

การตรวจสอบ microRNAs ของเซลล์ที่จำเพาะกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ A-J

นางสาวอภิญา คล้ายฟังสินธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2555  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EVALUATION OF CELLULAR MIRNAS TARGETING HBV GENOTYPE A-J

Miss Apichaya Khlaiphuengsin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจสอบ microRNAs ของเซลล์ที่จำเพาะกับยีน  
ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ A-J

โดย

นางสาวอภิษฎา คล้ายพึ่งสินธุ์

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตยชัย พยุงกร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้แก่นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โสภณ นภากาศ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตยชัย พยุงกร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ)

อภิธาน ค่ายฟังสินธุ์ : การตรวจสอบ microRNAs ของเซลล์ที่จำเพาะกับยีนของเชื้อไวรัส  
 ตับอักเสบบี จีโนไทป์ A-J. (EVALUATION OF CELLULAR MIRNAS TARGETING  
 HBV GENOTYPE A-J) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศศ.ดร.สัญญา พยุภกร, 79 หน้า.

microRNAs (miRNAs) เป็นอาร์เอ็นเอสายสั้นซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออก  
 ของยีนภายในเซลล์ โดยผ่านกลไกการสลายสาย mRNAs หรือยับยั้งกระบวนการแปลรหัส งานวิจัย  
 ก่อนหน้านี้พบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ ใน  
 การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์หา miRNAs ของเซลล์ที่จำเพาะกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโน  
 ไทป์ต่าง ๆ โดยอาศัยฐานข้อมูล miRBase และ RNAhybrid ในการวิเคราะห์ แล้วพิจารณาคัดเลือก  
 miRNA จากรูปแบบการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA ของไวรัสตับอักเสบบี พบว่ามี  
 miRNAs ทั้งหมด 41 miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับไวรัสตับอักเสบบีได้ และมี miRNAs จำนวน 14  
 ชนิดที่สามารถเข้าคู่กับไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง hsa-mir-5193 ซึ่งเป็น  
 miRNA ที่เลือกมาศึกษาเพิ่มเติมในครั้งนี เนื่องจากเป็น miRNA ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์  
 ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ต่าง ๆ ได้มากที่สุด ได้แก่ จีโนไทป์ A, B, C, E, F, H, I และ J

จากนั้นจึงทำการสร้าง miRNA Expression Vector และ Reporter Vector เพื่อใช้ใน  
 การศึกษาการทำงานของ hsa-mir-5193 ในเซลล์มะเร็งตับ ชนิด HepG2 แล้วตรวจสอบการทำงานของ  
 ของ miRNA โดยการวัดระดับการแสดงออกของยีน Luciferase โดยอาศัยเทคนิค Relative  
 Luciferase Assay และ real-time PCR จากผล relative luciferase assay พบว่า hsa-mir-5193  
 สามารถลด Luciferase activity ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของ  
 ยีน Luciferase ในระดับ mRNA ได้ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง hsa-mir-5193  
 และ mRNA ของไวรัสตับอักเสบบีแบบไม่สมบูรณ์ (partial complementary) จึงเกิดการยับยั้งได้ใน  
 ระดับการแสดงออกของโปรตีนเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐาน และมีประโยชน์ใน  
 การพัฒนาแนวทางใหม่สำหรับการยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในอนาคต

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
 สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา.....2555.....

## 5474188330 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS:HEPATITIS B VIRUS / MIRNAS

APICHAYA KHLAIPHUENGSIN : EVALUATION OF CELLULAR MIRNAS TARGETING HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE A-J. ADVISOR : ASST.. PROF. SUNCHAI PAYUNGORN, Ph.D., 79 pp.

A role of microRNA (miRNA) is regulation of gene expression by triggering mRNA degradation or translational repression. Recent studies demonstrated that miRNAs also plays an important role in viral. In this study, cellular miRNAs targeting multiple genotypes of hepatitis B virus (HBV) were evaluated. Candidate human miRNAs were initially predicted by miRBase and RNAhybrid based on hybridization pattern between miRNA and HBV nucleotide. Each genotype of HBV was differential targeted by different miRNAs. Furthermore, there were 14 human miRNAs targeting multiple genotypes of HBV. Interestingly, hsa-mir-5193 targeted almost all genotypes of HBV including A, B, C, E, F, H, I and J. Then the hsa-mir-5193 was evaluated by transfections of reporter vector and miRNA expression vector into human hepatoblastoma (HepG2) cells. Relative luciferase assay and RT-qPCR were used for the gene silencing analysis. Result revealed that hsa-mir-5193 significantly triggered down-regulation of luciferase activity but couldn't reduce mRNA level. Thus, the result implied that hsa-mir-5193 might be able to trigger gene silencing by translational repression.

This study predicted the hybridization patterns between cellular miRNAs and target viral genes among various genotypes (A-J) and then the potential hsa-mir-5193 was confirmed by experimental analysis to ensure the effect of an in vitro gene silencing. The miRNAs targeting hepatitis B virus might be useful and have a potential for inhibition of hepatitis B viral replication in the future.

Department :.....Biochemistry.....Student's Signature.....

Field of Study :...Medical Biochemistry...Advisor's Signature.....

Academic Year :2012.....

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สัญชัย พยุงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโท รวมถึงให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐสำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่สำคัญต่องานวิจัยและการดำเนินชีวิต

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความรู้ ความช่วยเหลือ ตลอดจนความอบอุ่นตลอดเวลาที่ศึกษาในระดับปริญญาตรีและปริญญาโท

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 724 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 7312/2-3 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนความรู้สึกที่ดีตลอดการทำวิจัยที่ผ่านมา

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาของมูลนิธิธีนิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนของบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนการเรียนในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมถึงกำลังใจที่เป็นแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี (Epidemiology of Hepatitis B Virus).....	5
ไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี (Molecular Virology of Hepatitis B Virus).....	6
วัฏจักรการจำลองตัวเองของไวรัสตับอักเสบบี (HBV Life Cycle).....	8
การรักษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Anti-Viral Treatments).....	10
กลไกการสร้าง miRNAs.....	11
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction).....	13
Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR).....	13
การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR.....	14
การทดสอบ Luciferase.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
รูปแบบการวิจัย.....	17
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	17

วิธีดำเนินการวิจัย .....	20
การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี .....	20
การออกแบบและเข้าสู่ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว .....	21
วิธีการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction) .....	22
วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture) .....	31
Transfection .....	33
การสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA Extraction) .....	34
การทดสอบ Luciferase assay .....	34
การย่อยดีเอ็นเอ (DNase Treatment) .....	35
Polyuridylation .....	35
Reverse Transcription .....	36
การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย Real-time Polymerase chain reaction .....	37
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	40
การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ ..	40
การออกแบบและเข้าสู่ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาว .....	51
การตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction) .....	51
การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR .....	58
การทดสอบ Luciferase Assay .....	59
การวิเคราะห์ระดับของ mRNA โดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR .....	64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	65
สรุปผลการวิจัย .....	66
อภิปรายผล .....	68
ข้อเสนอแนะ .....	71
รายการอ้างอิง .....	72
ภาคผนวก .....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	79



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการกระจายสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี.....	6
ตารางที่ 2 แสดง Accession numbers ที่ระบุในปัจจุบันของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J .....	20
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์สายยาว.....	21
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเข้าสู่ของนิวคลีโอไทด์สายยาว.....	22
ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด Reporter Vector.....	23
ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด miRNA Expression Vector .....	24
ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด Internal Control Vector .....	25
ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ Reporter Vector .....	29
ตารางที่ 9 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา.....	31
ตารางที่ 10 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด.....	31
ตารางที่ 11 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ (PCR condition) .....	31
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ .....	35
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation.....	36
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription สำหรับ mRNA.....	36
ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription สำหรับ miRNA.....	36
ตารางที่ 16 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription .....	37
ตารางที่ 17 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ Real-Time PCR.....	37
ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ใน Real-time PCR.....	38
ตารางที่ 19 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ mRNA (Real-Time PCR Condition).....	38
ตารางที่ 20 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ miRNA (Real-Time PCR Condition) .....	38
ตารางที่ 21 แสดง miRNAs ที่สามารถเข้ากับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J .....	42
ตารางที่ 22 แสดง miRNAs ที่สามารถเข้ากับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์..	49
ตารางที่ 23 แสดงนิวคลีโอไทด์สายยาวของยีนที่สนใจ .....	51
ตารางที่ 24 แสดงค่า Firefly, renilla และ relative luciferase activity .....	61

## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี .....	7
รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี .....	8
รูปที่ 3 แสดงการถอดรหัสจาก mRNA เป็น โปรตีนชนิดต่างๆของไวรัสตับอักเสบบี .....	9
รูปที่ 4 แสดงวัฏจักรการจำลองตัวเองของไวรัสตับอักเสบบี (HBV Life Cycle).....	10
รูปที่ 5 กลไกการสร้าง microRNA (miRNAs).....	11
รูปที่ 6 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมายตัดแปลงจาก.....	12
รูปที่ 7 แสดงเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs .....	15
รูปที่ 8 แสดงปฏิกิริยา Bioluminescent โดยอาศัย <i>Firefly</i> and <i>Renilla</i> luciferases.....	16
รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างในการออกแบบ miRNA.....	22
รูปที่ 10 โครงสร้างของ pCMVRLuc NP .....	24
รูปที่ 11 โครงสร้าง pCMVRLuc ที่นำ NP ออกแล้ว.....	25
รูปที่ 12 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic .....	27
รูปที่ 13 โครงสร้าง pGL3 Basic ที่มี target อยู่.....	27
รูปที่ 14 แสดงโครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 .....	28
รูปที่ 15 แสดงโครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 ที่มี miRNA หรือ FLuc อยู่.....	28
รูปที่ 16 แสดงตารางใน Hemacytometer.....	33
รูปที่ 17 แสดง mature miRNA ของ hsa-miR-5193 .....	51
รูปที่ 18 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด pGL3MS2/Basic .....	52
รูปที่ 19 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด pSilencer 3.0-H1 .....	53
รูปที่ 20 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด pCMVRLuc .....	54
รูปที่ 21 2% low-melting temperature agarose gel แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วย PCR.....	55
รูปที่ 22 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic HBV Insert .....	56
รูปที่ 23 2% low-melting temperature agarose gel แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วย PCR .....	56
รูปที่ 24 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer hsa-miR5193 .....	57

รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR .....	59
รูปที่ 26 แสดง Relative Luciferase Activity.....	63
รูปที่ 27 ผล Real-Time PCR แสดงระดับการลดลงของ mRNA เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง .....	65

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไวรัสตับอักเสบบี ในปัจจุบันสามารถจำแนกตามซีรัมวิทยาได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ adw ayw adr และ ayr และสามารถจำแนกตามความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 10 จีโนไทป์ (A-J) มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอไวรัสที่มีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded circular DNA) ขนาดประมาณ 3,200 เบสคู่สม ประกอบด้วย 4 overlapping open reading frames (ORFs) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ของไวรัส ได้แก่โปรตีน S, C, P และ X การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่อัตราการติดเชื้อของประชากรก็ยังไม่ลดลง จึงได้มีการพัฒนาการใช้ nucleos(t)ide analogues และ immunomodulators แต่ก็ยังมีข้อเสียหลายประการ เช่น ราคาแพง ระยะเวลาการรักษาาน การเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสและที่มีผลข้างเคียงต่อการรักษาสูงจึงมีการค้นคว้างานวิจัยต่างๆเช่น การใช้ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNAs, miRNAs)

miRNAs เป็นอาร์เอ็นเอชนิดหนึ่งที่มีขนาด 19-25 นิวคลีโอไทด์ สร้างขึ้นจากยีน miRNAs ซึ่งอยู่บริเวณ non-coding sequence ของจีโนมทั้งพืช สัตว์ และไวรัสด้วยเอนไซม์ RNA polymerase II (RNA pol II) และผ่านกระบวนการต่างๆ จนได้ลักษณะของ miRNAs ที่สมบูรณ์ โดย miRNAs นั้นสามารถเข้าคู่กับ mRNAs ของเป้าหมายแบบสมบูรณ์ (Perfect Complementary) จะทำให้เกิดการสลายของ mRNAs และอาจเกิดการเข้าคู่แบบไม่สมบูรณ์ (Partial Complementary) ซึ่งก็เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของสาย mRNAs ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์หา miRNAs ของเซลล์มนุษย์ที่สามารถจับกับไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆ ซึ่งช่วยในการยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีและอาจนำไปพัฒนาในทางคลินิกต่อไปได้ในอนาคต

### คำถามของการวิจัย

1. ในเซลล์มนุษย์มี miRNAs ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมาะต่อการจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หรือไม่
2. miRNAs ในเซลล์มนุษย์นั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน luciferase ได้หรือไม่

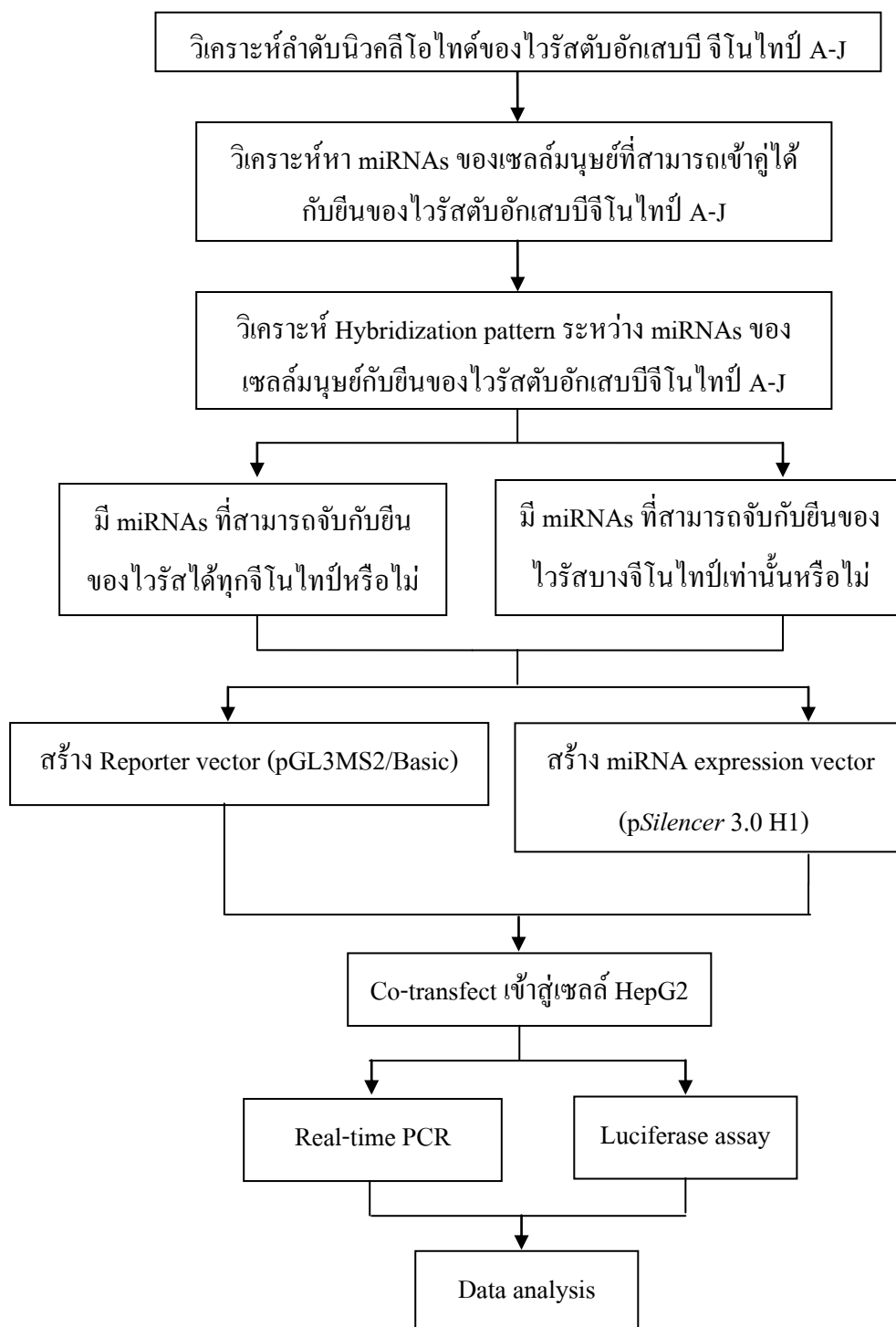
### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หา miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้
2. เพื่อตรวจสอบว่า miRNAs จะมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีน luciferase ได้

### สมมติฐานของการวิจัย

1. ในเซลล์มนุษย์มี miRNAs ที่สามารถเข้าคู่ได้กับยีนของไวรัส ซึ่งตรงตามทั้ง 3 รูปแบบ
2. miRNAs ของเซลล์มนุษย์ที่เข้าคู่ได้กับยีนของไวรัสนั้นจะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน luciferase ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้

## ขอบเขตของการวิจัย



### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Relative Luciferase Activity คือ การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *Firefly luciferase* ใน reporter vector ต่อการแสดงออกของยีน *Renilla luciferase* ใน internal control vector เพื่อเปรียบเทียบผลของ miRNAs ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Firefly luciferase* ซึ่งในบริเวณ 3'-UTR มียีนของไวรัสที่สนใจแทรกอยู่

### คำสำคัญ

Hepatitis B virus (HBV), MicroRNAs (miRNAs)

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถหา miRNAs ของเซลล์มนุษย์ที่อาจมีความสามารถในการยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้
2. อาจนำงานวิจัยนี้ไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางคลินิกต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus)

##### 1. ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี (Epidemiology of Hepatitis B Virus)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus Infection) นั้นจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เป็นผลให้มีประชากรเสียชีวิตเป็นจำนวน 600,000 ถึง 1 ล้านคนต่อปี [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในทวีปเอเชีย แอฟริกา ยุโรปตอนใต้ และลาตินอเมริกา ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute Hepatitis), โรคตับอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic Hepatitis), โรคตับแข็ง (Cirrhosis) และมะเร็งตับ (Hepatocellular Carcinoma หรือ HCC) [2]

ไวรัสตับอักเสบบีจัดอยู่ในตระกูล *Hepadnaviridae* ซึ่งในปัจจุบันสามารถจำแนกตามซีรัมวิทยาได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (Serotypes) คือ adw ayw adr และ ayr โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนโปรตีนพื้นผิว (Surface Protein) หรือ HBsAg (Antigenic Determinant) และสามารถจำแนกตามความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมได้เป็น 10 จีโนไทป์ (A-J) โดยใช้เกณฑ์ของ ความแตกต่างที่มากกว่าร้อยละ 8 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม [3] และยังสามารถแบ่งเป็นจีโนไทป์ย่อย (Subgenotypes) โดยแบ่งตามตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ (Geographic Origin) [4] โดยพบว่า จีโนไทป์ A พบในกลุ่มประเทศที่ตั้งอยู่ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาราในทวีปแอฟริกา (Subgenotype A1), ยุโรปตอนเหนือ (Subgenotype A2), และแอฟริกาตะวันตก (Subgenotype A3) จีโนไทป์ B พบได้ทั่วไปในประเทศญี่ปุ่น (Subgenotype B1), เอเชียตะวันออก (Subgenotype B2-B5), อลาสก้าแคนาดาตอนเหนือ และกรีนแลนด์ (Subgenotype B6) ส่วนจีโนไทป์ C (Subgenotype C1-C5) นั้นจะพบมากในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี [5] จีโนไทป์ D ได้แก่ Subgenotype D1-D5 พบในทวีปแอฟริกา ยุโรป ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียนและอินเดีย จีโนไทป์ E พบโดยทั่วไปในแถบของแอฟริกาตะวันตก จีโนไทป์ F ประกอบด้วย Subgenotype F1-F4 พบในทวีปอเมริกากลางและใต้ ส่วนจีโนไทป์ H พบในประเทศฝรั่งเศส เยอรมันและอเมริกา [6, 7] จากรายงานล่าสุดค้นพบจีโนไทป์ I ในประเทศลาวและเวียดนาม [8, 9] และจีโนไทป์ J พบในประเทศญี่ปุ่น [10] ดังตารางที่ 1



