

In vitro analysis of human microRNAs targeting hepatitis C virus

Miss Sasitorn Plakunmonthon

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

การวิเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์เพาะเลี้ยง  
เนื้อเยื่อตับ



นางสาวศศิธร พลากุลมณฑล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถยับยั้ง  
เชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตับ

โดย

นางสาวศศิธร พลากุลมณฑล

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงกร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์เผด็จ สิริยะเสถียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พยุงกร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

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

ศศิธร พลากุลมณฑล : การวิเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตับ. (In vitro analysis of human microRNAs targeting hepatitis C virus) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สัญชัย พยุงกร, 70 หน้า.

microRNA (miRNA) คืออาร์เอ็นเอสายสั้นๆขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทด์สามารถไปเข้าคู่ (hybridization) กับ mRNA เป้าหมาย และควบคุมการแสดงออกของยีนได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า microRNAs (miRNAs) สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C virus) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ สามารถแบ่งออกเป็น 6 จีโนไทป์หลัก โดยจีโนไทป์ที่พบอัตราการระบาดมากในประเทศไทยได้แก่ 1, 3 และ 6 การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจวิเคราะห์หา miRNA ของมนุษย์ ที่สามารถไปเข้าคู่กับยีนของไวรัสตับอักเสบซีทั้ง 3 จีโนไทป์ (1, 3 และ 6) ได้ โดยอาศัยการทำนายด้วยโปรแกรมทาง Bioinformatics ได้แก่ miRBase และ RNA hybrid เพื่อวิเคราะห์รูปแบบการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ ยีนของไวรัสตับอักเสบซี และค่าพลังงานในการจับ (Minimum free energy; MFE) พบว่ามี hsa-miR-4645-3p และ hsa-miR-4658 ที่สามารถเข้าคู่กับ บริเวณ 5'UTR ของไวรัสตับอักเสบซีได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นทำการทดสอบ hsa-miR-4645-3p ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน firefly luciferase ที่ต่อกับยีนของไวรัสตับอักเสบซี ในเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตับ (HepG2 cell) โดยใช้เทคนิค Luciferase assay พบว่า hsa-miR-4645-3p ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกยีน (gene silencing) ได้ จึงทำให้สัญญาณ Luciferase ไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจาก mRNA ของ firefly luciferase ที่ต่อกับยีนของไวรัสตับอักเสบซีเกิดโครงสร้างทุติยภูมิที่ขัดขวางไม่ให้ hsa-miR-4645-3p มาจับที่ยีนของไวรัสตับอักเสบซี ดังนั้นหากต้องการทดสอบ hsa-miR-4645-3p ควรเปลี่ยน vector ให้มี reporter gene ชนิดอื่นที่ไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิกับยีนของไวรัสตับอักเสบซี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิติต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

# # 5474161330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: HEPATITIS C VIRUS / MICRORNA / HYBRIDIZATION

SASITORN PLAKUNMONTHON: IN VITRO ANALYSIS OF HUMAN MICRORNAS TARGETING HEPATITIS C VIRUS. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPOORN, Ph.D., 70 pp.

MicroRNA is small non-coding RNA approximately 21-23 nucleotides in length that hybridizes with target mRNA and regulates gene expression. From previous studies, miRNAs are able to control viral replication. Hepatitis C virus (HCV) is a major health problem globally. There are 6 genotypes of HCV however the predominant genotypes in Thailand are genotype 1, 3 and 6. This study aimed to investigate human miRNAs that can hybridize to conserved regions among the 3 genotypes (1, 3 and 6) of hepatitis C virus. Computer softwares including miRBase and RNA hybrid were used for analysis of hybridization pattern and minimum free energy (MFE) between human miRNA and hepatitis C viral gene. Result showed that hsa-miR-4645-3p and hsa-miR-4658 can efficiently hybridize with 5'UTR of hepatitis C virus. After that hsa-miR-4645-3p was validated in term of silencing firefly luciferase linked with hepatitis C viral gene in HepG2 cell culture system. The result of luciferase assay revealed that hsa-miR-4645-3p could not inhibit the firefly luciferase gene expression. The possible reason that hsa-miR-4645-3p was unable to hybridize with hepatitis C viral gene might be due to the secondary structure between firefly luciferase gene and hepatitis C viral gene. When testing for the silencing function of hsa-miR-4645-3p, vectors with other reporter genes should be used instead of firefly luciferase gene in order to avoid the formation of secondary structure with hepatitis C viral gene (5'UTR).

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Science

Student's Signature .....

Academic Year: 2013

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สญชัย พยุงกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อระดับปริญญาโท รวมถึงให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ผศ.ดร. ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต.เทียนประเสริฐ สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่สำคัญต่องานวิจัยและการดำเนินชีวิต รวมถึงความอนุเคราะห์เวกเตอร์ pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0-H1 ที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวอภิชญา คล้ายพึ่งสินธุ์ สำหรับเวกเตอร์ pSilencerFLuc ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกในด้านเอกสารต่างๆ

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 724 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดการทำวิจัยที่ผ่านมา

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากราชกรีฑาสโมสร และทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนของบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนการเรียนในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมถึงกำลังใจที่เป็นแรงผลักดันจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
คำถามของการวิจัย .....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
สมมติฐานของการวิจัย .....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย .....	4
คำสำคัญ .....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus) .....	5
ไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบซี (Molecular Virology of Hepatitis C Virus) .....	5
ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบซี (Epidemiology of Hepatitis C Virus).....	6
MicroRNAs (miRNAs).....	7
Polymerase Chain Reaction (PCR).....	10
Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR).....	11
การวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNAs ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR.....	14
Luciferase assay .....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
รูปแบบการวิจัย .....	17
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	17
วิธีดำเนินการวิจัย .....	21

1.	การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซี	21
2.	การเตรียม Reporter vector .....	22
3.	การเตรียม miRNA expression vector.....	26
4.	Control vector .....	31
5.	การตรวจสอบดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis .....	31
6.	วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (Gel Extraction) โดยชุดสกัด HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction kit.....	32
7.	การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ <i>E.coli</i> โดยใช้ความร้อน (Transformation by heat shock) .....	33
8.	การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Real Genomic HiYield™ Plasmid Mini Kit .....	33
9.	การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) .....	34
10.	วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture).....	36
11.	Transfection .....	38
12.	การเตรียม positive control สำหรับ Real time PCR.....	38
13.	การสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA extraction) ด้วยชุดสกัด microRNA Purification Kit).....	40
14.	การย่อยดีเอ็นเอ (DNase Treatment).....	41
15.	Polyuridylation .....	41
16.	Reverse Transcription.....	42
17.	การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real time PCR.....	43
18.	การทดสอบ luciferase assay.....	45
19.	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....		46
1.	ผลการหาบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซี จีโนไทป์ 1-7..	46
2.	ผลการคัดเลือกไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีทั้ง 7 จีโนไทป์จากฐานข้อมูล miRBase และโปรแกรม RNAHybrid .....	47
3.	ผลการสร้าง vectors .....	48



4.	การตัดต่อเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction).....	49
5.	การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR.....	52
6.	การทดสอบ Luciferase Assay .....	53
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ .....	57
	การทำนายไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	57
	การทดสอบ hsa-miR-4645-3p ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน.....	58
	รายการอ้างอิง .....	61
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	70



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	แสดง Accession numbers ของจีโนมไทป์ของไวรัสตับอักเสบบีที่ใช้ในการศึกษา .....	21
ตารางที่ 2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ .....	23
ตารางที่ 3	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการ annealing สาย target mRNA.....	24
ตารางที่ 4	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด reporter vector .....	24
ตารางที่ 5	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ reporter vector.....	26
ตารางที่ 6	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย miRNA.....	27
ตารางที่ 7	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการ annealing สาย miRNA.....	28
ตารางที่ 8	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด miRNA expression vector .....	29
ตารางที่ 9	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ miRNA expression vector .....	30
ตารางที่ 10	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด.....	35
ตารางที่ 11	ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา.....	35
ตารางที่ 12	สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ (PCR condition).....	36
ตารางที่ 13	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมนิวคลีโอไทด์สำหรับเป็น positive control.....	39
ตารางที่ 14	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ <i>in vitro</i> transcription.....	39
ตารางที่ 15	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ .....	41
ตารางที่ 16	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ polyuridylation.....	42
ตารางที่ 17	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ reverse transcription สำหรับ miRNA.....	42
ตารางที่ 18	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ weverse transcription สำหรับ miRNA.....	43
ตารางที่ 19	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ใน real-time PCR.....	43
ตารางที่ 20	แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	44
ตารางที่ 21	แสดงสภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ miRNA (real-time PCR condition).....	44
ตารางที่ 22	แสดงการเข้าคู่กันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์และไวรัสตับอักเสบบี .....	47
ตารางที่ 23	แสดงนิวคลีโอไทด์สายยาวของยีนที่สนใจ (HCV-5' UTR).....	48
ตารางที่ 24	แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดที่ทำการ transfection .....	52
ตารางที่ 25	แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้ในการ transfection.....	54
ตารางที่ 26	แสดงรูปแบบการเข้าคู่และค่าพลังงาน MFE จากการศึกษาก่อนหน้า.....	58

