำไปประกอบการวินิจฉัยหาแนวทางรักษา ป้องกัน และประเมินความเป็นไปของโรคข้อเสื่อมในแต่ละช่วงได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคนชนิด YKL-39
2) เพื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาศึกษาหน้าที่ของโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไค-ติเนสในคนชนิด YKL-39 ต่อกลไกการอักเสบของเซลล์

3) เพื่อตรวจหาลิแกนด์ หรือโมเลกุลร่วมที่จับอยู่กับโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคนชนิด YKL-39
4) เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาตรวจวัดระดับการหลั่งโปรตีน YKL-39 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ไขข้อที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเทียบกับเซลล์ปกติ

1.3 **ข้อตกลงเบื้องต้น**

1. การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติทีมี impact factor อย่างน้อย 1 เรื่องหรือ
2. การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 3 ครั้ง
3. การผลิตนักวิจัยรุ่นเยาว์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง 1 คน

1.4 **ขอบเขตของโครงการวิจัย**

งานวิจัยนี้จะเริ่มต้นจากการนำโปรตีน YKL-39 บริสุทธิ์ที่ได้โดยวิธีการโคลนยีนส์ที่จำเพาะต่อโปรตีนนี้จาก cDNA library ของเซลล์บริเวณปากมดลูก ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKl-39 นี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์.ดร.วิภา สุจินต์ เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยวิธี hybridoma technique เมื่อได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว จะเป็นขั้นตอนการเตรียมแอนติบอดีให้ได้ปริมาณมากเพื่อ และแยกให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการตรวจหาโปรตีนที่จับอยู่กับโปรตีน YKL-39 โดยวิธี immunoprecipitation และ pull down assay จากนั้นจะนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ติดตามศึกษาหน้าที่ของโปรตีน YKL-39 ในกลไกการอักเสบของเซลล์ ท้ายสุดจะใช้ตรวจวัดระดับของโปรตีน YKL-39 ในตัวอย่างน้ำเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเทียบกับคนธรรมดา

1.5 **ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย**

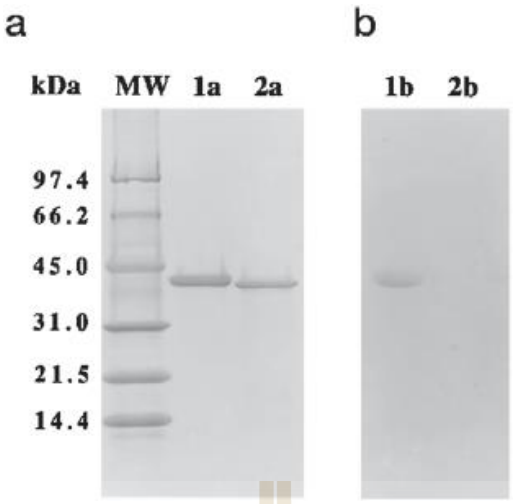
การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติทีมี impact factor อย่างน้อย 1 เรื่อง หรือ การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 3 ครั้ง การผลิตบัณฑิตที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทางอย่างน้อย 1 คน โดยหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หรือสถาบันวิจัยทางการแพทย์ทั้งในและต่างประเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคน YKL-39 หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า chittinase3-like2, CHI3L2 ค้นพบครั้งแรก โดยแยกได้จากโปรตีนที่หลั่งออกมาจากน้ำเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงเซลล์ articular chondrocytes ของมนุษย์โดยหลั่งออกมาร่วมกับโปรตีน YKL-40 ซึ่งเป็นโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสในคนอีกชนิดหนึ่งมีชื่อเรียกอื่นว่า chitinase3-like1 (CHI3L1) (Hu, Trinh et al. 1996) โปรตีนชนิดนี้มีการตั้งชื่อตามกรดอะมิโน 3 ตัวแรกที่อยู่บริเวณด้าน N-terminal ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวคือ tyrosine (Y), lysine (K) และ leusine (L) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับโปรตีน YKL-40 แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมาแยกให้บริสุทธิ์ตามขนาดของโมเลกุล และนำโมเลกุลดังกล่าวไปหาลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีโปรตีนอยู่ 2 ชนิด โดยชนิดแรกคือ YKL-40 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น YKLV*X*Y**Y**T**S**WSQ**Y**R ในขณะที่อีกโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรตีน YKL-40 แต่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น YKLV*X*Y**F**T**N**WSQ**D**R โดยตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้คือกรดอะมิโนที่ต่างจากของ YKL-40 จากผลการแยกวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนและขนาดของโปรตีน โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเป็นโปรตีนที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมีขนาด 39 kDa (รูปที่ 1) โปรตีนที่แยกได้นี้จึงถูกตั้งชื่อขึ้นใหม่เป็น YKL-39 ตามลำดับกรดอะมิโน 3 ตัวแรกที่ปลาย N-terminal และตามขนาดของโมเลกุล

YKL-39 เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 390 เรสิดิวส์ ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยเป็น signal peptide จำนวน 26 เรสิดิวส์และที่สร้างเป็นโปรตีนจริงๆ มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 364 เรสิดิวส์ เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนส โดยมีบริเวณ conserve region (สีเขียว) ซึ่งปกติจะเป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส โดยกรดอะมิโน Glutamate (E) จะถูกแทนที่ด้วย Isoleusine (I) แสดงในรูปที่ 2 ดังนั้นโปรตีน YKL-39 จึงไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสคือไม่สามารถย่อยสารไคตินได้ (Hu, Trinh et al. 1996) จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า YKL-39 และ YKL-40 มีความคล้ายกันมากทั้งขนาดและลำดับกรดอะมิโน โดยพบว่ามีความเหมือนกันมากกว่า 50% (รูปที่ 3) ส่วนที่แตกต่างจาก YKL-40 ก็คือ YKL-39 ไม่ใช่ไกลโคโปรตีนและ YKL-40 มีปลายทางด้านคาร์บอกซิลิกที่จับกับ heparin ได้ แต่ YKL-39 ไม่มี



รูปที่ 1 SDS-PAGE เปรียบเทียบขนาดของ YKL-39 และ YKL-40 (a) คือโปรตีนที่ผ่านการย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue ส่วน (b) คือการย้อมดูโปรตีนที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เลน 1a และ 1b คือ YKL-40 ส่วนเลน lanes 2a และ 2b คือ YKL-39 (Hu, Trinh et al. 1996)

```
          10         20         30         40         50         60
MGATTMDQKS LWAGVVVLLL LQGGSAYKLV CYFTNWSQDR QEPGKFTPEN IDPFLCSHLI
          70         80         90         100        110        120
YSFASIENNK VIIKDKSEVM LYQTINSLKT KNPKLKILLS IGGYLFGSKG FHPMVDSSTS
          130        140        150        160        170        180
RLEFINSIIL FLRNHNFDGL DVSWIYPDQK ENTHFTVLIH ELAEAFQKDF TKSTKERLLL
          190        200        210        220        230        240
TVGVSAGRQM IDNSYQVEKL AKDLDFINLL SFDFHGSWEK PLITGHNSPL SKGWQDRGPS
          250        260        270        280        290        300
SYYNVEYAVG YWIHKGMPSE KVVMGIPTYG HSFTLASAET TVGAPASGPG AAGPITESSG
          310        320        330        340        350        360
FLAYYEICQF LKGAKITRLQ DQQVPYAVKG NQWVGYDDVK SMETKVQFLK NLNLGGAMIW
          370        380        390
SIDMDDFTGK SCNQGPYPLV QAVKRSLGSL
```

รูปที่ 2 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน YKL-39 ประกอบด้วย 390 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นมี 26 กรดอะมิโน เป็น signal peptide (สีเทา) ปลาย N-terminal ของสายเปปไทด์คือกรดอะมิโน tyrosine (Y), lysine (K) and leucine (L) (สีฟ้า) และบริเวณ conserve sequence motif (สีเขียว)