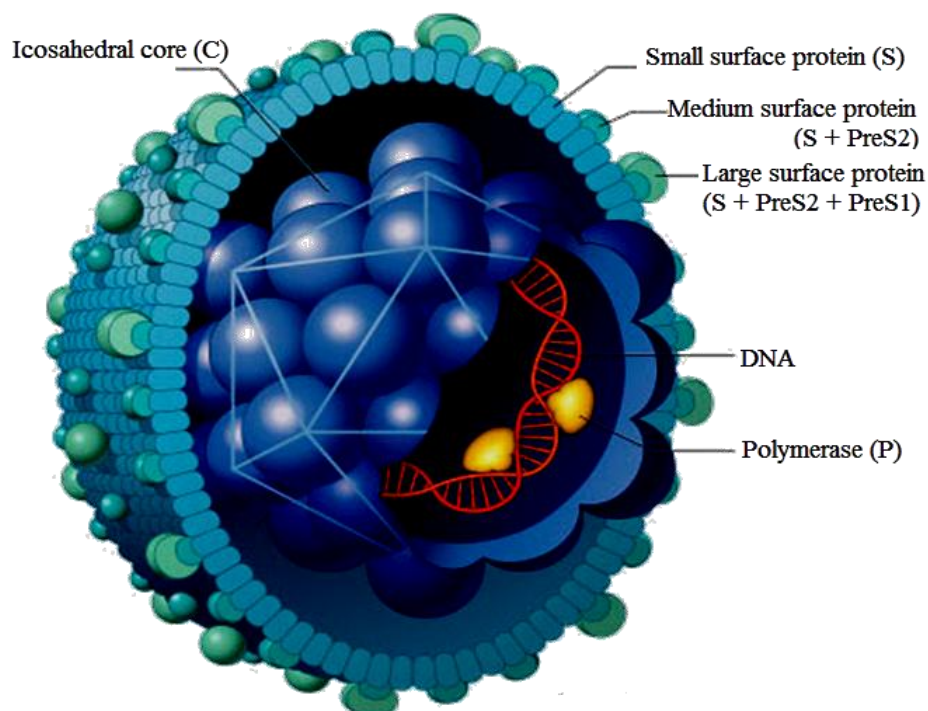
ตารางที่ 1 แสดงการกระจายสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี

จีโนไทป์	ตำแหน่งทางภูมิศาสตร์
A1	ตอนใต้ของทะเลทรายซาฮาราในทวีปแอฟริกา
A2	ยุโรปตอนเหนือ
A3	แอฟริกาตะวันตก
B1	ญี่ปุ่น
B2-B5	เอเชียตะวันออก
B6	อลาสก้า, แคนาดาตอนเหนือ, กรีนแลนด์
C	จีน, ญี่ปุ่น, เกาหลี
D1-D5	แอฟริกา, ยุโรป, ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน, อินเดีย
E	แอฟริกาตะวันตก
F1-F4	อเมริกากลาง, อเมริกาใต้
I	ลาว, เวียดนาม
J	ญี่ปุ่น

ประเทศไทยนั้นเป็นประเทศหนึ่งในทวีปเอเชียที่พบว่ามีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีค่อนข้างสูง ซึ่งพบว่า ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อจากแม่ไปสู่ลูก [11] โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ B และ C ซึ่งพบว่ามีความชุกของการติดเชื้อ (Prevalence) ถึง 11.6 และ 87.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [12]

## 2. ไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี (Molecular Virology of Hepatitis B Virus)

ไวรัสตับอักเสบบีมีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดประมาณ 42 นาโนเมตร ซึ่งประกอบด้วยเยื่อหุ้ม (Envelop) ซึ่งห่อหุ้ม Icosahedral Nucleocapsid Core Antigen (HBcAg) ที่มีจีโนมของไวรัส (Viral genome) และดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA Polymerase) อยู่ส่วนของเยื่อหุ้มนั้นจะประกอบด้วยโปรตีนพื้นผิว (Surface Protein) ที่มีขนาดใหญ่ (Large Surface Protein) ขนาดกลาง (Medium Surface Protein), และขนาดเล็ก (Small Surface Protein) ดังรูปที่ 1



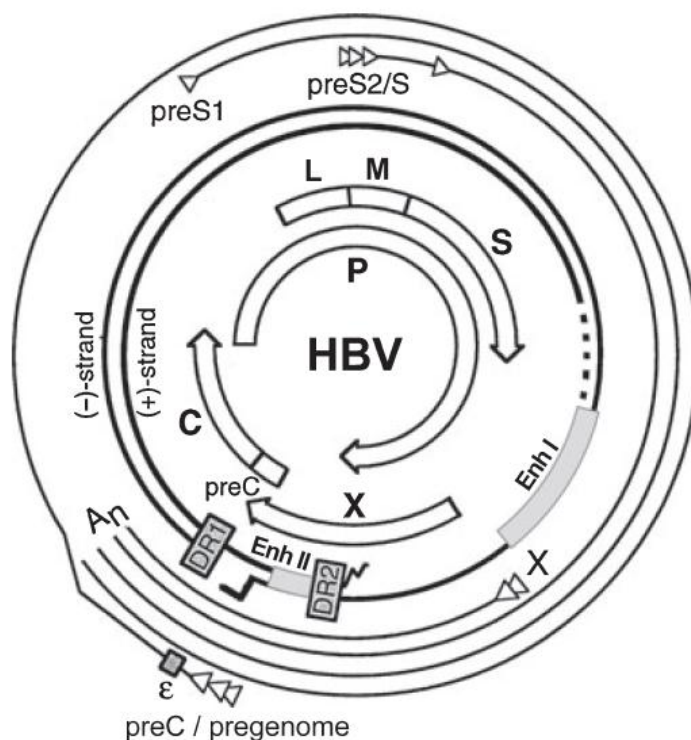
รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี [13]

จีโนมของไวรัสตับอักเสบบีมีลักษณะเป็นดีเอ็นเอไวรัสที่มีลักษณะเป็นวงกลมสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ (Partially Double-Stranded Circular DNA) ที่มีความยาวประมาณ 3,200 เบสคู่สม โดยประกอบด้วยสายลบ (Minus Strand) ที่มีความยาวประมาณ 3,020-3,320 เบสคู่สมและสายบวก (Plus Strand) ที่มีความยาวไม่แน่นอน โดยสายทั้งสองจะเชื่อมต่อกันในตำแหน่ง Direct Repeat (DR) ได้แก่ DR1 และ DR2 การควบคุมการแสดงออกของยีนในไวรัสนั้น จะประกอบด้วยหนึ่งหรือหลาย Enhancer ที่ไปควบคุม ได้แก่ Enh1 และ Enh2 [14] ดังรูปที่ 2

นอกจากนี้ยังประกอบด้วย 4 Overlapping Open Reading Frames (ORFs) เป็นส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโครงสร้าง (Structural Protein) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non-Structural Protein) ของไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่

- (1) S ORF ประกอบด้วยยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีนพื้นผิว (Surface Protein) หรือ HBsAg 3 ชนิด ได้แก่ Small Surface Protein (S), Medium Surface Protein (S+Pre-S2) และ Large Surface Protein (S+Pre-S1+Pre-S2) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ Envelop ของไวรัส
- (2) C ORF ประกอบด้วย Core Gene ที่สร้าง Core Protein และ HBcAg
- (3) P ORF หรือเรียกอีกอย่างว่า พอลิเมอเรส (Polymerase (Pol)) ทำหน้าที่สร้างพอลิเมอเรสที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Viral Replication)

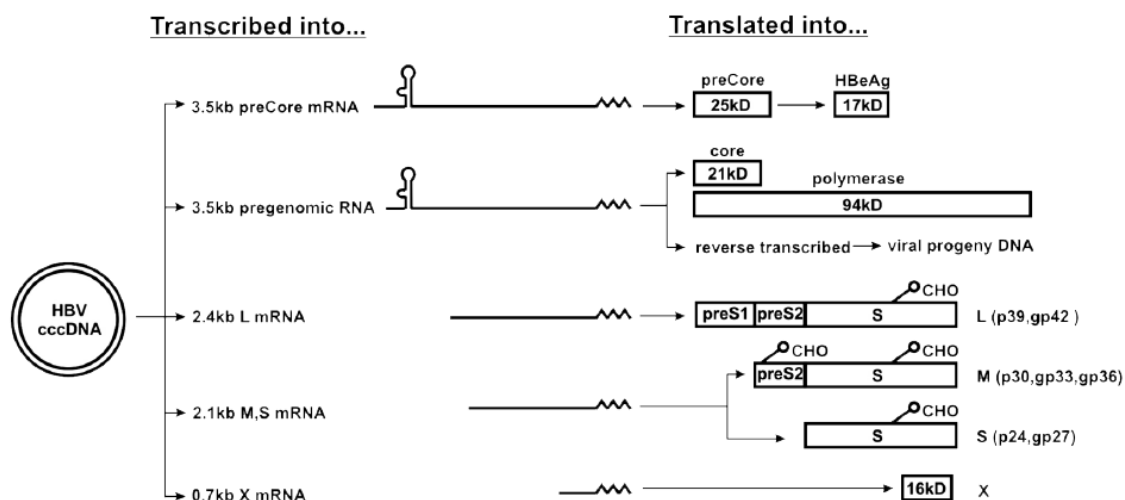
(4) X ORF ทำหน้าที่สร้างโปรตีน X หรือ Hepatitis B x Antigen ซึ่งมีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ p53 ซึ่งเป็นยีนที่สามารถต้านการเกิดมะเร็งได้ [15]



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี [16]

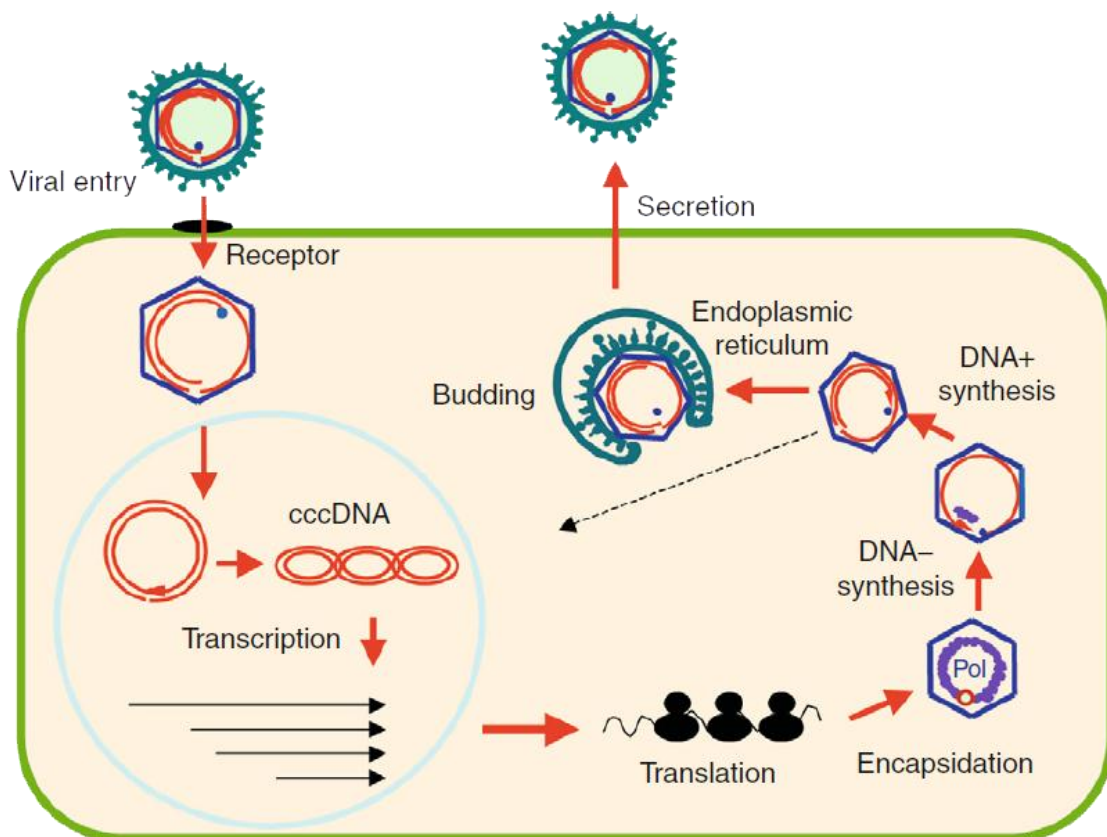
### 3. วัฏจักรการจำลองตัวเองของไวรัสตับอักเสบบี (HBV Life Cycle)

ไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยการจับกับ Hepatocyte-Specific PreS1-Receptor ซึ่งปัจจุบันกลไกดังกล่าวนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด หลังจากนั้นไวรัสจะถอดเปลือกหุ้ม (Uncoated) แล้วนิวคลีโอแคพซิด (Nucleocapsid) จะถูกขนส่งเข้าไปยังนิวเคลียสของเซลล์ตับในรูปของ partially double-stranded viral relaxed circular DNA (rcDNA) ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอสายบวก (Plus Strand) ให้สมบูรณ์ที่เรียกว่า covalently closed circular DNA (cccDNA) [17] จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามี cccDNA ประมาณ 1-50 โมเลกุลจะอยู่ในรูปของ Minichromosomes ซึ่งเป็นต้นแบบในการสร้าง mRNA หรือที่เรียกว่า Subgenomic RNA (sgRNA) และ Pregenomic RNA (pgRNA) โดย pgRNA ที่มีขนาด 3,500 คู่เบส นั้นจะถูกนำไปสร้างเป็น Core Protein และเอนไซม์พอลิเมอเรส (Polymerase) ส่วน sgRNA จะถูกนำไปสร้างเป็น X Protein และโปรตีนพื้นผิว (Surface Protein) ทั้ง 3 ชนิด [18] ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการถอดรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีนชนิดต่างๆของไวรัสตับอักเสบบี [18]

pgRNA จะเกิดกระบวนการ Encapsidation เพื่อรวมตัวกับพอลิเมอเรส (Polymerase) ก่อนที่จะถูกห่อหุ้มด้วย Core Protein โดยภายในนิวคลีโอแคพซิด (Nucleocapsid) จะมีการสร้างดีเอ็นเอสายลบ (Minus Strand) เพื่อเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายบวก (Plus Strand) โดยอาศัย sgRNA ต่อไป นิวคลีโอแคพซิด (Nucleocapsid) ส่วนหนึ่งจะถูกขนส่งไปยังนิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่ในการเพิ่มจำนวน cccDNA และส่วนหนึ่งจะถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนพื้นผิว (Surface Protein) และส่งออกไปยังนอกเซลล์ผ่านทาง endoplasmicreticulum (ER) [17] ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงวัฏจักรการจำลองตัวเองของไวรัสตับอักเสบบี (HBV Life Cycle) [19]

#### 4. การรักษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Anti-viral treatments)

ในปัจจุบันมีการพัฒนานำเอาวัคซีนมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยอาศัยส่วนของโปรตีนพื้นผิวของไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนายาต่างๆ ขึ้นมาใช้ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่

(1) กลุ่ม Immunomodulators ได้แก่ interferon (IFN- $\alpha$ ) และ pegylated IFN

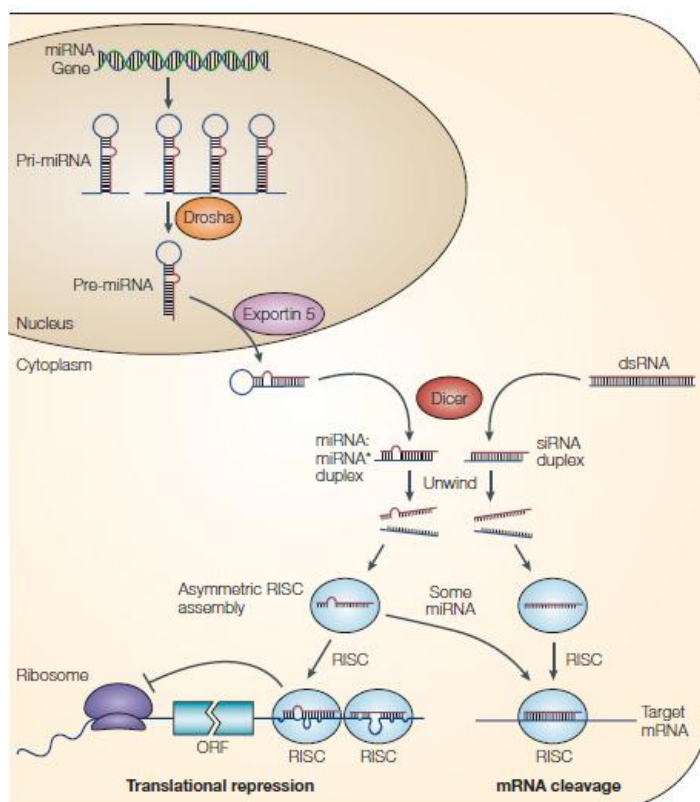
(2) กลุ่ม Nucleoside หรือ nucleotide Analogues เช่น lamivudine (Epivir), adefovir (Hepsera), telbivudine (Tyzeka), entecavir (Baraclude) และ tenofovir (Viread)

การใช้ยาในกลุ่มข้างต้นนั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่ม Nucleoside หรือ Nucleotide Analogues มีข้อเสียคือต้องอาศัยเวลาในการรักษานานและอาจเป็นผลทำให้ไวรัสเกิดการกลายพันธุ์ได้อีกด้วย ส่วนยาในกลุ่ม interferon นั้นมีข้อเสียคือ มีราคาแพงและมีผลข้างเคียงต่อการรักษาสูงมาก [20]

## MicroRNAs (MiRNAs)

### กลไกการสร้าง miRNAs

MicroRNAs (MiRNAs) เป็นอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ ขนาดประมาณ 19-25 นิวคลีโอไทด์ สร้างขึ้นจากยีน miRNAs ซึ่งอยู่บริเวณ non-coding sequence ของจีโนมทั้งพืช สัตว์ และไวรัสด้วยเอนไซม์ RNA polymerase II (RNA pol II) ได้เป็น primary miRNA (pri-miRNA) ที่มีลักษณะเป็น hairpin loop จากนั้นจะถูกตัดให้มีขนาดเล็กลงด้วย RNaseIII domain หรือ Drosha โดยตำแหน่งที่ตัดจะอยู่ประมาณ 11 นิวคลีโอไทด์จากส่วนที่เป็น hairpin loop เกิดเป็น precursor-miRNAs (pre-miRNAs) มีขนาดประมาณ 60-70 นิวคลีโอไทด์จากนั้นจะถูกส่งไปยังไซโทพลาสซึมผ่านทางโปรตีน Exportin-5 จากนั้น pre-miRNAs จะถูกตัดบริเวณส่วนที่เป็น loop ออกด้วยเอนไซม์ RNase III dicer เกิดเป็น RNA สายคู่ (duplex) ที่มีบางส่วนไม่เข้าคู่กัน ทำให้เกิดการแยกสายเป็นสายเดี่ยวโดยเอนไซม์ helicase ซึ่งสายหนึ่งจะไปรวมตัวกับ RNA-inducing silencing complex (RISC) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน [21, 22] ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 กลไกการสร้าง microRNA (miRNAs) [23]

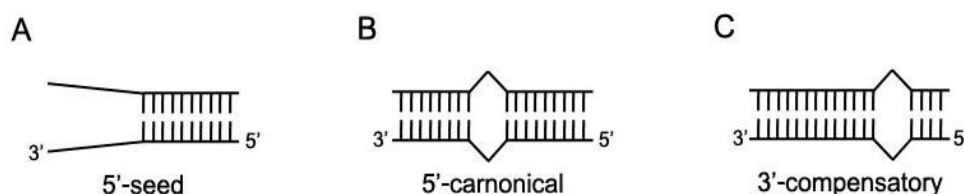
หาก miRNAs สามารถเข้าคู่กับ mRNAs ของเป้าหมายแบบสมบูรณ์ (perfect complementary) จะทำให้เกิดการสลายของ mRNAs แต่ถ้าหากมีการเข้าคู่แบบไม่สมบูรณ์ (partial complementary) ก็จะเป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของสาย mRNAs ได้ [24]

จากการศึกษาของ Brennecke และคณะในปี 2005 [25] พบว่าความจำเพาะของ miRNA และ mRNA ขึ้นกับบริเวณที่จับกัน (target binding site) ซึ่งมักอยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากทางด้านปลาย 5' ของ miRNA จับกับบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) ของ mRNA เป้าหมาย โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่

(1) 5' seed คือ การเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA ของเป้าหมายในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 เฉพาะด้านปลาย 5' ของ miRNA

(2) 5' canonical คือ การเข้าคู่กันที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 ทางด้านปลาย 5' ของ miRNA และมีบางส่วนของด้านปลาย 3' ของ miRNA ซึ่งเป็นรูปแบบที่ดีที่สุดในการเข้าคู่กัน

(3) 3' compensatory คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้าน 3' ของ miRNA จับกับ mRNAs และมีบางส่วนของด้าน 5' ของ miRNA จับกับ mRNA ด้วย ซึ่งจะพบรูปแบบนี้น้อยที่สุดดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมายดัดแปลงจาก [25]

อีกทั้งยังมีการรายงานเกี่ยวกับ miRNAs ที่สามารถถอดรหัสจากไวรัส เช่น herpesviruses (HSVs) [26] Epstein-Barr-Virus 3 (EBV) [27] Simian Virus 40 (SV40) [28] และ human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) [29] และ miRNAs ที่ถอดรหัสมาจากเซลล์เป้าหมายด้วย เช่น primate foamy virus type 6 1 (PFV-1) [30] vesicular stomatitis virus (VSV) [31] และ hepatitis C virus (HCV) [32]

ที่ผ่านมายังมีงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ miRNAs ที่สามารถไปรบกวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ เช่น hsa-miR-125a-5p [33] hsa-miR-122 [34] miR-199-3p, miR-210 [35] เป็นต้น

## ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือ PCR เป็นกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง (*In Vitro*) โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทำให้ได้ดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณของยีนที่สนใจเป็นปริมาณมาก โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอนี้จะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนซ้ำเป็นจำนวน 35-40 รอบ ได้แก่

