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.