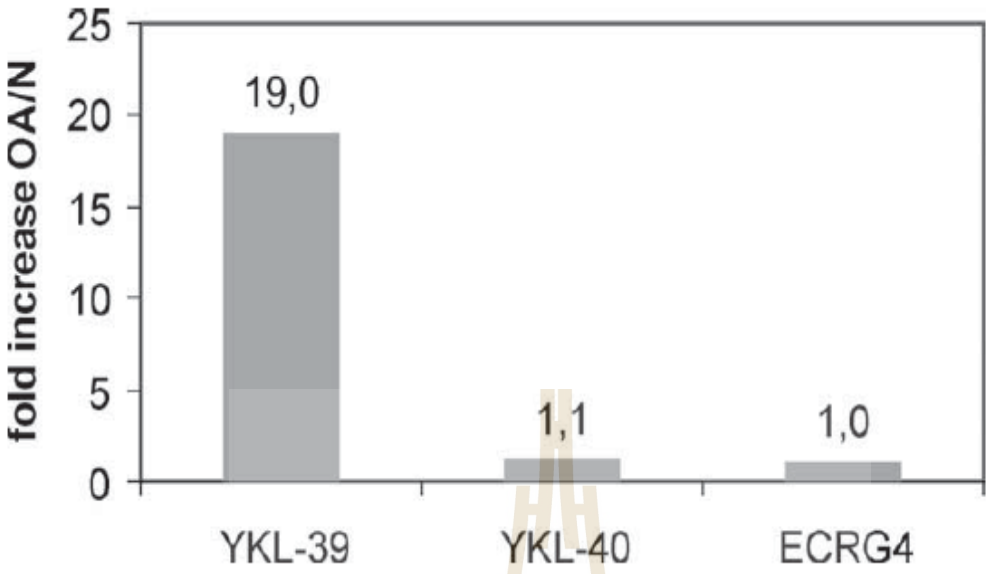
รูปที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน YKL-39 เทียบกับของโปรตีน YKL-40 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน YKL-39 เทียบกับของโปรตีน YKL-40 มีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนมากกว่า 50% (สีชมพู)

หลายรายงานยืนยันว่า YKL-39 ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes การแสดงออกของ YKL-39 mRNA มีปริมาณสูงในปอด นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบในหัวใจ แต่ไม่พบในเซลล์สมอง ม้าม ตับอ่อน หรือ ตับ (Hu, Trinh et al. 1996) ส่วน macrophage พบว่าสร้างสารในกลุ่มเอนไซม์ไคติเนสในคน (human chitinase) เป็นหลัก โดยมีเพียงกลุ่มเดียวรายงานว่า YKL-39 นั้นถูกสร้างโดย macrophage โดยการสร้างจะเกิดจากการกระตุ้นร่วมกันระหว่าง cytokine IL-4 และ TGF-β ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดกระบวนการแพ้ ในทางกลับกันหากเลือกกระตุ้น macrophage ด้วย IL-4 หรือ TGF-β ตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียวจะมีผลกระตุ้นให้มีการสร้างเพียงเล็กน้อย ดังนั้นระดับของ YKL-39 ที่เพิ่มขึ้นในกรณีที่มีการอักเสบแบบเรื้อรังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลมาจากการหลั่งโดยเซลล์ chondrocytes เพียงชนิดเดียว (Gratchev, Schmuttermaier et al. 2008) และอาจมีกลไกทางภูมิคุ้มกันที่ซับซ้อนมากกว่านี้มาเกี่ยวข้องด้วย

หน้าที่ทางชีวภาพของ YKL-39 และความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม

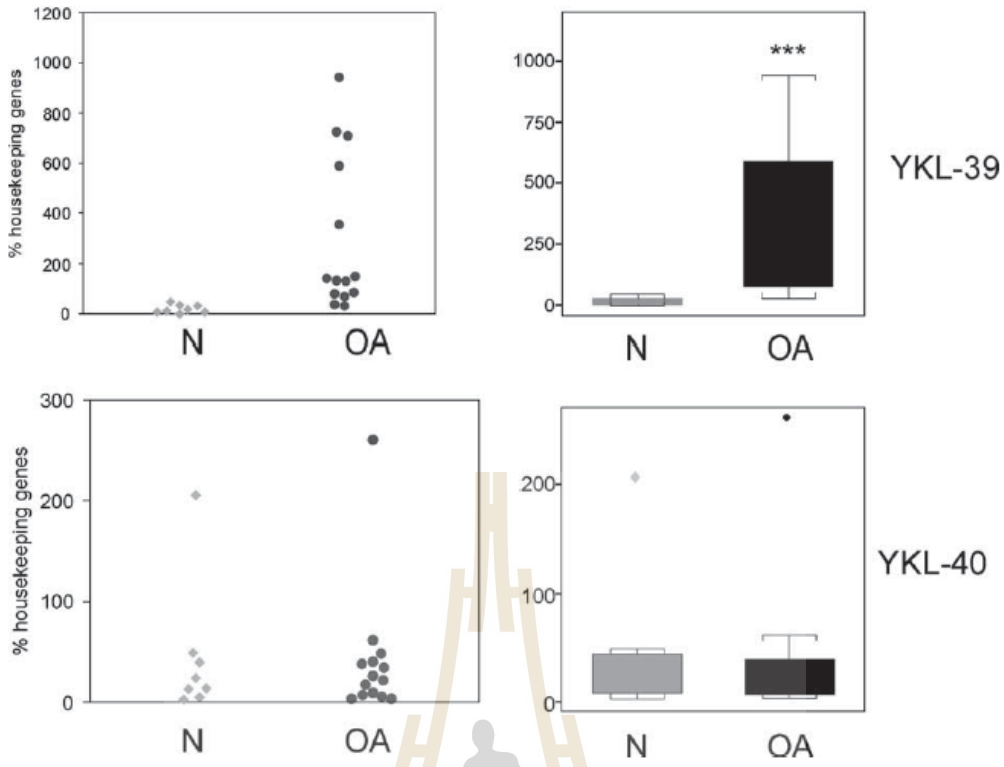
YKL-39 ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีสำหรับเซลล์ chondrocytes ที่ถูกกระตุ้น และใช้เป็นตัวติดตามการดำเนินไปของโรคข้อเสื่อมในคน ซึ่งพบว่ามีความแม่นยำมากกว่าการใช้ YKL-40 (Knorr, Obermayr et al. 2003) จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน YKL-39 กับ YKL-40 เซลล์กระดูกอ่อนที่มีภาวะข้อเสื่อม โดยวิธี real-time PCR และ cDNA microarray พบว่าระดับของ YKL-39 mRNA มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อม osteoarthritis (OA) เมื่อเทียบกับคนปกติ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ matrix protein ชนิด collagen type 2 ในขณะที่การแสดงออกของ YKL-40 mRNA ไม่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Steck, Breit et al. 2002) ดังแสดงใน รูปที่ 4 และ รูปที่ 5 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในเซลล์ chondrocyte ของมนุษย์มีการแสดงออกของ YKL-39 และ YKL-40 ในระดับ mRNA โดยการแสดงออกของ YKL-39 จะมีมากขึ้นทั้งในช่วงที่เริ่มมีการเสื่อมของข้อจนถึงระยะท้ายๆ ของการเกิดโรค ในขณะที่การแสดงออกของ YKL-40 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงที่มีการดำเนินไปของโรค (Knorr, Obermayr et al. 2003) จากการทำ proteomic analysis โดยดูจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนที่ได้จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมพบว่ามีโปรตีน YKL-39 แต่ไม่พบ YKL-40 (De Ceuninck, Marcheteau et al. 2005) การค้นพบนี้บ่งบอกว่ามีการเพิ่มขึ้นของ YKL-39 ในซีรั่มและ น้ำไขข้อ (synovial fluid) ของผู้ที่ป่วยด้วยโรคข้ออักเสบนั้นอาจเป็นผลมาจากการสร้างเซลล์ synoviocytes และ macrophages มากเกินไป โดย YKL-39 หลั่งมาจากเซลล์ดังกล่าวแต่ไม่ได้สร้างมาจากเซลล์ chondrocytes จากการรายงานก่อนหน้านี้สามารถสรุปบทบาทของโปรตีน YKL-39 ต่อการดำเนินของโรคข้อเสื่อมได้เป็น 2 กรณีคือ

1) โปรตีน YKL-39 เหนี่ยวนำให้เกิด autoimmune response (Sekine, Masuko-Hongo et al. 2001, Du, Masuko-Hongo et al. 2005) โดยมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อ YKL-39 ในซีรั่มของผู้ป่วยที่เป็นโรค rheumatoid arthritis (RA) ประมาณ 8% โดยวิธี enzyme link immunosorbent assay (ELISA) และ Western blotting นอกจากนี้ยังพบว่ามีผู้ป่วยด้วยโรคเดียวกันนี้เพียง 1% ที่มี autoantibodies ต่อโปรตีน YKL-40 และแอนติบอดีต่อ YKL-39 ไม่สามารถจับได้กับโปรตีน YKL-40 จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเทียบกับคนปกติพบว่าในผู้ป่วยด้วยโรคข้อเข่าเสื่อม 14 คน มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-39 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (15 เท่า, $p < 0:001$) (Steck, Breit et al. 2002)



