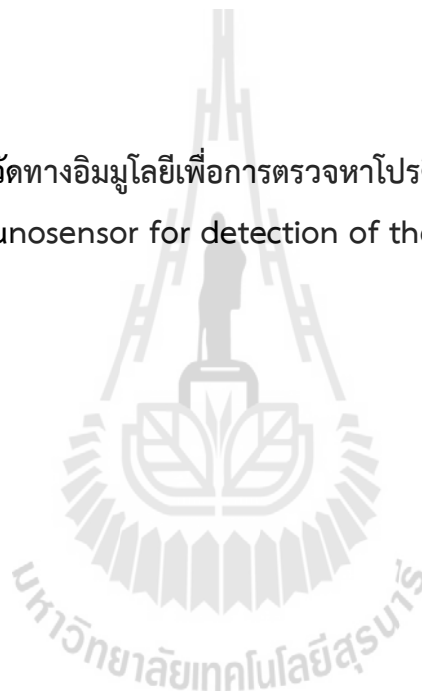




รายงานการวิจัย

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางอิมมูโนโลยีเพื่อการตรวจหาโปรตีนบ่งชี้โรคมะเร็ง YKL-40
Development of immunosensor for detection of the tumor marker YKL-40



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดทางอิมมูโนโลยีเพื่อการตรวจหาโปรตีนบ่งชี้โรคมะเร็ง YKL-40
Development of immunosensor for detection of the tumor marker YKL-40

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

ผู้ร่วมโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อัลเบิร์ต ชูลท

หน่วยวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า

สาขาวิชาชีวเคมี/สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554-2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ
ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมีเพื่อการ
วิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557

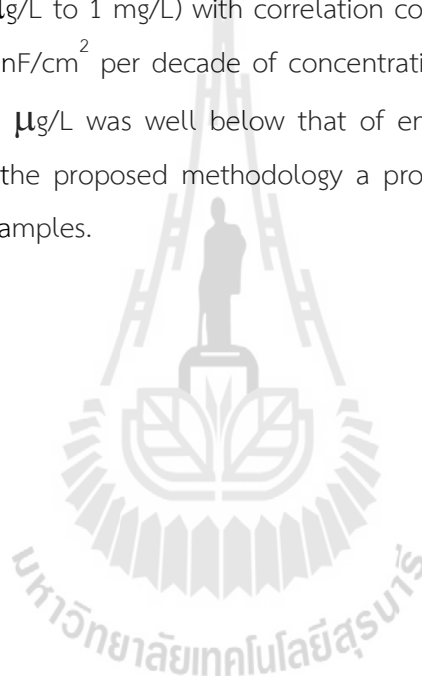
บทคัดย่อ

ได้มีรายงานว่า การติดเชื้ออหิวสและพยาธิสภาพของมะเร็งบางชนิดมีความสัมพันธ์แบบมีนัยสำคัญกับการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของไกลโคโปรตีน YKL-40 ในซีรัม งานวิจัยนี้รายงานเกี่ยวกับการสร้างและการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของ capacitive immunosensing setup ที่จำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 โดยทำการตรึง anti-YKL-40 polyclonal antibodies ที่ผลิตในห้องปฏิบัติการนี้บนผิวหน้าของอิเล็กโทรดทองคำ โดยทำการตรวจวัดด้วยอิมมูโนเซนเซอร์ที่เตรียมได้โดยต่อเข้ากับระบบ flow injection ที่ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า capacitance ที่เกิดขึ้นจากการจับอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นให้ linear range ในช่วงกว้างคือ 0.1 $\mu\text{g/L}$ to 1 mg/L โดยให้ค่า correlation coefficients (R^2) มากกว่า 0.99 และให้ความไวในการวัดสูงคือ $(12.28 \pm 0.27 \text{ nF/cm}^2/\text{decade})$ ของความความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ค่า limit of detection limit ที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าที่วัดได้จากวิธี ELISA assay ดังนั้นเทคนิค immunosensing ที่พัฒนาขึ้นน่าจะมี ความเหมาะสมในการตรวจหาปริมาณโปรตีน YKL-40 จากตัวอย่างคลินิกจริง



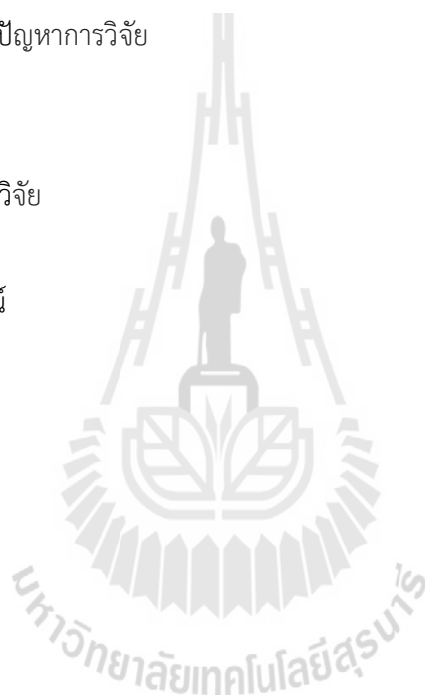
ABSTRACT

It has been reported that tissue inflammation and the occurrence of certain cancers are significantly correlated with increased concentrations of a serum YKL-40 glycoprotein. This research reports the construction and characterization of capacitive immunosensing setup specifically for detection of YKL-40, using the in house generated anti-YKL-40 polyclonal antibodies, which was immobilized on gold electrode surface. The resultant immunosensors were operated in an electrochemical flow system with detection of capacitive change upon specific binding between antigen and antibody. The developed technique provided a wide linear detection range (0.1 $\mu\text{g/L}$ to 1 mg/L) with correlation coefficients (R^2) above 0.99 and good sensitivity ($12.28 \pm 0.27 \text{ nF/cm}^2$ per decade of concentration change). Additionally, the detection limit of $0.07 \pm 0.01 \mu\text{g/L}$ was well below that of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which makes the proposed methodology a promising alternative for YKL-40 detection from real clinical samples.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	
ก ผลงานเผยแพร่	29
ข ประวัติผู้วิจัย	30



สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้าง cartoon ของโปรตีน YKL-40 ที่ประกอบด้วย TIM barrel	2
รูปที่ 1.2 การวิเคราะห์ทาง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อที่ทำ paraffin section	3
รูปที่ 1.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน YKL-40 และระดับโปรตีนบ่งชี้ CA-125 ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด endometrial cancer	4
รูปที่ 1.4 หลักการตรวจวัดหาปริมาณโปรตีน YKL-40 โดยเทคนิค immunosensor	5
รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ flow injection system ของ YKL-40 capacitive immunosensor	11
รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์ PCR product ของยีน human YKL-40 โดยวิธี gel electrophoresis	12
รูปที่ 3.2 แสดงการวิเคราะห์โปรตีน YKL-40 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE	13
รูปที่ 3.3 การหาระดับความไวในการจับกันระหว่าง YKL-40 antigen กับ anti-YKL-40 polyclonal antibody ที่ผลิตใหม่	14
รูปที่ 3.4 การตรวจหาความจำเพาะของ anti YKL-40 antiserum ที่ผลิตใหม่	15
รูปที่ 3.5 การทำบริสุทธิ์ anti YKL-40 antiserum โดยวิธี affinity chromatography และการวิเคราะห์แอนติบอดีหลังการทำบริสุทธิ์	16
รูปที่ 3.6 การทดสอบ cross reactivity ของ anti YKL-40 antiserum ที่ทำบริสุทธิ์	17
รูปที่ 3.7 Cyclic voltammogram ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation/reduction ของสาร ferrocyanide	18
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์การเปลี่ยนของกระแสในหน่วย μA ต่อเวลา	19
รูปที่ 3.9 กราฟแสดงค่าการลดลงของ capacitance เมื่อทำการเติมแอนติเจนคือโปรตีน YKL-40 ในระบบ flow injection	20
รูปที่ 3.10 กราฟแสดงค่าการเปลี่ยนแปลงค่า capacitance ที่ความเข้มข้นของโปรตีน ไกลโคซิล ไฮโดรเลสแฟมิลี 18	23
รูปที่ 3.11 แสดงการตรวจหาโปรตีน YKL-40 ที่วัดจาก capacitive YKL-40 immunosensing	24

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ regenerate YKL-40 immunosensor หลังการฉีดตัวอย่างแอนติเจน	21
ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา YKL-40 แอนติเจนด้วยวิธี flow injection-based capacitive YKL-40 immunosensing	22
ตารางที่ 3.3 ตารางเปรียบเทียบค่าการตรวจหาโปรตีน YKL-40 จากการ spike ตัวอย่างจริง	25

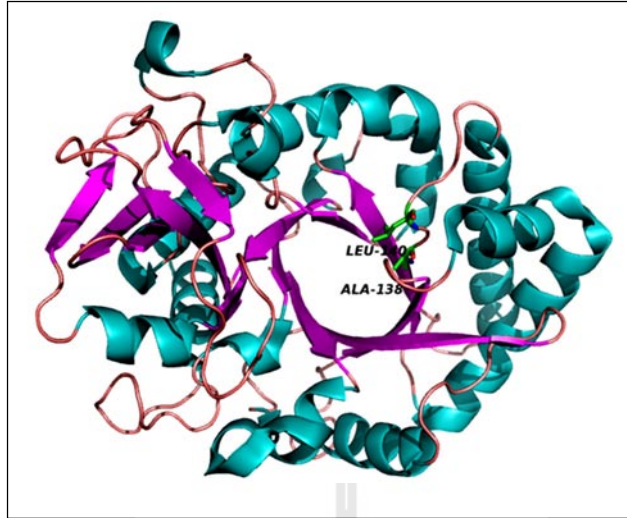


บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โปรตีน YKL-40 (HCgp-39 หรือ chitinase 3-like protein 1) เป็นไกลโคโปรตีนที่พบในซีรัมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โปรตีนนี้ประกอบด้วยสายโพลีเพปไทด์สายเดียวมีจำนวนกรดอะมิโนทั้งหมด 383 ตัว มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์สามารถจับกับน้ำตาลโคโตแซคคาร์ไรด์ โดยชื่อโปรตีน YKL-40 มีที่มาจากลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายด้านเอ็นสามตัวที่เป็น Y-K-L และโปรตีนมีขนาดประมาณ 40 kDa (Rejman & Hurley, 1988; Hakala et al., 1993; Johansen et al., 1992) รายงานการศึกษาครั้งแรกพบโปรตีนนี้ในน้ำนมของวัวเพศเมียที่ไม่ได้ตั้งครรรค์ (Rejman and Hurley, 1988; Hakala et al., 1993) และต่อมาพบโปรตีนนี้ถูกสร้างในเซลล์มนุษย์หลายชนิด ได้แก่ synovial cells (Nyirkos & Golds, 1990) ใน osteosarcoma cell line (Johansen et al., 1992) ใน chondrocytes (Hakala et al., 1993) ใน smooth muscle cells (Shackelton et al., 1995) ใน macrophages (Kirkpatrick et al., 1997) และ neutrophils (Volck et al., 1998) การศึกษาระดับดีเอ็นเอพบว่า ยีน YKL-40 สังกะยาสายโพลีเพปไทด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับโปรตีน chitotriosidase (Fusetti et al., 2002) และโปรตีนอื่น ๆ ในกลุ่มของ chitinase-like proteins เช่น YKL-39 (Hu et al., 1996) โปรตีน Ym1 (Chang et al., 2001; Sun et al., 2001) โปรตีน acidic mammalian chitinase (Boot et al., 2001) oviduct-specific, estrogen-dependent glycoprotein (Buhi, 2002) และ stabilin-1-interacting chitinase-like protein (Kzhyshkowska et al., 2006) โปรตีนทั้งหมดที่กล่าวมานี้จัดอยู่ในแฟมิลี 18 ไกลโคซิลไฮโดรเลส เช่นเดียวกับโปรตีนโคติเนสที่พบแบคทีเรียและพืชบางชนิด ต่อมาได้มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน YKL-40 เป็นครั้งแรกโดย Daan van Aalten และคณะ โครงสร้างของ YKL-40 ประกอบด้วยโดเมนเดี่ยวที่เรียกว่า $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel มีลักษณะเหมือนกับโดเมนเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนแฟมิลี-18โคติเนสหลาย ๆ ชนิด (Fusetti et al., 2002) โปรตีนโคติเนสเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ ปีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก ที่เชื่อมหน่วยน้ำตาล N-acetylglucosamine ของสายโคติเนสและโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เข้าด้วยกัน โดเมนเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนโคติเนสมีกรดอะมิโนวงแหวนหลายตัวที่ทำหน้าที่จับกับสับสเตรท และมีส่วนที่ conserve มีลำดับกรดอะมิโนเป็น DXXDXDXE ที่ปลายสายปีต้าที่ 4 ของ TIM barrel และกรดอะมิโน glutamic acid ตัวสุดท้ายของ motif นี้ทำหน้าที่เป็นหมู่ให้โปรตอนและเป็นกรดอะมิโนเร่งปฏิกิริยาตัดพันธะไกลโคซิดิกของสายสับสเตรท ส่วนโปรตีน YKL-40 ไม่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ถึงแม้ว่าโปรตีน YKL-40 จะมีกรดอะมิโนวงแหวนภายในร่องที่คล้ายบริเวณเร่งที่จับสายโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ได้แต่เกิดการเร่งปฏิกิริยาตัดพันธะไกลโคซิดิกไม่ได้เนื่องจากกรดอะมิโนเร่งปฏิกิริยา Glu315 และกรดอะมิโน Asp313 ที่ทำหน้าที่ยึด transition state ที่พบในโครงสร้างของโปรตีนโคติเนส (ใน *Serratia* ChiA หรือ *Vibrio* ChiA) (Perrakis et al., 1994 & Sonsiriritthigul et al., 2008) ถูกแทนที่ด้วย Leu140 และ Ala138 ในโครงสร้างของ YKL-140 ดังแสดงในรูปที่ 1.1