1. ขั้นตอนการแยกสายของดีเอ็นเอ (Denaturation) เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอนั้นเสื่อมสภาพ โดยเปลี่ยนจากดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งจะใช้อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที
2. ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่เป็นแม่แบบ (Annealing) เป็นขั้นตอนการจับกันระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบให้คู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 55-58 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที
3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) โดยจะสังเคราะห์จากด้าน 5' ไปยังด้าน 3' ของไพรเมอร์ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ได้โดยการทำ agarose gel electrophoresis

## Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR)

Real-Time PCR จัดเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความไวสูงและสามารถตรวจสอบปริมาณการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นได้โดยอาศัยสารเรืองแสง เช่น SYBR Green ซึ่งจะไปแทรกบริเวณของ minor groove ของดีเอ็นเอ หลังจากถูกกระตุ้นจะทำให้มีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสง

การแทรกตัวของสารเรืองแสงที่บริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอนั้นจะเป็นไปอย่างไม่จำเพาะ ซึ่งสามารถไปแทรกตัวบริเวณของไดเมอร์หรือผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการเปรียบเทียบด้วยค่า melting temperature ( $T_m$ ) ซึ่งเป็นค่าที่แปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์ GC และความยาวของสายดีเอ็นเอ โดยค่า  $T_m$  ของไดเมอร์หรือผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการนั้นจะมีค่าต่ำกว่าค่า  $T_m$  ของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีขนาดที่สั้นกว่า โดยสามารถวิเคราะห์ได้จาก melting curve



### การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ miRNAs เพิ่มมากขึ้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆเพื่อใช้ในการวัดการแสดงออกของ miRNAs เช่น Northern Blot [36], Microarray [37] และ Real-Time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่เริ่มคิดค้นในปี 2005 โดย Chen และคณะ [38] ซึ่งจะอาศัย stem-loop RT primer และ TaqMan Probe ในขั้นตอนของ Real-Time PCR

ต่อมา Rui Shi และ Vincent L. Chiang ได้มีการพัฒนาเทคนิคโดยอาศัย poly(T)-adapter primers ซึ่งเป็น universal primers ทำให้เทคนิคนี้มีราคาต่ำกว่าเทคนิคแรก แต่ก็มีความจำเพาะ (Specificity) ที่ต่ำด้วย เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (Linear Structure) ทำให้สามารถเข้าคู่กับ double-stranded genomic DNA ได้ [39] นอกจากนี้ ยังมีการดัดแปลงไพรเมอร์โดยนำ locked nucleic acid (LNA) มาใช้เพื่อเพิ่มค่าของ Tm และความจำเพาะให้สูงขึ้น แต่ต่อมาพบว่า LNA จะไปลดประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Amplification Efficiency) และยังมีผลทำให้การจับของ ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA Polymerase) ไม่ดีอีกด้วยต่อมาจึงได้มีการปรับปรุงเทคนิคข้างต้นเพื่อนำมาใช้ [40]

เทคนิคนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่

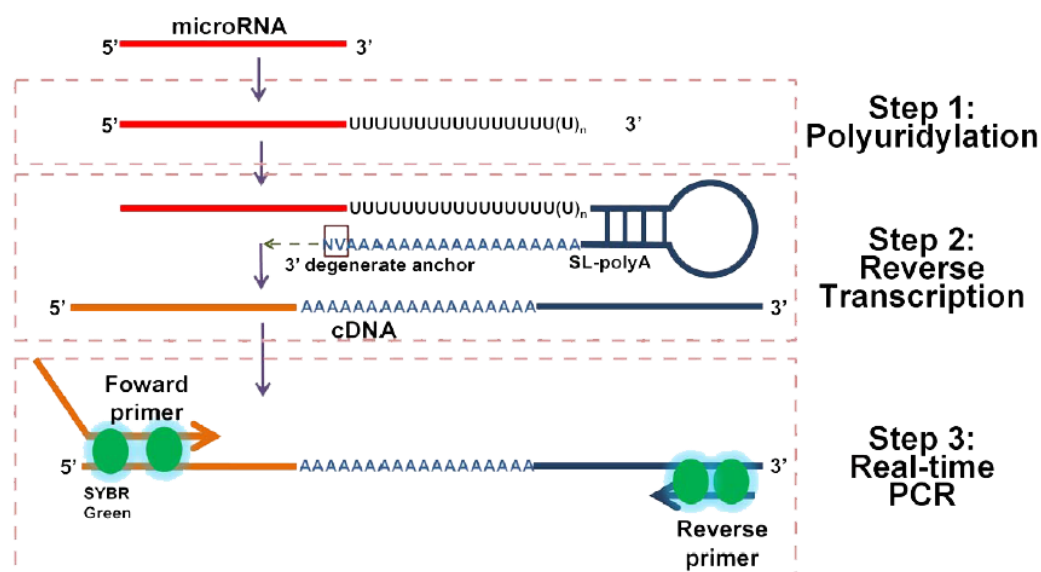
(1) Polyuridylation เป็นการเติม UTP จำนวนมากกว่า 100 ตำแหน่งที่บริเวณปลาย 3' ของอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ Poly (U) Polymerase

(2) Reverse Transcription เป็นเทคนิคการสร้าง cDNA โดยอาศัย universal poly (A) stem-loop RT primers หรือ SL-poly (A) ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ

(2.1) 3'-poly (A) ซึ่งเป็นส่วนที่จะไปจับกับ Poly (U) ของ miRNAs โดยมี Degenerated Anchor Sequence อยู่ที่ปลาย 3' เพื่อเป็นตำแหน่งจับของ miRNA

(2.2) 5'-Stem-Loop ซึ่งเป็นตำแหน่งจับของ Universal Reverse Primer ในขั้นตอน Real-Time PCR

(3) Real-Time PCR โดยอาศัย miRNA-Specific Forward Primer และ Universal Reverse Primer ดังรูปที่ 7

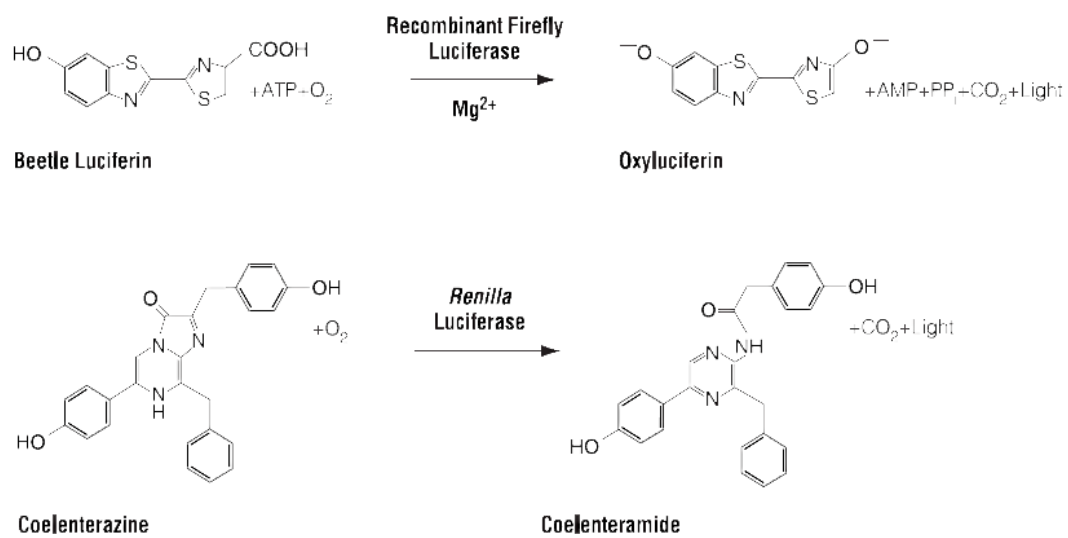


รูปที่ 7 แสดงเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ Polyuridylation, RT Reaction และ Real-TimePCR [40]

#### การทดสอบ Luciferase

การทดสอบ Luciferase นั้นเป็นการทดสอบโดยอาศัยการทำงานของ *Firefly* และ *Renilla* luciferases ภายในตัวอย่างเดียวกันซึ่ง *Firefly* luciferase (*Photinus pyralis*) เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 61 กิโลดาลตัน และสามารถปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Beetle Luciferin ซึ่งจะอาศัยพลังงานในรูปของ ATP,  $Mg^{2+}$  และออกซิเจน

*Renilla* luciferase (*Renilla reniformis* หรือที่เรียกว่า sea pansy) เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน และสามารถปล่อยพลังงานออกมาในรูปของพลังงานแสงเช่นเดียวกับ *Firefly* Luciferase ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงปฏิกิริยา Bioluminescent โดยอาศัย *Firefly* and *Renilla* luciferases [41]

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

#### วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. สารเคมีสำหรับเตรียม Annealing Buffer

- Tris (AMRESCO)
- NaCl (Merck)
- EDTA (Sigma)

##### 2. สารเคมีสำหรับ การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion)

- *NheI* (Thermo Scientetific)
- *XhoI* (Thermo Scientetific)
- *BamHI* (Thermo Scientetific)
- *HindIII* (Thermo Scientetific)
- 10X Buffer Tango™ (Thermo Scientetific)
- 10X Buffer *BamHI* (Thermo Scientetific)

##### 3. สารเคมีสำหรับ Ligation, Cloning และการสกัดพลาสมิด

- T4 DNA Ligase (Thermo Scientetific)
- Difco™ Agar Technical (Becton Dickinson)
- Bacto™ Tryptone (Becton Dickinson)
- Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson)
- NaCl (Merck)
- *E. Coli* DH-5α (RBC Bioscience)
- Ampicillin (General Drugs House)
- Kanamycin (General Drugs House)
- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience Cat No.

YPD100)

#### 4. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับตรวจสอบยีนด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Thermal Cycler
- Distilled Water (DW)
- Master Mix (5 PRIME)
- ไพร์เมอร์ (1<sup>st</sup> Base)

#### 5. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose (Invitrogen Cat No. 75510-019)
- 1x TBE
- Ethidium Bromide (AMRESCO)
- 1Kb และ 100 Bp Marker (RBC Bioscience Cat No.RD001)
- Transilluminator (Biogenomed)
- Electrophoresis (Major Science)

#### 6. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจาก Agarose Gel ให้บริสุทธิ์

- HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience)

#### 7. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์

- DMEM (Thermo Scientific)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Antibiotic-Antimycotic (Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies)
- Trypsin 0.25% (1X) Solution (HyClone<sup>®</sup>)
- Tissue Culture Flask (TPP)
- Serological Pipette (TPP)
- หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรและ 50 มิลลิลิตร (Axygen Scientific)
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 320 R)

#### 8. วัสดุ และสารเคมีสำหรับ Transfection

- Lipofectamine<sup>®</sup>2000 Reagent (Invitrogen)
- Opti-MEM<sup>®</sup>I (1X) Reduced Serum Medium (Gibco)
- 96-well plate (TPP)

### 9. สารเคมีสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ

- RBC Real Genomics Total RNA Extraction Kit (Blood/Bacteria/Cultured Cells)(RBC Bioscience Cat No. YRB50)

### 10. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

- Poly (U) Polymerase (New England Biolabs)
- Ribonucleotide Solution Set (NTP Set) (New England Biolabs)

### 11. สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ

- RQ1 RNase-Free DNase (Promega)

### 12. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription

- HelixCript™ Thermo Reverse Transcriptase (Nanohelix)

### 13. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับทำ Real-Time PCR

- Applied Biosystem StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems
- SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)

### 14. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับ Dual-Luciferase Assay

- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
- Microplate Reader
- 96-Well Plate White Opaque (Costar®)

### 15. วัสดุ และอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย

- Heat box (Bioer Technology)
- Mini Centrifuge (Eppendorf)
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส (Biosan)
- MicroCentrifuge Tube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)
- Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Neptune)
- Pipette ขนาด 3, 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Biohit)

### 16. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

- miRBase (<http://www.mirbase.org/>)
- RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html>)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.4.1)
- Oligos Primer Design Software (Version 9.1)

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี

ตารางที่ 2 แสดง Accession numbers ที่ระบุในปัจจุบันของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J

Hepatitis B virus	Accession number
Genotype A	AM282986
Genotype B	DQ361535
Genotype C	EU498227
Genotype D	X80926
Genotype E	AB091255
Genotype F	AB116654
Genotype G	AB056513
Genotype H	AY090457
Genotype I	AF241409
Genotype J	AB486012

1.1 วิเคราะห์หา miRNAs ของมนุษย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J ในฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mature miRNAs ที่ได้จากฐานข้อมูล miRBase มาวิเคราะห์เพื่อคุณลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs กับไวรัสตับอักเสบบี โดยอาศัยฐานข้อมูล RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html>) โดยพิจารณาจากลักษณะของการเข้าคู่ ดังนี้

5' Canonical พิจารณานิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (Seed Region) จากทางด้าน 5' ของ miRNA เทียบกับ mRNA ต้องมีนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันอย่างน้อย 6 ตำแหน่ง และมีการเข้าคู่กันในปลายด้าน 3' ด้วย

5' Seed พิจารณานิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (Seed Region) จากทางด้าน 5' ของ miRNA เทียบกับ mRNA ต้องมีนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันอย่างน้อย 6 ตำแหน่ง แต่ไม่มีการเข้าคู่กันในปลายด้าน 3'

3' Compensatory นิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของ miRNAs มีการเข้าคู่กันอย่างน้อยครั้งหนึ่งกับสายของ mRNAs

1.2 เลือก miRNAs ที่สามารถเข้าสู่กับไวรัสตับอักเสบบีทุกจีโนมไทป์เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งไวรัสต่อไป

## 2. การออกแบบและเข้าสู่ไมวคลีโอไทด์สายยาว

### 2.1 ไมวคลีโอไทด์สายยาวของยีนที่สนใจ

- (1) ออกแบบไมวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจโดยกำหนดให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะเป็น *XhoI* และ *NheI*
- (2) ละลายไมวคลีโอไทด์สายยาวแต่ละสายด้วย TE Buffer ให้ได้เป็นความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
- (3) เจือจางด้วย Nuclease-Free Water ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์
- (4) วัดความเข้มข้นของไมวคลีโอไทด์ที่  $A_{260}$  และปรับให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
- (5) เตรียม 25 ไมโครลิตรของ Annealing Mixture ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเชื่อมไมวคลีโอไทด์สายยาว

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Top strand	1
Bottom strand	1
1X annealing buffer	23
ปริมาตรรวม	25

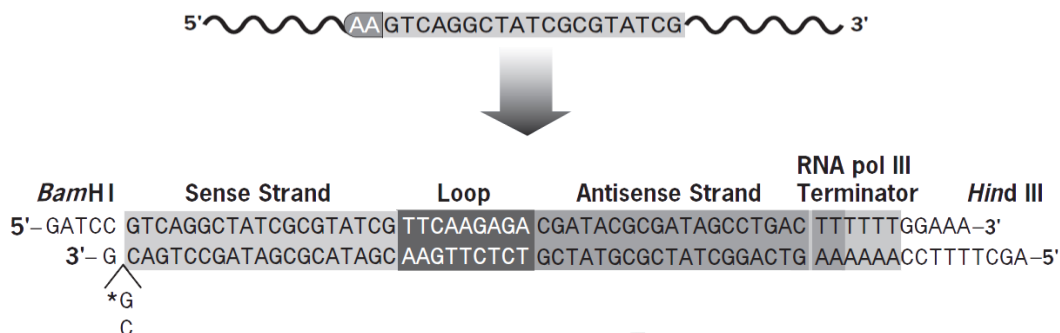
(6) บ่มที่ 90 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

(7) เจือจางไมวคลีโอไทด์ที่เข้าสู่กันแล้ว 10 เท่าใน Nuclease-Free Water

### 2.2 ไมวคลีโอไทด์สายยาวที่ใช้เป็น miRNA template และ FLuc template

- (1) อาศัยการสร้าง miRNA และ FLuc ตามรูปที่ 8
- (2) ละลายไมวคลีโอไทด์สายยาวแต่ละสายด้วย 100 ไมโครลิตรของ Nuclease-Free Water และเจือจาง 1 ไมโครลิตร ของไมวคลีโอไทด์แต่ละสายด้วย TE buffer ในอัตราส่วน 1:100
- (3) วัดความเข้มข้นของไมวคลีโอไทด์ที่  $A_{260}$  และปรับให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรด้วย TE buffer





**รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างในการออกแบบ miRNA**

(4) เตรียม 25 ไมโครลิตรของ Annealing mixture ดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเข้าสู่ของนิวคลีโอไทด์สายยาว**

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Top strand	1
Bottom strand	1
1X annealing buffer	23
ปริมาตรรวม	25

(5) บ่มที่ 90 องศาเซลเซียส 3 นาที และ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

(6) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 5 ไมโครลิตรเจือจางใน Nuclease-Free Water 45 ไมโครลิตร

### 3. วิธีการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction)

#### 3.1 วิธีเตรียม Competent cell

(1) นำ Single colony ของแบคทีเรีย *E. coli* ลงใน LB (Luria Bertani) (1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง

(2) นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนมาใส่ในขวดชมพูที่มี LB 200 มิลลิลิตรและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 3 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรมีค่าประมาณ 0.4-0.6

(3) แบ่งใส่หลอด 50 มิลลิลิตร และแช่ในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที

(4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที

(5) เทส่วนใส่ทิ้งและละลายตะกอนด้วย 0.1 โมลาร์  $\text{CaCl}_2$  10 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง 30 นาที และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 4,000 รอบต่อวินาทีนาน 30 นาที

(6) เทส่วนใส่ทิ้ง และละลายตะกอนด้วย 0.1 โมลาร์  $\text{CaCl}_2$  ที่มี 15% (v/v) กลีเซอรอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร

(7) แช่น้ำแข็ง 2-3 ชั่วโมง และแบ่งมาใช้ครั้งละ 100 ไมโครลิตร

(8) เก็บ *E. coli* ที่ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion)

#### 3.2.1 Reporter Vector

(1) เตรียมสารเคมีตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด Reporter Vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	14
pGL3MS2/Basic	10
10X Buffer Tango™	3
<i>Xho</i> I	2
<i>Nhe</i> I	1
ปริมาตรรวม	30

(2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

(3) หยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที

(4) หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% Low-Melting Temperature Agarose Gel และใช้ 1Kb DNA Ladder เป็น Marker เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย HiYield™ Gel Extraction

### 3.2.2 miRNA Expression Vector

(1) เตรียมสารเคมีตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด miRNA Expression Vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	14
pSilencer 3.0-H1	10
10X Buffer Tango™	3
<i>Bam</i> HI	1
<i>Hind</i> III	2
ปริมาตรรวม	30

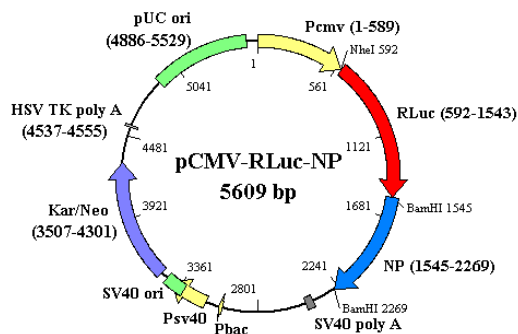
(2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

(3) หยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที

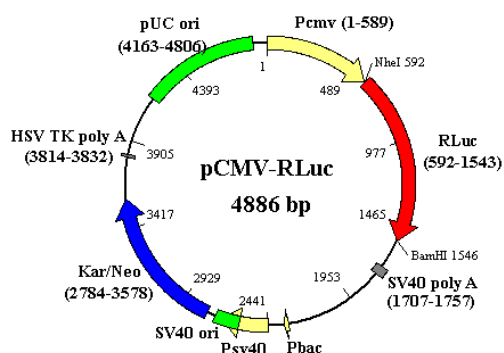
(4) หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1Kb DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย HiYield™ Gel Extraction

### 3.2.3 Internal Control Vector

Internal Control Vector ที่ใช้คือ pCMVRLuc ดังรูป 10 โดยจะต้องนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเอาส่วนของยีน NP ออกก่อน



รูปที่ 10 โครงสร้างของ pCMVRLuc NP



รูปที่ 11 โครงสร้าง pCMVRLuc ที่นำ NP ออกแล้ว

(1) เตรียมสารเคมีตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด Internal Control Vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	17
pCMVRLuc NP	10
10X Buffer BamHI	3
BamHI	1
ปริมาตรรวม	30

(2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

(3) หยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที

(4) หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1Kb DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย HiYield™ Gel Extraction

### 3.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดย Agarose gel electrophoresis

(1) เตรียม 1% low-melting temperature agarose gel โดยชั่ง 1 กรัมของ low-melting temperature agarose gel ผสมกับ 1xTBE (50xTBE buffer : 54 กรัม Tris base, 27.5 กรัม Boric Acid, 4.16 กรัม EDTA) เช่นเดียวกับ 2% low-melting temperature agarose gel

(2) นำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสเจลละลาย และรอให้อุ่นหมุ่มีต่ำลงเล็กน้อย

(3) เทอะกาโรสเจลลงบนถาด ใส่หัว และตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแข็งตัว