รูปที่ 4 กราฟแสดงการแสดงออกของ mRNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน YKL-39 โปรตีน YKL-40 และ human oesophageal cancer related protein 4 gene (ECRG4) ในผู้ป่วย (osteoarthritis; OA) เทียบกับคนปกติ (normal; N) การแสดงออกของ mRNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีน YKL-39 โปรตีน YKL-40 และ human oesophageal cancer related protein 4 gene (ECRG4) โดยวิธี Real time PCR จากตัวอย่างเซลล์กระดูกอ่อนของผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Steck, Breit et al. 2002)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 5 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างของโปรตีน YKL-39 และ YKL-40 โดยวิธี cDNA-array การแสดงออกยีนที่กำหนดการสร้างของโปรตีน YKL-39 และ YKL-40 โดยวิธี cDNA-array โดยวิเคราะห์จากตัวอย่างเซลล์กระดูกอ่อนของคนปกติ 8 คน และผู้ที่เป็นโรคข้อ

สามารถสรุปได้ว่าการตอบสนองต่อระบบภูมิกันของ YKL-39 แตกต่างจาก YKL-40 อย่างชัดเจน (Sekine, Masuko-Hongo et al. 2001) โดยผลการศึกษาที่สามารถตรวจพบ autoantibodies ต่อโปรตีนหลายชนิดที่เชื่อมโยงให้เกิดโรคข้ออักเสบ arthritis ในช่วงแรกของการเกิดการเสื่อมของข้อเข่านั้นเป็นข้อมูลสำคัญที่บ่งบอกว่าการเกิดโรคมีความเกี่ยวข้องอย่างจำเพาะเจาะจงกับการตอบ สนองทางภูมิคุ้มกันในช่วงแรกที่เซลล์กระดูกอ่อนเริ่มเสื่อม (Du, Masuko-Hongo et al. 2005)

2) โปรตีน YKL-39 ต่อการเกิดโรคข้อเสื่อมคือเข้าไปเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนรูปร่างของเนื้อเยื่อ (Sakata, Masuko-Hongo et al. 2002) จากการศึกษาโดยการฉีดรีคอมบิแนนท์ YKL-39 เข้าไปบริเวณข้อเท้าของหนูหลายสายพันธุ์โดยพบว่า YKL-39 สามารถเหนี่ยวนำให้หนูทุกสายพันธุ์มีอาการของข้ออักเสบ โดยเกิดได้ดีที่สุดในหนู *BALB/c* (Sakata, Masuko-Hongo et al. 2002) จากการนำเอาชิ้นเนื้อบริเวณที่มีการอักเสบมาตรวจสอบ พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของ synovial และ ผิวของกระดูกอ่อนบริเวณนั้นมีรูปร่างผิดปกติไป หลังจากที่มีการฉีด YKL-39 ให้หนู พบว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อ YKL-39 เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบแอนติบอดีต่อโปรตีน type II collagen ถูกสร้างขึ้นมาด้วย แสดงว่าเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา autoimmune แพร่ต่อไปยังโปรตีนอื่นๆ ด้วย (Sakata,

Masuko-Hongo et al. 2002) จากการทดลองโดยใช้สัตว์เป็นต้นแบบ สรุปได้ว่า YKL-39 เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ autoimmune ในโรคข้ออักเสบ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเนื้อเยื่อ และได้มีรายงานแสดงให้เห็นว่า YKL-39 และ YKL-40 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเหมือนกันทางโครงสร้าง มีบทบาทในการกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน ERK1/ERK2 ในวิถี MAPK ในเซลล์ human embryonic kidney (HEK293) และ human glioblastoma (U87 MG) โดยการกระตุ้นนี้ส่งผลลัพท์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย YKL-40 ส่งผลการเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์ ในขณะที่ YKL-39 ส่งผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ดังกล่าว (Areshkov and Kavsan 2010, Areshkov, Avdieiev et al. 2012) และถึงแม้ว่าจะมีการรายงานเกี่ยวความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ YKL-39 ที่เพิ่มขึ้นกับการดำเนินไปของโรคข้ออักเสบ แต่บทบาทที่แท้จริงของ YKL-39 ยังไม่ชัดเจน จึงเกิดคำถามว่าเซลล์สร้างโปรตีนนี้มาเพื่ออะไร และเมื่อสร้างมาแล้วจับกับโมเลกุลใดได้บ้างนั้น หากทราบหน้าที่ที่ชัดเจนของโมเลกุลนี้อาจสามารถนำไปหาวิธีการรักษา และป้องกันหรือชะลอการเกิดโรคได้

รูปที่ 6 โปรตีน YKL-39 เหนี่ยวนำให้ข้อเท้าของหนู *BALB/c* อักเสบ (a) ขาขวาของหนูที่ใช้ป็นตัวควบคุมการทดลอง (b) ขาขวาของหนูที่ได้รับการฉีดโปรตีน YKL- 39 เป็นเวลา 30 วัน หลังจากการฉีดครั้งแรก (Sakata, Masuko-Hongo et al. 2002)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การกระตุ้นหนู Balb/c เผื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ human YKL-39

ฉีดโปรตีน human YKL-39 ปริมาณ 70 ไมโครกรัม ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 เข้าสู่ช่องท้องหนู Balb/c จำนวน 3 ครั้งทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยเก็บเลือดหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นทางหางทุกๆ 2 อาทิตย์โดยเริ่มเก็บตัวอย่างเลือดหนึ่งอาทิตย์หลังการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองในแต่ละครั้ง แยกซีรั่มจากเลือดที่เก็บได้แต่ละครั้งมาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลองโดยวิธี indirect ELISA ดังอธิบายในหัวข้อ 3.2 เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของซีรั่มจากเลือดที่เก็บก่อนการฉีดกระตุ้น (pre-immuned serum) เมื่อตรวจพบระดับแอนติบอดีในซีรั่มหนูจะทำการฉีดกระตุ้นหนูด้วยโปรตีน human YKL-39 เข้าสู่ช่องท้องหนูในปริมาณเท่ากัน เป็นเวลา 5 วันก่อนการทำเมตตาฆาตรเพื่อแยกเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 จากม้ามสำหรับเตรียม Hybridoma cell ต่อไป

3.2 การตรวจสอบหาแอนติซีรั่มต่อโปรตีน YKL-39 ที่ผลิตได้จากหนูโดยวิธี indirect ELISA

เตรียม recombinant YKL-39 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน coating 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 ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง เติมแอนติซีรั่มจากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง ก่อนเติม Horserasdish peroxidase (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 จากนั้นเติม TMB substrate 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งไว้ให้เอนไซม์ Horasdish peroxidase ทำงานโดยเก็บ ELISA plate ไว้ในที่มืดจนเกิดสี (ประมาณ 3-5 นาที) หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดย Hybridoma technique

นำเซลล์จากม้ามของหนู (splenocytes) ที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 มาผสมกับ P3X63Ag8.653 mouse myeloma cells จากนั้นเตรียมเซลล์ลูกผสมโดย standard hybridoma technique โดยการใช้ 50% (v/v) polyethylene glycol (PEG) (Kohler and Milstein C. 1975, Khunkaewla, Chiampanichayakul et al. 2007) ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 400xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM ที่มี 10% fetal calf serum (FCS) 10% BM condimed H1 (Roche) และยาสำหรับเลือกเซลล์ลูกผสม (HAT medium) ใน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วันใน 5% CO_2 incubator เติม HT medium อีก 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ต่อใน 5% CO_2 incubator เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เซลล์เจริญเติบโตมาทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน human YKL-39 โดยวิธี indirect ELISA เมื่อตรวจพบเซลล์ในหลุมที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 เซลล์ในหลุมดังกล่าวจะถูกนำไปทำเจือจาง (single cell cloning) อีก 2 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าได้เซลล์ลูกผสมที่มาจากโคลนเดียวเท่านั้น

นำเซลล์ที่อยู่ในหลุมที่ตรวจพบว่ามีการผลิตแอนติบอดีมานับจำนวน และปรับความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ IMDM (ที่มี 10%FCS และ 10% BM condimed H1) โดยให้ได้ความเข้มข้นโดยประมาณของเซลล์เป็น 4 เซลล์ 2 เซลล์ และ 1 เซลล์ต่อ150 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์แต่ละความเข้มข้นมาเติมลงใน 96 well plate เลี้ยงเซลล์ใน 5% CO_2 incubator ครบหนึ่งอาทิตย์สังเกตหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ เมื่อโคลนมีขนาดใหญ่ เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