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบซี ..... 5

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบซี ..... 6

รูปที่ 3 แสดงกระบวนการการสร้างและการทำงานของ miRNAs ..... 8

รูปที่ 4 แสดงรูปแบบการเข้าสู่ของ miRNAs และ mRNAs เป้าหมาย ; modified from ..... 9

รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ..... 10

รูปที่ 6 การใช้ SYBR Green ในเทคนิค Real-time PCR ..... 11

รูปที่ 7 กราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot) ที่ได้จากเทคนิค ..... 12

รูปที่ 8 กราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot) ..... 13

รูปที่ 9 Melting curve ของปฏิกิริยา Real-time PCR ..... 14

รูปที่ 10 แสดงเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์การแสดงออกของ miRNAs ..... 15

รูปที่ 11 แสดงปฏิกิริยา Bioluminescent โดยอาศัย Firefly และ *Renilla luciferase* ..... 16

รูปที่ 12 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic ..... 23

รูปที่ 13 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic ที่มี target อยู่ ..... 25

รูปที่ 14 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 ..... 26

รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างการออกแบบสาย miRNA ..... 27

รูปที่ 16 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 ที่มี miRNA แทรกอยู่ ..... 30

รูปที่ 17 โครงสร้าง pCMV-RLuc ที่ใช้เป็น control vector ..... 31

รูปที่ 18 แสดงตารางใน Hemacytometer ..... 37

รูปที่ 19 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของไวรัสตับอักเสบซี จีโนไทป์ 1-7 ..... 46

รูปที่ 20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ mature miRNA ของ hsa-miR-4645-3p ..... 49

รูปที่ 21 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซไฟลิเมอเรส ..... 50

รูปที่ 22 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic HCV-5'UTR .... 51

รูปที่ 23 แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกลูโซไฟลิเมอเรส ..... 51

รูปที่ 24 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer hsa-miR-4645-3p .... 52

รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs ภายในเซลล์ โดยเทคนิค RT-qPCR ... 53

รูปที่ 26 แสดงเปอร์เซ็นต์ Relative Luciferase Activity เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ..... 56

รูปที่ 27 แสดงผล RNA folding แสดงการเข้าคู่กันระหว่าง Firefly luciferase และ ยีนของไวรัสตับ  
อักเสบซี ..... 60

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ M	Micromolar
ATP	Adenosine triphosphate
CTP	Cytosine triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
GP1	Glycoprotein 1
GTP	Guanosine triphosphate
miR	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Sodium chloride
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
NS	Non-structural
PCR	Polymerase chain reaction
RNA pol III	RNA polymerase III
U	Unit
UTP	Uridine triphosphate
UTR	Untranslated region
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C virus) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบทั้งแบบเฉียบพลัน (acute hepatitis) และแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis) ตลอดจนสามารถพัฒนาไปเป็นตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ไวรัสตับอักเสบซีเป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีเยื่อหุ้มจัดอยู่ใน family *Flaviviridae*, genus *Hepacivirus* ลักษณะจีโนมของไวรัสเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายบวก ความยาวประมาณ 9.6 กิโลเบส ในปัจจุบันไวรัสชนิดนี้ได้ถูกจำแนกออกเป็น 6 จีโนไทป์หลักๆ ได้แก่ จีโนไทป์ 1-7 และแบ่งออกเป็น subtype ได้ประมาณ 80 subtypes สำหรับในประเทศไทยจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดได้แก่ จีโนไทป์ 1a, 3a และ 6 โดยในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี มีเพียงการรักษาด้วย Interferon หรือ ribavirin ซึ่งยังให้ผลการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย และเชื้อไวรัสสามารถดื้อต่อยาได้

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับ microRNA (miRNAs) ซึ่งเป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ สร้างจาก non-coding region ภายในจีโนม ของเซลล์ มีขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทด์ มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยอาศัยการเข้าคู่ (complementary) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5' ของ miRNAs กับ 3'-UTR ของ mRNAs เป้าหมาย ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ด้วยกระบวนการยับยั้งการแปลรหัส (translational repression) หรือการสลาย mRNA (mRNA degradation) บทบาทของ miRNAs เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การควบคุมสมดุลต่างๆ ของเซลล์ การตายของเซลล์ (apoptosis) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า miRNAs ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ด้วย เช่น ยับยั้งเชื้อไวรัส primate foamy virus type 1 (PRV-1) ยับยั้งไวรัส Vesicular Stomatitis รวมไปถึงการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่าอาจมี miRNAs ที่มีอยู่ภายในเซลล์มนุษย์ที่สามารถยับยั้ง ไวรัสตับอักเสบซีได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์และทดสอบหา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสตับอักเสบซี โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs ต่างๆ ที่พบในเซลล์มนุษย์ กับสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบซี จีโนไทป์ 1-7

### คำถามของการวิจัย

1. ภายในเซลล์ของมนุษย์มี miRNAs ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ ได้แก่ 1-7 หรือไม่
2. miRNAs ที่พบในเซลล์มนุษย์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ 1-7 หรือไม่

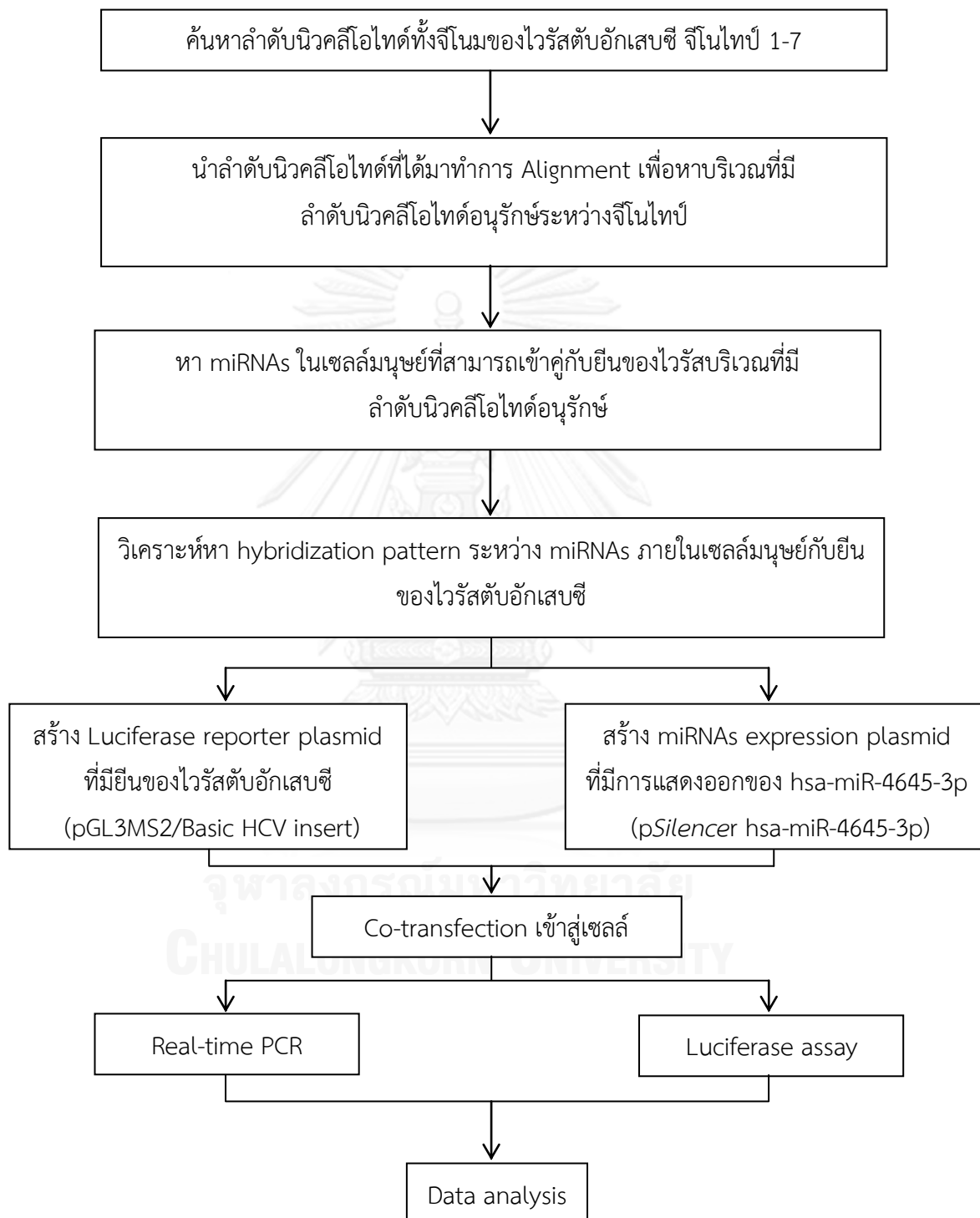
### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หา miRNAs ในเซลล์ของมนุษย์ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ ได้แก่ 1-7
2. เพื่อทดสอบว่า miRNAs จากภายในเซลล์ของมนุษย์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ ได้แก่ 1-7 ได้