(4) นำเอาเจลที่มีอะกาโรสเจลใส่ลงใน chamber และใส่ 1xTBE บัฟเฟอร์ลงไปจนท่วม

(5) หยอดดีเอ็นเอที่ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (6x DNA Loading Dye) ลงไปโดยใช้เวลาประมาณ 50-60 นาที ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

- นำอะกาโรสเจลออกมาบ่มด้วย Ethidium Bromide และส่องด้วยเครื่อง Gel Documentation

### 3.4 วิธีการทำเจลให้บริสุทธิ์ (Gel extraction) โดยอาศัยชุด HiYield™ Gel Extraction

(1) ตัดเจลที่มีขนาดที่ต้องการใส่ลงใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube

(2) เติม 500 ไมโครลิตรของ DF Buffer ลงใน microcentrifuge tube และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex

(3) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสประมาณ 15 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด โดยระหว่างบ่มนั้นควรกลับ microcentrifuge tube ทุกๆ 2-3 นาที

(4) นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน DF column ที่ใส่อยู่ใน collection tube

(5) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที

(6) ทิ้งของเหลวใน collection tube และใส่ DF column กลับไปใน collection tube

(7) เติม 600 ไมโครลิตรของ wash buffer ลงใน DF column

(8) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที

(9) ทิ้งของเหลวใน collection tube และใส่ DF column กลับไปใน collection tube

(10) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 2 นาที

(11) นำ DF column ใส่ลงใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube อันใหม่

(12) เติม elution buffer 20-50 ไมโครลิตรใน DF column

(13) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

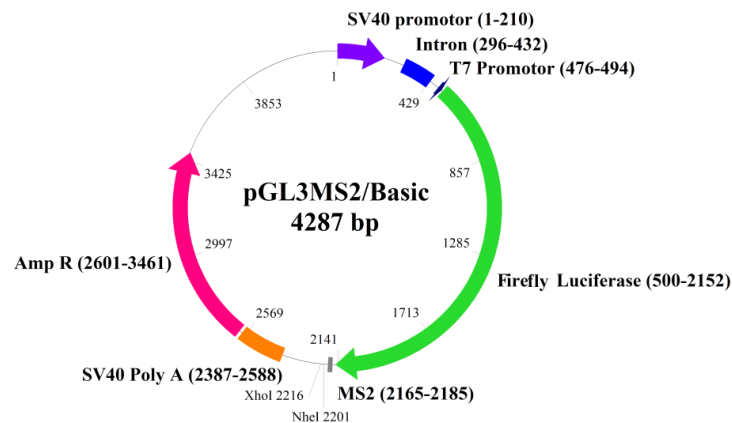
(14) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 2 นาที

(15) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

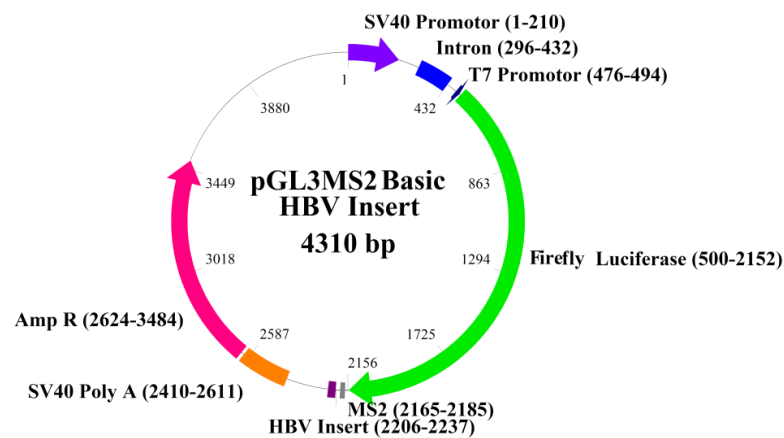
### 3.5 การเชื่อมพลาสมิดกับนิวคลีโอไทด์สายยาว (Ligation)

#### 3.5.1 Reporter Vector

Reporter vector ที่ใช้คือ pGL3MS2/Basic ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Brown Department of Biochemistry, University of Otago [42] โดย vector มีขนาดประมาณ 4287 คู่เบสซึ่งมียีน *Firefly Luciferase* เป็น reporter gene ดังรูปที่ 11



รูปที่ 12 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic [42]



รูปที่ 13 โครงสร้าง pGL3 Basic ที่มี target อยู่

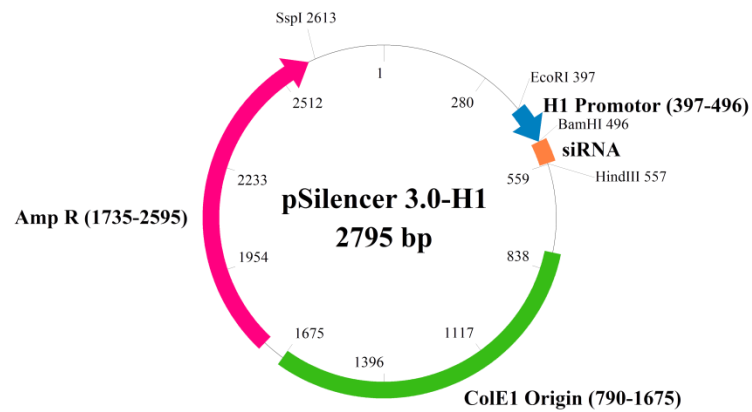
(1) เชื่อมส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจไปยังบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* (ตำแหน่งที่ 2201) และ *XhoI* (ตำแหน่งที่ 2216) ดังรูปที่ 12

(2) อาศัยสารเคมีที่แสดงดังตารางที่ 8

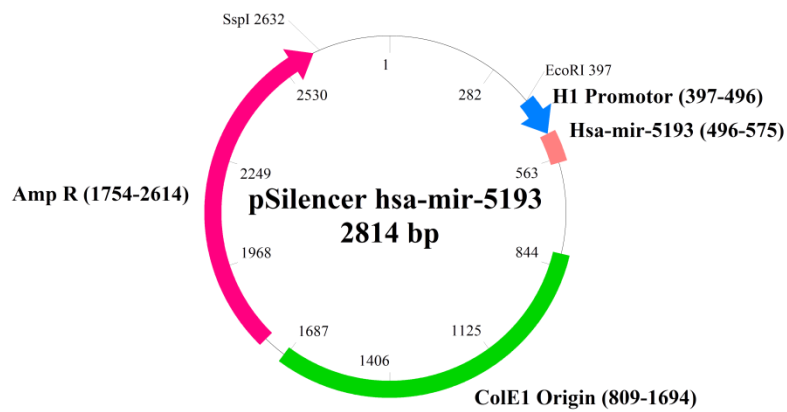
### 3.5.2 miRNA Expression Vector

miRNA expression vector ที่ใช้คือ pSilencer 3.0-H1 ขนาดประมาณ 2795 คู่เบส

ดังรูปที่ 13



รูปที่ 14 แสดงโครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1



รูปที่ 15 แสดงโครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 ที่มี miRNA หรือ FLuc อยู่

- (1) เชื่อมส่วนของ FLuc หรือ miRNA ที่สนใจระหว่างบริเวณที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ตำแหน่งที่ 496) และ *HindIII* (ตำแหน่งที่ 557) ดังรูปที่ 14
- (2) อาศัยสารเคมีที่แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ Reporter Vector (pGL3MS2/Basic),  
MiRNA Expression Vector (pSilencer 3.0-H1) และ Internal Control Vector (pCMVRLuc)

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	2
10X T4 DNA ligase Buffer	1
Fermentus™ T4 DNA ligase (5U ต่อไมโครลิตร)	1
Vector	1
นิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมกันแล้วสำหรับ Reporter Vector และ MiRNA Expression Vector	5
ปริมาตรรวม	10

(3) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

### 3.6 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. Coli* โดยใช้ความร้อน (Transformation by heat shock)

(1) นำ Competent Cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย ligation 2 ไมโครลิตรแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที

(2) บ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาทีแล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที 1-2 นาที

(3) เติม SOC Media (2% (w/v) Peptone, 0.55% (w/v) Yeast Extract, 10 มิลลิโมลาร์ NaCl, 2.5 มิลลิโมลาร์ KCl, 10 มิลลิโมลาร์ MgCl<sub>2</sub>, 10 มิลลิโมลาร์ MgSO<sub>4</sub>, 20 มิลลิโมลาร์ Glucose) ปริมาตร 950 ไมโครลิตรและบ่มพร้อมกับเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 90 นาที

(4) ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาทีและเทส่วนใส่ออกเหลือประมาณ 50 ไมโครลิตร

(5) กระจายตะกอนด้วยสารละลายที่เหลืออยู่และนำมาเลี้ยงบน LB Agar ที่ผสม Ampicillin สำหรับ Reporter vector และ miRNA expression vector และ kamamycin สำหรับ Internal control vector

(6) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

### 3.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี HiYield™ Plasmid Mini Kit

(1) นำโคลนินที่ได้จากการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E. Coli* มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มี LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่ผสม Ampicillin หรือ Kanamycin และบ่มพร้อมเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง



- (2) นำ LB ที่บ่มไว้ 16-18 ชั่วโมงถ่ายลงใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube
- (3) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
- (4) เติม PD1 buffer 200 ไมโครลิตรและนำไป vortex
- (5) เติม PD2 buffer 200 ไมโครลิตรกลับ microcentrifuge tube ไปมาและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- (6) เติม PD3 buffer 300 ไมโครลิตร และกลับไปมา
- (7) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 2 นาที
- (8) เตรียม PD column ลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube หลังจากนั้นให้ถ่ายส่วนใสที่อยู่ใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube ลงใน PD column
- (9) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที
- (10) ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (11) เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที
- (12) ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (13) เติม wash buffer 600 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 30 วินาที
- (14) ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (15) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 3 นาที
- (16) นำ PD column ใส่ใน 1.5 มิลลิลิตร microcentrifuge tube หลอดใหม่
- (17) เติม elution buffer 30 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- (18) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 2 นาที
- (19) เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.8 การตรวจสอบพลาสמידที่ได้ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรส

- (1) เตรียมสารเคมีใน 0.2 มิลลิลิตร microcentrifuge tube ดังตารางที่ 9 โดยอาศัยไพรเมอร์ดังตารางที่ 10 และสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ (PCR condition) ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 9 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6	
2.5X Master Mix (5 PRIME)	5	1X Final conc
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์อย่างละ	0.5	400 นาโนโมลาร์
200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พลาสมิด	0.5	8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	12.5	

ตารางที่ 10 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด

พลาสมิด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
pGL3MS2/Basic	Luc+3F	CGTGGATTACGTCGCCAGTC	400
	SV40+R	TCTAGAGTTAACTTGTTTATTGCA	
pSilencer 3.0-H1	M13_F	GTTTTCCCAGTCACGAC	350
	pSilencer-H1_R	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	

ตารางที่ 11 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ (PCR condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-Denaturation	94	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 35 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final-Extension	72	7 นาที	

(2) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

#### 4. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

##### 4.1 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง (Cell Recovery)

(1) นำเซลล์ที่ละลายอยู่ใน Freezing media ใส่ในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร

- (2) เติม DMEM ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- (3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที 5 นาที
- (4) ทิ้งส่วนใส เติม DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS และ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) Antimicrotic Antibiotic ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเพื่อละลายตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นดูดใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- (5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

#### 4.2 การเลี้ยงเซลล์

- (1) เมื่อปริมาณเซลล์มีจำนวนเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ จะเริ่มจากการเท DMEM ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์
- (2) ใส่ PBS (Phosphate Buffered Saline) พอดีขวดและเอียงขวดไปมา
- (3) ใส่ Trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร หรือ 3 มิลลิลิตรลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- (4) บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 นาที
- (5) ดูดเซลล์ลงในหลอด 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที
- (6) ทิ้งส่วนใส และเติม DMEM ประมาณ 1 มิลลิลิตรเพื่อละลายตะกอนเซลล์
- (7) ปิเปตต์ใส่ลงในขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเติม DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS และ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) antimicrotic antibiotic ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

#### 4.3 การเก็บรักษาเซลล์ (Freezing Cells)

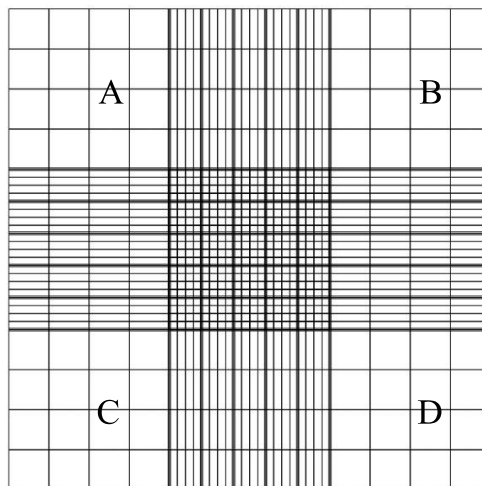
หลังจากที่มีการ Passage Cells แล้วให้ละลายเซลล์ด้วย Freezing Media 1 มิลลิลิตรแล้วดูดใส่หลอด Cryotube เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปยัง -80 องศาเซลเซียส

#### 4.4 การนับปริมาณเซลล์ (Counting Cells)

- (1) หลังจากที่มีการ Passage Cells ปิเปตต์สารละลายเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Bromphenol Blue 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

(2) นำเซลล์ที่ผสมไว้มา 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน Hemocytometer จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับเซลล์ที่อยู่ในบริเวณทั้ง 4 ช่อง ดังรูปที่ 15 และนำมาคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์} = \frac{A + B + C + D}{4} \times 2 \times 10^4 \quad \text{เซลล์ต่อมิลลิลิตร}$$



รูปที่ 16 แสดงตารางใน Hemacytometer

#### 4.5 การเพาะเซลล์ (Seeding Cells)

เซลล์หลังจากที่นับจำนวนเซลล์แล้วมาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน  $8 \times 10^3$  เซลล์ แล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate เติม DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS ให้ได้ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร บ่มลงในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 5. Transfection

(1) ผสม Lipofectamine®2000 Reagent ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตรลงใน Opti-MEM®I Reduced Serum Medium ใน 1.5 มิลลิลิตร Centrifuge Tube

(2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(3) เจือจางดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมของ pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HBV Insert, 10 นาโนกรัม pCMVRLuc และ 50 นาโนกรัมของ pSilencer 3.0 H1 หรือ pSilencerFLuc หรือ pSilencer hsa-mir-5193 ลงใน Opti-MEM®I Reduced Serum Medium และผสมลงไปในส่วนผสมของ Lipofectamine®2000 Reagent

(4) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-45 นาที

(5) หยอดลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มี DMEM กับ 10 เปอร์เซ็นต์ FBS

## 6. การสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA Extraction)

- (1) ทำการ Trypsinize เซลล์ และเก็บเซลล์ใน 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge tube
- (2)ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (3) เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลล์ ด้วย 100 ไมโครลิตรของ RBC Lysis Buffer
- (4) ใส่ 400 ไมโครลิตรของ RB Buffer ที่มี Beta-Mercaptoethanol 1% v/v แล้วนำไป Vortex จนเป็นเนื้อเดียวกัน
- (5) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- (6) นำสารละลายข้างต้นปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ลงไปใน Filter Column และปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- (7) ทิ้ง Filter Column และนำส่วนของสารละลายใสที่ได้ใส่ลงใน 1.5 มิลลิลิตร Centrifuge Tube อันใหม่
- (8) ใส่ 400 ไมโครลิตรของ 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol
- (9) ใส่ 500 ไมโครลิตรของข้อ (8) ลงใน RB Column
- (10) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- (11) ใส่ 400 ไมโครลิตรของ R-W1 Buffer
- (12) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (13) ใส่ 600 ไมโครลิตร R-Wash Buffer
- (14) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (15) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- (16) ย้ายลงใน 1.5 มิลลิลิตร Microcentrifuge Tube หลอดใหม่
- (17) ใส่ 30 ไมโครลิตร RNase Free Water และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที
- (18) ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

## 7. การทดสอบ Luciferase assay

- (1) เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์และล้างเซลล์ด้วย PBS
- (2) หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง
- (3) เติม 1x PLB 20 ไมโครลิตร
- (4) เขย่า Plate เบาๆ เป็นเวลา 15-30 นาที
- (5) เติม LARII 100 ไมโครลิตรลงใน 96-Well Plate White Opaque

- (6) ตั้งค่าเครื่อง Microplate Reader เพื่อวัด Luminescence
- (7) เติม PLB lysate 20 ไมโครลิตรและผสมให้เข้ากัน
- (8) วัด Firefly Luciferase Activity ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- (9) เติม Stop & Glow® ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- (10) วัด Renilla Luciferase Activity ที่ความยาวคลื่น 482 นาโนเมตร
- (11) หาค่า Relative Luciferase Activity โดยคำนวณจาก

$$\text{Relative Luciferase Activity} = \frac{\text{FLuc expression}}{\text{RLuc expression}}$$

## 8. การย่อยดีเอ็นเอ (DNase Treatment)

- (1) เตรียมสารเคมี ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอที่สกัดได้	30
RNase-free DNase 10X Buffer	3.5
RNase-free DNase	1.5
ปริมาตรรวม	35

- (2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- (3) ใส่ DNase Stop Solution 10 ไมโครลิตร
- (4) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

## 9. Polyuridylation

- (1) เป็นการเติม UTP ที่บริเวณปลาย 3' ของอาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ Poly (U) Polymerase โดยเตรียมสารดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อาร์เอ็นเอ	2.5
10X NE Buffer 2	1.25
50 มิลลิโมลาร์ UTP	0.15
RNase Inhibitor	0.5
Poly (U) Polymerase	0.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	8.1
ปริมาตรรวม	12.5

(2) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

#### 10. Reverse Transcription

(1) เตรียมสารเคมี ดังตารางที่ 14, 15

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription สำหรับ mRNA

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อาร์เอ็นเอ	10
Random Hexamer	1
10 มิลลิโมลาร์ dNTP	1
ปริมาตรรวม	12

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription สำหรับ miRNA

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อาร์เอ็นเอ	10
SL Poly A*	1
10 มิลลิโมลาร์ dNTP	1
ปริมาตรรวม	12

\*GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAA  
AAAAAVN

(2) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

- (3) บ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 นาที
- (4) ใส่สารเคมี ดังตารางที่ 16

**ตารางที่ 16 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription**

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
5X RT Buffer	4
0.1 โมลาร์ DTT	1
RNase Inhibitor	0.5
Reverse Transcriptase	1

- (5) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- (6) บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- (7) บ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน
- (8) หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 11. การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย Real-time PCR

(1) ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Firefly Luciferase, GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) MicroRNA และ siRNA-FLuc เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออก

- (2) หาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละยีนในการทำ Real-Time PCR
- (3) เตรียมสารเคมี ดังตารางที่ 15 โดยอาศัยสภาวะของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 17

**ตารางที่ 17 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ Real-Time PCR**

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3.4	
SYBR® GreenERTM qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)	5	1X Final conc
10 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ ชนิดละ	0.2	200 นาโนโมลาร์
ROX Reference Dye	0.2	
cDNA	1	
ปริมาตรรวม	10	



ตารางที่ 18 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ใน Real-time PCR

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
FLuc	FLuc_F633	TCATAGAACTGCCTGCGTGAG
	FLuc_R774	ACATATCAAATATCCGAGTGTAGT
hsa-mir-5193	miR5193_F	GCAGGGTCCGAGGTATTC
	miRNA_R	TCCTCTACCTCATCCCAGT
siRNA-FLuc	siRNA_FLuc_F	GCGCTGCTGGTGCCAACC
	miRNA_R	TCCTCTACCTCATCCCAGT
GAPDH	GAPDH-F85	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG
	GAPDH-R191	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG

ตารางที่ 19 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ mRNA (Real-Time PCR Condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-Denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final-Extension	74	30 วินาที	

ตารางที่ 20 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ miRNA (Real-Time PCR Condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-Denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	

(3) บันทึกค่า Threshold Cycle (Ct) แล้วคำนวณหา Relative Quantitation ดังนี้

สมการ

$$\text{ปริมาณเชิงเปรียบเทียบ} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{ตัวอย่าง}) - \Delta Ct (\text{Calibrator})$$

$$\Delta Ct (\text{ตัวอย่าง}) = Ct (\text{Target Gene ของตัวอย่าง}) - Ct (\text{GAPDH})$$

$$\Delta Ct (\text{Calibrator}) = Ct (\text{Target Gene ของcalibrator}) - Ct (\text{GAPDH})$$

## 12. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ค่า Student's *t*-test ซึ่งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกรณีกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มเป็นอิสระจากกัน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้คือ IBM SPSS Statistics Version 19 และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้

#### 1. ผลการคัดเลือก miRNAs ของมนุษย์จากฐานข้อมูล miRBase และโปรแกรม RNAHybrid

เมื่อวิเคราะห์หา miRNAs ของมนุษย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 50 คู่เบสของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J ในฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Mature miRNAs ที่ได้จากฐานข้อมูล miRBase มาวิเคราะห์การเข้าคู่ระหว่าง miRNAs กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจาก RNAHybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html>) แล้วพบว่า มี miRNAs ทั้งหมด 41 miRNA ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ โดยแบ่งเป็น