3.4 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีให้ได้ปริมาณมาก

เลี้ยงเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 แต่ละ clone ที่ผลิตได้ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด serum free medium เพื่อให้เซลล์ลูกผสมผลิตแอนติบอดีมาในน้ำเลี้ยง เซลล์ และทำการทดสอบ activity ของแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการทดลองที่ 3.2 ก่อนที่จะนำไปเตรียมเป็นแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ต่อไป

3.5 การตรวจสอบ Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี capture ELISA

เจืองจางแอนติบอดีต่อ isotype แต่ละชนิด (IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b และ IgM) ด้วยสารละลาย 0.1 M Carbonate/bicarbonate, pH9.6 สัดส่วน 1:1,000 เติมลงใน ELISA plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน เติมสารละลาย PBS ที่มี skimmed milk ความเข้มข้น 2% w/v (blocking buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

ล้าง ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการเลี้ยงเซลล์ลูกผสม clone ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ โปรตีน human YKL-39 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง ก่อนเติม HRP-conjugated rabbit anti-mouse Igs ที่เจือจางใน blocking buffer ด้วยอัตราส่วน 1:5,000 โดยเติม 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้ง จากนั้นเติม TMB substrate 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งไว้ให้เอนไซม์ HRP ทำงานโดยเก็บ ELISA plate ไว้ในที่มืดจนเกิดสี หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

3.6 การการเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 ที่แช่เย็นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่และ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 4.04 โมลาร์ ที่เย็น จนครบปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีการแกว่งขวดในถังน้ำแข็งตลอดเวลาที่มีการเติมสารละลายเกลือ เขย่าขวดที่มีสารผสมต่ออีก 30 นาทีในถังน้ำแข็ง เมื่อครบเวลาถ่ายสารผสมใส่ 50 ml centrifuge tube และปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้งที่ ความเร็ว 2,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายด้วยสารละลาย 1x PBS pH7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการ dialysis ด้วยสารละลาย 1x PBS pH7.2 เพื่อกำจัด $(NH_4)_2SO_4$ ที่ปนเปื้อนออกให้หมด และวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดย BCA protein assay kit (Novagen) ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.7 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 มาปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ออกไป ดูดเฉพาะส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์มาแยกบริสุทธิ์โดยเครื่องแยกบริสุทธิ์โปรตีน ÄKTA START โดยใช้ สำหรับแยกแอนติบอดีชนิด IgM โดยหลักการจะเป็นการจับแบบ affinity chromatogrphy นำแอนติบอดีที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไปเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ โดยการ dialyze ด้วย PBS และวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้โดย BCA protein assay kit (Novagen) ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.8 การตรวจดูความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.7 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์มาผสมกับ non-reducing SDS buffer หรือ reducing SDS buffer และต้มที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการวิเคราะห์โดยใช้ 10% resolving gel จากนั้นย้อมแผ่นเจลที่แยกแอนติบอดีที่สนใจด้วยสี Coomassie Brilliant blue R250 ล้างสีส่วนเกินออกโดย destaining solution จนพื้นเจลส่วนที่ไม่มีแถบโปรตีนใสสะอาด โดยขนาดของแถบโปรตีนที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ทำควบคู่กันในแผ่นเจลเดียวกัน

3.9 การทำ Western blotting

แยกโปรตีน YKL-39 ในภาวะ non-reducing หรือ reducing โดย 10% SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวิธี semi-dry electroblotting ทำการ block nitrocellulose membrane ด้วย 5% skimm milk ในสารละลาย PBS นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ หรือที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วที่เจือจางด้วย 2% skimmed milk ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติบอดีที่ไม่จับออกด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ที่มี Tween 20 ละลายอยู่ด้วย 0.1% (0.1% PBST) ก่อนที่จะย้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง คือ Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse immunoglobulins antibody โดยเจือจางใน 2% skimmed milk ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1: 5,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ล้าง membrane 3 ครั้งด้วย PBST และ ล้างด้วยสารละลาย PBS pH7.2 2 ครั้ง ก่อนทำการวิเคราะห์หาปฏิกิริยาการจับกันของแอนติบอดีและโปรตีนที่สนใจบนแผ่น membrane โดยวิธี chemiluminescence detection system เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนจำเพาะบนแผ่นฟิล์มเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ที่ทำควบคู่ไปด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

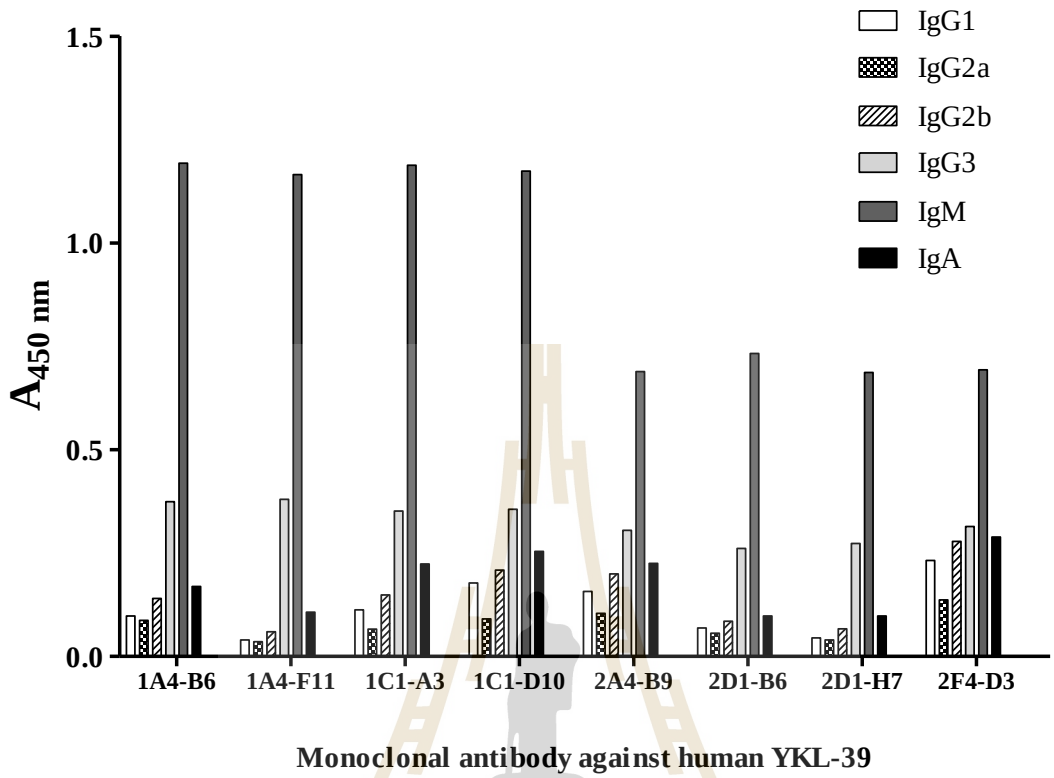
4.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39

ผู้วิจัยได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 โดยการกระตุ้นหนู Balb/c โดยใช้ recombinant YKL-39 เป็นแอนติเจน ปริมาณ 70 µg ทางช่องท้องทุก 2 อาทิตย์จนครบ 3 ครั้ง หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 2 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดทางหางเพื่อแยกซีรั่มเพื่อตรวจวัดระดับของแอนติบอดีต่อโปรตีน YKl-39 ที่หนูสร้างขึ้นโดยวิธี indirect ELISA เทียบกับซีรั่มที่เจาะเก็บไว้ก่อนการฉีดกระตุ้น โดยเรียกซีรั่มส่วนนี้ว่า pre-immunized serum จากนั้นนำหนูที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีน YKl-39 ในซีรั่มแล้วมาทำเมตตาฆาตรและแยกเก็บเฉพาะม้ามซึ่งมีส่วนของบีลิมโฟไซต์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 มาผสมและเชื่อมเข้ากับ myeloma cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของหนูโดยวิธี Hybridroma technique (Kohler and Milstein C. 1975) โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) เป็นสารที่เปิด และเชื่อมผิวเซลล์ทั้งสองชนิดเพื่อให้เป็นเซลล์เดียวกัน นำเซลล์ลูกผสมที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา Aminopterine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสังเคาะห์สารนิวคลีโอไทด์แบบ de novo pathway ซึ่งเป็นวิถีหลักที่ Myeloma cell ใช้ในการสังเคราะห์สารนิวคลีโอไทด์เพื่อการเจริญเติบโต เนื่องจาก Myeloma cell ไม่มีระบบการสังเคราะห์สารนิวคลีโอไทด์แบบ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ myeloma ที่ไม่ได้เชื่อมติดกับ splenocytes จะตาย ส่วน splenocyte ที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดกับ myeloma cell นั้น ถึงแม้จะมีการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ทั้งแบบ de novo pathway และ salvage pathway แต่เนื่องจากเป็นเซลล์ธรรมดาที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งจึงมีอายุได้ไม่นานและตายไปในที่สุด ดังนั้นเซลล์ที่จะอยู่ได้และมีการเจริญเติบโตในหลุม คือเซลล์ที่มีการเชื่อมกันระหว่าง splenocytes และ mouse myeloma เรียกเซลล์กลุ่มนี้ว่าเซลล์ลูกผสม (hybrid cells)