### สมมติฐานของการวิจัย

1. ในเซลล์มนุษย์มี miRNAs ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ ได้แก่ 1-7
2. miRNAs ภายในเซลล์ของมนุษย์ที่เข้าคู่กับยีนของไวรัสตับอักเสบบีสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ ได้แก่ 1-7 ได้

## ขอบเขตของการวิจัย



### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Relative Luciferase Activity เป็นการเปรียบเทียบการแสดงออกของ ยีน Firefly luciferase ใน reporter vector ต่อการแสดงออกของยีน *Renilla* luciferase ใน internal control vector เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลของ miRNAs ต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly luciferase ที่บริเวณ 3'-UTR ซึ่งมียีนของไวรัสที่สนใจแทรกอยู่

### คำสำคัญ

Hepatits C virus (HCV), MicroRNAs (miRNAs), Hybridization

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. สามารถหา miRNAs ภายในเซลล์มนุษย์ที่อาจมีความสามารถในการยับยั้งไวรัสตับอักเสบซีได้
2. อานำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางคลินิกต่อไปในอนาคต

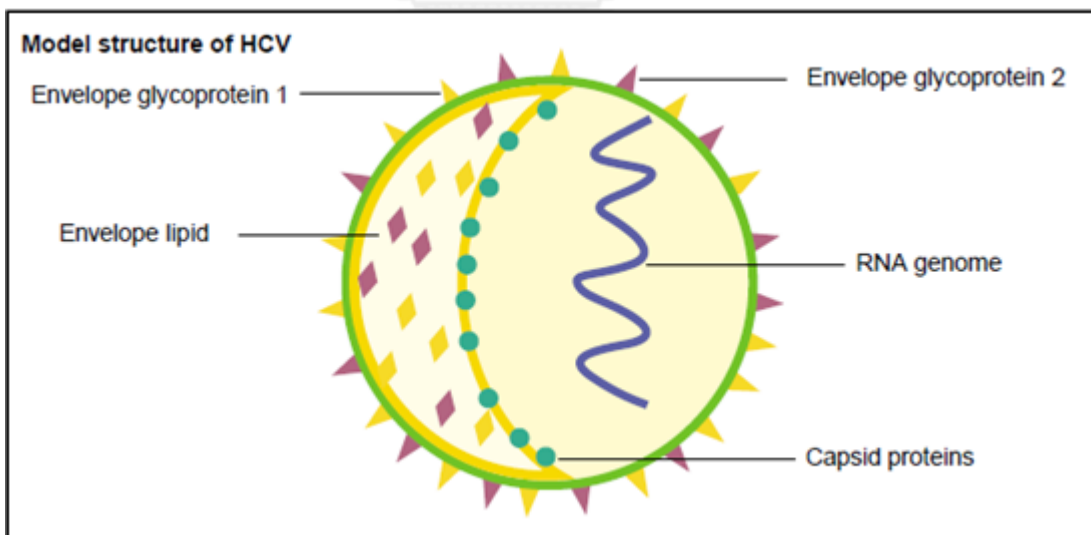


บทที่ 2  
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

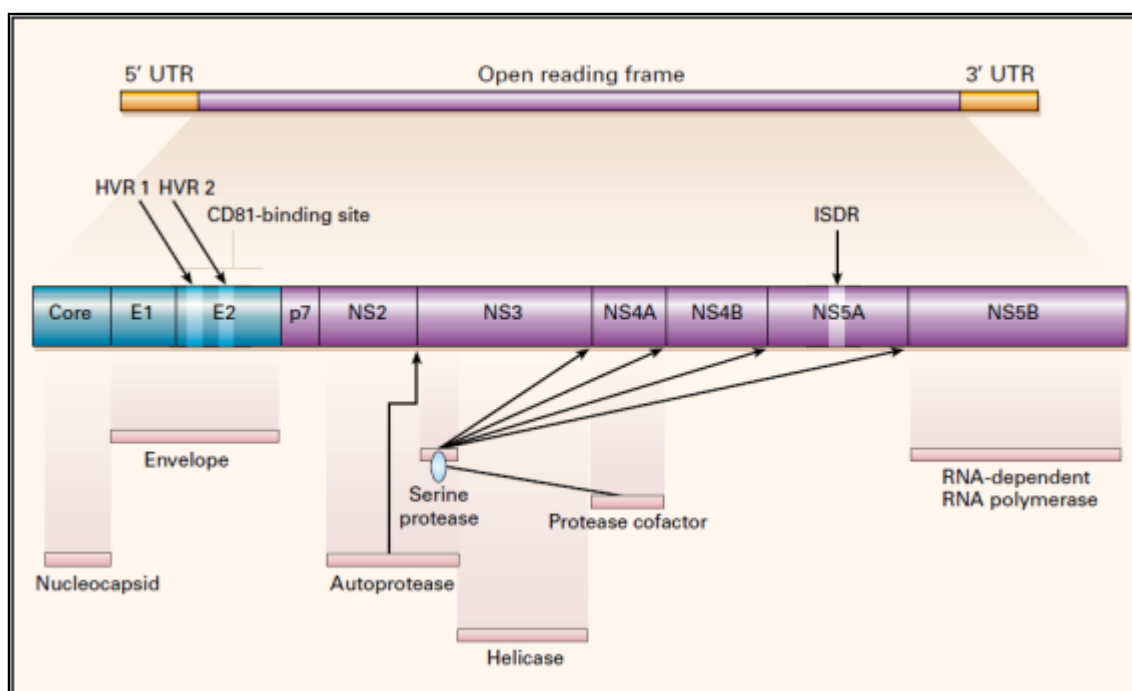
ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus)

ไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบซี (Molecular Virology of Hepatitis C Virus)

ไวรัสตับอักเสบซีถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1989 โดยเป็นสาเหตุของโรคไวรัสตับอักเสบชนิด non-A non-B (1) ไวรัสตับอักเสบซีเป็นไวรัสขนาดเล็กที่มีเยื่อหุ้ม จัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* จีนัส *Hepacivirus* (2) ลักษณะจีโนมของไวรัสชนิดนี้เป็นสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายบวก ซึ่งมีความยาวประมาณ 9.6 กิโลเบส ถูกขนาบข้างด้วย 5' UTR และ 3'UTR (3) ไวรัสชนิดนี้จะถอดรหัสพันธุกรรมได้เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวเพียงสายเดียวประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 3,000 ตัว จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ proteases ทั้งจากไวรัสเองและจากเซลล์เจ้าบ้านที่ไวรัสเข้าไปอาศัย ได้ออกมาเป็นโปรตีนขนาดสั้นๆ 10 ชนิด โดยแบ่งได้เป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง (structural protein) ได้แก่ core, E1, E2 และ p7 และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ได้แก่ NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B(4) ส่วนบริเวณ 5'-UTR พบว่ามีความแตกต่างระหว่างไวรัสแต่ละตัว จึงใช้บริเวณนี้ในการแยกจีโนไทป์ของไวรัสได้ (5) ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบซี (6)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบซี (7)

### ระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบซี (Epidemiology of Hepatitis C Virus)

ปัจจุบันไวรัสตับอักเสบซีสามารถจำแนกได้เป็น 7 จีโนไทป์หลัก ได้แก่ จีโนไทป์ 1-7 และสามารถแบ่งออกเป็น subtype ได้ประมาณ 80 subtypes เช่น subtype 1b, 2a เป็นต้น (8) ซึ่งจะพบการแพร่ระบาดของไวรัสแต่ละจีโนไทป์หรือแต่ละ subtypes แตกต่างกันไปตามพื้นที่ เช่น

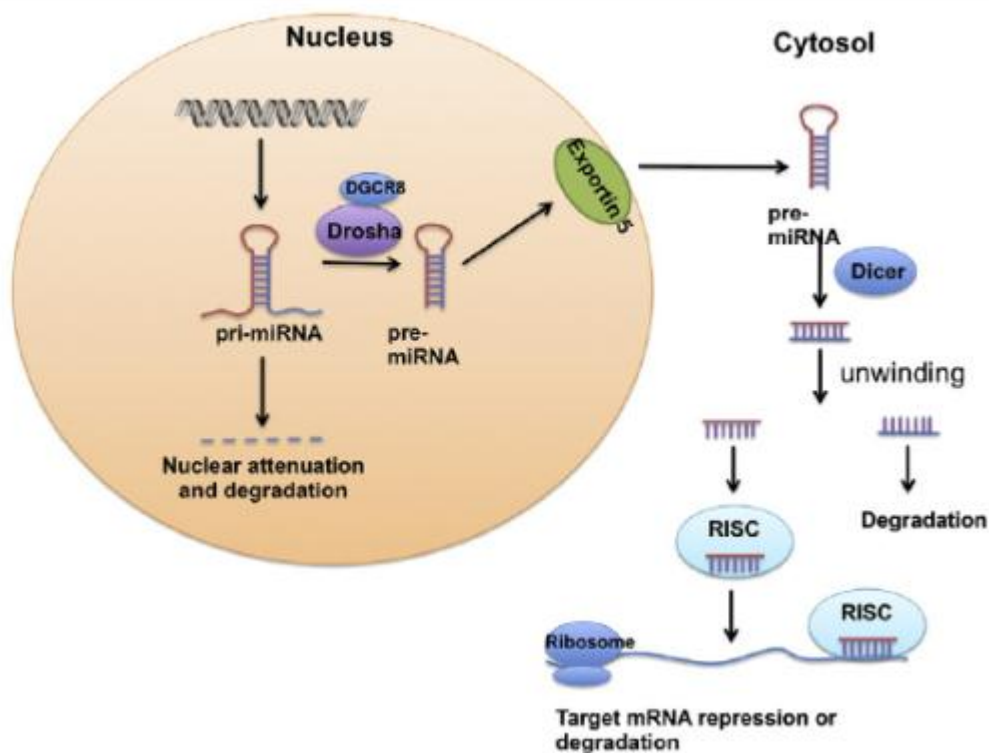
- จีโนไทป์ 1a และ 1b พบได้บ่อยที่สุดแถบอเมริกาและยุโรปตะวันตก รองลงมาเป็น จีโนไทป์ 2 และ 3 (7)
- จีโนไทป์ 4 พบมากที่สุดในประเทศอียิปต์ (9)
- จีโนไทป์ 5 พบมากที่สุด ในประเทศแอฟริกา (7)
- จีโนไทป์ 6 เป็นจีโนไทป์ที่พบมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (7)