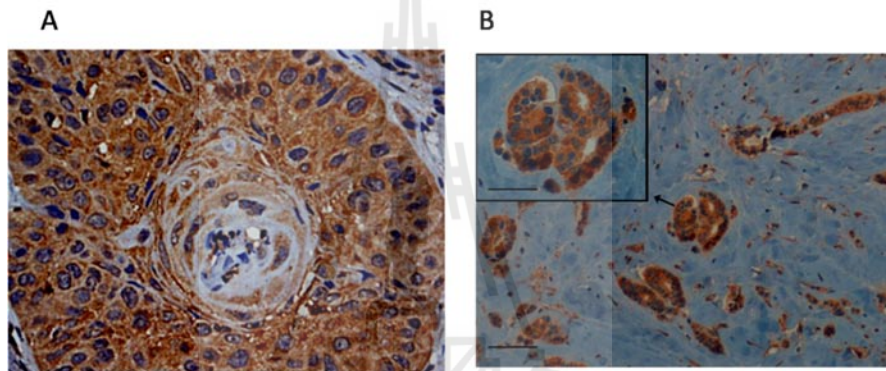


รูปที่ 1.1 โครงสร้าง cartoon ของโปรตีน YKL-40 ที่ประกอบด้วย TIM barrel ตำแหน่ง Ala138 และ Leu140 แทนที่กรดอะมิโน Glu และ Asp ที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนไคตินเนส (โปรแกรมแสดงภาพ Pymol โครงสร้างที่ใช้แสดงโปรตีน YKL-40 จาก pdb code: 1HJV)

แม้ว่ายังไม่มีการศึกษาบทบาทของโปรตีน YKL-40 ภายในเซลล์อย่างแน่ชัดแต่ได้มีผลการวิจัยอย่างน้อย 100 ชิ้น ที่บ่งชี้ว่าโปรตีน YKL-40 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับพยาธิสภาพของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยการทำงานของโปรตีนน่าจะเกิดผ่านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายในลักษณะ T-cell mediated autoimmune response โรคที่เกี่ยวข้องได้แก่ rheumatoid arthritis โรค liver fibrosis และ asthma

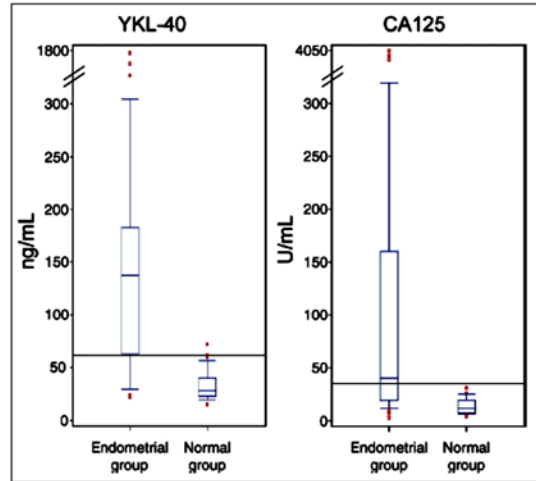
งานวิจัยในช่วงหลัง ๆ พบว่าระดับของโปรตีน YKL-40 มีส่วนบ่งชี้พยาธิสภาพของโรคมะเร็งชนิด solid tumors ของอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะมะเร็งสมองชนิด glioblastoma มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งรังไข่ มะเร็งมด มะเร็งไต และมะเร็งผิวหนัง ผลการวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติหลายชิ้นระบุว่าผู้ป่วยมะเร็งชนิดดังกล่าวจะผลิตโปรตีน YKL-40 ออกมาในกระแสเลือดในปริมาณมาก ผิดปกติเมื่อเทียบกับคนปกติ ในระดับสูงกว่า 60 ng/mL และระดับของโปรตีนจะสูงสุดในผู้ป่วยมะเร็งที่อยู่ในระยะลุกลาม หรือในผู้ป่วยที่มี prognosis ต่ำ (Johansen et al., 2008) ตัวอย่างรายงานของ Qin et al ในวารสาร Int J Cancer ปี พ.ศ. 2007 ระบุว่า การคัดกรองมะเร็งเต้านมของผู้หญิงจำนวน 118 คน ที่มีอายุตั้งแต่ 17-95 ปี พบจำนวน 61 คน ให้ผลปกติ จำนวน 10 ให้ผล precancer และอีก 47 คน ให้ผล cancer ผลการตรวจพบระดับโปรตีน YKL-40 ในส่วนของ nipple aspirate fluid ของกลุ่ม precancer และ cancer สูงกว่ากลุ่มปกติเกือบทั้งหมด (Qin et al., 2007)

งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งของ Bergmann และคณะ (Bergmann et al., 2005) พบว่าโปรตีน YKL-40 น่าจะทำหน้าที่เป็น growth factor หรือ differentiation factor ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หรือเป็น anti-apoptotic factor ที่ยับยั้งเซลล์ไม่ให้เข้าสู่ภาวะ apoptosis จากผลการวัดระดับโปรตีน YKL-40 ในซีรัมโดยวิธี ELISA ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute myeloid leukemia (AML) จำนวน 77 ราย พบว่าผู้ป่วย 55% มีระดับของ YKL-40 สูงผิดปกติ ผลการติดตามการรักษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีระดับโปรตีนสูงมีอัตราการตายหลังการรักษาครั้งแรกในระยะ 12 เดือน (12 months survival) สูงกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ YKL-40 ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับโปรตีน YKL-40 สูงมีโอกาสการติดเชื้ออวัยวะที่ปอดสูงอีกด้วย ในการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งชนิดอื่น ๆ ให้ผลสอดคล้องกัน ผลการศึกษาทาง immunohistochemistry ในผู้ป่วย high-grade neck cancer (Roslind et al., 2008) และมะเร็งรังไข่ (Yang et al., 2009) พบผลการย้อมติดสีโปรตีน YKL-40 ในเซลล์มะเร็งดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 การวิเคราะห์ทาง immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อที่ทำ paraffin section เซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำตาลแสดงผลบวกของแอนติบอดีกับโปรตีน YKL-40: A. มะเร็งคอ; B. มะเร็งรังไข่

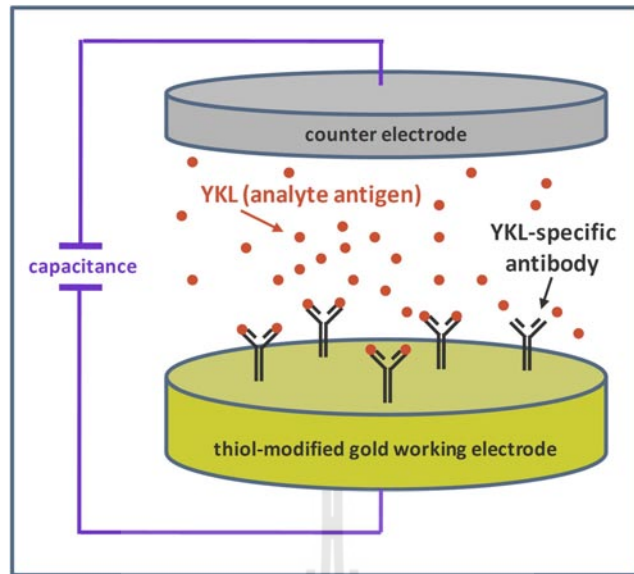
ผลการศึกษาอื่น ๆ เช่นในมะเร็งมดลูกชนิด endometrial cancer ให้ผลเหมือนกับการศึกษาอื่น ๆ โดยพบระดับของโปรตีน YKL-40 สูงกว่า 61 ng/mL เทียบกับคนปกติ และระดับของโปรตีนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับระดับของโปรตีนบ่งชี้ CA-125 ดังแสดงในรูปที่ 1.3 (Diefenbach et al., 2007)



รูปที่ 1.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน YKL-40 และระดับโปรตีนบ่งชี้ CA-125 ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด endometrial cancer (Diefenbach et al., 2007)

จากการรวบรวมข้อมูลจากผลการวิจัยหลาย ๆ ชิ้นพบว่า ระดับของโปรตีน YKL-40 ในผู้ป่วยมะเร็งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะการดำเนินของโรค โดยระดับของโปรตีนจะสูงสุดในมะเร็งระยะลุกลามและในกลุ่มของผู้ป่วยที่มี poor prognosis ซึ่งบ่งบอกถึงอัตราการรอดชีวิตต่ำ และได้มีการนำเสนอว่าอาจใช้ โปรตีน YKL-40 เป็นโปรตีนบ่งชี้ภาวะ prognosis ของมะเร็งในกลุ่ม solid tumor โดยเฉพาะมะเร็งรังไข่ (Yang et al., 2009)

งานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการตรวจหาระดับของโปรตีนในซีรัมของผู้ป่วยโดยใช้เทคนิคทาง enzyme-linked immunosorbent assay บางรายงานแสดงการตรวจหาการแสดงออกของ mRNA ของ YKL-40 ของเนื้อเยื่อโดยวิธี In Situ Hybridization และ Polymerase Chain Reaction หรือการทำ immunohistochemistry แต่เทคนิคดังกล่าวมีความยุ่งยาก ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ อาศัยเวลาเป็นอาทิตย์หรือเป็นเดือนในการทราบผล เนื่องจากต้องทำในห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์มีราคาแพงจึงเสียค่าใช้จ่ายสูง ในงานวิจัยนี้แนะนำการพัฒนาเทคนิค immuno based sensor เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนบ่งชี้ YKL-40 เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งและภาวะ prognosis ของผู้ป่วย โดยหลักการแล้วเทคนิคการตรวจวัดโดย immunosensor ได้มีการพัฒนาให้เหมาะสมกับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนบ่งชี้โรคมะเร็งหรือ cancer marker เพื่อคัดกรองหาะเร็งระยะเริ่มแรกหลายชนิด (Tothill, 2009; Wu et al., 2007) รูปที่ 1.4 แสดงหลักการของ immunosensor ต่อโปรตีน YKL-40 โดยแอนติบอดีจะถูกตรึงอยู่บนผิวของ working electrode ที่เชื่อมอยู่กับ counter electrode และเมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนคือ YKL-40 จะทำให้การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัว free analyte ที่สามารถตรวจวัดได้ภายใต้สนามความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ค่าใด ๆ (Daniels & Pourmand, 2007)