หลังทำ fusion มีการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมโดยการเติมยา Aminopterine ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเนื่องจากเซลล์ที่เจริญเติบโตเป็นเซลล์ที่เกิดจากการนำเอา splenocyte ทั้งหมดของหนูมาเตรียมเซลล์ลูกผสม ดังนั้นอาจมีเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีชนิดอื่นๆ รวมอยู่ด้วย จำเป็นต้องทำการคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 เท่านั้นโดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมที่มีเซลล์เจริญเติบโตมาตรวจวัดหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน human YKL-39 โดยวิธี indirect ELISA

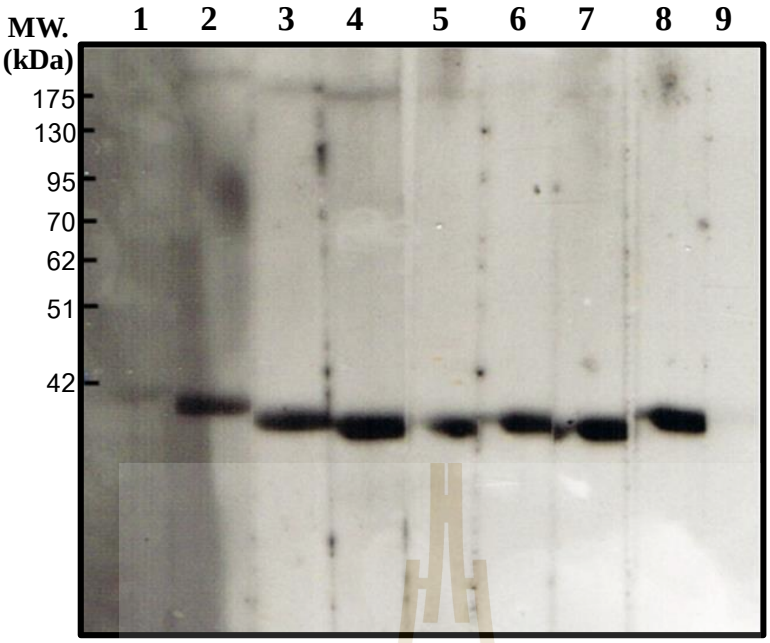
จากการวิเคราะห์โดยวิธี indirect ELISA ตามที่อธิบายในวิธีดำเนินการวิจัย นำเซลล์แต่ละหลุมที่ตรวจพบการสร้างแอจติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 มาแยกเลี้ยงโดยวิธี single cell cloning เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ลูกผสมที่ได้นั้นมาจาก splenocyte โคลนเดียวเท่านั้น ซึ่งหลังจากทำการทำ single cell cloning คณะผู้วิจัยสามารถผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 ได้จำนวนทั้งสิ้น 8 โคลน คือ 1A4-B6, 1A4-F11, 1C1-A3, 1C1-D10, 2A4-B9, 2D1-B6, 2D1-H7 และ 2F4-D3

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มาตรวจสอบชนิดของ isotype โดยวิธี capture ELISA ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 7 ซึ่งพบว่าแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้เป็นชนิด IgM isotype



รูปที่ 7 กราฟแสดง isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 นำน้ำเลี้ยง hybridoma cell ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 แต่ละโคลนมาตรวจหาชนิดของ isotype โดยวิธี capture ELISA โดยผลการทดลองได้จาก 2 การทดลองที่แยกกันและแสดงผลไปในทางเดียวกัน

นอกจากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้โดยวิธี ELISA แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยวิธี Western Blotting ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลน มีความจำเพาะกับ recombinant protein YKL-39 ที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วิภา สุจินต์ ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 Western blotting แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 recombinant human YKL-39 มาแยกโดย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing condition โดยแต่ใส่โปรตีนปริมาณ 10 μg ต่อเลน ถ่ายโปรตีนลงใน PVDF membrane และย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (**1**:1C1-A3; **2**:1C1-D10; **3**:1A4-F11; **4**:1A4-B6; **5**:2D1-B6; **6**:2D1-H7; **7**:2F4-D3; **8**:2A4-B9; **9**: conjugate control) (n=3)

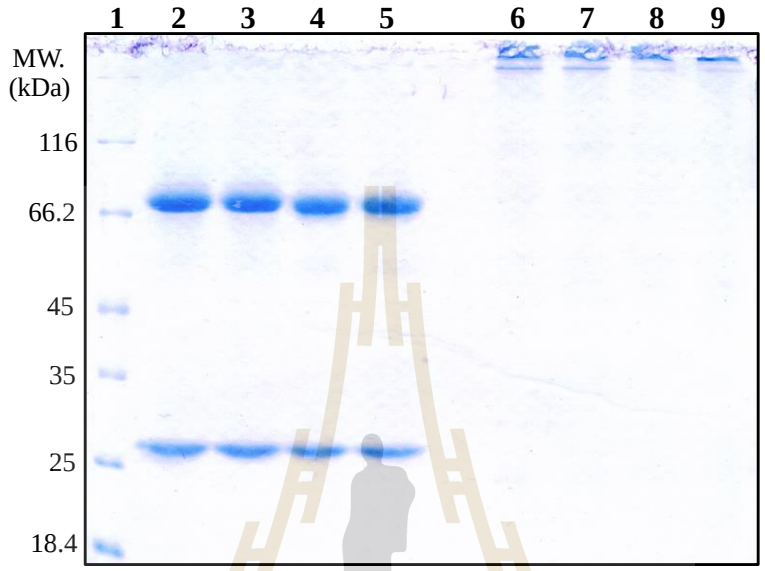
4.2 การแยกบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YLK-39

เพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ให้มีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้งานได้ ผู้วิจัยได้เลี้ยง hybridoma cells ที่ผลิตได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด serum free medium มาทำการแยกบริสุทธิ์ โดยได้ทำการแยก 2 วิธี คือ

4.2.1 โดยวิธีตกตะกอนด้วยสาร $(NH_4)_2SO_4$

การตกตะกอนด้วยเกลือเป็นวิธีที่ค่อยข้างง่ายและและนิยมใช้ในการตกตะกอนแอนติบอดีชนิด IgM isotype ผู้วิจัยจึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1A4-B6 และ 1C1-D10 มาทำการตกตะกอนจากน้ำเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตกตะกอนได้ %yield เป็น 0.84% และ 0.72% สำหรับ 1A4-B6 และ 1C1-D10 ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูงดังแสดงใน รูปที่ 9 ในสภาวะ reducing จะพบแถบโปรตีน 2 แถบที่ขนาดประมาณ 25 kDa และ 66 kDa ซึ่งเป็นส่วน light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีตามลำดับ ในสภาวะ non reducing พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ด้านบนของแผ่นเจลซึ่งเป็นแอนติบอดีทั้งโมเลกุล แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำแอนติบอดีทั้ง

2 โคลนที่แยกบริสุทธิ์ไปทดสอบความจำเพาะต่อโปรตีนพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลนไม่สามารถจับกับโปรตีน YKL-39 ได้ จึงสรุปว่าภาวะที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธีนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography

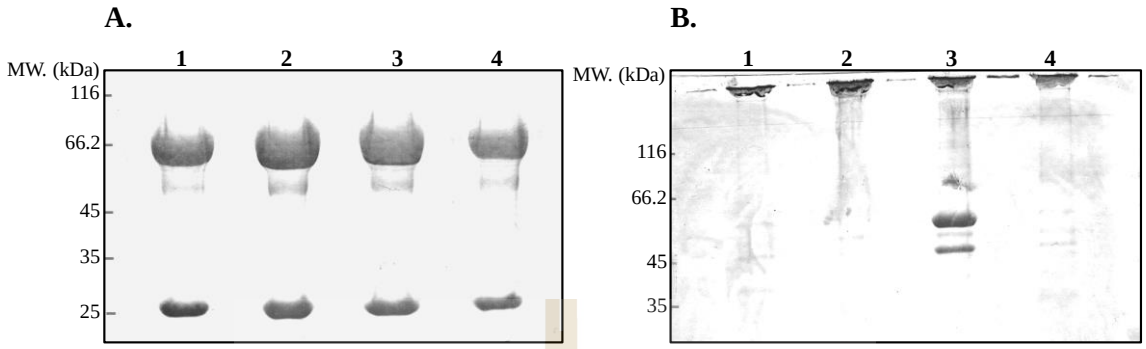


รูปที่ 9 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ที่แยกโดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 โคลน 1C1-D10 (2, 3, 6, 7) และ โคลน 1A4-B6 (4, 5, 8, 9) ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing (R) และภาวะ non reducing (NR) และย้อมโปรตีนด้วย Coommassie Brilliant blue R250

4.2.2 โดยวิธี Affinity chromatography

หลังจากแยกบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนตามหัวข้อ 3.6 โดยก่อนการนำไปใช้งาน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ จะถูกตรวจสอบความบริสุทธิ์ และตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนทุกครั้งหลังการแยกบริสุทธิ์โดยทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่า ในสภาวะ reducing จะพบแถบโปรตีน 2 แถบที่ขนาดประมาณ 25 kDa และ 66 kDa ซึ่งเป็นส่วน light chain และ heavy chain ของแอนติบอดีตามลำดับ ในสภาวะ non reducing พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่ด้านบนของแผ่นเจลซึ่งเป็นแอนติบอดีทั้งโมเลกุล แสดงใน รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 โคลน 1A4-B6 1C1-D10 2D1-H1 และ 2F4-D3 จากผลการ

ทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39 ที่แยกบริสุทธิ์ได้นั้นมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้งานต่อไป

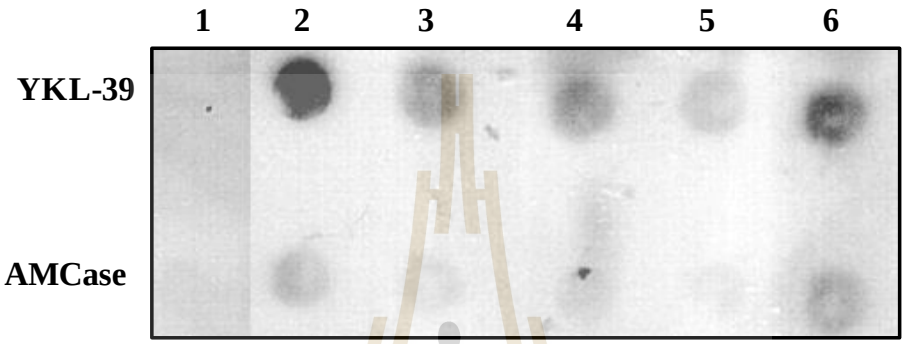


รูปที่ 10 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ที่แยกโดยวิธี affinity chromatography โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนไคติเนส human YKL-39 จำนวน 4 โคลน หลังการแยกบริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ถูกแยกโดย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reducing (A) และภาวะ non reducing (B) และย้อมโปรตีนด้วย Coommassie Brilliant blue R250 (1: 1A4-B6; 2: 1C1-D10; 3: 2D1-H1; 4: 2F4-D3)

4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 มีความจำเพาะต่อ YKL-39 และไม่จับกับเอนไซม์ human acidic mammalian chitinase (huAMCase)

เพื่อทดสอบความความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แยกบริสุทธิ์ได้ วิเคราะห์ได้จากการทำ indirect ELISA ทุกครั้งก่อนนำมาใช้งาน ซึ่งในการทดลองนี้ ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวมาตรวจสอบความจำเพาะโดยการทำ dot blot โดยผู้วิจัยได้ใช้ โปรตีน huAMCase ซึ่งเป็นเอนไซม์ไคติเนสที่พบในคน ซึ่งจะใกล้เคียงกับโปรตีน YKL-39 ซึ่งเป็นโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนส มาทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่แยกได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสที่ได้ความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วิภา สุจินต์นั้น อยู่ในรูป inclusion body และละลายอยู่ใน 2 M urea ซึ่งทำให้โปรตีนบางส่วนเกิดการ degraded หากแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE จะทำให้เห็นเป็นแถบ smear ของ degraded proteins จึงเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์โดยวิธี dot blot ซึ่งจะเป็นการหยดโปรตีนโดยตรงลงไปบนแผ่น membrane และใช้แรงสูญญากาศดึงโปรตีนให้ติดอยู่กับแผ่น membrane ดังนั้นโปรตีนที่ติดอยู่บน membrane จะเป็น native protein โดยจากผลการทดลอง ผู้วิจัยเลือกโมโนโคลนอล แนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 จำนวน 5 โคลน คือ 2F4-D3 1A4-B6 1C1-D10 2D1-H7 และ 2A4-B9 โดยเลือกจากโคลนที่สามารถผลิตแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้มาก และให้ผล strong

reactivity กับโปรตีน YKL-39 โดยวิธี ELISA จากการทดสอบใน รูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์โคลน 2F4-D3 1A4-B6 1C1-D10 และ 2A4-B9 จับกับโปรตีน YKL-39 ได้ดีเนื่องจากจุดมีสีเข้มโดยเฉพาะโคลน 2F4-D3 ในขณะที่โคลน 2D1-H7 สามารถจับกับโปรตีน YKL-39 ได้น้อย และเมื่อเทียบกับการจับกับ AMCase จะจับได้น้อยมากหรือไม่จับเลยเมื่อเทียบกับจุดของ YKL-39 ซึ่ง background ที่เกิดขึ้นสันนิษฐานว่ามาจาก degraded proteins จึงสรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโปรตีน YKL-39

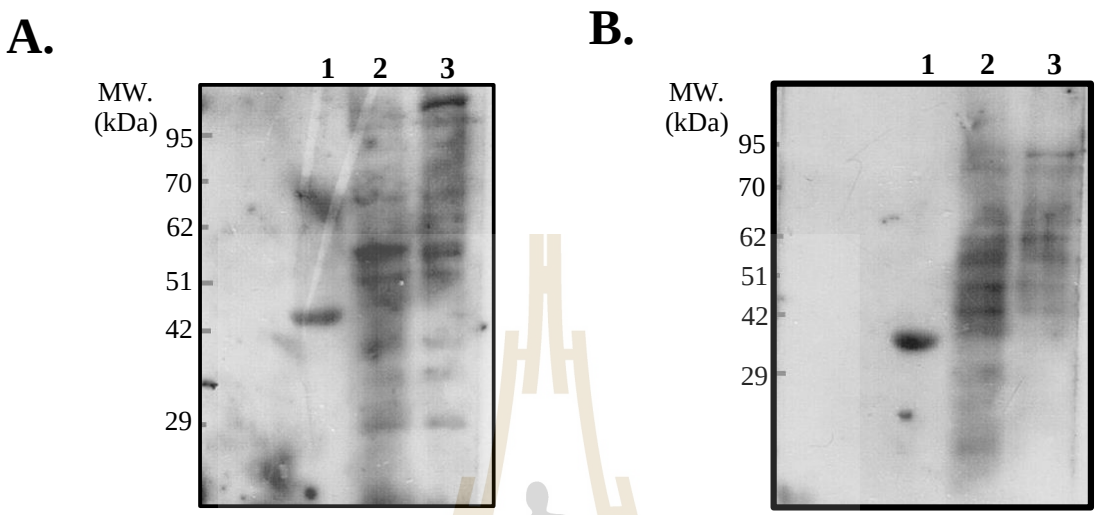


รูปที่ 11 Dot blot แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน human YKL-39
(1: conjugate control; 2: 2F4-D3; 3: 1A4-B6; 4: 1C1-D10; 5: 2D1-H7; 6: 2A4-B9)

4.4 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน YKL-39 ใน human monocytic cell line U937, THP-1 และ human macrophages