จีโนไทป์ A มีทั้งหมด 6 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-671-3p, hsa-mir-615, hsa-mir-1273d, hsa-mir-186, hsa-mir-195 และ hsa-mir-5193

จีโนไทป์ B มีทั้งหมด 4 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-4756, hsa-mir-3910-1, hsa-mir-3142 และ hsa-mir-5193

จีโนไทป์ C มีทั้งหมด 8 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-142-5p, hsa-mir-3915, hsa-mir-4731-5p, hsa-mir-5702, hsa-mir-3922-5p, hsa-mir-5193, hsa-mir-4999-5p และ hsa-mir-4439

จีโนไทป์ D มีทั้งหมด 8 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-142-5p, hsa-mir-384, hsa-mir-4297, hsa-mir-544b, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-4731-5p, hsa-mir-509-1 และ hsa-mir-4760

จีโนไทป์ E มีทั้งหมด 9 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-384, hsa-mir-671-3p, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-1914, hsa-mir-4747, hsa-mir-4731-5p, hsa-mir-1273d, hsa-mir-5193 และ hsa-mir-500b

จีโนไทป์ F มีทั้งหมด 7 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-384, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-4463, hsa-mir-4640-5p, hsa-mir-4493, hsa-mir-3193 และ hsa-mir-5193

จีโนไทป์ G มีทั้งหมด 9 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-3677, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-4699, hsa-mir-4640, hsa-mir-1914, hsa-mir-4731-5p, hsa-mir-509-1, hsa-mir-221 และ hsa-mir-500b

จีโนไทป์ H มีทั้งหมด 7 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-384, hsa-mir-520a, hsa-mir-5007, hsa-mir-127, hsa-mir-450b, hsa-mir-5193 และ hsa-mir-4638

จีโนไทป์ I มีทั้งหมด 8 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-142-5p, hsa-mir-3664-3p, hsa-mir-4640-5p, hsa-mir-5702, hsa-mir-195, hsa-mir-5193, hsa-mir-4999-5p และ hsa-mir-500b

จีโนไทป์ J มีทั้งหมด 7 miRNAs ได้แก่ hsa-mir-671-3p, hsa-mir-4731-5p, hsa-mir-5706, hsa-mir-3122, hsa-mir-5193, hsa-mir-4999-5p และ hsa-mir-500b ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดง miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไฟป์ A-J

Genotype	Human miRNA	Hybridization of miRNA-target mRNA	Position genome	MFE (kcal/mol)	Pattern
A	hsa-mir-615	target 5' G G G 3' CGAG ACUGGGGACCCU GCUC UGGCCCCUGGG miRNA 3' CUAG G G 5'	129-145 Surface/polymerase	-39.4	5' canonical
	hsa-mir-1273d	target 5' A G UUAUUC A A 3' UG GG CCU AACUUCAGGGUU AC UC GGA UUGGAGUACCCAA miRNA 3' UG G G G 5'	856-883 Polymerase	-29.9	5' canonical
	hsa-mir-186-5p	target 5' G GGGGU U 3' UCAAGAAAU CUUUUGGGC GGUUUUUAAA GGAACCCG miRNA 3' G GU 5'	990-1014 Polymerase	-25.5	5' canonical
	hsa-mir-195	target 5' G UUU GG U C 3' GUC UG CU UGCUCU CGG AU GA ACGACGA miRNA 3' UU AAA C U 5'	1004-1023 Polymerase	-18.9	5' canonical
	hsa-mir-5193	target 5' G G C 3' ACUGGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'	1729-1750 X	-38.3	5' canonical
	hsa-mir-671-3p	target 5' G C C A C 3' GGUUGAGCCCU AGG UC GGG CCACCUCGGGA UCU GG CCU miRNA 3' C U 5'	3080-3100 Surface/polymerase	-33.1	3' compensatory
B	hsa-miR-3910-1	target 5' G UAUCCUC A G 3' UGGU UUUU UGCCUU ACCA AAU ACGGAA miRNA 3' ACAGA 5'	1008-1031 Polymerase	-17.7	5' canonical
	hsa-mir-3142	target 5' U CCGCAACUUU U 3' UCU AAGGCCUU AGA UUCCGGAA miRNA 3' CUUCCAAGUCU 5'	1067-1088 Polymerase	-16.8	5' canonical
	hsa-mir-5193	target 5' G G U G 3' UGGGA GAG UGGGGAGGA ACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' UG A C 5'	1701-1720 X	-35.4	5' canonical
	hsa-miR-4756-3p	target 5' G UACUCCCU C 3' GUAGGAAGGCAGC GUCUC UADCCUCCUUGG UAGAG miRNA 3' ACC 5'	3118-3145 Surface/polymase	-33.6	3' compensatory

C	hsa-miR-4731-5p	target 5' C UG U 3' CAC UU UGGCUUUCAGU GUG AG ACCGGGGGUCC miRNA 3' UG UAC U 5'	718-735 Surface/polymerase	-26.6	5' canonical
	hsa-miR-5702	target 5' U AA A 3' CAUGGGUAUUGU UUGG GUACCCUAUACA GACU miRNA 3' AC GAGU 5'	876-893 Polymerase	-24.6	3'compensatory
	hsa-miR-3922-5p	target 5' A U G C 3' UUGUGGG CUUCU GGCUUUG GACACCC GGAGA CCGGAAC miRNA 3' AC U U 5'	998-1018 Polymerase	-33.1	5' canonical
	hsa-miR-5193	target 5' G G U 3' ACUGGGA GAG UGGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C U 5'	1729-1750 X	-38.3	5' canonical
	hsa-miR-4999-5p	target 5' A C C C C 3' UUGCU ACCU AC AUACAGCA AGUGA UGGA UG UAUGUCGU miRNA 3' C U 5'	2041-2062 Core	-25.2	5' canonical
	hsa-miR-4439	target 5' A A A U 3' GC UCCAGGG AUCAGUCG CG AGGUUCC UAGUCAGU miRNA 3' UA G A G 5'	2138-2156 Core	-31.4	5' canonical
	hsa-miR-142-5p	target 5' A GAAA A GG U 3' GGUGG CUUU CU GCUUUU UCAUC GAAA GA UGAAAUA miRNA 3' AC C 5'	2471-2495 Polymerase	-17.2	5' canonical
	hsa-miR-3915	target 5' C C C 3' CC UCUUUUCUCA GG AGAAAAGGAGU miRNA 3' UUAUUCU U U 5'	2535-2548 Polymerase	-23.3	5' canonical
D	hsa-mir-214-3p	target 5' G AUUUC G 3' GCCUGU CCUGCUG CGGACA GGACGAC miRNA 3' UGA GACAC A 5'	47-64 Surface/polymerase	-29.6	5' canonical
	hsa-mir-4731-5p	target 5' C UG U 3' CAC UU UGGCUUUCAGU GUG AG ACCGGGGGUCC miRNA 3' UG UAC U 5'	720-737 Surface/polymerase	-26.6	5' canonical
	hsa-mir-509-1	target 5' A U GUUA C G 3' CU CCU ACAGGC UAUUGAUU GA GGG UGUCUG AUUGGUAG miRNA 3' U C U 5'	957-981 Polymerase	-20.1	5' canonical

	hsa-mir-4760-3p	target 5' G AU C 3' CADGU UCAAUCUAAA GUACA AGUUAGAUUU mirRNA 3' GAUUGAA 5'	1069-1085 Polymerase	-20.6	5' canonical
	hsa-mir-142-5p	target 5' A GAAA A GGG U 3' GGUGG CUUU C GCUUUUU UCAUC GAAA G UGAAAUA mirRNA 3' AC A C 5'	2473-2497 Polymerase	-17.1	5' canonical
	hsa-mir-384	target 5' A G C 3' UGUGAACAAUUU UAGG AUACUUGUUAAA AUCC mirRNA 3' G UUA 5'	2582-2598 Polymerase	-23.8	3' compensatory
	hsa-mir-4297	target 5' G U G 3' ACAG CAGGAAGGCA UGUC GUCCUUCCGU mirRNA 3' G U 5'	3112-3127 Surface/polymerase	-30.3	5' canonical
	hsa-mir-544b	target 5' G A U U C 3' AGAAAU C CA CCUCAGG UCUUUA G GU GGAGUCC mirRNA 3' AA C U U A 5'	3153-3171 Surface/polymerase	-24.2	5' canonical
E	hsa-mir-214-3p	target 5' G AUUUU G 3' GCCUGU CCUCGUG CCGACA GAGCAGC mirRNA 3' UGA GACAC A 5'	45-62 Surface/polymerase	-29.6	5' canonical
	hsa-mir-1914	target 5' C UCAUCA ACCA A 3' CAGGA CC GUACGGG GUCUU GG CGUGUCC mirRNA 3' CACCC CC C 5'	486-510 Surface/polymerase	-17.9	5' canonical
	hsa-mir-4747-3p	target 5' A U UUC C 3' G GG G CCGGGCUUU C CC C GCGCCGGAA mirRNA 3' GACC U UUU G 5'	697-713 Surface/polymerase	-22.7	5' canonical
	hsa-mir-4731-5p	target 5' C UG U 3' CAC UC UGGCUUUCAGU GUG AG ACCGGGGGUCG mirRNA 3' UG UAC U 5'	718-735 Surface/polymerase	-27.7	5' canonical
	hsa-mir-1273d	target 5' A G AUUUU A A 3' UG GG CCU AACUUCAGGGUU AC UC GSA UUGGAGUACCAA mirRNA 3' UG G G 5'	856-883 Polymerase	-29.9	5' canonical
	hsa-mir-5193	target 5' G G U 3' ACUGGGG GAG UGGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCCUCCUU mirRNA 3' A C 5'	1729-1750 X	-38.3	5' canonical
	hsa-mir-500b	target 5' U GU U 3' ACCUGGGUGG G UGGGUCCAUC U mirRNA 3' GU CCUAA 5'	2108-2120 Core	-21.0	3' compensatory

	hsa-mir-384	target 5' A G C 3' UGUGAACAAUUU UAGG AUACUUGUUAAA AUCC mirRNA 3' G UUA 5'	2580-2596 Polymerase	-23.8	3' compensatory
	hsa-mir-671-3p	target 5' G C C A 3' GGGGAGCCCU AGG UC CCACCUCCGGG UCU GG mirRNA 3' C U CCU 5'	3071-3088 Surface/polymerase	-31.2	3' compensatory
	hsa-mir-4640-5p	target 5' G CC UC G 3' CC UCAGC GUU UCCUGGCUA GG GGUCG CGA GGGACCGGU mirRNA 3' G U A 5'	651-674 Surface/polymerase	-33.0	5' canonical
	hsa-mir-4493	target 5' C C 3' AAGGCCUUU UUCGGGAG mirRNA 3' UGUCUCUACCU A 5'	1110-1120 Polymerase	-18.1	5' seed
	hsa-mir-3193	target 5' U G AAC C 3' GCU CC UGGAUCCUACGGGGG UGA GG GUCUAGGAUGCGUCU mirRNA 3' A A 5'	1390-1414 X	-35.8	5' canonical
F	hsa-mir-5193	target 5' G G C 3' ACUGGGA GAG UGGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU mirRNA 3' A C 5'	1729-1750 X	-38.3	5' canonical
	hsa-mir-384	target 5' A G C 3' UGUGAACAAUUU UAGG AUACUUGUUAAA AUCC mirRNA 3' G UUA 5'	2580-2596 Polymerase	-23.8	3' compensatory
	hsa-mir-142-5p	target 5' U A G 3' UGC UACUUUAUG ACG AUGAAAUAC mirRNA 3' UCAUC AAAG 5'	2749-2761 Polymerase	-17.1	5' canonical
	hsa-mir-4463	target 5' A GGGAGAAAACCA U 3' GGUCC ACCCCAGUCUC CCGGG UGGGUACAGAG mirRNA 3' G 5'	3146-3173 Surface/polymerase	-32.0	5' canonical
G	hsa-mir-214-3p	target 5' G AUUUU G 3' GCCUGU CCUGCUG CGGACA GGAAGAC mirRNA 3' UGA GACAC A 5'	45-62 Surface/polymerase	-29.6	5' canonical
	hsa-mir-4699-3p	target 5' U C A C U C 3' CU AC UCU G CAAUCUUCU GA UG AGA C GUUAGAAGA mirRNA 3' CCUU A 5'	108-128 Surface/polymerase	-18.1	5' canonical
	hsa-mir-4640-5p	target 5' U C G A 3' GCC G UGU UCCUGGCCUA UGG C ACC GGGACCGGGU mirRNA 3' GGG U G A 5'	289-307 Surface/polymerase	-30.4	5' canonical



	hsa-mir-1914-5p	target 5' C UCCUC A ACCA A 3' CAGGA G CC GUACGGG GUCUU C GG CGUGUCC mirRNA 3' CACC CC C 5'	486-510 Surface/polymerase	-18.1	5' canonical
	hsa-mir-4731-5p	target 5' C UG U 3' CAC UC UGGCUUUCAG GUG AG ACCGGGGGUCG mirRNA 3' UG UAC U 5'	718-735 Surface/polymerase	-29.5	5' canonical
	hsa-mir-509-1	target 5' A UGUUA G 3' CU CCC ACAG GCCAAUU GA GGG UGUC UGGUUAG mirRNA 3' U UGCA U 5'	955-975 Polymerase	-18.7	5' canonical
	hsa-mir-221	target 5' A GUCAACGAAUA UG C U 3' AAGUCU AC GU UGUUGGU UUUAGA UG CA ACCGUCCA mirRNA 3' UAA U 5'	983-1014 Polymerase	-17.6	5' canonical
	hsa-mir-500b	target 5' U GU AUAUUU A 3' ACCUGGGUGG A GGA UGGGUCCAUC U CCU mirRNA 3' GU AA 5'	2144-2166 Core	-22.5	3' compensatory
	hsa-mir-3677-3p	target 5' U AGA AACAGGUAAGGU A 3' GGCC GGCC GGACCUUUG CCGG CCGG UCUUGGUGCU mirRNA 3' CA C 5'	3035-3076 Surface/polymerase	-34.2	5' canonical
H	hsa-mir-127-3p	target 5' A A U UU G 3' CCAAGC C G GGAUCCGA GGUUCG G C CCUAGGCCU mirRNA 3' UC A U UG 5'	19-38 Surface/polymerase	-30.9	5' canonical
	hsa-mir-450b	target 5' C UG A 3' UCAGGAACAUAU UGCAAAA AGUCCUUGUAUA ACGUUUU mirRNA 3' AUA 5'	915-935 Polymerase	-30.2	5' canonical
	hsa-mir-5193	target 5' G G UC G 3' ACUGGA GAG GGGGAGGA UGACCCU CUC UCUCCUCCU mirRNA 3' A CA 5'	1732-1753 X	-37.2	5' canonical
	hsa-mir-4638-3p	target 5' U A 3' CCG C UGUCCGG GGC G ACAGGUCC mirRNA 3' GCC C ACUCGCC 5'	1976-1988 Core	-18.9	5' canonical
	hsa-mir-384	target 5' A G C 3' UGUGAACAAUUU UAGG AUACUUGUUAAA AUCC mirRNA 3' G UUA 5'	2583-2599 Polymerase	-23.8	3' compensatory
	hsa-mir-520a	target 5' A U 3' UACUCCCCUUUGA AUGAAGGGAGACCU mirRNA 3' UCUUUC C 5'	2673-2686 Polymerase	-28.8	5' seed

	hsa-mir-5007-5p	target 5' U U G 3' AAACCAUUAUUA CCAGA UUUGGUUAUAGU GGUCU miRNA 3' C GAGAU 5'	2697-2713 Polymerase	-25.2	3' compensatory
I	hsa-mir-4640-5p	target 5' G CC UC G 3' CC UCAGC GUU UCCUGGCCUA GG GGUCG CGA GGGACCCGGU miRNA 3' G U A 5'	651-674 Surface/polymerase	-33.0	5' canonical
	hsa-mir-5702	target 5' AAUUGGAA G 3' CAUGGGAAUAGU GUUGG GUACCCUAUACA CGACU miRNA 3' A GAGU 5'	876-900 Polymerase	-24.6	3' compensatory
	hsa-mir-195	target 5' U AGA A GACUCUGGGCU C 3' GUCAA AUUC G UGCUCU CGGU UAAAG C ACGACGA miRNA 3' A A U 5'	989-1023 Polymerase	-18.5	5' canonical
	hsa-mir-5193	target 5' G G U G 3' ACUGGGA GAG UGGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'	1729-1750 X	-39.1	5' canonical
	hsa-mir-4999-5p	target 5' A GUUC C C C 3' CAUU ACCU AC AUACAGCA GUGA UGGA UG UAUGUCGU miRNA 3' A C U 5'	2039-2062 Core	-23.9	5' canonical
	hsa-mir-500b	target 5' U G U 3' ACCUGGGUGG AAG UGGGUCCAUC UUC miRNA 3' G CUAA 5'	2108-2121 Core	-23.1	3' compensatory
	hsa-mir-142-5p	target 5' A GAAA ACCGG U 3' GGUGG CUUU GCUUUAU UCAUC GAAA UGAAAUA miRNA 3' AC GA C 5'	2471-2495 Polymerase	-17.0	5' canonical
	hsa-mir-3664-3p	target 5' U A U 3' AC CUGUCUUUA UCCUGAG UG GACAGAAAU AGGACUC miRNA 3' U A G U 5'	2507-2525 Polymerase	-29.4	5' canonical
J	hsa-mir-4731-5p	target 5' C UG U 3' CAC UU UGGCUUUCAGU GUG AG ACCGGGGGUCG miRNA 3' UG UAC U 5'	718-735 Surface/polymerase	-26.6	5' canonical
	hsa-mir-5706	target 5' U CA GAC A A 3' GC CAG CAU UUAUCCAGAA CG GUC GUA AAUAGGUUUU miRNA 3' U AA C 5'	909-932 Polymerase	-23.2	5' canonical
	hsa-mir-3122	target 5' U CUCCGUCUGCC C 3' ACCGUCCUCU GUUCGCAC UGGCAGGAGAA CAGGGUUG miRNA 3' UUC 5'	1484-1513 X	-32.6	5' canonical

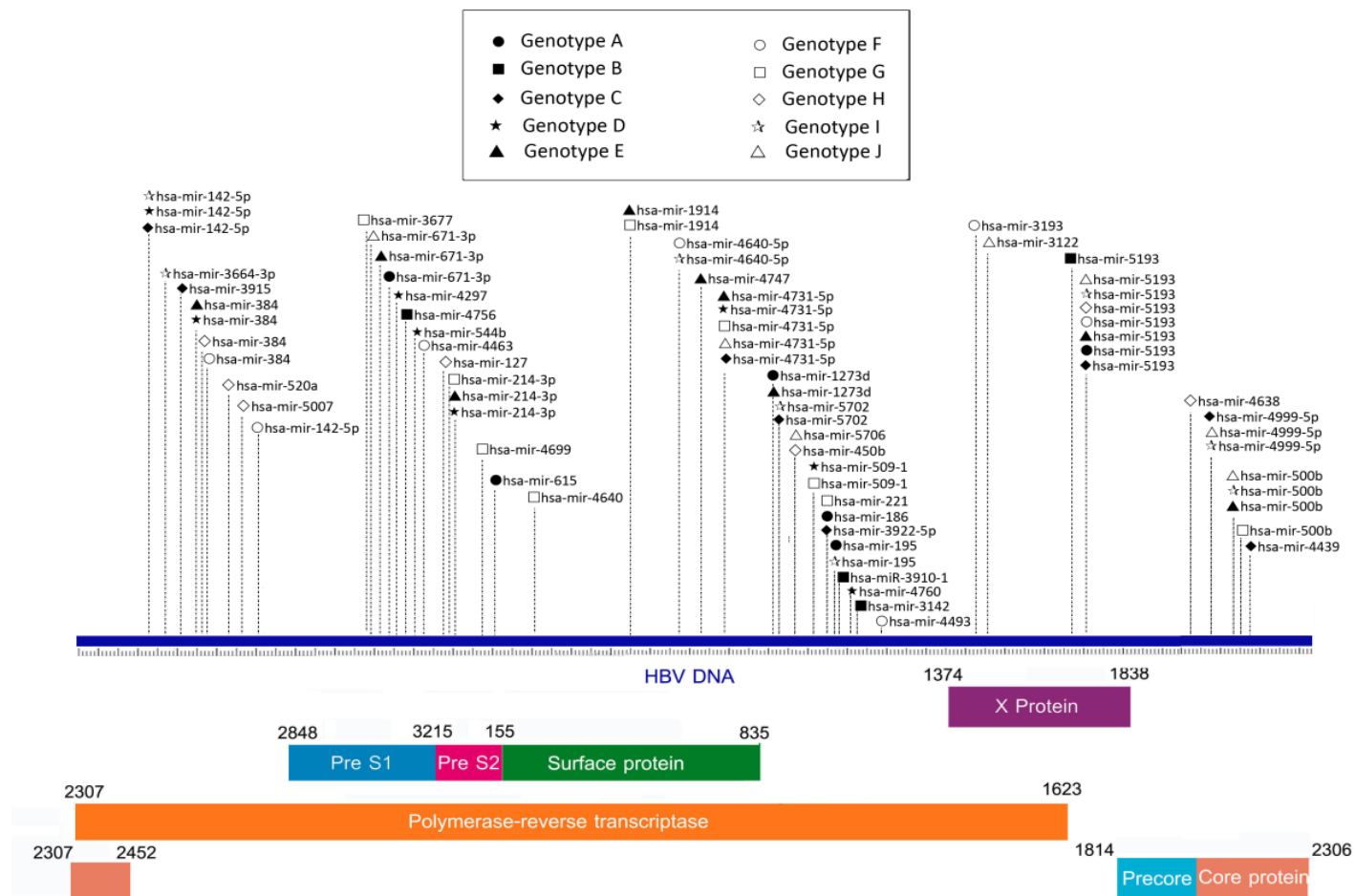
hsa-mir-5193	target 5' G G UC 3' ACUGGA GAG AGGGGAGGA UGACCCU CUC UCUCUCCU miRNA 3' A CA 5'	1729-1750 X	-36.4	5' canonical
hsa-mir-4999-5p	target 5' A C C C C 3' UUGCU ACCU AC AUACAGCA AGUGA UGGA UG UAUGUCGU miRNA 3' C U 5'	2041-2062 Core	-25.2	5' canonical
hsa-mir-500b	target 5' U G U 3' ACCUGGUGG AAG UGGGUCCAUC UUC miRNA 3' G CUA 5'	2108-2121 Core	-23.1	3' compensatory
hsa-mir-671-3p	target 5' G C C A A 3' GGUGGAGCCU AGG UC GGG CCACCUCGGGA UCU GG CCU miRNA 3' C U 5'	3041-3062 Surface/polymerase	-33.4	3' compensatory