สำหรับในประเทศไทยจีโนไทป์ ที่พบการระบาดมากที่สุดคือ 3a รองลงมาได้แก่ 1a, 1b และ 6 ตามลำดับ (10, 11)

การแบ่งจีโนมของไวรัสเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการทำนายการดำเนินของโรคและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ซึ่งให้ผลแตกต่างกันในแต่ละจีโนมที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่นผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนมไทป์ 1 และ 4 มีแนวโน้มของการดำเนินโรคที่รุนแรงกว่าจีโนมไทป์ 2, 3 หรือ 5 โดยมีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นตับอักเสบนานเรื้อรัง (chronic hepatitis), ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับต่อไปได้ (hepatocellular carcinoma) (8) นอกจากนี้ จีโนมไทป์ 1b มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย alpha-interferon ได้ไม่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนมไทป์ 2 และ 3 ซึ่งอาจส่งผลให้การติดเชื้อชนิดนี้รุนแรงขึ้นในผู้ป่วย (10) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยส่วนมากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกายได้ (12) ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อมีอาการตับอักเสบทันทีเฉียบพลัน (Acute hepatitis) และเรื้อรัง (Chronic hepatitis) ซึ่งจะนำไปสู่การเป็นตับแข็ง (Cirrhosis) และมะเร็งตับได้ (Hepatocellular carcinoma) จากการรายงานพบว่าผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และยังไม่มียาสำหรับป้องกันเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ มีเพียงการรักษาด้วยยาต้านไวรัส Interferon/ribavirin ซึ่งผลการรักษายังไม่เป็นที่น่าพอใจ (13) เพราะไม่สามารถใช้กับทุกจีโนมไทป์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งมีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (14)

### MicroRNAs (miRNAs)

microRNAs (miRNAs) เป็นอาร์เอ็นเอสายสั้นๆขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทด์ สร้างมาจากยีน miRNAs ซึ่งอยู่บน non-coding sequences (15) โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II และ RNA polymerase III (16) ภายในนิวเคลียสได้เป็น โครงสร้างที่มีลักษณะ hairpin loop เรียกว่า primary miRNAs (pri-miRNAs) จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase III domain ใน Drosha ได้เป็น miRNA precursors (pre-miRNAs) ความยาวประมาณ 60-70 นิวคลีโอไทด์ (17) โดย pre-miRNAs จะถูกส่งออกไปยังไซโตพลาสซึมด้วยโปรตีน Exportin 5 แล้วถูกตัดบริเวณส่วนที่เป็น loop ออกด้วยเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็น endoribonuclease ที่จัดอยู่ในตระกูล RNase III ได้เป็น mature miRNAs ที่มีลักษณะเป็นสายคู่ (duplex) ประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ (18) โดยจะมีบางส่วนที่ไม่เข้าคู่กัน ซึ่งจะไปรวมตัวกับ RNA-inducing silencing complex (RISC) แล้วเกิดการแยกเป็นสายเดี่ยวด้วยเอนไซม์ helicase จากนั้นจึงไปควบคุมการแสดงออกของยีน โดย ถ้ามีการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ mRNA เป้าหมายแบบสมบูรณ์ (perfect complementary) จะทำให้เกิดการสลายของสาย mRNAs เป้าหมาย (mRNA degradation) ในทางตรงกันข้าม ถ้ามีการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ mRNA แบบไม่สมบูรณ์ (partial complementary) จะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัสของสาย mRNAs (translational inhibition) (19, 20) ดังแสดงในรูปที่ 3

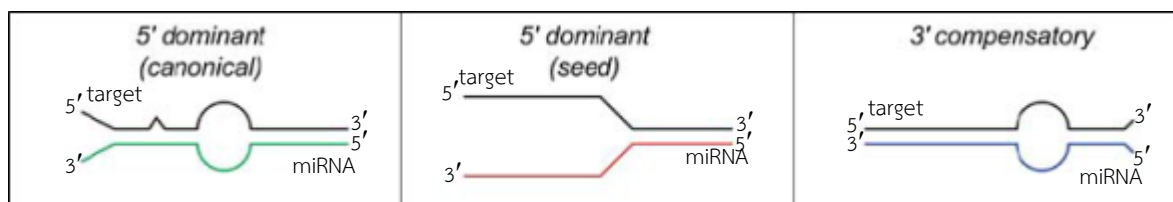


รูปที่ 3 แสดงกระบวนการการสร้างและการทำงานของ miRNAs (19)

จากการศึกษาของ Brennecke และคณะ ในปี 2005 (21) พบว่าการเข้าคู่กันระหว่าง miRNAs และ mRNAs เป้าหมาย มีบริเวณสำคัญที่จับกัน (target binding site) ซึ่งมักอยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากทางด้านปลาย 5' ของ miRNAs เรียกว่า seed region มีตำแหน่งเป้าหมายบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) ของ mRNAs เป้าหมาย โดยรูปแบบในการเข้าคู่กันของ miRNAs และ mRNAs เป้าหมาย อาจแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะดังรูปที่ 4

- **5'canonical** คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้านปลาย 5'-miRNAs ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 และมีบางส่วนของด้านปลาย 3'-miRNAs จับกับ mRNAs เป้าหมายด้วย การจับกันในลักษณะนี้ทำให้ miRNAs จับกับ mRNAs เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ารูปแบบอื่นๆ
- **5' seed** คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้านปลาย 5'-miRNAs ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 แต่ไม่มีส่วนด้าน 3'-miRNAs จับกับ mRNAs ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกับ mRNAs น้อยกว่าแบบ 5'canonical

- 3'compensatory คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้าน 3'-miRNAs จับกับ mRNAs โดยมี บางส่วนของด้าน 5'-miRNAs จับกับ mRNAs ด้วย ซึ่งรูปแบบนี้พบได้น้อยที่สุด

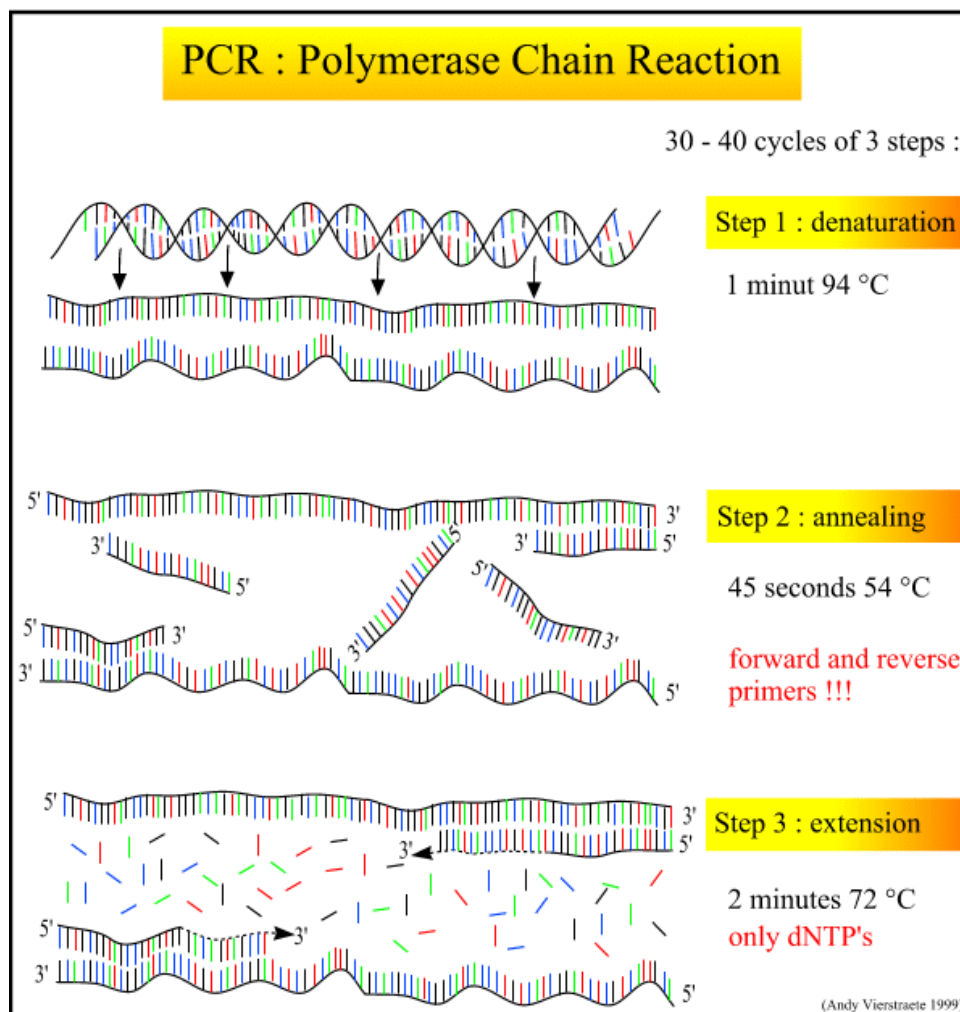


รูปที่ 4 แสดงรูปแบบการเข้าคู่ของ miRNAs และ mRNAs เป้าหมาย ; modified from (21)