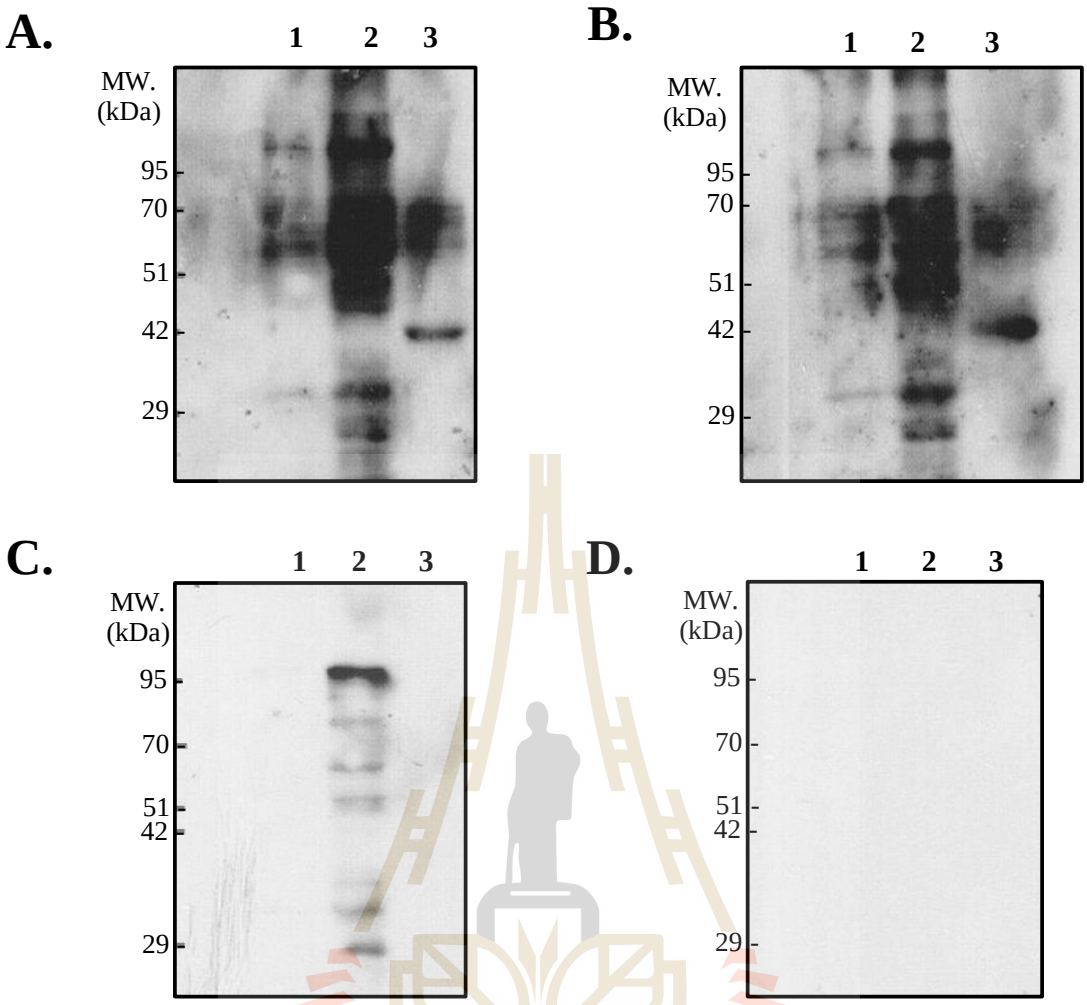
เนื่องจากผู้วิจัยมีความประสงค์ในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจหาโปรตีนเหมือนไคติเนสชนิด YKL-39 ที่หลั่งจากเซลล์ของมนุษย์จึงนำโมโนโคลนอลที่ผลิตได้มาตรวจสอบหาโปรตีน YKL-39 ในเซลล์มนุษย์ โดยเบื้องต้นได้นำ monocytic cell line U937 และ THP-1 มาเป็นต้นแบบในการศึกษา นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการกระตุ้นเซลล์ดังกล่าวด้วยสาร Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) เพื่อให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ macrophages เนื่องจากมีรายงานว่ามีการแสดงออกของโปรตีนเหมือนไคติเนสในเซลล์ YKL-39 และมีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Litviakov, Tsyganov et al. 2018, Liu, Larionova et al. 2018, Kzhyshkowska, Larionova et al. 2019) จึงคาดว่าจะพบการแสดงออกของโปรตีนเหมือน YKL-39 ในเซลล์นี้ แต่เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาทำการทำสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่นำมาทดสอบ ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน YKL-39 ทั้งในเซลล์ U937 และ THP-1 รวมถึง

เซลล์ macrophages ด้วย แต่จับได้กับริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 ที่ใช้ผลิตจากแบคทีเรีย ซึ่งใช้เป็น ดังแสดงในรูป **รูปที่** 12 และ **รูปที่** 13



รูปที่ 12 การแสดงออกของโปรตีน YKL-39 ใน U937 cell line และ macrophages ริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 (1) U937 cell lysates (2) และ cell lysates ของmacrophages ที่ได้จากการกระตุ้น U937 ด้วย สาร PMA (3) แยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reduced และทำ Western blotting ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1A4-B6 (A) และ 2D1-H7 (B) ผลการทดลองที่แสดงเป็นหนึ่งในสาม การทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน n=3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 13 การแสดงออกของโปรตีน YKL-39 ใน THP-1 cell line และ macrophages Cell lysates ของmacrophages ที่ได้จากการกระตุ้น THP-1 ด้วย สาร PMA (1) THP-1 cell lysates (2) และ ริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 (3) แยกด้วย 10% SDS-PAGE ในภาวะ reduced และทำ Western blotting ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1A4-B6 (A), 1C1-D10 (B), 2F4-D3 (C), conjugate control (D) ผลการทดลองที่แสดงเป็นหนึ่งในสามการทดลองที่ทำแยกกันและมีผลการทดลองที่เหมือนกัน n=3

บทที่5
บทสรุป

จากผลการวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนไคติเนส YKL-39 เป็นจำนวนทั้งสิ้น 8 โคลน คือ 1A4-B6, 1A4-F11, 1C1-A3, 1C1-D10, 2A4-B9, 2D1-B6, 2D1-H7 และ 2F4-D3 ซึ่งจำเพาะต่อริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 ของมนุษย์ที่ผลิตโดยเซลล์แบคทีเรีย
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-39 มีความจำเพาะต่อ ริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39 และไม่จับกับเอนไซม์ human acidic mammalian chitinase (AMCase) ที่มีความใกล้เคียงกัน
3. หลังการตรวจสอบชนิด isotype ของแอนติบอดีทั้งหมดที่ผลิต เป็นชนิด IgM isotype
4. โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่สามารถตรวจจับกับโปรตีน YKL-39 ในเซลล์ U937, THP-1 และ macrophages ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยสาร PMA แต่สามารถจับได้ดีกับ ริคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-39

ผลการทำวิจัยนี้ต้องการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดติต่อโปรตีนเหมือนไคติเนส YKL-39 เพราะไปใช้ทดสอบหรือตรวจหาการสร้างโปรตีน YKL-39 ในเซลล์ของคนที่คาดว่าเป็น marker ของโรคข้อเสื่อม แต่ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ได้จริงเนื่องจากยังไม่สามารถตรวจพบโปรตีน YKL-39 ในเซลล์มนุษย์ ซึ่งสรุปไม่ได้ว่าเป็นผลมากจากการที่เซลล์ดังกล่าวไม่มีการแสดงออกของโปรตีน YKL-39 ที่สนใจ หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมาไปจับกับ YKL-39 ที่ผลิตโดย eukaryotic cell หรืออาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน YKL-39 ที่ผลิตในเซลล์มีปริมาณน้อยเพราะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ แต่ผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบ YKL-39 โดยใช่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ งานวิจัยจึงไม่บรรลุวัตถุประสงค์ทุกข้อที่ตั้งไว้ ทั้งนี้ระหว่างที่ทำงานวิจัยได้มีงานที่ใกล้เคียงกันและมีการนำเสนอผลงาน โดยผลงานจากโครงการวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมนานาชาติในรูปแบบบทคัดย่อ

Khunkaewla, P., Lowhalidanon, K. Newly generated monoclonal antibodies bind specifically to glycosylated form of human acidic mammalian chitinase. Eur. J. immunol. Vol49 Special Issue: SI Supplement: 3; 750-750, Meeting abstract: P1995, Oct 2019

การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี peer review และอยู่ในฐานข้อมูล ISI โดยมีการ acknowledge ทุนนี้ จำนวน 1 เรื่อง

Wansook S, Mahasongkram K, Chruekamlow N, Pata S, Kasinrerk W, **Khunkaewla P.** Anti-human CD63 monoclonal antibody COS3A upregulates monocyte-induced IL-10 excretion leading to diminution of CD3-mediated T cell response (2019) Mol Immunol. 114:591-599. doi: 10.1016/j.molimm.2019.09.005. (Q2: IF2019=3.641)

สำเนาบทคัดย่อ และผลงานฉบับเต็มแสดงในภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Areshkov, P. A. and V. M. Kavsan (2010). "Chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2, YKL-39) activates phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases ERK1/ERK2 in human embryonic kidney (HEK293) and human glioblastoma (U87 MG) cells." Tsitol Genet 44(1): 3-9.