เมื่อพิจารณา miRNAs ของแต่ละจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี พบว่ามีหลาย miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์ ได้แก่ hsa-mir-195, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-509-1, hsa-mir-671-3p, hsa-mir-1273d, hsa-mir-1914, hsa-mir-4640-5p, hsa-mir-4999-5p, hsa-mir-5702, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-384, hsa-mir-500b, hsa-mir-4731-5p และ hsa-mir-5193 ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดง miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์

miRNAs	Target HBV	HBV genotype									
	gene	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
hsa-mir-142-5p	P			●	●		●			●	
hsa-mir-195	P	●									●
hsa-mir-214-3p	S/P				●	●		●			
hsa-mir-384	P				●	●	●		●		
hsa-mir-500b	C					●		●		●	●
hsa-mir-509-1	P				●			●			
hsa-mir-671-3p	S/P	●				●					●
hsa-mir-1273d	P	●				●					
hsa-mir-1914	S/P					●		●			
hsa-mir-4640-5p	S/P						●	●		●	
hsa-mir-4731-5p	S/P			●	●	●		●			●
hsa-mir-4999-5p	C			●						●	●
hsa-mir-5193	X	●	●	●		●	●		●	●	●
hsa-mir-5702	P			●						●	

## 2. แผนภาพการจับกันระหว่าง miRNA กับยีนต่างๆของไวรัสตับอักเสบบี



## การออกแบบและเข้าสู่ไมโครไรโบไซม์สายยาว

### 1. ไมโครไรโบไซม์สายยาวของยีนที่สนใจ

#### ตารางที่ 23 แสดงไมโครไรโบไซม์สายยาวของยีนที่สนใจ

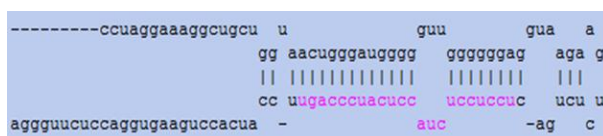
ตำแหน่ง	ไมโครไรโบไซม์สายยาว
1681-1702	TS CTAGCCTTCAAAGACTGTGTGTTTACTGAGTGGGAGGC BSGGAAGTTTCTGACACACAAATGACTCACCTCCGAGCT

(สีเทาเข้ม แสดง ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ, สีดำ แสดง ลำดับไมโครไรโบไซม์ที่เพิ่มจากส่วนที่ miRNA สามารถเข้าสู่ได้ และสีเทา แสดง ลำดับไมโครไรโบไซม์ที่ miRNA เข้าสู่ได้)

จากตารางที่ 23 ไมโครไรโบไซม์ที่สนใจนั้น อยู่ที่ตำแหน่งระหว่าง 1681 ถึง 1702 ซึ่งเป็นบริเวณของยีน X ของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ hsa-miR-5193 สามารถเข้าสู่ได้ โดยในการทำการทดลองนั้น ได้เลือกออกแบบเฉพาะไมโครไรโบไซม์สายยาวของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ B และกำหนดให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะเป็น *XhoI* และ *NheI*

### 2. ไมโครไรโบไซม์สายยาวที่ใช้เป็น miRNA template

miRNA ที่เลือกมานั้น คือ hsa-miR-5193 เนื่องจากเป็น miRNA ที่สามารถเข้าสู่กับลำดับไมโครไรโบไซม์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์ ได้แก่ จีโนไทป์ A, B, C, E, F, H, I และ J จากรูปที่ 17 hsa-miR-5193 นั้น มี mature miRNA เพียงสายเดียว คือสายด้านล่าง โดยอาศัยการออกแบบจาก Instruction Manual ของ pSilencer™ siRNA Expression Vectors (Ambion) เช่นเดียวกับการออกแบบ siRNA-FLuc ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลอง



รูปที่ 17 แสดง mature miRNA ของ hsa-miR-5193

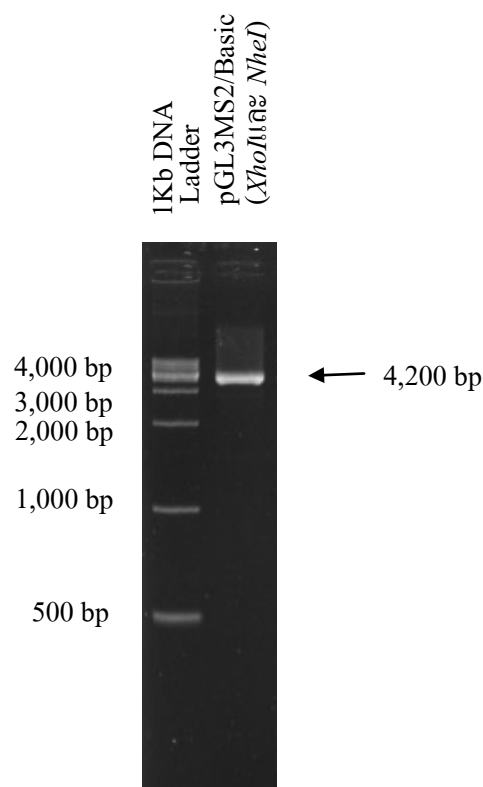
## การตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction)

### 1. การตัด pGL3MS2/Basic (Reporter vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากที่มีการเพิ่มจำนวนพลาสมิด pGL3MS2/Basic [42] แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด (double digestion) ได้แก่ *XhoI* และ *NheI* ดังตารางที่ 5 หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วย

เทคนิค agarose gel Electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1Kb DNA Ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

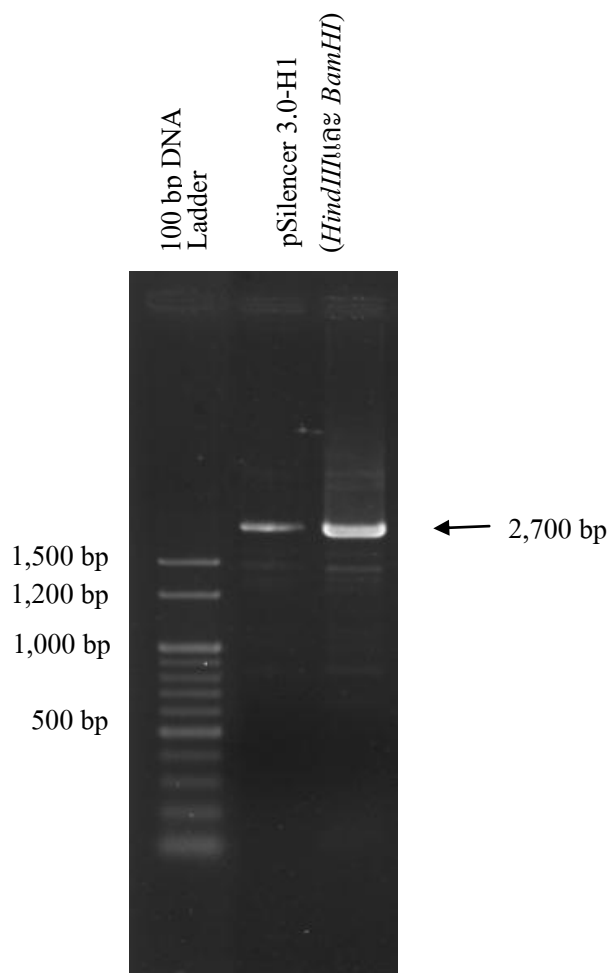
จากรูปที่ 18 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 4,200 bp เกิดขึ้นจากการตัดด้วย *XhoI* และ *NheI* ซึ่งหมายถึงสามารถตัด pGL3MS2/Basic ด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *NheI* ได้สำเร็จ



รูปที่ 18 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด pGL3MS2/Basic ด้วย *XhoI* และ *NheI* โดยพลาสมิดที่ได้มีขนาดประมาณ 4,200 bp

## 2. การตัด pSilencer 3.0-H1 (miRNA expression vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด pSilencer 3.0-H1 และนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ตำแหน่งที่ 496) และ *HindIII* (ตำแหน่งที่ 557) แล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 2,700 bp ดังรูปที่ 19

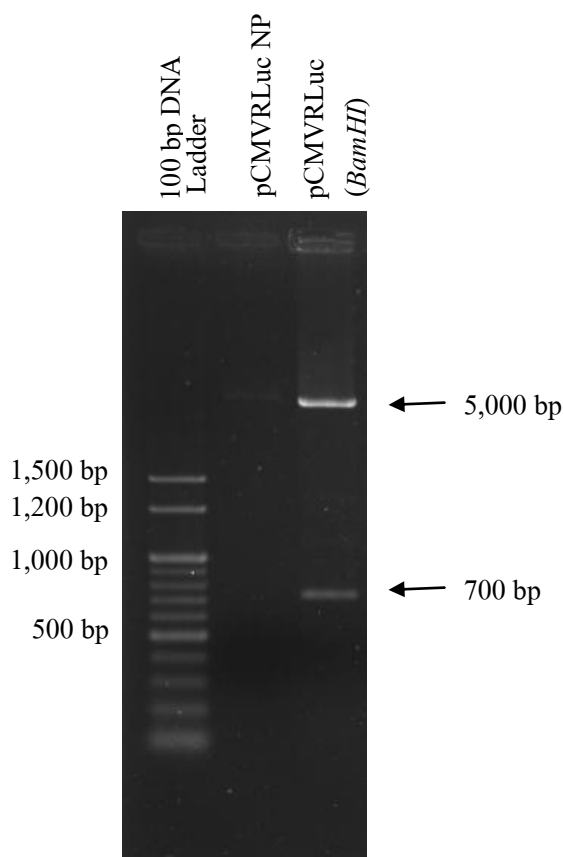


รูปที่ 19 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด *pSilencer 3.0-H1* ด้วย *HindIII* และ *BamHI* โดยพลาสมิดที่ได้มีขนาดประมาณ 2,700 bp

### 3. การตัด pCMVRLuc (Internal control vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

pCMVRLuc ที่นำมาใช้เป็น internal control vector นั้น มาจากพลาสมิดตั้งต้นที่เป็น pCMVRLuc NP โดยจะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* เพื่อเอาชิ้น NP ออก จากรูปที่ 20 ผลิตรหัสที่ได้มีขนาดประมาณ 5,000 bp ส่วนชิ้น NP นั้นมีขนาดประมาณ 700 bp





รูปที่ 20 1% low-melting temperature agarose gel แสดงการตัดพลาสมิด pCMVRLuc ด้วย *Bam*HI โดยพลาสมิดที่ได้มีขนาดประมาณ 5,000 bp

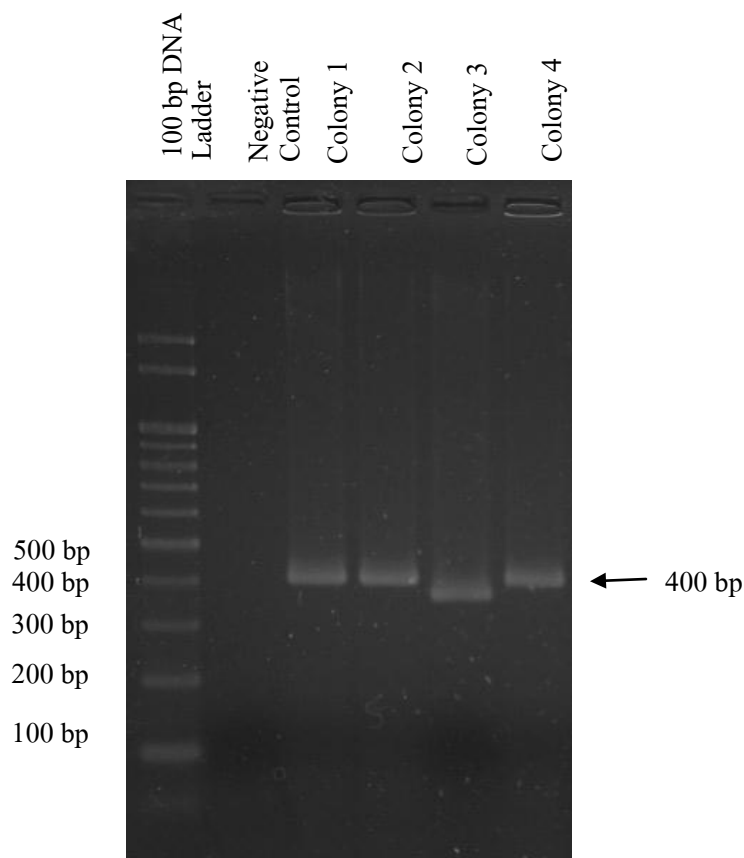
#### 4. ผลการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid construction)

##### 4.1 Reporter vector

หลังจากที่เชื่อมส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจไปยังบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe*I และ *Xho*I แล้ว จึงนำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. Coli* โดยใช้ความร้อน (Heat Shock) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีขึ้นทั้งหมด 6 โคโลนี จึงนำทั้ง 4 โคโลนีเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

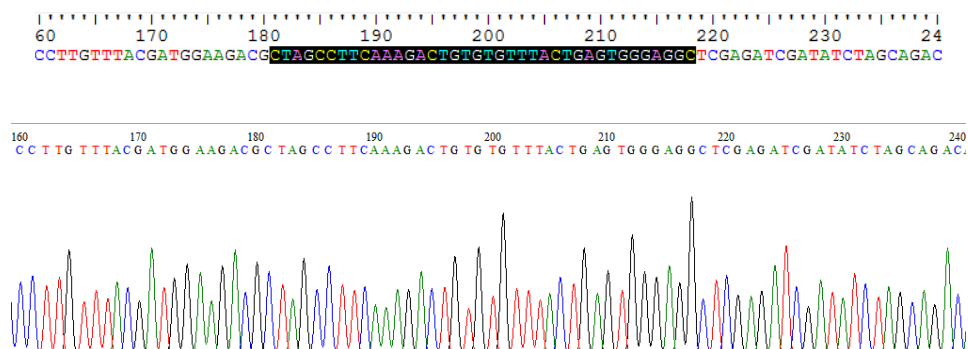
จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี HiYield™ Plasmid Mini Kit และตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยใช้ forward และ reverse primer เป็น Luc3\_F และ Sv40\_R

ตามลำดับเมื่อนำมาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 400 bp ดังในโคโลนีที่ 1, 2 และ 4



รูปที่ 21 2% low-melting temperature agarose gel แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยา  
ลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ Luc3\_F และ Sv40\_R primer

หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตรวจสอบ  
ต่อไปด้วยเทคนิค sequencing (1st BASE) ดังรูปที่ 22

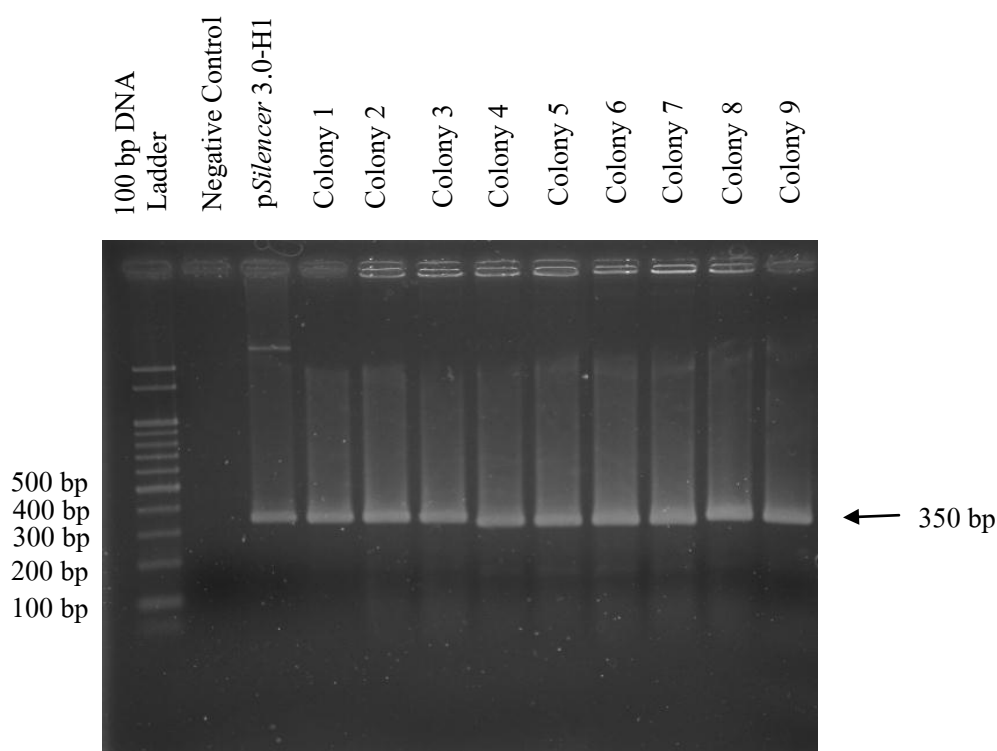


## รูปที่ 22 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic HBV Insert

### 4.2 miRNA expression vector

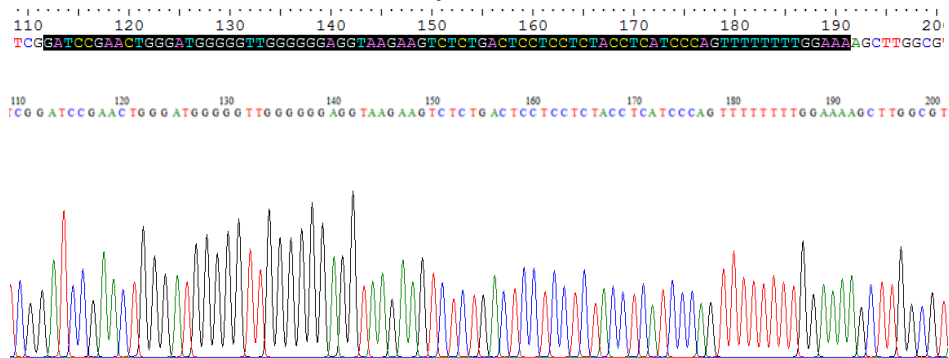
สำหรับ miRNA expression vector จะเชื่อมส่วนของ miRNA ที่ออกแบบไว้ระหว่างบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III หลังจากนั้นจึงนำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. Coli* โดยใช้ความร้อน (Heat shock) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีขึ้นทั้งหมด 9 โคโลนี จึงนำทั้ง 9 โคโลนีเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่สกัดแล้วมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ forward primer เป็น M13\_F และ reverse primer เป็น p*Silencer*-H1\_R ตาม Instruction Manual ของ p*Silencer*<sup>TM</sup> siRNA Expression Vectors (Ambion)



รูปที่ 23 2% low-melting temperature agarose gel แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ M13\_F และ p*Silencer* H1\_R

จากรูปที่ 23 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคลนที่ 1, 2, 3 และ 8 มีขนาดประมาณ 350 bp ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามีส่วนของ hsa-mir-5193 อยู่ แต่ขนาดที่ได้มีใกล้เคียงกับ pSilencer 3.0-H1 มาก เนื่องจาก miRNA ที่ออกแบบนั้นมีความยาวเพียง 80 bp เท่านั้น จึงต้องทำการยืนยันผลที่ได้ด้วย Sequencing (1<sup>st</sup> BASE) ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer hsa-miR5193

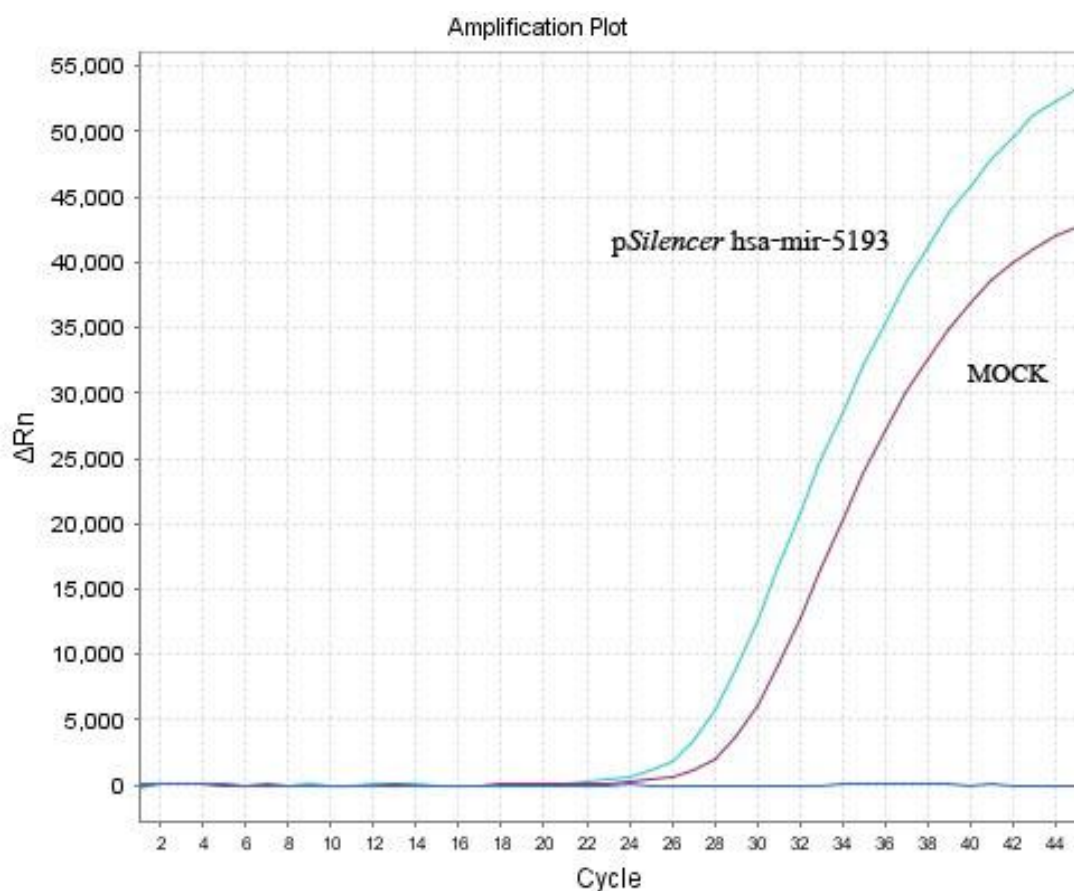
#### 4.3 siRNA-FLuc

สำหรับ siRNA-FLuc ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเพื่อดูระดับการแสดงออกของ *Firefly* Luciferase โดยจะเชื่อมส่วนของ FLuc ที่ออกแบบไว้เช่นเดียวกับ miRNA Expression Vector หลังจากนั้นจึงนำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. Coli* โดยใช้ความร้อน (Heat shock) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคลนขึ้นทั้งหมด 1 โคลน จึงนำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

หลังจากนั้นจึงนำพลาสมิดที่สกัดแล้วมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีปฏิกิริยา ลูกโซ่ พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ forward primer เป็น M13\_F และ reverse primer เป็น pSilencer-H1\_R และยืนยันผลที่ได้ด้วย Sequencing (1<sup>st</sup> BASE)

### การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR

สำหรับการวัดระดับการแสดงออกของ miRNA ที่ได้ทำการ transfection เปรียบเทียบกับ miRNA ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์โดยอาศัยเทคนิคของ Mei และคณะในปี 2005 [40] ซึ่งใช้ universal poly(A) stem-loop RT primers หรือ SL-poly(A) เป็นไพรเมอร์สำหรับการทำ Reverse Transcription และวัดระดับของ cDNA โดยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าระดับการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ที่ผ่านการ transfection ลงไปมีการแสดงออกมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ miRNA ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์ที่ Ct เท่ากับ 28 และ 30 ตามลำดับดังรูปที่ 25



## รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค RT-qPCR

### การทดสอบ Luciferase Assay

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 จำนวน  $8 \times 10^3$  เซลล์ ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการ transfection 100 นาโนกรัมของ pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HBV Insert, 10 นาโนกรัมของ pCMVRLuc และ 50 นาโนกรัมของ pSilencer 3.0-H1, pSilencerFLuc หรือ pSilencer hsa-mir-5193 โดยใช้ Lipofectamine®2000 Reagent

#### 1. การทดสอบ Luciferase assay เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง

เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง จะทำการเก็บเซลล์โดยใช้ 1x PLB ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อทดสอบ luciferase assay ซึ่งวัดค่า firefly luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรและค่า renilla luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรดังตารางที่ 24 หลังจากนั้นนำมาหาค่า relative luciferase activity ดังรูปที่ 26 ก

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic, pCMVRLuc และ pSilencerFLuc มีระดับการแสดงออกของยีน Luciferase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1 เช่นเดียวกับเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencerFLuc ที่มีระดับการแสดงออกของยีน Luciferase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1

ส่วนเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer hsa-mir-5193 พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน luciferase ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1

#### 2. การทดสอบ Luciferase assay เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

ค่า Relative luciferase activity ซึ่งได้จากการเก็บเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงพบว่าผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับค่า Relative luciferase activity ของเซลล์ที่ทำการเก็บเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แต่มีค่าที่แตกต่างกันชัดเจนมากกว่า ดังตารางที่ 24 โดยค่าของเซลล์ที่ผ่านการ

transfection ด้วย pGL3MS2/Basic, pCMVRLuc และ pSilencerFLuc มีระดับการแสดงออกของยีน Luciferase ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/BasicHBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1 เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน luciferase ของเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/BasicHBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencerFLuc ที่มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1

ส่วนเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pSilencer hsa-mir-5193 มีระดับการลดลงของยีน luciferase อย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1 ดังรูปที่

ตารางที่ 24 แสดงค่า Firefly, renilla และ relative luciferase activity เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (ก) และ 72 ชั่วโมง (ข)

ก

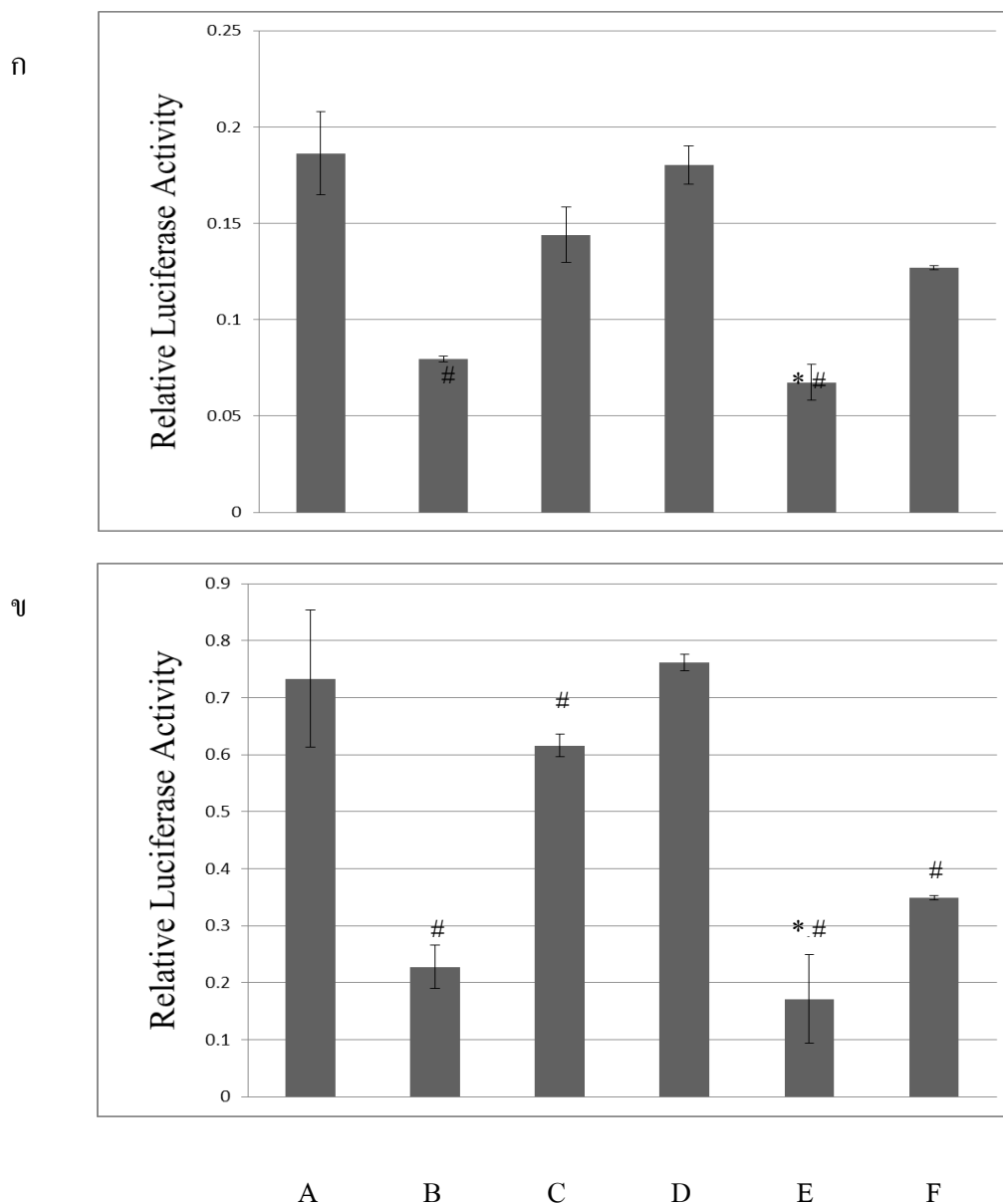
	1	2	3	4	5	6	7
<b>Firefly luciferase activity</b>	1989	22951	11573	25394	18049	5515	13497
	1689	25132	10506	24922	22028	6956	15418
<b>Average</b>	<b>1839</b>	<b>24041.5</b>	<b>11039.5</b>	<b>25158</b>	<b>20038.5</b>	<b>6235.5</b>	<b>14457.5</b>
<b>Renilla luciferase activity</b>	2753	139356.5	143060.5	195980.5	106016.5	94808.5	107318.5
	2664	120964.5	134375.5	157250.5	115751.5	90733.5	120372.5
<b>Average</b>	<b>2708.5</b>	<b>130160.5</b>	<b>138718</b>	<b>176615.5</b>	<b>110884</b>	<b>92771</b>	<b>113845.5</b>
<b>Relative luciferase activity</b>	<b>0.722484562</b>	<b>0.164692713</b>	<b>0.080895845</b>	<b>0.129574116</b>	<b>0.170247084</b>	<b>0.05816989</b>	<b>0.125765828</b>
	<b>0.634009009</b>	<b>0.207763435</b>	<b>0.078183895</b>	<b>0.158485983</b>	<b>0.190304229</b>	<b>0.076664077</b>	<b>0.128085734</b>
<b>Average</b>	<b>0.678246786</b>	<b>0.186228074</b>	<b>0.07953987</b>	<b>0.144030049</b>	<b>0.180275657</b>	<b>0.067416983</b>	<b>0.126925781</b>
<b>SD</b>	<b>0.062561664</b>	<b>0.0304556</b>	<b>0.001917638</b>	<b>0.020443777</b>	<b>0.014182543</b>	<b>0.013077365</b>	<b>0.001640421</b>
<b>Number</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Root No.</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>	<b>1.414213562</b>
<b>Error bar (SD/RootNo.)</b>	<b>0.044237777</b>	<b>0.021535361</b>	<b>0.001355975</b>	<b>0.014455933</b>	<b>0.010028573</b>	<b>0.009247093</b>	<b>0.001159953</b>



๗

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Firefly luciferase activity</b>	2762	59065.5	15806.5	43102.5	50910.5	15070.5	15630.5
	2697	54303.5	15128.5	37200.5	41117.5	7530.5	11612.5
<b>Average</b>	<b>2729.5</b>	<b>56684.5</b>	<b>15467.5</b>	<b>40151.5</b>	<b>46014</b>	<b>11300.5</b>	<b>13621.5</b>
<b>Renilla luciferase activity</b>	1451	96365	83346	72327	68083	60458	45218
	2421	63619	56886	58491	53022	80489	32921
<b>Average</b>	<b>1936</b>	<b>79992</b>	<b>70116</b>	<b>65409</b>	<b>60552.5</b>	<b>70473.5</b>	<b>39069.5</b>
<b>Relative luciferase activity</b>	1.903514817	0.612935194	0.189649173	0.595939276	0.747771103	0.249272222	0.345669866
	1.114002478	0.853573618	0.265944169	0.63600383	0.775479989	0.093559368	0.352738374
<b>Average</b>	<b>1.508758648</b>	<b>0.733254406</b>	<b>0.227796671</b>	<b>0.615971553</b>	<b>0.761625546</b>	<b>0.171415795</b>	<b>0.34920412</b>
<b>SD</b>	0.558269529	0.170157061	0.053948709	0.028329918	0.019593142	0.110105615	0.00499819
<b>Number</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Root No.</b>	1.414213562	1.414213562	1.414213562	1.414213562	1.414213562	1.414213562	1.414213562
<b>Error bar (SD/RootNo.)</b>	<b>0.39475617</b>	<b>0.120319212</b>	<b>0.038147498</b>	<b>0.020032277</b>	<b>0.013854443</b>	<b>0.077856427</b>	<b>0.003534254</b>

โดยที่ 1 = MOCK, 2 = pGL3MS2/Basic+p*Silencer* 3.0-H1, 3 = pGL3MS2/Basic+p*Silencer* Fluc, 4 = pGL3MS2/Basic+p*Silencer* has-mir-5193, 5 = pGL3MS2/Basic HBV Insert+p*Silencer* 3.0-H1, 6 = pGL3MS2/Basic HBV Insert+p*Silencer* Fluc และ 7 = pGL3MS2/Basic HBV Insert+p*Silencer* has-mir-5193



รูปที่ 26 แสดง Relative Luciferase Activity เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (ก) และ 72 ชั่วโมง (ข)

โดย A : pGL3MS2/Basic + pSilencer 3.0-H1, B : pGL3MS2/Basic + pSilencer Fluc,

C : pGL3MS2/Basic + pSilencer has-mir-5193, D : pGL3MS2/Basic HBV Insert +

pSilencer 3.0-H1, E : pGL3MS2/Basic HBV Insert + pSilencer Fluc และ F :

pGL3MS2/Basic HBV Insert + pSilencer has-mir-5193

\*, # แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับ pGL3MS2/Basic + pSilencer 3.0-H1 และ

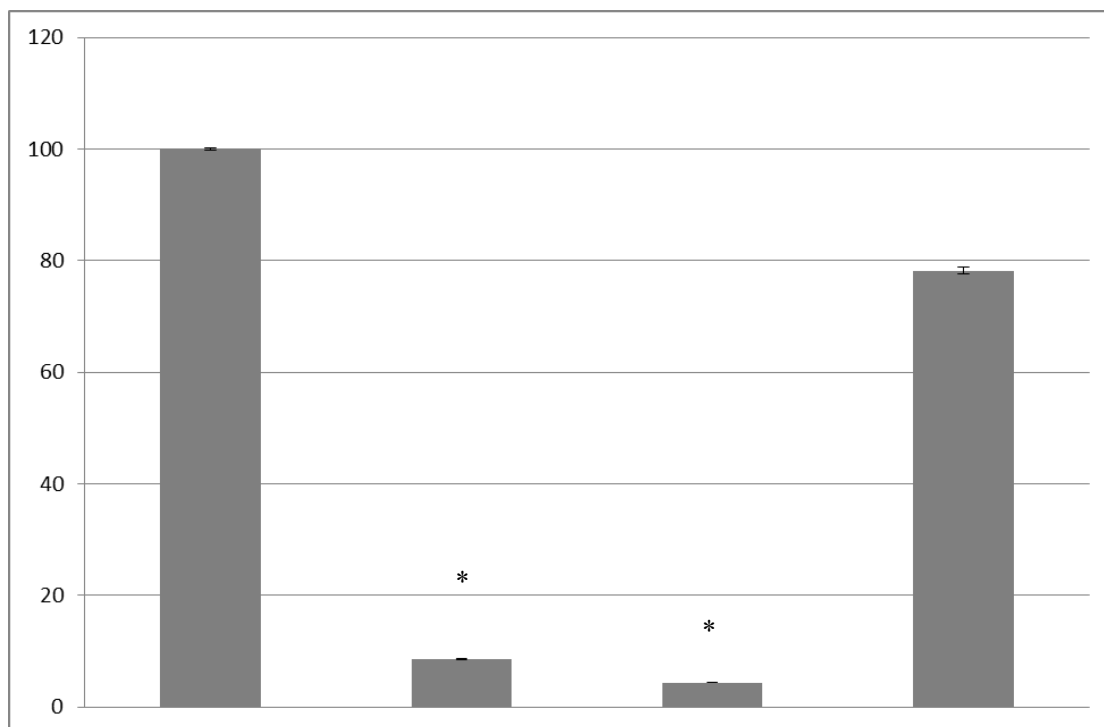
pGL3MS2/BasicHBV Insert + pSilencer 3.0-H1 ตามลำดับ

โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$

### การวิเคราะห์ระดับของ mRNA โดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR

การวัดระดับของ mRNA ในการทดลองนี้จะอาศัยการวิเคราะห์โดยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งทำการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับยีน *Firefly Luciferase* และ *GAPDH* ได้ หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลโดยอาศัยค่า  $\Delta\Delta C_t$  โดยใช้ *Calibrator* เป็นค่า  $\Delta C_t$  ของเซลล์ที่ทำการ transfection ด้วย *pGL3MS2/Basic*, *pCMVRLuc* และ *pSilencer 3.0 H1*

เมื่อทำการเก็บเซลล์ที่เวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย *pGL3MS2/Basic*, *pCMVRLuc* และ *pSilencerFLuc* มีระดับของ mRNA อยู่ที่ 9 เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย *pGL3MS2/Basic HBV Insert*, *pCMVRLuc* และ *pSilencerFLuc* มีระดับของ mRNA อยู่ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย *pSilencer hsa-mir-5193* มีระดับของ mRNA อยู่ที่ 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (100 เปอร์เซ็นต์) ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 ผล Real-Time PCR แสดงระดับการลดลงของ mRNA เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

โดย โดย A : pGL3MS2/Basic + pSilencer 3.0-H1 ซึ่งกำหนดให้ระดับ mRNA ของ pGL3MS2/Basic+pSilencer hsa-mir-5193 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์, B : pGL3MS2/Basic + pSilencer Fluc, C : pGL3MS2/Basic HBV Insert + pSilencer Fluc และ

D : pGL3MS2/Basic HBV Insert + pSilencer has-mir-5193

\* แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับ pGL3MS2/Basic+pSilencer 3.0-H1

โดยมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การค้นหามiRNA ของเซลล์ที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J

ผลการคัดเลือก miRNAs ของมนุษย์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ A-J โดยใช้ฐานข้อมูล miRBase และโปรแกรม RNAHybrid พบว่ามี miRNAs ทั้งหมด 41 miRNAs ที่สามารถเข้าคู่ (Hybridization) กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้อีกทั้งยังพบว่ามีอีกหลาย miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์ ได้แก่ hsa-mir-195, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-509-1, hsa-mir-671-3p, hsa-mir-1273d, hsa-mir-1914, hsa-mir-4640-5p, hsa-mir-4999-5p, hsa-mir-5702, hsa-mir-142-5p, hsa-mir-384, hsa-mir-500b, hsa-mir-4731-5p และ hsa-mir-5193 ดังแสดงในตารางที่ 22

ลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง hsa-mir-5193 และนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีแต่ละจีโนไทป์

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการเลือก hsa-mir-5193 มาใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากเป็น miRNA ที่สามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ต่าง ๆ ได้มากที่สุด ได้แก่ จีโนไทป์ A, B, C, E, F, H, I และ J โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ B และ C ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่พบการระบาดในประเทศไทยมากที่สุด นอกจากนี้ลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง hsa-mir-5193 และนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ต่าง ๆ เป็นชนิด 5'-canonical ดังรูปที่ 28 ซึ่งเป็นรูปแบบการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และยื่นเป้าหมายที่มีความเสถียรมากที่สุด จึงเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพในการทำงานของ miRNAs ด้วย

รูปที่ 28 แสดงลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง hsa-mir-5193 กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี

Genotype A	<pre> target 5' G G C 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'                     </pre>	Genotype F	<pre> target 5' G G C 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'                     </pre>
Genotype B	<pre> target 5' G G U G 3' UGGA GAG UGGGGAGGA ACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' UG A C 5'                     </pre>	Genotype H	<pre> target 5' G G UC G 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC UCUCCUCCU miRNA 3' A CA 5'                     </pre>
Genotype C	<pre> target 5' G G U 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'                     </pre>	Genotype I	<pre> target 5' G G U G 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'                     </pre>
Genotype E	<pre> target 5' G G U 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC AUCUCCUCCU miRNA 3' A C 5'                     </pre>	Genotype J	<pre> target 5' G G UC 3' ACUGGA GAG UGGGGAGGA UGACCCU CUC UCUCCUCCU miRNA 3' A CA 5'                     </pre>