รูปที่ 1.4 หลักการตรวจวัดหาปริมาณโปรตีน YKL-40 โดยเทคนิค immunosensor

ข้อดีของการตรวจวัดทาง immnosensor คือเป็นเทคนิคที่มีความไวและแม่นยำในการตรวจวัดหาปริมาณสารในช่วงกว้างตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยมาก ๆ ระดับ nanomolar ถึงระดับสูงมาก ๆ millimolar ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ต้องการตรวจวัดสารในซีรัม เทคนิคนี้มีความจำเพาะสูงเนื่องจากใช้หลักการตรวจจับแบบจำเพาะระหว่าง specific antibody และสามารถพัฒนาให้ผู้ป่วยตรวจวัดเองได้ในทุกสถานที่ ทุกเวลา โดยไม่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญใด ๆ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สามารถตรวจวัดและทราบผลทันทีโดยไม่ต้องคอยผลจากห้องปฏิบัติการ (Limbut et al., 2006; Hedstroem et al., 2005; Hu et al., 2000) เนื่องจากมะเร็งเป็นโรคร้ายที่การดำเนินของโรคที่เร็ว ประชากรเสียชีวิตสูงส่วนหนึ่งมาจากจากการตรวจวินิจฉัยและการวางแผนรักษาที่ล่าช้า ดังนั้น immunosensor จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมอย่างมากในการพัฒนาเป็นเครื่องมือตัววัดโปรตีนบ่งชี้ระยะและการกลับมาของโรคมะเร็งที่ต้องการทราบผลทันที ทำให้การตรวจวินิจฉัยและการรักษาทำได้รวดเร็ว ทำให้ลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งของผู้ป่วยได้

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำการโคลนและแสดงออกของ human YKL-40 ในระบบ *E. coli* /human cell line
2. เพื่อทำบริสุทธิ์และการเตรียม antibody ที่จำเพาะกับโปรตีน YKL-40
3. เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ immunosensor ที่จำเพาะและไวต่อการตรวจวัดปริมาณโปรตีนบ่งชี้โรคมะเร็ง YKL-40

1.3.ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน human YKL-40 ขั้นตอนนี้ทำโดยอาศัยข้อมูลจาก human genome project ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI หลังจากนั้นจะทำการสังเคราะห์ยีนและโคลนยีนโดยเทคนิคทาง PCR ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของยีนที่ได้ การทดลองในขั้นตอนนี้คือการโคลนยีนและการศึกษาการแสดงออกของยีน YKL-40 ใน *E. coli* และใน cancer cell line ชนิดต่าง ๆ ต่อจากนั้นทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ หลังจากนั้นทำการเตรียม monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 ขั้นตอนนี้มาทำการตรวจหาระดับการแสดงออกของโปรตีนร่วมกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ใน cancer cell lines ต่าง ๆ โดยวิธีทาง immunoprecipitation และ immunocytochemistry และขั้นตอนนี้สุดท้ายนำ polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 มาใช้ในการเตรียมอุปกรณ์ตรวจวัด immuno sensor แล้วตรวจสอบระดับความแม่นยำและความจำเพาะต่อโปรตีน YKL-40 ของอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้หลักการจับแบบจำเพาะ

1.4.ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาเทคนิค immunosensor เพื่อตรวจวัดระดับของโปรตีนบ่งชี้มะเร็งระยะลุกลามและทำนายสถานะ prognosis และการกลับมาระยะหลังการรักษา มะเร็ง งานวิจัยนี้ยังไม่มีผู้ใดดำเนินการมาก่อน ดังนั้นผลงานวิจัยที่ได้ถือเป็นเรื่องความรู้ใหม่ เทคนิคที่ต้องการพัฒนามีเป้าหมายชัดเจนและให้ผลกระทบต่อวงการแพทย์และคุณภาพของประชากรไทยสูง โดยผลสำเร็จที่คาดว่าจะได้รับหลังจากเสร็จสิ้นโครงการคือ

1. การตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor สูง (ตั้งแต่ 2.0-10.0) อย่างน้อย 1 เรื่อง
2. การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 2 ครั้ง
3. การผลิตนักวิจัยรุ่นเยาว์ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง 1 คน
4. การทดลองในระดับปฏิบัติการเทคนิค immune sensor เพื่อการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือ

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. สถาบันวิจัยทางการแพทย์ทั้งในและต่างประเทศ
3. สถาบันมะเร็งแห่งชาติทั้งในและต่างประเทศ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การโคลนยีน human *CHI3L1* ที่ผลิต YKL-40

1. ทำการโคลนยีน *CHI3L1* gene ที่ผลิตโปรตีน human YKL-40 โดยการค้นหาลำดับของยีนจากฐานข้อมูล GenBank database (Genbank accession number NM_001276.2)
2. ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มี *SacI* restriction site ที่ forward primer และ *XhoI* restriction site ที่ reverse primer ดังข้างล่าง

YKL-40 *SacI* Forward 5'-AGAGCTCGGTGTGAAGGCGTCTCAAAC-3'

YKL-40 *XhoI* Reverse 5'-TCTCGAGCGTTGCAGCGAGTGCATC-3'
3. ทำการสังเคราะห์ *CHI3L1* gene โดยเทคนิค PCR โดยใช้ human placental cDNA (GenScript Corporation, USA) เป็น DNA ต้นแบบ โดยใช้ PCR condition ดังข้างล่าง

Denaturation at 97°C, 30 sec

Annealing at 60°C, 1 min

Extension at 72°C, 1 min

Final extension cycle, 4 min

โดยกำหนดค่า cycle ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน PCR product คือ 35 cycles
4. ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยการแยกดีเอ็นเอบน 1% agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วตัดชิ้น PCR product ขนาด 1.1. kb เพื่อนำทำบริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
5. ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ทำบริสุทธิ์เข้าสู่ pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA) โดยเรียก construct ที่ได้ว่า *p-GEM-T/CHI3L1*
6. ทำการย่อย *p-GEM-T/CHI3L1* ด้วย restriction enzyme สองตัวคือ *SacI* และ *XhoI* เพื่อสร้าง sticky end ที่ปลายทั้งสองด้านของ *CHI3L1* DNA
7. ทำการ ligate ชิ้น *CHI3L1* DNA เข้าสู่ pQE-TriSystem expression vector ด้วยปฏิกิริยา ligation ของโปรตีน T4 DNA ligase ที่ 4°C เป็นเวลา 16 h
8. ทำการ transform รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *pQE-Tri/CHI3L1* เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) agar ที่มี 100 μ g/mL ของ ampicillin อยู่ด้วยทำการบ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมงในตู้บ่ม
9. เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ได้หลังจากการทำ transformation มาตรวจสอบการมียีน *CHI3L1* ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CHI3L1*

10. เลือกโคลนที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ colony PCR มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit from Geneid (Taipei, Taiwan)
11. ทำการยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CHI3L1* ใน pQE-Tri/*CHI3L1* construct ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย automated DNA sequencing (First Base Laboratories, Selangor, Malaysia) โดยใช้ universal primers สำหรับ pQE-TriSystem expression vector โดยเรียก construct ที่มี *CHI3L1* ที่ถูกต้องนี้ว่า pQE-Tri/*CHI3L1* construct

2.2. การผลิตและการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์ YKL-40 ในระบบ *E. coli*

ทำการศึกษาการแสดงออกของ recombinant YKL-40 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB/100 µg/ml ampicillin ที่ 30°C จนได้ OD₆₀₀ ประมาณ 0.6 ทำการ induce เซลล์ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่ 20°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C ทำการละลายเซลล์ด้วย 40 ml ของ lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 1.0 mg/ml lysozyme ต่อจากนั้นทำการสลายเซลล์ด้วยเทคนิค ultrasonication แล้วปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่นตกตะกอนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับ หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย 5 mM imidazole ตามด้วย 10 mM imidazole ทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ Ni²⁺ ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli [18] ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนโคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (Mr 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's [19] แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหน้าที่ โครงสร้าง หรือเก็บที่ -30°C ใน 15% (w/v) กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

2.3. การผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนโคติเนสในคน (human YKL-40)

1. เก็บเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดดำบริเวณใบหู เพื่อแยกเก็บซีรัมก่อนการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง (pre-immune serum) สำหรับใช้เปรียบเทียบกับระดับแอนติบอดีที่ได้หลังการฉีดกระตุ้นด้วย recombinant YKL-40 antigen ที่ผลิตจาก *E. coli*
2. ฉีดกระตุ้นกระต่าย New Zealand White ด้วยโปรตีน human YKL-40 ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ปริมาณ 250 ไมโครกรัมใน 2 M Urea ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยผสมกับ Freund's Complete adjuvant ด้วยอัตราส่วน 1:1 รวมปริมาตร 1.0 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ฉีด YKL-40 antigen เข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอ ทำการฉีดซ้ำอีก 2 ครั้งทุก 2 อาทิตย์โดยใช้ปริมาณของโปรตีนเท่ากันแต่เปลี่ยนเป็นผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ด้วยอัตราส่วนเท่าเดิม
4. เก็บเลือดจากใบหูของกระต่ายทุก 1 อาทิตย์หลังการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง

5. แยกแอนติซีรัมโดยการตั้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกซีรัมที่ความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกซีรัมและเก็บไว้ที่ -40 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

2.4. การทำบริสุทธิ์แอนติบอดี anti-YKL-40 polyclonal antibodies

1. ทำการเจือจาง anti-YKL-40 antiserum ด้วย binding/wash Buffer ที่ประกอบด้วย 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 8.0) ด้วยอัตราส่วน 1:1
2. ทำการใส่ตัวอย่างลงคอลัมน์ protein A ที่ทำการ pre-equilibrate ไว้แล้วที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างคอลัมน์ด้วย 60 ml ของ binding/wash buffer จนไม่มีโปรตีนอยู่ใน wash fraction แล้ว
4. ทำการชะคอลัมน์ด้วย 3x5 ml ด้วย elution buffer (0.1M glycine, pH 2.5) แล้วเติม neutralization buffer ปริมาตร 1:10 ของปริมาตรของ eluted fractions เพื่อทำการปรับ pH ขึ้นไปที่ค่า 7.4
5. กำจัดเกลือและเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้เป็น PBS ออกจากตัวอย่างด้วย Hiprep 26/10 desalting column
6. เก็บ purified antibody โดยทำเป็น aliquots ที่ปริมาตรน้อย ๆ ไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2.5. การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อแสดงการจับกันระหว่าง anti-YKL-40 กับ recombinant YKL-40

2.5.1. การทดสอบโดยวิธี western blotting

1. ผสมโปรตีน human YKL-40 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% skim milk ในสารละลาย PBS
3. นำ membrane ที่ผ่านการ block แล้วมาข้อมด้วยซีรัมกระต่ายที่เจือจางด้วย 2% skim milk แล้วที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทียบกับ Pre-immune serum
4. ล้างแอนติบอดีที่ไม่จับและโปรตีนอื่นในซีรัมออกด้วย 0.1% Tween 20 ในสารละลาย PBS ก่อนที่จะข้อมด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง 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

2.5.2. การทดสอบโดยวิธี Indirect ELISA

1. เตรียมโปรตีน YKL-40 ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน coating buffer (0.1 M carbonate/bicarbonate, pH9.6) และเติมใน ELISA plate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง บล็อกที่ว่างในหลุมด้วยสารละลาย PBS ที่มี 2% (w/v) skimmed milk อยู่ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

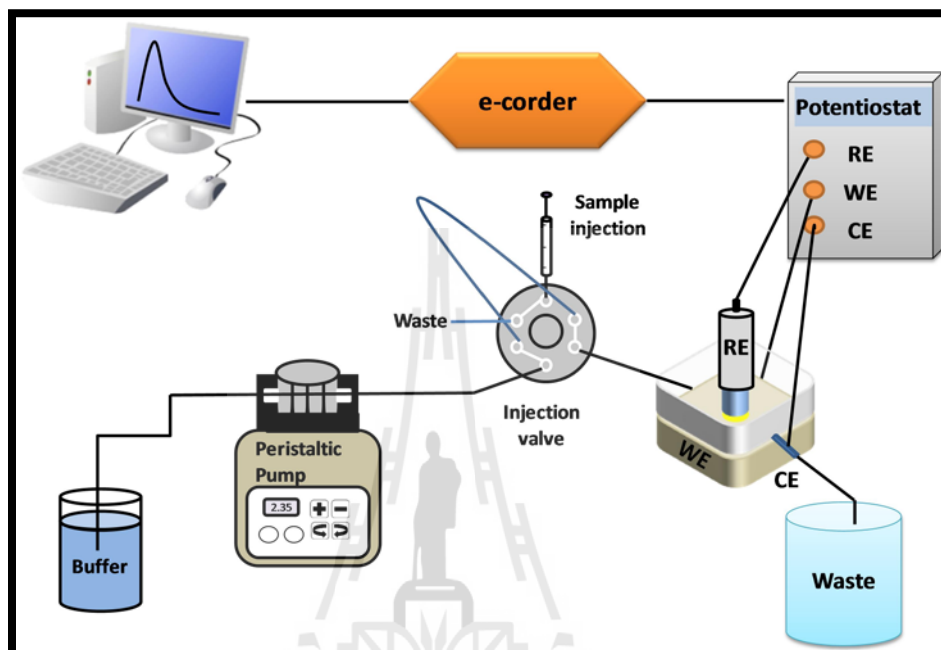
2. ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 in PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมละ 3 ครั้ง เติมแอนติซีรัมจากหนูที่มีการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน YKL-40 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดฝาและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.05% Tween-20 ใน PBS) 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 ชั่วโมง ก่อนล้างด้วย washing buffer 3 ด้วยปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม
4. เติม TMB substrate 50 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งไว้ให้โปรตีน horseradish peroxidase ทำงานโดยเก็บ ELISA plate ไว้ในที่มืดจนเกิดสี (ประมาณ 3-5 นาที)
5. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

2.6. การเตรียม immunosensor ที่จำเพาะต่อ YKL-40 antigen

1. ขัดผิวอิเล็กโทรดทองคำที่มีความบริสุทธิ์ 99% เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม ด้วยผงอลูมิเนียมขนาด 5 ไมครอน และขัดซ้ำด้วยผงอะลูมิเนียมละเอียดขนาด 1 ไมครอน ต่อจากนั้นล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด
2. ทำการเตรียมอิเล็กโทรดก่อนการใช้งาน (pre-treat) ด้วยวิธี electrochemical etching ด้วย 0.5 M H₂SO₄ โดยการหา cyclic potential ในช่วง 0 to +1500 mV และใช้ Ag/AgCl reference electrode
3. จุ่มอิเล็กโทรดที่สะอาดใน 250 mM thiourea ที่เตรียมในน้ำ แล้วปรับ pH ของสารละลายยูเรียให้มีความเท่ากับ 1 ด้วย HCl ทั้งอิเล็กโทรดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจนสะอาดแล้วทำให้แห้งด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน
5. เคลือบอิเล็กโทรดด้วย 5% (v/v) glutaraldehyde ที่เตรียมใน 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาทีเพื่อ activate หมู่คาร์บอกซิล
6. ทำการตรึงแอนติบอดี anti-YKL-40 antibody โดยหยด 20 µl ของ 1 mg/ml anti-YKL-40 ลงบนผิวหน้าของอิเล็กโทรดแล้วทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 °C
7. ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยด 10 mM 1-dodecanethiol ที่เตรียมใน ethanolic solution ที่แห้งบนหน้าอิเล็กโทรดให้แห้งเป็นเวลา 20 นาที
8. ตรวจสอบคุณสมบัติอิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยการ run cyclic voltammograms ด้วยสารละลาย 1mM K₃[Fe(CN)₆] ที่มี 3M KCl โดยใช้ scan rate ในช่วง 0.1–1 volt/s โดยใช้ Ag/AgCl reference electrode เป็นตัวเทียบและ ค่าความต่างศักย์ที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วง -0.2 to 0.7 volts

2.7. การวัดกระแสด้วยวิธี Capacitive measurement

1. ทำการวัดการระดับของ YKL-40 antigen ในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยระบบ flow injection system ที่เชื่อมต่อกับอิลคโตรดสามชนิดคือ 1) Ag/AgCl reference electrode, 2) counter electrode, และ 3) anti-YKL40 antibody modified working electrode และ potentiostat ดังแสดงในรูปที่ 2. 1



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ flow injection system ของ YKL-40 capacitive immunosensor

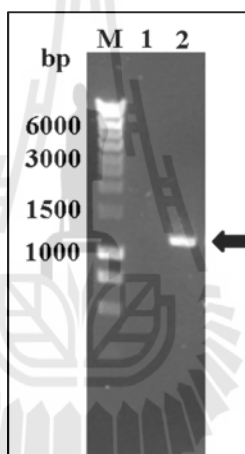
1.2. คำนวณหาค่า capacitance จากกระแสที่ค่าความต่างศักย์ที่ 50 mV โดยสารละลายตัวอย่างมีปริมาตร 200 μl ใน 10 mM phosphate buffer pH7.0 buffer ค่า flow rate ที่ใช้ที่ 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ และใช้ regeneration solution คือ 25 mM HCl pH 2.5

บทที่ 3

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

3.1. การโคลนและการผลิตรีคอมบิแนนท์ human YKL-40

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหายีน human YKL-40 ใน human genome ใน Genbank Database พบยีนเป้าหมายที่มี Genbank accession number เป็น NM_001276.2 จึงได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน YKL-40 ได้สำเร็จโดยใช้ human placenta cDNA เป็นต้นแบบในการทำ PCR ผลการทำ PCR amplification ได้ PCR product ขนาด 1.1 kb ดังแสดงในรูปที่ 3.1.



รูปที่ 3.1 การวิเคราะห์ PCR product ของยีน human YKL-40 โดยวิธี gel electrophoresis ทำการแยกแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจล agarose 1% (w/v) ในสนามไฟฟ้าแล้วย้อมสีดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วย Sybergreen DNA stain

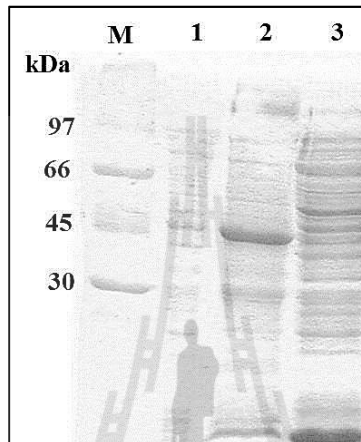
ช่อง M: 1-kb DNA marker

ช่องที่ 1: negative control (ปฏิกิริยาที่ไม่ใส่ DNA template ใน PCR reaction)

ช่องที่ 2: PCR product ของ YKL-40

หลังจากนั้นทำการย่อย PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย *SacI* และ *XhoI* แล้วทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด pQE tri system ทำการทดสอบได้สร้าง pQE-Tri/YKL-40 construct สำเร็จด้วยการทำ DNA sequencing พบว่ายีนที่โคลนได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนต้นต้น 100% แสดงว่าไม่มีการเกิดการกลายพันธุ์ในระหว่างปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน M15 (pREP) แล้วเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน YKL-40 ด้วย 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเซลล์สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน YKL-40 ขนาด 40 kDa ออกมาปริมาณมาก ผลของการศึกษาการแสดงออกโปรตีน YKL-40 แสดงในรูปแบบที่ 3.2 จากการวิเคราะห์การแยกแถบโปรตีนในเซลล์พบโปรตีน YKL-40 ในส่วนของตะกอนของ cell lysate (Lane 2) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน YKL-40 ถูกสร้างออกมาในรูปแบบ inclusion bodies

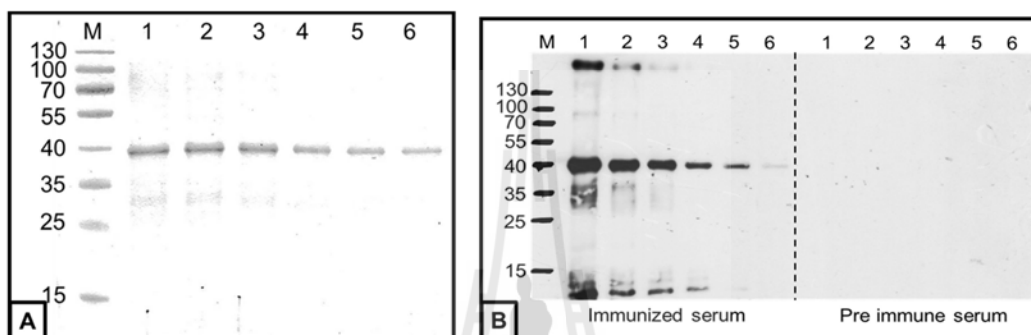


รูปที่ 3.2 แสดงการวิเคราะห์โปรตีน YKL-40 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE หลังจากเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย 0.5 mM IPTG แล้วนำเซลล์มาทำให้แตก แล้วแยกโปรตีนในสนามไฟฟ้าโดยใช้ 10% (w/v) SDS-PAGE gel
 ช่อง M: protein molecular weight marker
 ช่องที่ 1: ส่วน cell lysate ของแบคทีเรีย BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิด pQE-Tri/YKL-40 ก่อนปั่นตกตะกอน
 ช่องที่ 2: ส่วนตะกอนของ cell lysate หลังปั่นตกตะกอน
 ช่องที่ 3: ส่วนใสของ cell lysate

3.2. การทำบริสุทธิ์โปรตีน การผลิตและการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ anti-YKL-40 polyclonal antibodies

ทำการละลายตะกอนโปรตีนด้วย 8M urea แล้วทำบริสุทธิ์โปรตีน YKL-40 แล้วทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยวิธี affinity chromatography โดยผ่านสารละลายโปรตีนลงไป Ni-NTA agarose column (Qiagen, USA) แล้วชะโปรตีนออกด้วย 250 mM imidazole เมื่อทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีน YKL-40 มีความบริสุทธิ์ประมาณ 90% และปริมาณโปรตีนที่ได้หลังทำบริสุทธิ์อยู่ที่ 3 mg ของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อการเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร ต่อจากนั้นตัดแถบโปรตีนบนแผ่น SDS-PAGE gel แล้วใช้ YKL-40 ที่ได้เป็นแอนติเจนในการผลิต anti-YKL 40 polyclonal antibodies จากกระต่าย ทำการเก็บเลือดกระต่ายแล้วหา

ระดับ (titre) ของแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี Western blotting ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาระหว่าง YKL-40 antigen ที่ 2 μg และ anti-YKL-40 antiserum ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ พบว่ามีการจับกันโดยเห็นเป็นแถบสัญญาณดำเข้มบนแผ่น X-ray ที่ความเจือจางของแอนติบอดีเป็น 1:5000 และความเข้มของแถบสัญญาณลดลงเรื่อย ๆ ที่ความเจือจางเท่ากับ 1:10,000 1:20,000, และ 1:40,000 ตามลำดับ และไม่เห็นแถบสัญญาณที่ระดับความเจือจางเท่ากับ 1:16,0000 (รูปที่ 3.3A) ส่วนการทดสอบกับ pre-immune serum ที่ความเจือจางระดับเดียวกันให้ผลลบทั้งหมด (Fig. 3.3B) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า anti-YKL-40 antiserum ที่ผลิตได้สามารถจับกับแอนติเจนได้โดยให้ความไวในการจับแอนติเจนสูงถึงระดับความเจือจางเท่ากับ 1:40,000



รูปที่ 3.3 การหาระดับความไวในการจับกันระหว่าง YKL-40 antigen กับ anti-YKL-40 antibody ที่ผลิตใหม่

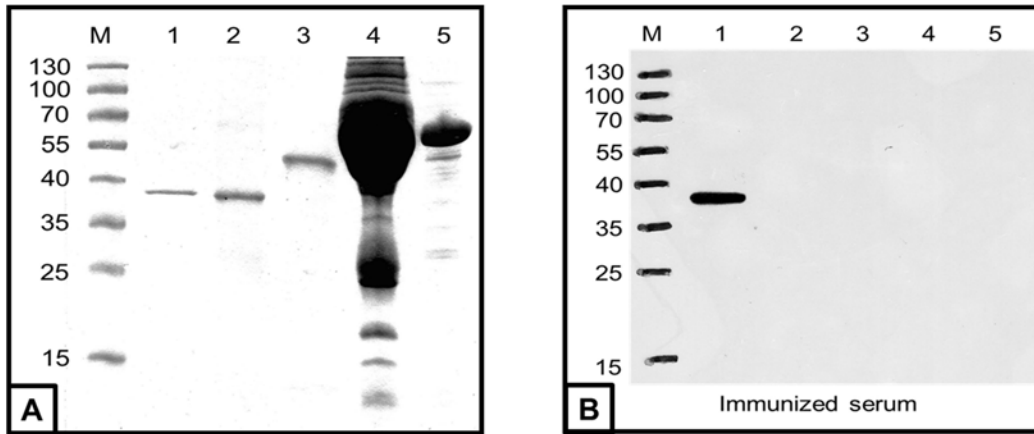
A) SDS-PAGE แสดงการแยกโปรตีน YKL-40 บริสุทธิ์บนแผ่น gel โดยใช้โปรตีน 2 μg

B) Western blotting แสดงแถบการจับกันระหว่าง YKL-40 antigen กับ anti YKL-40 antibody (ซ้ายมือ) ส่วน pre-immune serum ให้การทดสอบเป็นลบ (ขวามือ)

ช่อง M: Protein molecular weight standard (lane M);

ช่องที่ 1-6: โปรตีน YKL-40 บริสุทธิ์ 2 μg กับแอนติบอดีที่ระดับการเจือจาง 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000 และ 1:160000 ตามลำดับ

การทดลองต่อมาคือการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตใหม่โดยวิธี Western blotting เมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในกลุ่มแฟมิลี 18 โกลโคซิล ไฮโดรเลส ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ human YKL-40 acidic mammalian chitinase (AMCase) human YKL-39 และ bacterial chitinase A ผลการทดสอบพบว่า anti-YKL-40 antiserum จับอย่างจำเพาะกับ human YKL-40 เพียงชนิดเดียวโดยไม่ทำ cross reaction กับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.4A และ B ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า anti-YKL-40 antiserum ที่ผลิตในห้องปฏิบัติการมีความจำเพาะสูงกับ human YKL-40 และมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาอุปกรณ์ immunosensor ในการตรวจหาระดับของ serum YKL-40 ในตัวอย่างจริงได้



รูปที่ 3.4 การตรวจหาความจำเพาะของ anti YKL-40 antiserum ที่ผลิตใหม่

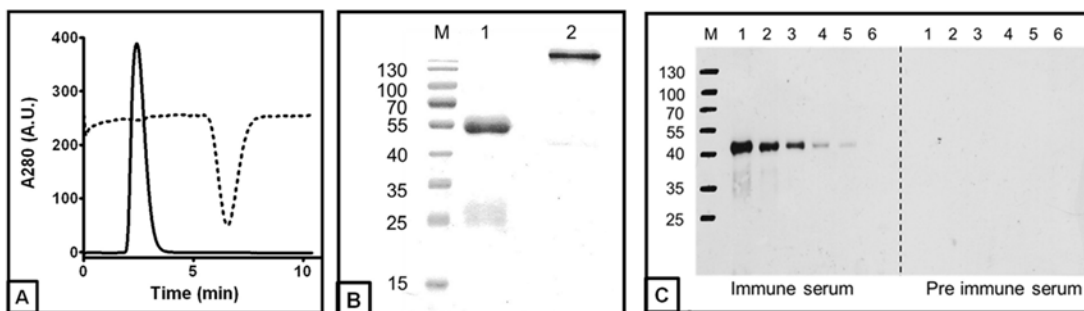
A) การแยกโปรตีนบน 12% polyacrylamide-SDS gel และย้อมด้วย Coomassie blue stain

B) Immunoblotting ที่ตรวจวัดโดยใช้ anti-YKL-40 antiserum ที่ระดับความเจือจาง 1:40,000

ช่องที่ 1: purified YKL-40 protein (2 μg); 2, human YKL-39 (3 μg); 3, human AMCCase (3 μg); 4, human serum (230 μg); และ 5, bacterial chitinase (10 μg)

3.3. การทำบริสุทธิ์แอนติบอดีและการทดสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีบริสุทธิ์

เนื่องจาก antiserum ที่เตรียมที่ยังไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อนอยู่มากโดยเฉพาะ serum albumin จึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เตรียม immunosensor ผู้วิจัยจึงทำการทำบริสุทธิ์แอนติบอดีที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ ในการทดลองได้ผ่าน immunized serum เข้าสู่คอลัมน์ protein A ตามด้วย Hiprep 26/10 desalting column ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การทำบริสุทธิ์ anti YKL-40 antiserum โดยวิธี affinity chromatography และการวิเคราะห์แอนติบอดีหลังการทำบริสุทธิ์

A) Chromatographic profile ของ anti YKL-40 antiserum ที่ชะออกจาก desalting 26/10 column

B) SDS-PAGE แสดงการเคลื่อนที่ของ anti YKL-40 ที่บริสุทธิ์ในสภาวะรีดิวซ์ (ช่องที่ 1) เทียบกับสภาวะนอนรีดิวซ์ (ช่องที่ 2) เทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน (ช่อง M)

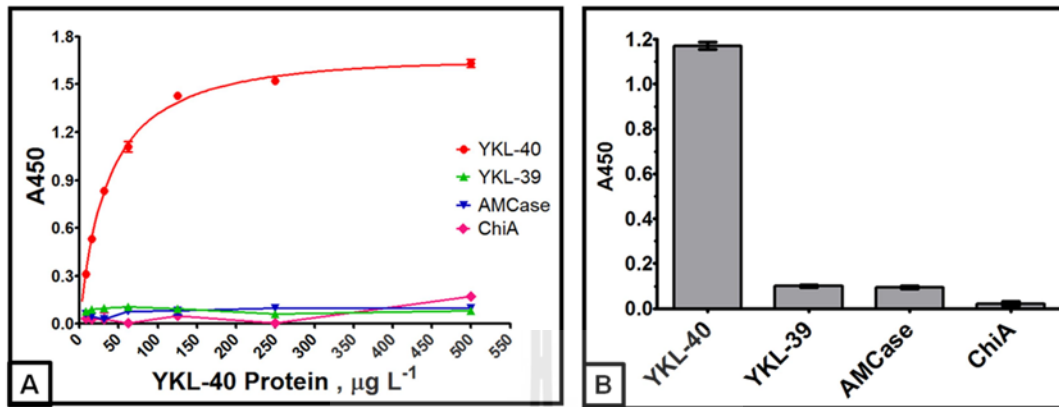
C) Immunoblot ของที่เกิดจากปฏิกิริยาการจับระหว่าง anti YKL-40 antiserum ที่บริสุทธิ์กับ human YKL-40 antigen ที่ผลิตจาก *E. coli*

ช่องที่ 1-6 ความเจือจางของแอนติบอดีที่ใช้ 1:5000, 1:10,000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, และ 1:160000 ตามลำดับ

ผลการทำบริสุทธิ์ anti YKL-40 antiserum peak ที่ถูกชะออกมาจาก protein A column แล้วนำมาผ่าน desalting column เพื่อทำการแลกเปลี่ยนบัฟเฟอร์และปรับ pH (รูปที่ 3.A) เมื่อนำ fraction ที่ได้มารวมกันแล้วแยกผ่านสนามไฟฟ้าแบบ SDS-PAGE พบการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสภาวะรีดิวซ์ที่ 25 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของหน่วยย่อย light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ส่วนแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 55 kDa ตรงกับขนาดของหน่วยย่อย heavy chain ของอิมมูโนโกลบูลิน (รูปที่ 3.5B ช่องที่ 1) เมื่อทำการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของแอนติบอดีในสภาวะนอนรีดิวซ์พบแถบโปรตีนขนาดมากกว่า 130 kD (รูปที่ 3.5B ช่องที่ 2) เนื่องจากแอนติบอดีที่ทำบริสุทธิ์ด้วย protein A column จะจับกับ constant region (Fc) ของ IgG ดังนั้น anti YKL-40 ที่ได้ น่าจะมี isotype เป็น IgG โดยไม่มี IgM ปนเปื้อนมาด้วย เมื่อนำแอนติบอดีที่ทำบริสุทธิ์ไปทดสอบความสามารถในการจับกับ YKL-40 antigen โดยใช้ระดับความเจือจางของแอนติบอดีตั้งแต่ 1:5,000 ถึง 1: 120,000 พบว่าแถบสัญญาณการทำปฏิกิริยาเข้มที่สุดที่ความเจือจาง 1:50000 และค่อย ๆ ลดลงและความเจือจางสุดท้ายที่ยังสังเกตเห็นแถบสัญญาณอยู่ที่ 1:40000 ผลการทดสอบแสดงว่าแอนติบอดีไม่สูญเสียคุณสมบัติในการจับแอนติเจนหลังการทำบริสุทธิ์แล้ว

การทดสอบต่อมาคือการหา cross reactivity ของแอนติบอดีบริสุทธิ์กับแอนติเจนต่าง ๆ โดยแอนติเจนที่ใช้ทดสอบได้แก่ human YKL-40, human YKL-39, human acidic mammalian (AMCase) และ bacterial

chitinase โดยทำ titration curve จาก Indirect ELISA assay โดยใช้ปริมาณของแอนติบอดีซึ่งที่ทำปฏิกิริยาการจับกับปริมาณแอนติเจนต่าง ๆ ผลของการทำ titration แสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การทดสอบ cross reactivity ของ anti YKL-40 antiserum ที่ทำบริสุทธิ์

A) กราฟการจับระหว่างแอนติเจนต่าง ๆ กับ anti YKL-40 antiserum

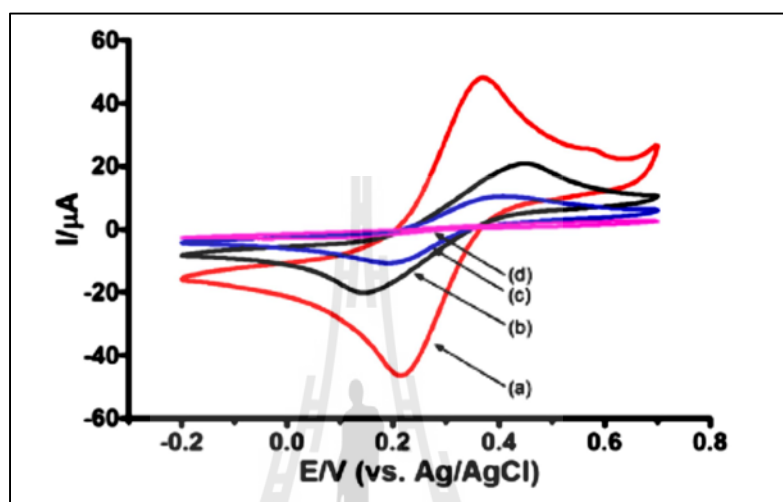
B) กราฟแสดง relative binding ของ anti-YKL-40 กับแอนติเจนต่าง ๆ

จากรูปที่ 3.6A พบว่าการลักษณะกราฟการจับระหว่าง anti YKL-40 กับ human YKL-40 โดยการจับเป็นลักษณะเพิ่มขึ้นแบบเป็นเส้นตรงแปรผันตามความเข้มข้นของแอนติเจนในช่วงความเข้มข้นของแอนติเจนต่ำ ๆ คือ 0 - 50 $\mu\text{g/L}$ หลังจากนั้นกราฟเข้าสู่จุดอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของแอนติเจนสูง ๆ มีลักษณะเป็นการจับแบบจำเพาะที่เป็นไปตามทฤษฎีจลนพลศาสตร์แบบ Michaelis Menten kinetics ส่วนกราฟการจับของแอนติบอดีกับแอนติอื่น ๆ เกิดขึ้นน้อยมาก จากรูปที่ 3.6B แสดงเปอร์เซ็นต์การจับของ human YKL-39 ประมาณ 9% ส่วน human AMCase ให้ค่าการจับเป็น 8% ส่วน bacterial chitinase ไม่เห็นค่าการจับอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการจับระหว่าง human YKL-40 กับ anti YKL-40 antibody ที่คิดค่าการจับเป็น 100% การทดลองดังกล่าวให้ข้อสรุปว่า anti YKL-40 antibody ที่เตรียมบริสุทธิ์มี cross reactivity ต่อโปรตีนอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันต่ำมากหรือไม่มีเลย และแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อ human YKL-40

3.4. การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดอิมมูโนเซนเซอร์ที่จำเพาะต่อ human YKL-40

การศึกษาขั้นตอนต่อไปคือการนำแอนติบอดีบริสุทธิ์มาเตรียม immunosensor ที่จำเพาะต่อ human YKL-40 antigen เทคนิคที่ใช้ศึกษาเป็นวิธีทางเคมีไฟฟ้าที่เรียกว่า capacitive immunosensor ซึ่งเตรียมได้จากการตรึง anti YKL-40 antiserum บนผิวหน้าของอิเล็กโทรดทองคำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม ด้วยการเชื่อมต่อหมู่ thiol ของสาร thiourea กับธาตุทองคำ (Au) หลังจากนั้นปฏิกิริยาพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนบนผิวของแอนติบอดีซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนกับหมู่ thiol โดยใช้สาร glutaraldehyde เป็นตัวช่วย

อิเล็กโทรดที่เตรียมได้เป็น working electrode ต่อจากนั้นทำการเคลือบผิวหน้าอิเล็กโทรดที่มีแอนติบอดีติดอยู่ อีกครั้งด้วยสาร 1-dodecanethiol เพื่อสร้าง capacitor configuration ที่เป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการตรวจวัดสัญญาณทาง immunosensor หลังจากนั้นทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของอิเล็กโทรดที่เตรียมได้ ด้วยการหากระแสที่เกิดขึ้นโดยการทำให้ cyclic voltammogram (CVs) โดยตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของกระแส ที่แสดง oxidation/reduction peak ของสาร ferrocyanide ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 กราฟ cyclic voltammogram แสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยา oxidation/reduction ของสาร ferrocyanide

ในการวัด cyclic voltammogram กระแสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบนผิวของ working electrode เทียบกับ Ag/AgCl reference electrode

กราฟ a สีแดง: unmodified gold electrode

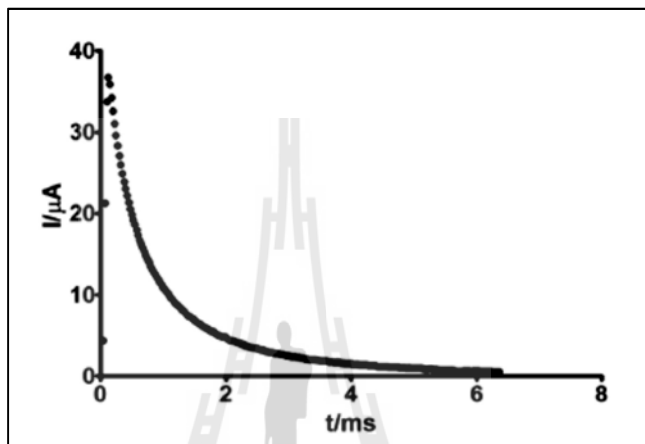
กราฟ b สีเขียว: thiourea-modified gold electrode

กราฟ c สีน้ำเงิน: thiourea/glutaraldehyde/anti-YKL-40-modified gold electrode

กราฟ d สีชมพู: thiourea/glutaraldehyde/anti-YKL-40/CH₃(CH₂)₁₁SH-modified gold electrode

จากรูปที่ 3.7 จะเห็นว่าค่า faradic current แสดงปฏิกิริยา oxidation ของ ferrocyanide ที่ความต่างศักย์ เท่ากับ +0.4V และปฏิกิริยา reduction ที่ค่าความต่างศักย์ +0.2 V โดย redox peak ที่เห็นมี amplitude ลดลงเรื่อย ๆ เมื่อชั้นของอิเล็กโทรดถูกเคลือบด้วยสาร thiourea ตามด้วย glutaraldehyde และ anti YKL-40 antiserum ตามลำดับ เมื่อเคลือบผิวอิเล็กโทรดครั้งสุดท้ายด้วย 1-dodecanethiol จะเห็นว่าค่า faradic current เข้าใกล้ศูนย์แสดงว่าผิวหน้าอิเล็กโทรดมีคุณสมบัติเป็นฉนวนซึ่งแสดงถึงการเคลือบอิเล็กโทรดมีความสมบูรณ์พร้อมที่จะนำมาทำการทดสอบกับตัวอย่างแอนติเจน

ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนกับวิธีทาง immusensor ที่เตรียมอิเล็กโทรดที่จำเพาะต่อแอนติเจน YKL-40 ได้ โดยสภาวะทดสอบที่เหมาะสมคือสารละลายแอนติเจนที่เตรียมใน 10 mM phosphate buffer pH 7.0 ค่า flow-rate เท่ากับ 0.1 mL/min ในระบบ flow injection ค่าความต่างศักย์ที่ scan คือ 50 mV ทุก ๆ 6.375 ms กราฟที่ 3.8 แสดงการตอบสนองของกระแส $i(t)$ ที่ได้จากการวัดเมื่อมีการผ่านของสารละลายแอนติเจนเข้าสู่ระบบที่ทำกรวัดเป็นระยะเวลา 8 ms โดยสัญญาณที่ได้จากกราฟแสดงถึงการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแบบจำเพาะ



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์การเปลี่ยนของกระแสในหน่วย μA ต่อเวลา

ในการวัดหาปริมาณแอนติเจน YKL-40 ใช้อิเล็กโทรดที่เตรียมด้วยการตรึง anti YKL-40 antibody บนผิวอิเล็กโทรดทองคำ

สัญญาณที่แสดงการลดลงของกระแสที่แสดงในรูปที่ 3.8 มีการเปลี่ยนแปลงของกระแสในลักษณะ exponential decay ดังสมการที่แสดงข้างล่าง

$$\ln i(t) = \ln \frac{\Delta E}{R_s} - \left(\frac{1}{R \times C} \right) t$$

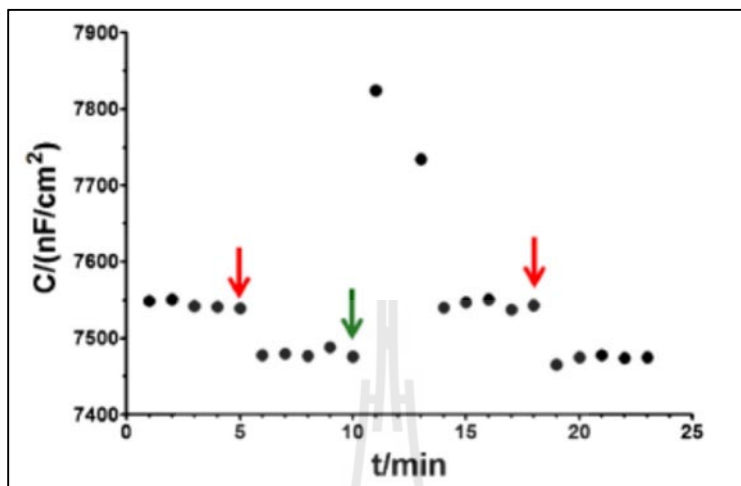
โดยที่ค่า $i(t)$ คือ กระแสที่วัดได้ใน cell circuit ที่เวลา t

ค่า ΔE คือค่า amplitude ของ potential pulse ที่ใช้ในการวัด

ค่า R คือค่าความต้านทาน (dynamic resistance) ที่เกิดขึ้นบนผิวอิเล็กโทรดบนชั้น thiol/antibody recognition layer

ค่า C คือค่าความสามารถในการประจุกระแสไฟฟ้าทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากพื้นที่ผิวของอิเล็กโทรดเท่ากับ $7.07 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$

จากกราฟค่า capacitance (C) ที่ต้องการหาได้จากความชันของกราฟในช่วงที่ค่า $\ln i$ แปรผันโดยตรงกับเวลา t ในช่วงเวลาน้อย ๆ ระหว่าง 0.2 ถึง 0.4 ms แล้วนำค่า C ที่หาได้จากการฉีดแอนติเจนปริมาณเท่า ๆ กันหลาย ๆ ครั้งและสร้างกราฟระหว่างค่า C ในหน่วย nF/cm² ต่อเวลา (t) ในหน่วย ms จะได้กราฟที่แสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงค่าการลดลงของ capacitance เมื่อทำการเติมแอนติเจนคือโปรตีน YKL-40 ในระบบ flow injection แสดงถึงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่บริเวณผิวอิเล็กโทรดทองคำ

ทำการฉีด YKL-40 antigen เข้าระบบ flow injection จากรูปที่ 3.9 จะเห็นว่าการฉีดแอนติเจนแต่ละครั้ง (ลูกศรสีแดงเทียบกับลูกศรสีเขียว) จะให้ค่า capacitance ลดลงมาอยู่ที่ 7480 nF/cm² ซึ่งแสดงถึงปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ทุกครั้งหลังฉีดแอนติเจนจะทำการ regenerate ตัวเซนเซอร์ด้วยสารละลาย 3 mM HCl เพื่อให้ค่า baseline กลับคืนสู่ค่า capacitance เดิมคือที่ 7544 nF/cm²

3.5. การตรวจหาตัวแปรที่เหมาะสมในการจับระหว่าง YKL-40 antigen กับ YKL-40 immunosensor

ตัวแปรต่าง ๆ ที่ทำการตรวจวัดได้แก่ i) ชนิด ความเข้มข้น และค่า pH ของ running buffer; ii) ชนิดและความเข้มข้นของ regeneration buffer; iii) ปริมาตรของ sample volume และ iv) ค่า flow rate ในระบบ flow injection โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเป็นอย่างน้อย ผลการทดสอบค่าตัวแปรต่าง ๆ สรุปได้ในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ regenerate YKL-40 immunosensor หลังการฉีดตัวอย่างแอนติเจน

Regeneration solution	Percentage (%) average residual activity
Low pH	
50 mM glycine/HCl pH = 2.5	59.1 ± 1.4
100 mM HCl (pH = 1.0)	67.5 ± 0.2
31.6 mM HCl (pH = 1.5)	80.6 ± 2.0
10 mM HCl (pH = 2.0)	86.0 ± 0.7
3.2 mM HCl (pH = 2.5)	99.4 ± 0.5
1 mM HCl (pH = 3.0)	80.1 ± 1.0
High pH	
5 mM NaOH (pH = 11.7)	30.3 ± 0.6
50 mM NaOH (pH = 12.7)	40.7 ± 0.1
High ionic strength	
1 M NaCl	12.4 ± 1.3
1 M KCl	24.5 ± 2.1

จากตารางที่ 3.1 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ความเข้มข้นของ regeneration buffer ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ค่า pH ต่ำและสูง และที่ ionic strength 1M ของ NaCl และ 1M KCl สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ regeneration solution คือ 3.2 mM HCl, pH, 2.5 โดยสภาวะนี้ให้ค่า %residual activity ของ immobilized anti YKL-40 antibody บนผิวอิเล็กโทรดสูงที่สุดคือ 99.4±0.5%

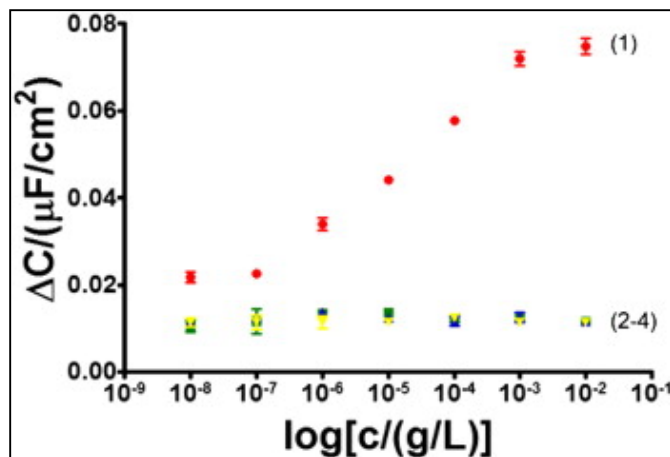
ส่วนตารางที่ 3.2 แสดงตัวแปรอื่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา YKL-40 antigen ด้วยวิธี flow injection-based capacitive YKL-40 immunosensing ผลการทดสอบพบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ให้ค่า ΔC สูงที่สุดได้แก่ 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 ค่าปริมาตรที่ฉีดได้แก่ 200 μL และ flow rate ที่เหมาะสมได้แก่ 100 $\mu\text{L}/\text{min}$

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา YKL-40 แอนติเจนด้วยวิธี flow injection-based capacitive YKL-40 immunosensing

Parameter	Property range	YKL-40 test concentration (g/L)	ค่าที่เหมาะสม
Buffer solution			
Type	Phosphate buffer HEPES buffer Tris-HCl buffer	10^{-7} to 10^{-3}	Phosphate buffer
pH	6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0	10^{-5}	7.0
Concentration	5, 10, 50, 100 mM	10^{-5}	10 mM
Sample volume	100, 200, 300, 400 μ L	10^{-5}	200 μ L
Flow rate	50, 100, 200, 300, 400 μ L /min	10^{-5}	100 μ L/min

3.6. การตรวจหาความจำเพาะในการตรวจวัดของ YKL-40 immunosensor

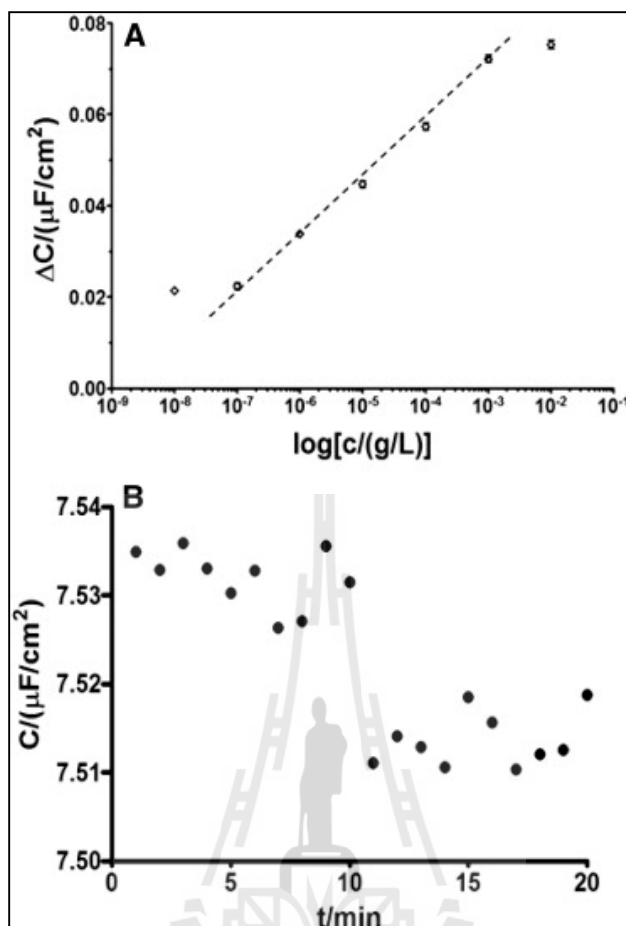
ทำการตรวจหาความจำเพาะในการจับระหว่างแอนติเจนต่าง ๆ กับ YKL-40 ที่ถูกตรึงอยู่บนผิวอิเล็กโทรด โดยแอนติเจนที่ทดสอบเป็นโปรตีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมิลี 18 ได้แก่ human YKL-39 human YKL-40 และ human AMCase รูปที่ 3.10 แสดงกราฟการเปลี่ยนแปลงค่า capacitance (ΔC) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 10^{-08} ถึง 10^{-02} g/L จากกราฟแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนค่า ΔC ในช่วงความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ในปฏิกิริยาของ human YKL-39 และ human AMCase ส่วนค่า ΔC ของ human YKL-40 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนโดยมีกราฟการเพิ่มค่า ΔC เป็นเส้นตรงในช่วง 0.02 ถึง 0.08 μ F/cm² ซึ่งเป็นลักษณะการจับแบบจำเพาะระหว่าง YKL-40 antigen กับ anti YKL-40 antibody หลังจากนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงของ ΔC ลดลงกราฟในช่วงหลังนี้แสดงการอึดตัวของ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอิเล็กโทรดที่ตรึงด้วย anti YKL-40 antibody มีความจำเพาะต่อ YKL-40 antigen เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงค่าการเปลี่ยนแปลงค่า capacitance ที่ความเข้มข้นของโปรตีนไกลโคซิล ไฮโดรเลส แฟมิลี 18

3.7. การสร้างกราฟมาตรฐานของ capacitive YKL-40 immunosensing

การทดลองต่อมาทำการวัดหาค่า ΔC ที่ความเข้มข้นของ YKL-40 antigen ในช่วงตั้งแต่ 0.01 $\mu\text{g/L}$ ถึง 10 mg/L แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของแอนติเจนดังแสดงในรูปที่ 3.11A จากกราฟจะเห็นว่าช่วงของความเข้มข้นของ YKL-40 antigen ที่ให้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า ΔC เพิ่มขึ้นและขึ้นโดยตรงต่อความเข้มข้นคือช่วง $\log(c) = 10^{-7}$ ถึง 10^{-3} g/L หรือ ช่วง $c = 0.1$ $\mu\text{g/L}$ ถึง 1 mg/L และค่าความชันกราฟซึ่งแสดงถึงความไว (sensitivity of detection) ในการวัด เท่ากับ 12.28 ± 0.27 nF/cm^2 ต่อช่วงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นใน logarithmic scale และค่าการจับเข้าสู่จุดอิ่มตัวที่ความเข้มข้นของ YKL-40 antigen เท่ากับ 1 mg/L YKL-40 หมายถึงทุกโมเลกุลของแอนติบอดีที่อยู่บนผิวอิเล็กโทรดจับกับแอนติเจนหมด ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ได้แก่ 0.07 ± 0.01 $\mu\text{g/L}$ ส่วนรูปที่ 3.11 แสดงตัวอย่างค่า capacitance ที่วัดได้หลังจากการฉีด YKL-40 antigen ปริมาตร 200 μL ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/L}$ เข้าสู่ระบบ flow injection



รูปที่ 3.11 แสดงการตรวจหาโปรตีน YKL-40 ที่วัดจาก capacitive YKL-40 immunosensor

A) กราฟมาตรฐานที่สร้างจากความเข้มข้นของ YKL-40 antigen ที่ความเข้มข้นในช่วง 10^{-7} ถึง 10^{-2} g/L โดยใช้ running buffer คือ 10 mM phosphate pH, 7.0 ค่า flow rate เท่ากับ 100 μ L/min ใช้ regeneration solution คือ 3 mM HCl โดยทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 C

B) ตัวอย่างการตอบสนองต่อ capacitive YKL-40 immunosensor ที่เตรียมได้กับตัวอย่างแอนติเจนที่มีความเข้มข้น 0.1 μ g/L

3.8. การทดสอบความสามารถในการตรวจหา YKL-40 กับตัวอย่างจริง

การทดสอบในขั้นตอนนี้คือการตรวจหา YKL-40 ที่มีอยู่ในตัวอย่างจริง ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างซีรัมที่ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ที่วัดได้จากวิธี indirect sandwich ELISA assay เป็นวิธีอ้างอิง โดยทำการ spike ตัวอย่างซีรัม 4 ครั้ง ที่ความเข้มข้นของ YKL-40 เท่ากับ 25, 50, 80 and 100 μ g/L 0.5–100 μ g/ผลการทดลองดังกล่าวสรุปไว้ในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ตารางเปรียบเทียบค่าการตรวจหาโปรตีน YKL-40 จากการ spike ตัวอย่างจริง ค่าที่ได้จากการวัดได้โดยวิธี capacitive immunosensor นำมาเปรียบเทียบกับค่าที่ได้โดยวิธีอ้างอิง Indirect ELISA assay

Added/ $\mu\text{g/L}$	Immunosensor		ELISA	
	Found/ $\mu\text{g/L}$ ^a	Recovery %	Found/ $\mu\text{g/L}$ ^a	Recovery %
25.00	25.1 \pm 1.2	100.4 \pm 4.8	25.5 \pm 0.8	101.9 \pm 3.2
50.00	49.6 \pm 3.4	99.2 \pm 5.7	50.8 \pm 0.7	101.5 \pm 1.3
80.00	85.5 \pm 1.9	106.7 \pm 2.4	79.5 \pm 0.3	99.4 \pm 0.4
100.00	101.2 \pm 3.5	101.2 \pm 3.5	101.1 \pm 0.5	101.1 \pm 0.5

^aValues represent average of triplicate assessments at T = 298 K (25 °C).

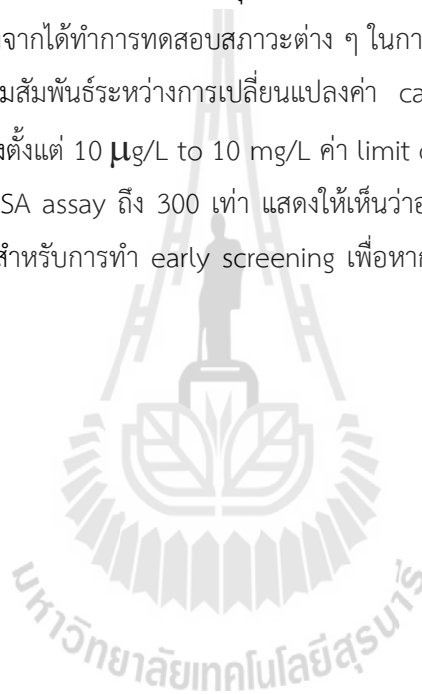
^bRecovery defined as (Found/Added) \times 100

ผลการทดลองพบว่าค่า %recovery ในการตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 ในตัวอย่างซีรัมอยู่ในช่วง 99.2 -106.7 ซึ่งค่าในช่วงที่ประมาณได้สอดคล้องกับผลการวัดจากวิธีอ้างอิง (Indirect ELISA assay) ที่ให้ค่า %recovery เท่ากับ 99.4 -101.5 แสดงว่าการตรวจวัดหาโปรตีนในซีรัมมีความน่าเชื่อถือได้ และเทคนิค capacitive YKL-40 immusensing ที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้มีความเหมาะสมในการตรวจหาโปรตีน YKL-40 จากตัวอย่างจริง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

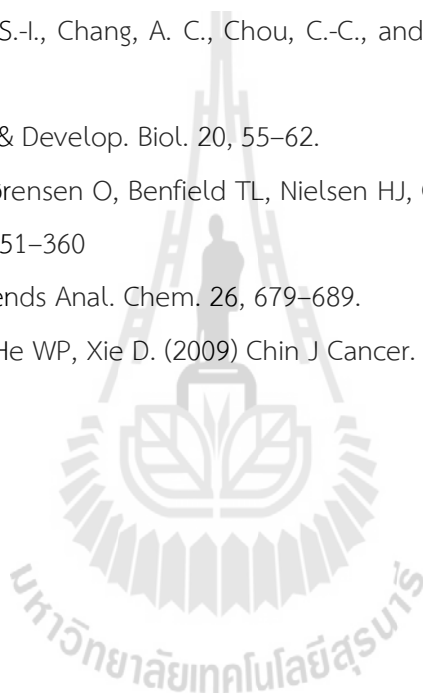
ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดโปรตีน YKL-40 ซึ่งจัดเป็น prognosis biomarker เนื่องจากพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนนี้สูงผิดปกติในผู้ป่วยมะเร็งระยะลุกลามหลายชนิด ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ capacitive immunosensor ที่ได้จากการตรึงผิวหน้าของอิเล็กโทรดทองคำด้วย anti-YKL 40 antiserum บริสุทธิ์ที่ผู้วิจัยได้เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มีความจำเพาะในการวัดหาโปรตีน YKL-40 เพียงอย่างเดียว หลังจากได้ทำการทดสอบสภาวะต่าง ๆ ในการวัดได้สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถวัดหาโปรตีน YKL-40 ในช่วงที่ได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงค่า capacitance (ΔC) กับความเข้มข้นของโปรตีน YKL-40 เป็นเส้นตรงในช่วงกว้างตั้งแต่ 10 $\mu\text{g/L}$ to 10 mg/L ค่า limit of detection เท่ากับ $0.07 \pm 0.01 \mu\text{g/L}$ ซึ่งค่านี้นี้ต่ำกว่าค่าที่วัดด้วย Indirect ELISA assay ถึง 300 เท่า แสดงให้เห็นว่าอุปกรณ์นี้มีความเหมาะสมในการตรวจหาระดับของโปรตีนต่ำมาก ๆ หรือเหมาะสำหรับการทำ early screening เพื่อหาการดำเนินไปของโรคที่เกี่ยวข้องกับระดับของโปรตีน YKL-40 ในช่วงต้น ๆ ได้