Areshkov, P. O., S. S. Avdieiev, O. V. Balynska, D. Leroith and V. M. Kavsan (2012). "Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation." Int J Biol Sci 8(1): 39-48.

De Ceuninck, F., E. Marcheteau, S. Berger, A. Caliez, V. Dumont, M. Raes, P. Anract, G. Leclerc, J. A. Boutin and G. Ferry (2005). "Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome." J Biomol Tech 16(3): 256-265.

Du, H., K. Masuko-Hongo, H. Nakamura, Y. Xiang, C. D. Bao, X. D. Wang, S. L. Chen, K. Nishioka and T. Kato (2005). "The prevalence of autoantibodies against cartilage intermediate layer protein, YKL-39, osteopontin, and cyclic citrullinated peptide in patients with early-stage knee osteoarthritis: evidence of a variety of autoimmune processes." Rheumatol Int 26(1): 35-41.

Gratchev, A., C. Schmuttermaier, S. Mamidi, L. Gooi, S. Goerdt and J. Kzhyshkowska (2008). "Expression of Osteoarthritis Marker YKL-39 is Stimulated by Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) and IL-4 in Differentiating Macrophages." Biomark Insights 3: 39-44.

Hu, B., K. Trinh, W. F. Figueira and P. A. Price (1996). "Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family." J Biol Chem 271(32): 19415-19420.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Khunkaewla, P., S. Chiampanichayakul, U. Yasamut, S. Pata and W. Kasinrerk (2007). " Production, characterization, and functional analysis of newly established CD9 9 monoclonal antibodies MT99/1 and MT99/2." Hybridoma (Larchmt) 26(4): 241-250.

Knorr, T., F. Obermayr, E. Bartnik, A. Zien and T. Aigner (2003). "YKL-39 (chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40 (chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes." Ann Rheum Dis 62(10): 995-998.

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

Kzhyshkowska, J., I. Larionova and T. Liu (2019). "YKL-39 as a Potential New Target for Anti-Angiogenic Therapy in Cancer." Front Immunol 10: 2930.

Litviakov, N., M. Tsyganov, I. Larionova, M. Ibragimova, I. Deryusheva, P. Kazantseva, E. Slonimskaya, I. Frolova, E. Choinzonov, N. Cherdyntseva and J. Kzhyshkowska (2018). "Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy." Cancer Chemother Pharmacol 82(1): 99-109.

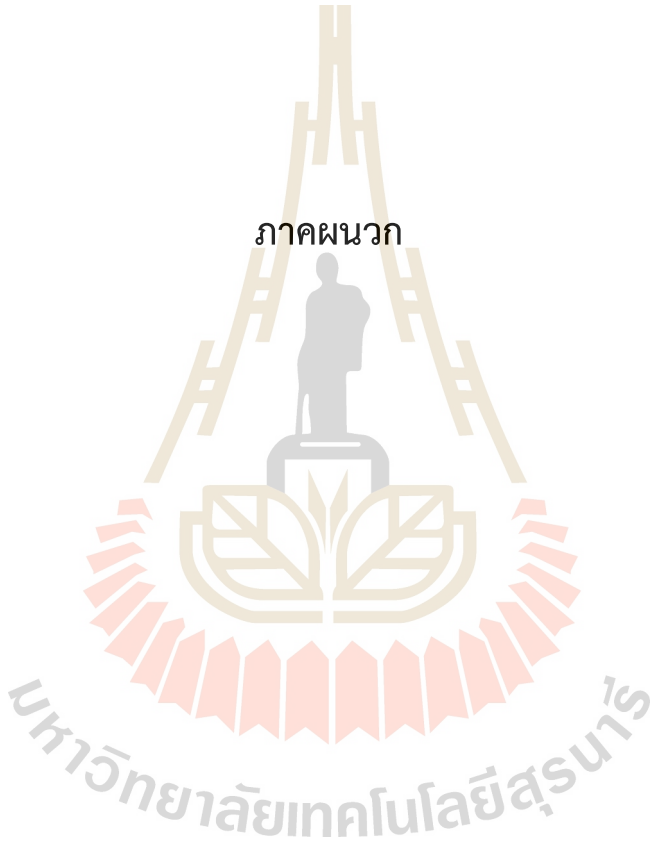
Liu, T., I. Larionova, N. Litviakov, V. Riabov, M. Zavyalova, M. Tsyganov, M. Buldakov, B. Song, K. Moganti, P. Kazantseva, E. Slonimskaya, E. Kremmer, A. Flatley, H. Kluter, N. Cherdyntseva and J. Kzhyshkowska (2018). "Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy." Oncoimmunology 7(6): e1436922.

Sakata, M., K. Masuko-Hongo, J. Tsuruha, T. Sekine, H. Nakamura, M. Takigawa, K. Nishioka and T. Kato (2002). "YKL-39, a human cartilage-related protein, induces arthritis in mice." Clin Exp Rheumatol 20(3): 343-350.

Sekine, T., K. Masuko-Hongo, T. Matsui, H. Asahara, M. Takigawa, K. Nishioka and T. Kato (2001). "Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 60(1): 49-54.

Steck, E., S. Breit, S. J. Breusch, M. Axt and W. Richter (2002). "Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage." Biochem Biophys Res Commun 299(1): 109-115.

ภาคผนวก



เอกสารรับรองการใช้สัตว์ทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

31 / 2554

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนเหมือนเอนไซม์ไคติเนสชนิด YKL-39 และการศึกษาหน้าที่ของ YKL-39 ในกระบวนการเกิดโรคข้อเสื่อม

หัวหน้าโครงการวิจัย อาจารย์ ดร. พนิดา ขันแก้วหล้า

หน่วยงาน สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ ผ่านความเห็นชอบโดยผู้ทรงคุณวุฒิด้านการใช้สัตว์และคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ ศธ 5621/ว.0377 เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2554 มีมติอนุมัติให้ใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัยตามข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ได้

(รองศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ ทองระอา)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

หลักฐานการตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานวิชาการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Newly generated monoclonal antibodies bind specifically to glycosylated form of human acidic mammalian chitinase

Panida Khunkaewla and Kanokwan Lowhalidanon

Biochemistry-Electrochemistry Research Unit, School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Human acidic mammalian chitinase (huAMCase), a 50 kDa protein containing a 30 kDa N-terminal terminal catalytic domain that can hydrolyze chitin, belongs to family 18 glycosyl hydrolases. High abundant of this enzyme was found in gastrointestinal tract. In lung, interleukin-13 was proposed to play a key role as primary effector that induces secretion of huAMCase by airway epithelial cells and macrophages. The secreted huAMCase activates elevation of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and eotaxin-1, which induce the recruitment of eosinophils, T cells, and macrophages to site of inflammation in lung epithelial cells. However, the mechanisms underlying huAMCase mediated cells recruitment and its surface receptor have not been identified. In this study, the monoclonal antibodies to huAMCase were raised using standard hybridroma technique. Four specific monoclones, namely 4G1-D9, 4G1-E5, 6E5-C2 and 6E5-C9 that highly specific to only huAMCase were successfully generated. All the clones belong to IgG1 isotype and react with huAMCase endogenously expressed in HeLa cells and monocytic cell lines: THP1 and U937. Interestingly, Western blotting showed that clones 6E5-C2 and 6E5C9 could detect the 70 kDa protein, which was reduced to 50 kDa by elimination of N-linked glycan using tunicamycin, indicating the glycosylated form of huAMCase. The obtained antibodies may be suitable for development of a sensitive detection of huAMCase that will help to predict the progress of the allergic disease. Keywords: huAMCase, monoclonal antibody, glycosylated form.

This work was supported financially by the National Research Council of Thailand [grant no. SUT-102-57-36-25] and Suranaree University of Technology, Thailand.

ประวัติผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1. **ชื่อ – นามสกุล** (ภาษาไทย) นางสาว พนิดา ขันแก้วหล้า
   (ภาษาอังกฤษ) Miss Panida Khunkaewla

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์สาขาวิชาชีวเคมี

3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**
   สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-223968 โทรสาร 044-224185 e-mail kpanida@sut.ac.th

4. **ประวัติการศึกษา**

2549-2550	นักวิจัยหลังปริญญาเอก ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2544-2548	Dr. Scient. Med. (Immunology) Medical University of Vienna, Austria
2540-2543	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2536-2540	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**
   ชีวเคมีและหน้าที่ทางภูมิคุ้มกันวิทยาของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี