Thesis Title Monoclonal Antibody Against Hyaluronan Binding Proteins From Shark Cartilage

Author Miss Jiraporn Chuangbunyat

M.S. Biochemistry

Examining Committee:

Asst. Professor Dr. Prachya Kongtawelert	Chairman
Lecturer Dr. Siriwan Ongchai	Member
Professor Dr. Maitree Suttajit	Member
Assoc. Professor Rujapa Nimsung	Member

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ABSTRACT

The main purpose of this study was to investigate the reactivity of monoclonal antibody (MAb) 1H8 with hyaluronan binding proteins (HABPs) from various cartilage sources (shark, bovine and human) and to determine a partial sequence of N-terminal amino acids of those HABPs.

The HABPs were prepared by the following steps: proteoglycan (PG) extraction, trypsin digestion, and affinity chromatography on HA-Sepharose. MAb 1H8 was prepared from culture medium of a hybridroma cell line and purified by salt-promoted chromatography on a thiophilic adsorbent. The antibody was characterized by competitive enzyme linked immunosorbent assay (competitive ELISA) method and immunoblotting method. It was found that this antibody could react with shark, bovine and human HABPs with 50% inhibition concentration (IC50) of 80, 100 and 800 ng/ml respectively. MAb 1H8 was found to react with shark-A1D1 and shark A1, from high to low affinity, respectively. No activity was observed with chondrointin sulfate C, chondrointin sulfate D, dextran sulfate, pentosan polysulfate, polyol polysulfate,

protamine sulfate, human keratan sulfate, G1 domain of pig PG and unbound fraction of PGs, which had been digested with chondroitinase ABC.

Sequence analysis of the first 10 N-terminal amino acids of HABPs fragments derived from shark, bovine and human cartilage resulted in sequences that bore no similarity. It is possible that sequencing of the first ten N-terminal amino acid is not enough to elucidate the common epitope sequence which should be further studied.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ โมโนโคลนอล แอนติบอดีย์ต่อโปรตีนซึ่งยึดไฮยาลูโรแนนจากกระดูกอ่อนปลาฉลาม

ชื่อผู้เขียน นางสาว จิราภรณ์ ช่วงบัญญัติ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
อ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ
ศ.ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	กรรมการ
รศ. รุจาภา นิ่มสังข์	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนอล แอนติบอดีย์ 1H8 ต่อโปรตีนยึดไฮยาลูโรแนนที่เตรียมมาจากกระดูกอ่อนของสัตว์สามชนิด คือ ฉลาม,วัว และ คน นอกจากนั้นยังได้นำโปรตีนดังกล่าวมาศึกษาลำดับกรดอะมิโนบางส่วนทางด้านปลายอะมิโนอีกด้วย

วิธีการเตรียมโปรตีนยึด ไฮยาลูโรแนนจากกระดูกอ่อนของฉลาม,วัว และ คน มีขั้นตอน คือ การสกัดสารโปรติโอไกลแคนจากกระดูกอ่อน นำสารที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วนำมาแยกโปรตีนยึดไฮยาลูโรแนนโดยการผ่าน HA-Sepharose column chromatography ส่วนโมโนโคลนอล แอนติบอดี 1H8 นั้นเตรียมได้จากการนำ culture medium ของ hybridoma cell line มาทำการแยกแอนติบอดีย์โดยเทคนิค thiophilic gel column chromatography แอนติบอดีที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณลักษณะต่อด้วยวิธี competitive enzyme linked immunosorbent assay (competitive ELISA) และ immunoblotting พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ โปรตีนยึดไฮยาลูโรแนนซึ่งเตรียมได้จากกระดูกอ่อนของ ฉลาม,วัว และ คน โดยมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนยึดไฮยาลูโรแนนจาก ฉลามดีที่สุด รองลงมาคือ วัว และคน ด้วยค่าความเข้มข้นของ competitors ที่การยับยั้ง 50% (IC50) เท่ากับ 80, 100 และ 800 ng/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีย์นี้กับสารอื่นๆ พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีย์ 1H8 สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ shark-A1D1 และ shark A1 ตามลำดับ และพบว่าไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ chondrointin sulfate C, chondrointin sulfate D, dextran sulfate, pentosan polysulfate, polyol polysulfate, protamine sulfate, human keratan sulfate,pig G1 และ สารสกัดโปรติโอไกลแคนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC และไม่จับกับ HA-Sepharose

ผลการหาลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวแรกจากปลายอะมิโนของชิ้นส่วนโปรตีนยึดไฮยาลูโรแนน (hyaluronan binding protein fragment) ที่เตรียมได้จากสัตว์ทั้งสามชนิด พบว่ามีความแตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่าลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวแรกของ fragment ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (67 kDa) ไม่เพียงพอจะบ่งชี้ถึงส่วนที่เป็น epitope sequence ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีย์ 1H8 ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University