นอกจากนี้มีการศึกษาอื่นๆพบว่า miRNAs ของเซลล์เจ้าบ้าน ที่มีการติดเชื้อไวรัส มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการ replication ของไวรัส เช่น primate foamy virus type-1 (PFV-1) (22) และ vesicular stomatitis virus (VSV) (23) ในทางตรงกันข้ามไวรัสเองก็สามารถถอดรหัสให้ miRNAs ได้เช่นกัน ได้แก่ Simian virus (SV40) (24), Herpes virus (HSV) (25) Human deficiency virus-1 (HIV-1) (26) และ Epstein-Barr virus (EBV) (27) รวมถึงยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง miRNAs ในเซลล์ของมนุษย์ และไวรัสตับอักเสบบี ที่คาดว่าน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับตรวจคัดกรองการติดเชื้อได้ เช่น miR-134, miR-198, miR-320c และ miR-483-5p ถูกตรวจพบว่ามีปริมาณมากขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1 และ 3 (12) และมีการศึกษา miRNAs ที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยพบว่า miR-122 มีความจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 1a (Accession no. AF009606) (28) ในทางกลับกันได้มีการค้นพบ miRNAs ที่น่าจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้ เช่น hsa-miR-3065-3p ซึ่งเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ seed region ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GP1 (ซึ่งตรงกับตำแหน่งในโปรตีนส่วนโครงสร้าง E2) ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1 (Accession no. NC\_004102) (29) ซึ่งจะเห็นได้ว่างานวิจัยก่อนหน้านี้มุ่งเน้นศึกษา miRNAs ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีเฉพาะจีโนไทป์ที่สนใจเท่านั้น แต่ในความเป็นจริงเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก และถูกจำแนกออกเป็นหลายจีโนไทป์ดังที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษา miRNAs ที่สามารถยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ได้ โดยมุ่งเน้นในการศึกษาจีโนไทป์ 1a, 3a และ 6 ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่พบการระบาดในประเทศไทย

## Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ PCR เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่สนใจในหลอดทดลอง (*in vitro*) ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ โดยการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอเดิม ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนซ้ำ เป็นจำนวน 35-40 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 5 ได้แก่

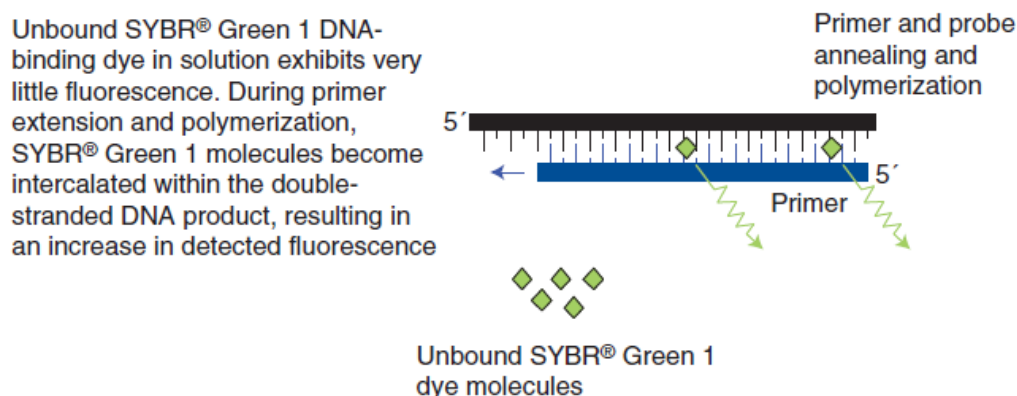


รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (30)

1. การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นสายต้นแบบจากดีเอ็นเอเกลียวคู่ ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส
2. การเข้าคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing) เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงให้เหลือประมาณ 45-65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้
3. การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ในทิศทาง 5' ไป 3' ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี (Thermostable DNA Polymerase) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 68-75 องศาเซลเซียส

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

Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความไวสูง โดยมีหลักการพื้นฐานที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) สามารถวัดปริมาณการเพิ่มของดีเอ็นเอได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน โดยอาศัยสารเรืองแสง เช่น SYBR Green ซึ่งใช้ง่ายและราคาถูก โดยจะเข้าไปจับที่บริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อสารถูกกระตุ้น จะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงที่มีความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง ดังแสดงในรูปที่ 6



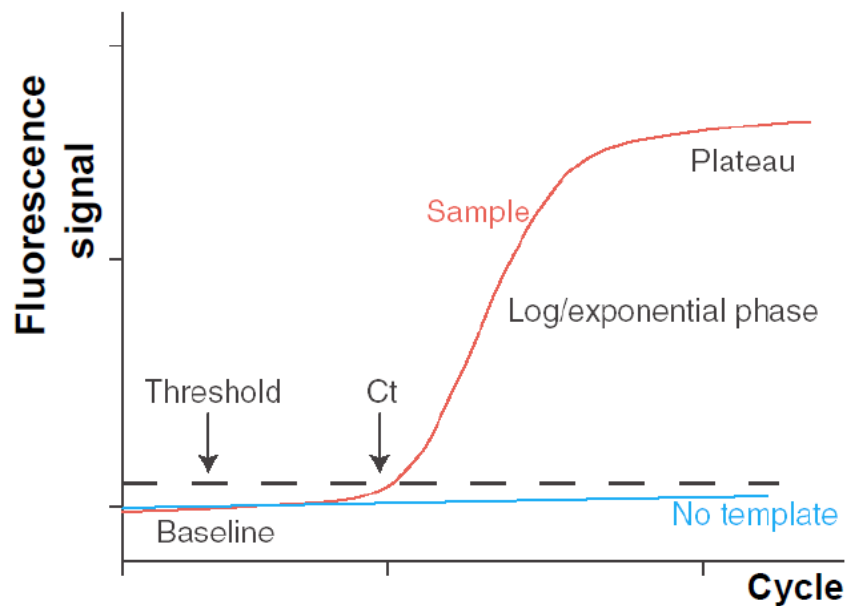
รูปที่ 6 การใช้ SYBR Green ในเทคนิค Real-time PCR (31)

เมื่อสร้างกราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot) การตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา Real-time PCR จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นรูป S (Sigmoid curve) ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งความหมายของคำนิยามต่างๆมีดังนี้

- Baseline คือช่วงเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ มีการสะสมของสารเรืองแสง แต่สัญญาณยังมีระดับต่ำกว่าที่เครื่องจะสามารถตรวจจับได้

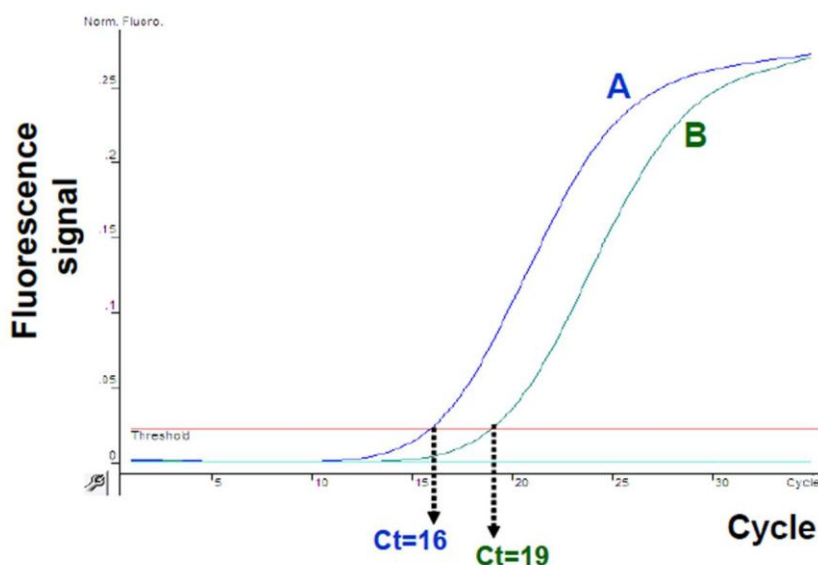


- Threshold เป็นระดับสัญญาณของสารเรืองแสงที่ใช้เป็นค่า cut-off ในการตรวจวัดสารเรืองแสง
- Threshold cycle (ct) แสดงจำนวนรอบของปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวนที่ทำให้ระดับสัญญาณการเรืองแสงสูงกว่า Threshold โดยตัวอย่างที่มีค่า ct ต่ำ แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นต่ำ จึงใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาไม่มากก็สามารถเพิ่มปริมาณสารเรืองแสงให้สูงกว่า Threshold ได้ ในทางกลับกัน ถ้าตัวอย่างไหนมีค่า ct สูง แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย จึงต้องอาศัยจำนวนรอบของปฏิกิริยามากเพื่อให้ระดับสัญญาณสูงกว่า Threshold ดังแสดงในรูปที่ 8
- Log/exponential phase คือช่วงที่ระดับสัญญาณการเรืองแสงสูงกว่า threshold แบบทวีคูณ ซึ่งมักอยู่ในช่วงปฏิกิริยารอบที่ 15-30
- Plateau phase เป็นช่วงที่ระดับสัญญาณการเรืองแสงคงที่ ไม่มีการเพิ่มแบบทวีคูณ เนื่องจากสารต่างๆในปฏิกิริยา เช่น dNTPs และ primer หมด รวมทั้ง activity ของ DNA polymerase เริ่มเสื่อมลง โดยมักจะอยู่ในช่วงปฏิกิริยารอบที่มากกว่า 30



รูปที่ 7 กราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot) ที่ได้จากเทคนิค



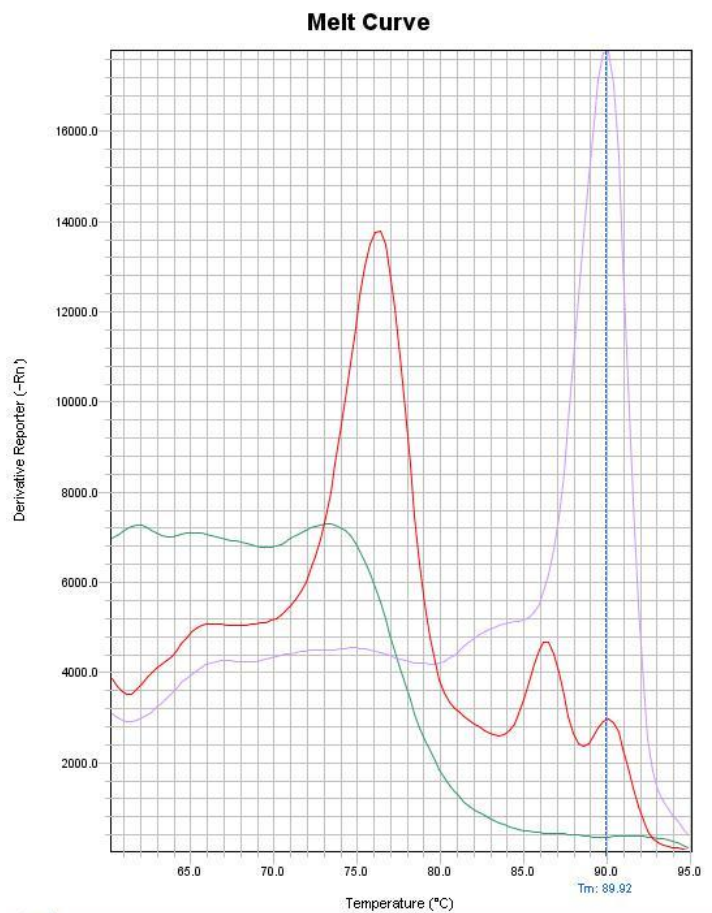


รูปที่ 8 กราฟการเพิ่มจำนวน (Amplification plot)

แสดงการเปรียบเทียบค่า threshold cycle (ct); modified from (31)

การแทรกตัวของสารเรืองแสงบริเวณ minor groove ของดีเอ็นเอเป็นไปอย่างไม่จำเพาะ อาจจะไปแทรกบริเวณของไพเมอร์ไดเมอร์ (primer dimers) หรือผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ (Non-specific PCR product) ได้ จึงต้องอาศัยการเปรียบเทียบด้วยค่า Melting temperature ( $T_m$ )

Melting Temperature ( $T_m$ ) คืออุณหภูมิที่ทำให้ 50 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single stranded DNA) โดยอาศัยเทคนิค melting curve analysis ทำได้โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ (Double stranded DNA) พร้อมกับตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ณ Melting Temperature ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้มีการลดลงของสารเรืองแสงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเขียนความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการลดลงของสัญญาณเรืองแสงต่ออุณหภูมิ (แกน Y) และอุณหภูมิ (แกน X) จะได้ melting curve เมื่อลากเส้นจาก melting peak ลงมาตัดแกน X จะได้ค่า melting temperature ( $T_m$ ) ดังรูปที่ 9 ซึ่งเป็นค่าที่แปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์ GC, ความยาวของสายดีเอ็นเอ และ  $Mg^{2+}$  ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่า  $T_m$  มาประยุกต์ใช้ในการแยก PCR product ได้ โดยค่า  $T_m$  ของไดเมอร์หรือผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ จะมีค่า  $T_m$  ต่างจากค่า  $T_m$  ของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีความยาวของสายดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์ GC ต่างจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (PCR product)



รูปที่ 9 Melting curve ของปฏิกิริยา Real-time PCR

### การวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNAs ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

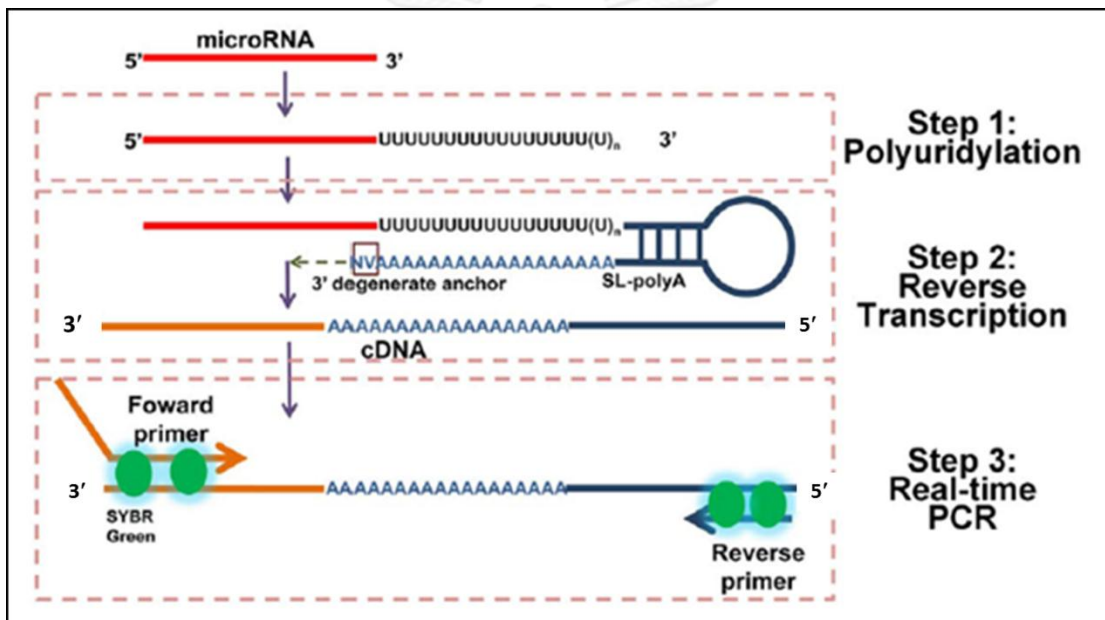
ในปัจจุบันมีการให้ความสำคัญในการศึกษาบทบาทของ miRNA เพิ่มขึ้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคมากมายที่ใช้วัดการแสดงออกของ miRNA ได้แก่ northern blot (32), microarray (33) และ real-time PCR (34) ซึ่งเทคนิค real-time PCR ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากได้ข้อมูลเชิงปริมาณที่แม่นยำ และมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เทคนิค real-time PCR ในการวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ทำการเติม UTP (polyuridylation) ที่ปลาย 3' ของไมโครอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ poly(U) polymerase

ขั้นตอนที่ 2 ทำการ reverse transcription ด้วย universal poly(A) stem-loop RT primers (SL-poly(A)) เพื่อให้ได้โมเลกุล cDNA โดย SL-poly(A) primer ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ ได้แก่

- 1) 3'-poly(A) ซึ่งจะเป็นส่วนที่ไปจับกับ poly(u) ของ miRNA โดยมี degenerated anchor sequence อยู่ที่ปลาย 3' เพื่อเป็นตำแหน่งจับของ miRNA
- 2) 5'-stem-loop ซึ่งถูกออกแบบให้สามารถจับกับ universal primer ในขั้นตอนการทำ real-time PCR ได้

ขั้นตอนที่ 3 real-time PCR โดยอาศัย miRNA-specific forward primer และ universal reverse primer และติดตามการเรืองแสงของ SYBR Green ดังรูปที่ 10



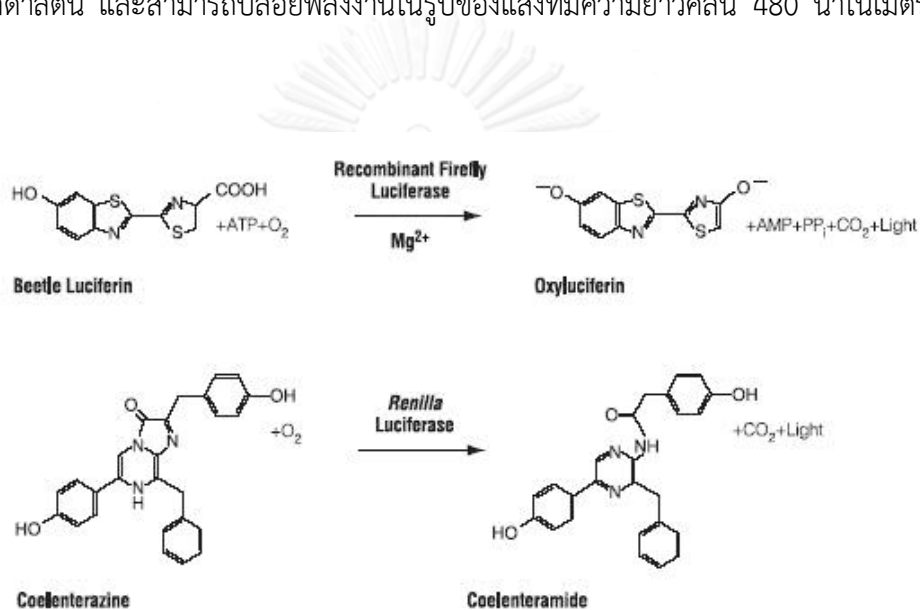
รูปที่ 10 แสดงเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์การแสดงออกของ miRNAs ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ polyuridylation, reverse transcriotion reaction และ real-Time PCR;

modified from (34)

### Luciferase assay

เป็นเทคนิคที่อาศัยการทำงานของ Firefly และ *Renilla* luciferase ภายในตัวอย่างเดียวกัน Firefly luciferase (*Photinus pyralis*) เป็นโปรตีนขนาดประมาณ 61 กิโลดาลตัน สามารถปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงที่มีความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Beetle Luciferin ซึ่งจะอาศัยพลังงานในรูปของ ATP,  $Mg^{2+}$  และออกซิเจน

*Renilla* luciferase (*Renilla reniformis* หรือ sea pansy) เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน และสามารถปล่อยพลังงานในรูปของแสงที่มีความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงปฏิกิริยา Bioluminescent โดยอาศัย Firefly และ *Renilla* luciferase [Promega]

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) และได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) 088/56

#### วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

##### 1. สารเคมีสำหรับเตรียม Annealing Buffer

- Tris (AMRESCO)
- NaCl (Merck)
- EDTA (Sigma Cat No.E5391)

##### 2. สารเคมีสำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion)

- *NheI* (Thermo Scientific, Cat No.ER0971)
- *XhoI* (Thermo Scientific, Cat No.ER0691)
- *BamHI* (Thermo Scientific, Cat No.ER0051)
- *HindIII* (Thermo Scientific, Cat No.ER0501)
- 10X Buffer Tango<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, Cat No.BY5)

##### 3. สารเคมีสำหรับ Ligation

- T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, Cat No.EL0011)

##### 4. สารเคมีสำหรับ Cloning

- Difco<sup>TM</sup> Agar Technical (Becton Dickinson Cat No.281230)
- Bacto<sup>TM</sup> Tryptone (Becton Dickinson Cat No.211705)
- Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson Cat No. 212750)

- Nacl (Merck)
- Ampicillin (General Drugs House)
- Kanamycin (General Drugs House)

#### 5. สารเคมีสำหรับการสกัดพลาสมิด

- RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience Cat No. YPD100)

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

- Thermal cycler; Mastercycler gradient (eppendorf)
- Distilled water (DW)
- dNTPs
- *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen™)
- ไพรมเมอร์ (1<sup>st</sup> Base)

#### 7. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose (Invitrogen Cat No. 75510-019)
- 1X TBE
- Ethidium Bromide (AMRESCO Cat No.X328)
- 1Kb และ 100 Bp Marker (RBC Bioscience Cat No.RD001)
- Transilluminator (Biogenomed)
- Electrophoresis set (Major Science)

#### 8. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจาก Agarose Gel

- HiYield Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience Cat No.YDF300)

#### 9. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์

- Clone HyDMEM/HIGH GLUCOSE (Thermo scientific Cat No.SH30022)

- Fetal Bovine Serum (biowest Cat No.S1520-500)
- Antibiotic-Antimycotic (Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies Cat No.15240-062)
- Hyclone Trypsin 0.25% (1X) Solution (Thermo scientific Cat No.SH30042)
- Tissue Culture Flask (TPP)
- Serological Pipette (TPP)
- หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร (Thermo Scientific)
- หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร (Axygen Scientific)
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ESCO class II BSC Model AC2)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 420 R, Hettich ZENTRIFUGEN)

#### 10. วัสดุ และสารเคมีสำหรับ Transfection

- Lipofectamine<sup>®</sup>2000 Reagent (Invitrogen Cat No.11668-027)
- Opti-MEM<sup>®</sup>I (1X) Reduced Serum Medium (Gibco Cat No.31985-070)
- 96-well plate (TPP)

#### 11. สารเคมีสำหรับสกัด miRNAs

- NORGEN microRNA Purification kit (Cat No.21300)

#### 12. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Polyuridylation

- Poly (U) Polymerase (New England Biolabs Cat No.M0337S)
- Ribonucleotide Solution Set (NTP Set) (New England Biolabs)

#### 13. สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ

- RQ 1 RNase-Free DNase (Promega Cat No. M6101)

#### 14. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Reverse Transcription

- HelixCript<sup>™</sup> Thermo Reverse Transcriptase (Nanohelix Cat No.RT10k)

### 15. สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ *in vitro* transcription

- RiboMAX<sup>TM</sup> Large Scale RNA Production System-T7 (Promega Cat No.P1300)

### 16. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับทำ Real-Time PCR

- Applied Biosystem StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems
- RBC ThermOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR Premix (Cat No.RT009)

### 17. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับ Dual-Luciferase Assay

- Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega Cat No.E1910)
- Microplate Reader
- 96-Well Plate White Opaque (Costar<sup>®</sup>)

### 18. วัสดุ และอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย

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

### 19. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

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



## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซี

1.1 ทำการดาวน์โหลดข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีจากฐานข้อมูล NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ได้แก่ จีโนมไทป์ 1-7 โดยรายละเอียด Accession No. แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง Accession numbers ของจีโนมไทป์ของไวรัสตับอักเสบซีที่ใช้ในการศึกษา

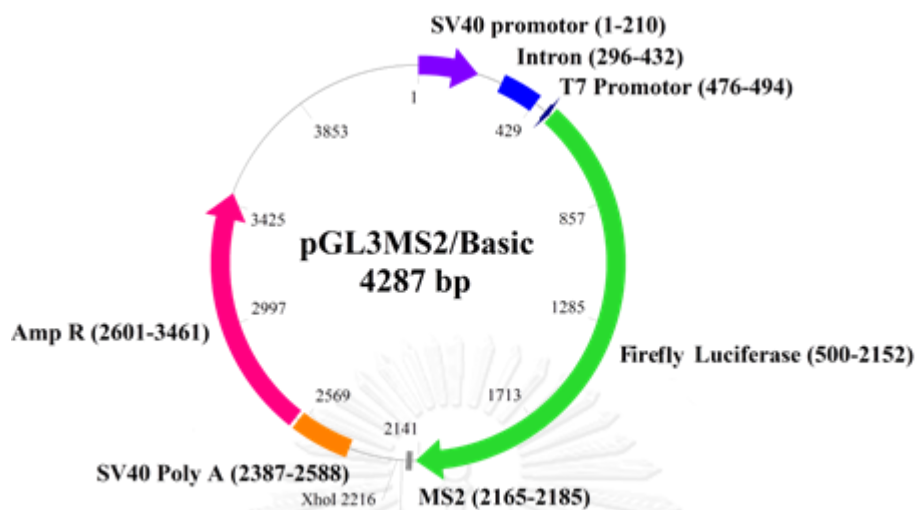
Hepatitis C virus	Accession number
Genotype 1a	M62321
Genotype 1b	M58335
Genotype 2a	D00944
Genotype 2b	AY232730
Genotype 3a	D17763
Genotype 3b	D49374
Genotype 3k	D63821
Genotype 4a	AB795432
Genotype 5a	KC844046
Genotype 6a	EU246938
Genotype 6b	D84262
Genotype 6d	D84263
Genotype 6h	D84265
Genotype 6k	D84264
Genotype 7	EF108306