### การสร้าง reporter vector และ miRNA expression vector

หลังจากนั้นจึงทำการสร้าง reporter vector ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ตำแหน่ง 1681-1702 (เป็นยีนเป้าหมายของ hsa-mir-5193) เชื่อมต่อกับบริเวณ 3'-UTR ของยีน *Firefly luciferase* (reporter gene) ใน reporter vector เรียกชื่อว่า pGL3MS2/Basic HBV Insert และทำการสร้าง miRNA expression vector เรียกว่า pSilencer hsa-mir-5193 เพื่อใช้เพิ่มการแสดงออกของ hsa-mir-5193 ที่สนใจในเซลล์มะเร็งตับหรือเซลล์ HepG2 โดยได้ทำการยืนยันผลโดยทำ nucleotide sequencing พบว่าสามารถสร้าง reporter vector และ miRNA expression vector ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องเหมาะสม

### การแสดงออกของ hsa-mir-5193

จากผล Real-Time PCR เพื่อดูระดับการแสดงออกของ hsa-mir-5193 พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ miRNA expression vector มีระดับการแสดงออกของ hsa-mir-5193 ในเซลล์มากกว่ากลุ่ม Mock ซึ่งมี hsa-mir-5193 ที่แสดงออกอยู่ภายในเซลล์อยู่แล้ว (endogenous miRNA) ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่า miRNA expression vector สามารถเพิ่มการแสดงออกของ hsa-mir-5193 ที่ต้องการศึกษาได้

### การศึกษาการทำงานของ hsa-mir-5193 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน

จากนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการทำงานของ hsa-mir-5193 นี้ในการยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยอาศัยการวัด luciferase activity พบว่าค่า relative luciferase activity ของเซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencerhsa-mir-5193 จะทำให้มีระดับ luciferase activity ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic, pCMVRLuc และ pSilencer 3.0 H1 จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบผลยับยั้งในระดับของ mRNA โดยอาศัยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าเซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV Insert, pCMVRLuc และ pSilencerhsa-mir-5193 มีการยับยั้งการแสดงออกของยีน luciferase ในระดับ mRNA เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ดังนั้นข้อสันนิษฐานของผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วนั้น มีความเป็นไปได้ว่าจะเกิดจากการเข้าสู่ของ hsa-mir-5193 กับ mRNA ของเป้าหมายแบบ 5' Canonical ซึ่งเป็นการเข้าสู่แบบไม่สมบูรณ์ (partial complementary) ก็จะเป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) ด้วยกระบวนการยับยั้งการแปลรหัส (translation repression) แต่ไม่เกิดการย่อยสลาย mRNA (mRNA degradation) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า hsa-mir-5193 น่าจะมีความสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบีได้โดยการบวนการ translation repression แต่ไม่สามารถทำลาย

mRNA หรือ pre-genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบบีโดยกระบวนการ mRNA degradation อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาขั้นต่อไปในอนาคต

## อภิปรายผล

hsa-mir-5193 เป็น miRNA ที่พบว่ามีการแสดงออกอยู่ภายในเซลล์มนุษย์ซึ่งก่อนหน้านี้ค้นพบว่า miRNA ชนิดนี้มีการแสดงออกมากในผู้ป่วยเด็กที่เป็น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน หรือ Acute Lymphoblastic leukemia (ALL) [43] ยังไม่เคยมีรายงานว่า miRNA ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับ การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จึงมีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นการศึกษา miRNA ชนิดใหม่ที่อาจมีผลในการยับยั้งการไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็น ปัญหาทางด้านสาธารณสุขในปัจจุบัน

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เลือกศึกษา hsa-mir-5193 ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งพบว่า เมื่อวิเคราะห์ในระดับการแสดงออกของโปรตีน luciferase โดยเปรียบเทียบ ระหว่างเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากการ transfection พบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมงให้ผลการทดลอง ที่ชัดเจนกว่า ดังรูปที่ 26 กล่าวคือสามารถวัดสัญญาณ luciferase ในเซลล์กลุ่มต่าง ๆ ได้สูงกว่าที่ เวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สัญญาณ luciferase ที่เวลา 72 ชั่วโมงมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่าง ชัดเจนทำให้สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากรูปที่ 26 เป็นการศึกษาการทำงานของ hsa-mir-5193 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ในระดับโปรตีน โดยตรวจสอบด้วยเทคนิค luciferase assay โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

1. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0-H1
2. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer Fluc
3. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer has-mir-5193
4. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer 3.0-H1
5. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer Fluc
6. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer hsa-mir-5193

เซลล์กลุ่มที่ 1 จะถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0-H1 ในการ ทดลองจะเลือกใช้กลุ่มที่ 1 เป็นค่าพื้นฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกลุ่มต่าง ดังนี้

เมื่อพิจารณาสัญญาณ luciferase ในเซลล์กลุ่มที่ 2 พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 เนื่องจากในกลุ่มที่ 2 เซลล์ถูก transfection ด้วย pSilencer Fluc ซึ่งจะ สร้าง shRNA ที่จะถูกตัดด้วย Dicer ภายในเซลล์ให้กลายเป็น siRNA ที่มีความจำเพาะในการยับยั้ง

การแสดงออก (gene silencing) ของยีน Fluc ที่เป็น reporter gene โดยตรง ดังนั้นเซลล์ในกลุ่มที่ 2 จึงเป็นจัดเป็น positive silencing control เพื่อยืนยันว่าระบบ reporter vector และ miRNA expression vector ที่ใช้ในการศึกษามีสามารถทำให้เกิด gene silencing ได้จริง

เซลล์กลุ่มที่ 3 ถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer hsa-mir-5193 มีสัญญาณ luciferase ลดลงเล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 ดังนั้นจึงเป็นการบ่งชี้ว่า hsa-mir-5193 ที่แสดงออกมาจาก pSilencer hsa-mir-5193 ของเซลล์ในกลุ่มที่ 3 ไม่มีผลในการลดการแสดงออกของยีน luciferase ซึ่งเป็น reporter gene ใน pGL3MS2/Basic

เซลล์กลุ่มที่ 4 ถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 จะสามารถตอบคำถามว่า endogenous miRNA-5193 ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์อยู่แล้ว จะสามารถยับยั้งนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีที่อยู่ใน pGL3MS2/Basic HBV insert ในกลุ่มที่ 4 ได้หรือไม่ จากผลการทดลองพบว่าสัญญาณ luciferase ระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า endogenous miRNA-5193 มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถยับยั้งนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีที่สร้างมาจาก pGL3MS2/Basic HBV insert ได้ และเลือกสามารถใช้กลุ่มที่ 1 หรือกลุ่มที่ 4 เป็นค่าพื้นฐานในการเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มต่าง ๆ ต่อไปได้

เซลล์กลุ่มที่ 5 ถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer Fluc ผลที่ได้จะมีลักษณะเหมือนกับเซลล์ในกลุ่มที่ 2 กล่าวคือ สัญญาณ luciferase มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 หรือกลุ่มที่ 4 เนื่องจากในกลุ่มที่ 5 เซลล์ถูก transfection ด้วย pSilencer Fluc ซึ่งจะสร้าง shRNA ที่จะถูกตัดด้วย Dicer ภายในเซลล์ให้กลายเป็น siRNA ที่มีความจำเพาะในการยับยั้งการแสดงออก (gene silencing) ของยีน Fluc ที่เป็น reporter gene โดยตรง ผลที่ได้จากกลุ่มที่ 5 เป็นการบ่งชี้ว่าการเชื่อมนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีเข้าที่บริเวณ 3'-UTR ของ luciferase gene ไม่มีผลต่อการทำงานของ siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Firefly luciferase*

เซลล์กลุ่มที่ 6 ถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer hsa-mir-5193 มีสัญญาณ luciferase ลดลงค่อนข้างมาก (มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 4 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1) เนื่องจากผลการทดลองในกลุ่มที่ 1 มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ค่อนข้างมาก จึงส่งผลทำให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 6 นั้นไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) อย่างไรก็ตามผลการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 6 นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นจึงสามารถแปลผลได้ว่า pSilencer hsa-mir-5193 ในกลุ่มที่ 6 สามารถสร้าง has-mir-5193 ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งนิวคลีโอไทด์



ของไวรัสตับอักเสบบีที่อยู่บริเวณ 3'-UTR ของ luciferase ยีน จึงมีผลทำให้ยับยั้งการแสดงออกของ ยีน luciferase ได้ด้วย

จากรูปที่ 27 เป็นการศึกษาการทำงานของ hsa-mir-5193 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน ในระดับ mRNA โดยตรวจสอบด้วยเทคนิค real-time PCR โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- A. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0-H1
- B. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer Fluc
- C. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer Fluc
- D. เซลล์ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer hsa-mir-5193

เซลล์กลุ่ม A จะถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0-H1 ในการทดลองจะเลือกใช้กลุ่ม A เป็นค่าพื้นฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกลุ่มต่าง ดังนี้

กลุ่ม B และ C ถูก transfection ด้วย pSilencer Fluc ซึ่งจะสร้าง shRNA ที่จะถูกตัดด้วย Dicer ภายในเซลล์ให้กลายเป็น siRNA ที่มีความจำเพาะในการยับยั้งการแสดงออก (gene silencing) ของยีน *Firefly luciferase* ที่เป็น reporter gene โดยตรง นอกจากนี้ siRNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาจะมีลักษณะเป็น perfect complementary กับยีน luciferase ดังนั้นกลไกการยับยั้งจะเป็นแบบ mRNA degradation ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบคือ ปริมาณ mRNA ของยีน Fluc ในกลุ่ม B และ C มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม A

กลุ่ม D ถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic HBV insert และ pSilencer hsa-mir-5193 มีปริมาณ mRNA ของยีน Fluc ลดลงเล็กน้อย (แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม A ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่า hsa-mir-5193 มีกลไกการยับยั้งไม่เป็นแบบ mRNA degradation แต่เป็นแบบ translational repression เนื่องจากลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง hsa-mir-5193 และนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นแบบ partial complementary

เนื่องจาก hsa-mir-5193 สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้ที่ ตำแหน่ง 1681-1702 (เทียบกับ whole genome sequence accession number DQ361535) เมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังรูปที่ 2 และการถอดรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีนชนิดต่าง ๆ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังรูปที่ 3 พบว่าลักษณะสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นแบบ overlap open reading frame ส่งผลให้ hsa-mir-5193 สามารถเข้าคู่กับ mRNA ของไวรัสตับอักเสบบีในลักษณะ partial complementary ได้ทั้งส่วนของ pregenomic RNA และ subgenomic RNA จึงเป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้หลายชนิด ได้แก่ Surface (S), Core (C), Polymerase (P) และ X

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงเป็นประโยชน์ในแง่ของการศึกษา miRNA ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์มนุษย์และสามารถเข้าคู่กับไวรัสตับอักเสบบีได้หลายจีโนไทป์ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทำการศึกษาในบางจีโนไทป์เท่านั้น เช่น ในปี 2010, Qui และคณะ ได้ทำการศึกษางานของ hsa-mir-122 ต่อไวรัสตับอักเสบบี พบว่า miRNA ชนิดนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ ผ่านการทำงานของ heme oxygenase-1 (HO-1) [34] นอกจากนี้ในปี 2010, Zhang และคณะได้ทำการศึกษา miRNA 2 ชนิด ได้แก่ hsa-mir-199-3p และ hsa-mir-210 ซึ่งพบว่า มีบทบาทในการลดการแสดงออกของ HBsAg และเป็นผลทำให้การเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีลดลงได้ [35] เช่นเดียวกับ hsa-mir-125a-5p ที่ทำการศึกษาโดย Potenza และคณะในปี 2011 [33]

### ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า miRNA นั้นมีผลกับการแสดงออกในระดับของโปรตีนเท่านั้น เนื่องมาจากลักษณะของการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และ mRNA ของไวรัสตับอักเสบบี อีกทั้งผลการทดลองที่ได้ยังไม่สามารถที่จะยืนยันได้ว่า hsa-mir-5193 นั้นสามารถที่จะไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้จริงเนื่องจากการศึกษาเพียงบางส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองในเซลล์ที่มีจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีอยู่จริง เพื่อดูผลของ miRNA ชนิดนี้ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีต่อไป

อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ siRNA ของงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีผลทำให้เกิดกระบวนการสลายของ mRNA ได้ แต่ข้อจำกัดของการใช้ siRNA นั้น คือ การที่เมื่อร่างกายได้รับ siRNA เข้าไป ร่างกายของมนุษย์ก็จะมีกระบวนการในการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมภายนอก ดังนั้นการทำงานของ siRNA อาจไม่สมบูรณ์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำงานของ miRNA ที่มีการแสดงออกภายในเซลล์มนุษย์ แต่ miRNA ที่เลือกมาศึกษานั้นมีลักษณะการเข้าคู่กับ mRNA แบบ partial complementary ทำให้เกิดกระบวนการ translation repression เท่านั้น จึงจำเป็นต้องยังต่อการศึกษาในอนาคตในการเลือก miRNA ที่สามารถจับกับ mRNA ได้อย่างสมบูรณ์ (perfect complementary) เป็นผลทำให้เกิดการสลายของ mRNA ได้

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญต่อการศึกษา miRNA ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับของโปรตีน คือ การสร้างโปรตีน X ซึ่งพบว่ามีผลในการยับยั้งการทำงานของยีน p53 ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ เมื่อ miRNA ชนิดนี้สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน X ได้ ก็อาจจะมีผลทำให้อัตราการเกิดมะเร็งของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีลดลงได้เช่นกัน

## รายการอ้างอิง

- [1] Kao, J. H., and Chen D. S. Global control of hepatitis B virus infection. The Lancet Infectious Diseases 2 (July 2002): 395-403.
- [2] Kao, J. H., Chen, P. J. and Chen, D. S. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiologic and molecular biological aspects. Advances in Cancer Research 108 (2010): 21-72
- [3] Kao, J. H. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. Journal of Gastroenterology and Hepatology 17 (June 2002): 643–650.
- [4] Norder, H., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. Intervirology 47 (2004): 289-309.
- [5] Lin, C. L. and Kao, J. H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. Journal of Gastroenterology and Hepatology 26 (January 2011): 123-130.
- [6] Datta, S. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. Virology Journal 5 (2008): 156.
- [7] Kao, J.H. and Chen, D.S. HBV genotypes: epidemiology and implications regarding natural history. Current Hepatitis Reports 5 (2006): 5-13.
- [8] Phung, T.B., Alestig, E., Nguyen, T.L., Hannoun, C., and Lindh, M. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate. Journal of Medical Virology 82 (2010): 1327-1333.
- [9] Tran, T.T., Trinh, T.N., and Abe, K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. Journal of Virology 82 (June 2008): 5657-5663.
- [10] Tatematsu, K., et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. Journal of Virology 83 (October 2009): 10538-10547.
- [11] Grimm, D., Thimme, R., and Blum, H. E. HBV life cycle and novel drug targets. Hepatology International 5 (June 2011): 644-653.

- [12] Suwannakan, K., et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes. Hepatology Research 38 (March 2008): 244-251.
- [13] Howard, C.R. The biology of hepadnaviruses. The Journal of General Virology 67 (July 1986): 1215-1235.
- [14] Serger C., and Mason W.S. Hepatitis B virus biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (March 2000): 51-68.
- [15] Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M.A., and Neuveut, C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. Advances in Cancer Research 103 (2009): 75-109.
- [16] Quasdorff, M., and Protzer, U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. Journal of Viral Hepatitis 17 (August 2010): 527-536.
- [17] Urban, S., Schulze, A., Dandri, M., and Petersen, J. The replication cycle of hepatitis B virus. Journal of Hepatology 52 (February 2010): 282-284.
- [18] Block, T. M., Guo, H., and Guo, J. T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. Clinics in Liver Disease 11 (November 2007): 685-706.
- [19] Benhenda, S., Cougot, D., Buendia, M. A., and Neuveut, C. Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. Advances in Cancer Research 103 (2009): 75-109.
- [20] Karayiannis, P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51 (April 2003): 761-785.
- [21] Jin, W.B., Wu, F.L., Kong, D., and Guo, A.G. HBV-encoded microRNA candidate and its target. Computational Biology and Chemistry 31 (April 2007): 124-126.
- [22] Hsu, P.W., Lin, L.Z., Hsu, S.D., Hsu, J.B., and Huang, H.D. ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses. Nucleic Acids Research 35 (January 2007): D381-D385.

- [23] He, L., and Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics 5 (July 2004): 522–531.
- [24] Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell 116 (January 2004): 281-297.
- [25] Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. Cohen S. M. Principles of miRNA-target recognition. PLoS Biology 3 (March 2005): 404-418.
- [26] Pfeffer, S., et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. Nature Methods 2 (April 2005): 269-276.
- [27] Lo, A.K., et al. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. PNAS 104 (October 2007): 16164-16169.
- [28] Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., and Ganem, D. SV40-encoded microRNAs 15 regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. Nature 435 (June 2005): 682-686.
- [29] Omoto, S., et al. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. Retrovirology 1 (December 2004): 44.
- [30] Lecellier, C.H., et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. Science 308 (2005): 557-560.
- [31] Otsuka, M., et al. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. Immunity 27 (July 2007): 123-134.
- [32] Pedersen, I.M., et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. Nature 449 (October 2007): 919-922.
- [33] Potenza, N., Papa, U., Mosca, N., Zerbini, F., Nobile, V., and Russo, A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. Nucleic Acids Research 39 (July 2011): 5157-5163.

- [34] Qiu L., et al. miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV. Biochemical and Biophysical Research Communications 398 (August 2010): 771–777.
- [35] Zhang, G.L., Li, Y.X., Zheng, S.Q., Liu, M., Li, X., and Tang, H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. Antiviral Research 88 (November 2010): 169–175.
- [36] Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. Vertebrate microRNA genes. Science 299 (March 2003): 1540.
- [37] Liang, R. Q., et al. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. Nucleic Acids Research 33 (January 2005): e17.
- [38] Chen, C., et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research 33 (November 2005): e179.
- [39] Shi, R., and Chiang, V. L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. Biotechniques 39 (October 2005): 519–525.
- [40] Mei, Q., et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. PLoS One 7(2012):e46890.
- [41] Lindquester, G. J. Functional Analysis of Promoters[Online]. 2009. Available from: <http://faculty.rhodes.edu/lindquester/molbiol/reporter.html>[2013, April 16]
- [42] Rackham, O. and Brown, C. M. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. The EMBO Journal 23 (August 2004):3346-55.
- [43] Schotte, D., Akbari Moqadam, F., Lange-Turenhout, E. A., Chen, C., van Ijcken, W. F., Pieters, R., den Boer, M. L. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 25 (2011): 1389-99.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียม Annealing Buffer

- 10 มิลลิโมลาร์ Tris
- 50 มิลลิโมลาร์ NaCl
- 1 มิลลิโมลาร์ EDTA

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 และเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 100 มิลลิลิตร

#### 2. การเตรียมสารสำหรับ Cloning

##### 2.1 LB Agar

- Agar            3.75 กรัม
- Yeast Extract 1.25 กรัม
- Tryptone       2.5 กรัม
- NaCl            1.25 กรัม
- น้ำกลั่น        250 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15

นาที

##### 2.2 LB Broth

- Yeast Extract 0.5 กรัม
- Tryptone       1.0 กรัม
- NaCl            0.5 กรัม
- น้ำกลั่น        100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15

นาที



### 2.3 SOC Medium

- Yeast Extract 0.5 กรัม
- Tryptone 1.0 กรัม
- NaCl 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีและใส่ 2 โมลาร์ของ  $Mg^{2+}$ , 2 โมลาร์ Glucose และ 1 โมลาร์ KCl

### 3. การเตรียม 5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)

- Tris 54 กรัม
- Boric Acid 27.5 กรัม
- EDTA 4.16 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

### 4. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 45 มิลลิลิตร
- FBS (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum) 5 มิลลิลิตร
- Antibiotic-Antimycotic 500 มิลลิลิตร

### 5. การเตรียม Freezing Media

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 8.5 มิลลิลิตร
- FBS (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum) 5 มิลลิลิตร
- DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 1.5 มิลลิลิตร

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอภิษฎา คล้ายพึ่งสินธุ์

วัน เดือน ปีเกิด 3 มีนาคม พ.ศ. 2532

สถานที่เกิด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ บ้านเลขที่ 856/35 ซอยพหลโยธิน 8 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท จังหวัด  
กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400

### ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2553

### ทุนการศึกษาที่ได้รับ

พ.ศ. 2555 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาของมูลนิธิธินิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2556 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนของบัณฑิตวิทยาลัย

### ผลงานทางวิชาการ

#### การประชุมวิชาการ

หัวข้อเรื่อง Human MiRNAs Targeting Hepatitis B Virus Genotype A-J by Computational  
Analysis

ชื่อผู้นิพนธ์ Apichaya Khlaiphuengsin, Kritsada Khongnomnan, Nattanan T-

ThienprasertPanjaworayan, Yong Poovorawan, Sunchai Payungporn

ตีพิมพ์ในหนังสือ Proceedings ของงานประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35

ณ ห้องประชุมคอนเวนชัน 2 โรงแรมท็อปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 20-22 มีนาคม พ.ศ. 2556

หน้า 72-74