บรรณานุกรม

- Bergmann OJ, Johansen JS, Klausen TW, Mylin AK, Kristensen JS, Kjeldsen E, Johnsen HE. (2005) Clin Cancer Res. 15, 8644-8652.
- Boot RG, Blommaart EFC, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, and Aerts JM (2001) J. Biol. Chem. 276,6770-6778
- Buhi WC. (2002) Reproduction 123, 355-362 Chang, N.-C. A., Hung, S.-I., Hwa, K.-Y., Kato, I., Chen, J.-E., Daniels JS, Pourmand N. (2007) Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. Electroanalysis 19, 1239-1257.
- Diefenbach CS, Shah Z, Iasonos A, Barakat RR, Levine DA, Aghajanian C, Sabbatini P, Hensley ML, Konner J, Tew W, Spriggs D, Fleisher M, Thaler H, Dupont J. (2007) Gynecol Oncol. 104, 435-442.
- Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JM, and van Aalten DMF. (2002) J. Biol. Chem. 277,25537-25544
- Hayes DF. (1998) Recent Results Cancer Res. 152,71 - 85.
- Hayes DF, Bast RC, Desch CE, et al. (1996) J Natl Cancer Inst. 88, 1456 - 1466.
- Hakala BE, White C, and Recklies AD. (1993) J. Biol. Chem. 268, 25803-25810
- Hedstroem M, Galaev I Y, Mattiasson B. (2005) Biosens. Bioelectron. 21, 41-48.
- Hu B, Trinh K, Figueira WF, and Price PA. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19415-19420
- Hu SQ, Wu ZY, Zhou YM, Cao ZX, Shen GL, Yu RQ. (2002) Anal. Chim. Acta 458, 297-304.
- Johansen JS, Pedersen AN, Schroll M, Jørgensen T, Pedersen BK, Bruunsgaard H. (2008) Clin Exp Immunol. 151, 260-266.
- Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, and Price PA. (1992) J. Bone Miner. Res. 7, 501-512
- Kirkpatrick RB, Emery JG, Connor JR, Dodds R, Lysko PG, and Rosenberg M. (1997) Exp. Cell Res. 237, 46-54
- Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, and Goerdts S. (2006) Blood 107, 3221-3228
- Limbut W, Kanatharana P, Mattiasson B, Asawatreratanakul P, Thavarungkul P. (2006) Biosens. Bioelectron. 22, 233-240.
- Liu CH, and Chang AC. (2001) J. Biol. Chem. 276, 17497-17506
- Nyirkos P, and Golds EE. (1990) Biochem. J. 269, 265-268

- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS, Vorgias CE. (1994) *Structure*. 15, 1169-1180.
- Rejman JJ, and Hurley WL. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 329-334
- Qin W, Zhu W, Schlatter L, Miick R, Loy TS, Atasoy U, Hewett JE, Sauter ER. (2007) *Int J Cancer*. 121, 1536-1542
- Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC, Suginta W. (2008) *J Struct Biol*. 162, 491-499.
- Roslind A, Johansen JS, Christensen IJ, Kiss K, Balslev E, Nielsen DL, Bentzen J, Price PA, Andersen E. (2008) *Int J Cancer*. 122, 857-863.
- Shackelton LM, Mann DM, and Millis AJT. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13076-13083
- Sun, Y.-J., Chang, N.-C. A., Hung, S.-I., Chang, A. C., Chou, C.-C., and Hsiao, C.-D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 17507-17514
- Tothill IE. (2009) *Seminars in Cell & Develop. Biol.* 20, 55-62.
- Volck B, Price PA, Johansen JS, Sørensen O, Benfield TL, Nielsen HJ, Calafat J, and Borregaard N. (1998) *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110, 351-360
- Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. (2007) *Trends Anal. Chem.* 26, 679-689.
- Yang GF, Cai PY, Li XM, Deng HX, He WP, Xie D. (2009) *Chin J Cancer*. 28, 142-145





ภาคผนวก ก

ผลงานในรูปแบบตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน ได้แก่

- **Chaocharoen W, Suginta W, Limbut W, Ranok A, Numnuam A, Khunkaewla P, Kanatharana P, Thavarungkul P, Schulte A***. Electrochemical detection of the disease marker human chitinase-3-like protein 1 by matching antibody-modified gold electrodes as label-free immunosensors. **Bioelectrochemistry** (2014) 101, 106-113. (IF2013 = 3.8)

2. ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติ 3 ผลงาน ได้แก่

- Chaocharoen W, Ranok A, and **Suginta W.*** Expression and purification of human chitinase-like protein YKL-40. CHE-USDC Congress IV, The Zign Hotel, Pattaya, Chonburi. Sept 14-16, 2011. P136.
- Chaocharoen W, Ranok A, Thavarungkul P, Limbut W, Kanatharana P, Schulte A, and **Suginta W***. LABEL-FREE ELECTROCHEMICAL IMMUNODETECTION OF THE HUMAN DISEASE MARKER YKL-40: ANTIBODY PREPARATION, SENSOR ASSEMBLY AND SENSITIVE CAPACITIVE DETECTION. 13Th FAOBMB Congress, BITECH, Bangkok, 25-29 November, 2012, p148.
- Chaocharoen W, Ranok A, Thavarungkul P, Limbut W, Kanatharana P, Schulte A, and **Suginta W***. Capacitive immunosensor for detection of human YKL-40, chitinases like-protein and diseases marker. 8th International Symposium of the Protein Society of Thailand, 5-7 August, 2013, P77.

ภาคผนวก ข
ประวัติผู้วิจัย (หัวหน้าโครงการ)

Name	Mrs. Wipa Suginta
Date of Birth	22 November 1968
Affiliation	Biochemistry-Electrochemistry Research Group, School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand. Tel: +66 44 22 6187; E-mail wipa@sut.ac.th
Education	
1999-2000	Postdoctoral Research Fellow , Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, U.K. Supervisor: Dr. Richard H Ashley Research Title: Cloning, Expression, and Functional Characterization of Membrane Proteins in the Intracellular Chloride Ion Channel (CLIC) Family.
1995-1999	Ph.D. Biochemistry , Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Edinburgh University, UK Supervisor: Dr. Linda Fothergill-Gilmore Thesis Title: A chitinase from <i>Vibrio carchariae</i> : Purification, Gene isolation, and Sequence Determination
1990-1993	M.Sc. Biochemistry , Dept. of Biochemistry, Mahidol University, Thailand Supervisor: Professor Dr. MR. Jisnuson Svasti Thesis Title: Purification and Characterisation of β -Galactosidase from Thai Jute, <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. var. <i>altissima</i>
1986- 1990	B.Sc. (Genetics), Dept. of Botany and Genetics, Chulalongkorn University, Thailand

Academic positions

2007- present	Associate Professor in Biochemistry, SUT
2004-2007	Assistant Professor in Biochemistry, SUT
1994-2004	Lecturer in Biochemistry, SUT (on Ph.D. and postdoctoral research leaves from 1995-2000)

Memberships

1. Regular Member of the Biochemical Society, UK.
2. Regular Member of the Biophysical Society, USA.
3. Regular Member of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB).
4. Life Member of the Protein Society of Thailand (PST).
5. Life Member of the Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King.
6. Life Member of the Thai Society for Biotechnology.

Fellowships/Awards

ปี พ.ศ.	รางวัล	หน่วยงานที่มอบรางวัล
2014	รางวัลโล่เกียรติคุณโล่ประกาศเกียรติคุณสำหรับพนักงานผู้มีผลงานดีเด่นที่ได้รับรางวัลจากหน่วยงานภายนอก	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2014	รางวัลนักชีวเคมีและนักชีววิทยาโมเลกุลดีเด่น (Professor. M.R. Jisnuson Svasti BMB Award)	สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
2013	รางวัล “TRF-CHE-Scopus Researcher Award” สาขา Life Sciences and Agricultural Sciences	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) และสำนักพิมพ์ Elsevier
2009-2012	รางวัลทุนวิจัย “Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers”	The Alexander von Humboldt Foundation, Bonn, Germany
2010	รางวัลพนักงานดีเด่นประจำปี 2553 สาขา “การวิจัย”	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2006	รางวัลผู้มีผลงานดีเด่นทางด้านวิทยาศาสตร์ เนื่องในงานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ ประจำปี 2006	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2005	รางวัลทุนวิจัย “For Women in Science Fellowship”	L’OREAL (Thailand)/UNESCO

Research Interest

1. ชีวเคมีเชิงหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์ย่อยสลายไคติน ได้แก่ ไคติเนส และเอ็นอะซิทิลกลูโคซามินิเดส
2. ชีวเคมีและชีวฟิสิกส์เชิงหน้าที่และโครงสร้างของช่องไคโตพอรินที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในวิถีการสลายไคตินของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrios*
3. ชีวเคมีและเคมีไฟฟ้าของการประยุกต์ใช้สารไคตินและไคโตซานเป็นวัสดุนาโนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดเอนไซม์ไบโอเซนเซอร์และอิมมูโนเซนเซอร์
4. ชีวเคมีและชีวฟิสิกส์เชิงหน้าที่และโครงสร้างของช่องพอรินที่เกี่ยวข้องกับกลไกการติดต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคเมลิออยโดซิส *Burkholderia pseudomallei*
5. ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุลของโปรตีนเหมือนไคติเนส YKL-39 และ YKL-40 ที่เป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) โรคข้อเสื่อมและโรคมะเร็ง

List of Peer-Reviewed Published Articles

1. **Suginta W***, Chumjan W, Mahendran KR, Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M*. Chitoporin from *Vibrio harveyi*: Effects of transmembrane voltage and N-acetyl functionality on translocation of chitin oligosaccharides. Under revisions for **Biophys J**.
2. Ranok A, Wongsantichon J, Robinson RC,* **Suginta W,*** (2014) Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-Like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). **J Biol Chem**, Accepted.
3. Theanponkrang S, Suginta W, Weingart H, Winterhalter M, Schulte A* (2014) Robotic voltammetry with carbon nanotube-based sensors: A superb blend for convenient high-quality antimicrobial trace analysis. **Int J Nanomedicine**, In press.
4. Chotinantakul K, **Suginta W***, Schulte Albert* (2014) An Advanced amperometric respiration assay for antibiotic susceptibility testing. **Anal Chem**. In press.
5. 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.
6. 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.

7. Aunkham A, Schulte A, Winterhalter M, **Suginta W***. (2014) *BpsOmp38* porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of the ultraresistant melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*. **PLoS One**. 9:e95918.
8. 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.
9. **Suginta W**, Smith MF* (2013) Single-molecule trapping dynamics of sugar-uptake channels in marine bacteria. **Phys Rev Lett**. 110, 238102.
10. **Suginta W**, Khunkaewla P, Schulte A* (2013) Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **Chem Rev**. 113, 5458-5479.
11. **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.
12. **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.
13. **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.
14. Sritho N & **Suginta W*** (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. **App Biochem Biotech**. 166, 1192-1202.
15. 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.
16. **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 *BpsOmp38* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. **BBA-Biomembr**. 1808, 1552-1559.
17. **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)

18. 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.
19. **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.
20. 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.
21. 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.
22. **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.
23. **Suginta W*** (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. **Enzyme Microb Tech.** 41, 212-220.
24. 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.
25. **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.
26. 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.
27. **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.
28. 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.

29. **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.
30. **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.
31. 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.
32. 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.
33. **Suginta W**, Svasti MRJ* (1995) Purification and Properties of β -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 183-186.
34. **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.
35. 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. **Science Asia (Formerly J Sci Soc Thai)** 21, 293-303.

หมายเหตุ *Corresponding author

Oral/Poster Presentation in International Meetings (5 years): more than 80 abstracts were accepted.