- 1.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีจากฐานข้อมูล NCBI ตามข้อ 1.1 มาทำการ alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของไวรัสตับอักเสบบีทุกจีโนไทป์ แล้วทำการแบ่งนิวคลีโอไทด์เป็นช่วงๆละ 50 bp โดยให้มี 25 bp เหลื่อมกัน
- 1.3 วิเคราะห์หา mature miRNAs ภายในเซลล์ของมนุษย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับของไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 1-7 โดยใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่ได้จากข้อ 1.2 ลงในฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) โดยใช้เครื่องมือ SSEARCH (<http://www.mirbase.org/search.shtml>)
- 1.4 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mature miRNAs ภายในเซลล์มนุษย์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล miRBase มาวิเคราะห์เพื่อทำนายลักษณะการเข้าคู่ (Hybridization patterns) ของ mature miRNAs ภายในเซลล์ของมนุษย์กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนของไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้เว็บไซต์ RNA hybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถทำนาย minimum free energy (mfe) และแสดงลักษณะการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และ RNA ของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งจำแนกได้เป็น 3 แบบ ดังนี้
- 5' canonical มีการเข้าคู่กันของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (seed region) นับจากด้าน 5' ของ mature miRNAs กับ mRNAs ของไวรัสทั้งสามจีโนไทป์ และมีการเข้าคู่กันที่ด้าน 3' ของ miRNAs ด้วย
  - 5' seed มีการเข้าคู่ระหว่างนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (seed region) บริเวณ 5' ของ mature miRNAs กับ mRNAs ของไวรัส แต่ไม่พบการเข้าคู่กันที่ด้าน 3' ของ miRNAs
  - 3' compensatory นิวคลีโอไทด์ครึ่งหนึ่งของสายบริเวณด้าน 3' ของ mature miRNAs มีการเข้าคู่กับ mRNAs ของไวรัส

เลือก mature miRNAs ที่สามารถเข้าคู่กับ RNA ของไวรัสตับอักเสบบีที่ได้จากการวิเคราะห์ข้างต้น เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งไวรัสของ miRNAs ต่อไป

## 2. การเตรียม Reporter vector

pGL3MS2/Basic ถูกนำมาใช้เป็น Reporter Vector ในงานวิจัยนี้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Brown Department of Biochemistry, University of Otago [Rackham, 2004] vector นี้มีขนาด 4287 คู่เบส ซึ่งมียีน Firefly Luciferase เป็น reporter gene โดยมี Ampicillin resistance gene เป็น selectable gene ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic (35)

## 2.1 Oligonucleotide annealing

- (1) ออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวของยีนที่สนใจซึ่งในการศึกษานี้คือบริเวณอนุรักษ์ของไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ 5' UTR ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งต้องเป็นบริเวณที่ miRNA สามารถเข้าคู่ได้ โดยออกแบบให้มีลักษณะของ 2 สายที่มีการเข้าคู่กันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ Top strand และ Bottom strand และให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *XhoI* และ *NheI* เพื่อใช้ในการ cloning เข้า pGL3MS2/Basic ซึ่งเป็น reporter vector ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังที่กล่าวข้างต้น

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ

ตำแหน่ง	HCV-5'UTR
45-65	TS 5'- <u>CTAGCCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGC</u> -3' BS 3'- <u>GGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCGAGCT</u> -5'

(ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ, ตัวเอียง แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจากส่วนที่ไม่โครอาร์เอ็นเอสามารถเข้าคู่ได้, ตัวหนา แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่โครอาร์เอ็นเอสามารถเข้าคู่ได้)

- (2) ละลายนิวคลีโอไทด์สายยาวแต่ละสายด้วย TE Buffer ให้ความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครโมลาร์
  - (3) เจือจางนิวคลีโอไทด์สายยาวด้วย Nuclease-Free Water ให้ความเข้มข้นเป็น 10 ไมโครโมลาร์
  - (4) นำนิวคลีโอไทด์สายยาวที่เจือจางแล้วไปวัดความเข้มข้นที่  $A_{260}$  และปรับให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
  - (5) เตรียม Annealing Mixture ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3
- ตารางที่ 3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการ annealing สาย target mRNA

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Top-stranded oligonucleotide (10 $\mu$ M)	1
Bottom-stranded oligonucleotide (10 $\mu$ M)	1
Hybridization buffer	23
Total volume	25

## 2.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

- (1) เตรียมสารเคมีที่ใช้ตามตารางที่ 4

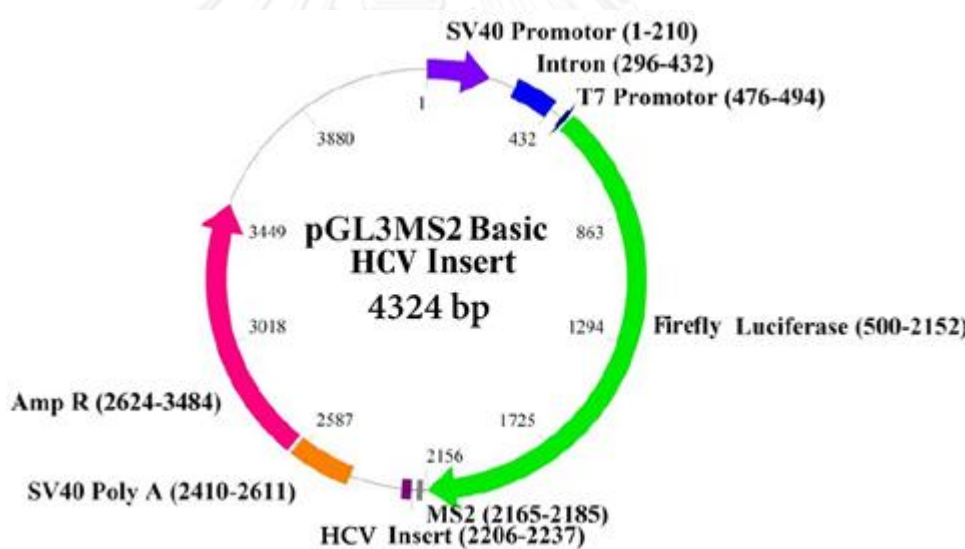
ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด reporter vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	Final concentration
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	14	-
pGL3MS2/Basic (100 ng/ $\mu$ l)	10	1000 ng
10X Buffer Tango <sup>TM</sup>	3	1X
XhoI (10 U/ $\mu$ l)	1	10 U
NheI (10 U/ $\mu$ l)	2	20 U
ปริมาตรรวม	30	-

- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- (3) หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- (4) ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% Low-melting temperature agarose gel และ ใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น Marker และนำมาสกัดดีเอ็นเอจากเจลโดยชุดสกัด HiYield™ Gel Extraction Kit

### 2.3 Ligation

- (1) เชื่อมส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจไปยังบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* (ตำแหน่งที่ 2201) และ *XhoI* (ตำแหน่งที่ 2216) ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 โครงสร้างของ pGL3MS2/Basic ที่มี target อยู่

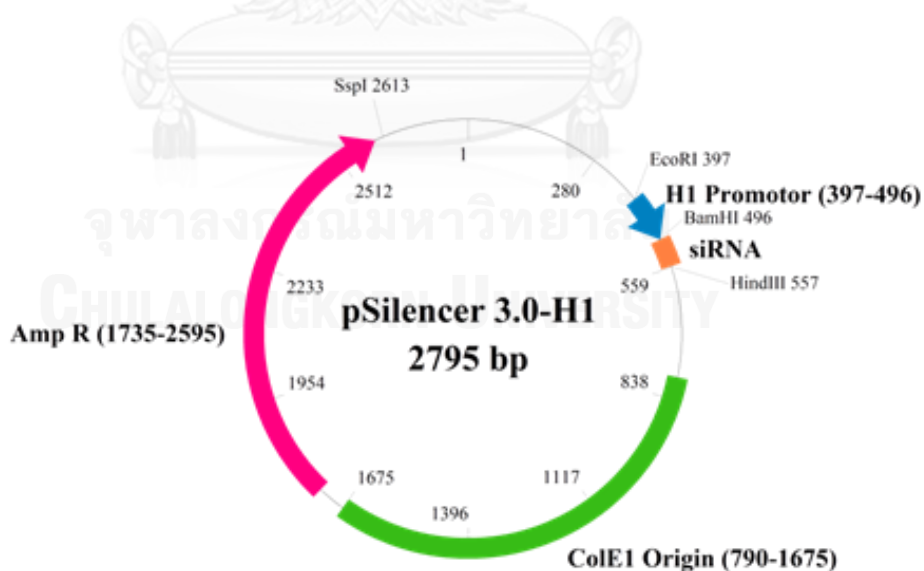
- (2) เตรียมสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ reporter vector

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	Final concentration
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	2	-
10X T4 DNA ligase Buffer	1	1X
Fermentus™ T4 DNA ligase (5U/μl)	1	5U
pGL3MS2/Basic (1μM)	1	1μM
Annealed HCV-5'UTR (1μM)	5	5μM
ปริมาตร	10	

### 3. การเตรียม miRNA expression vector

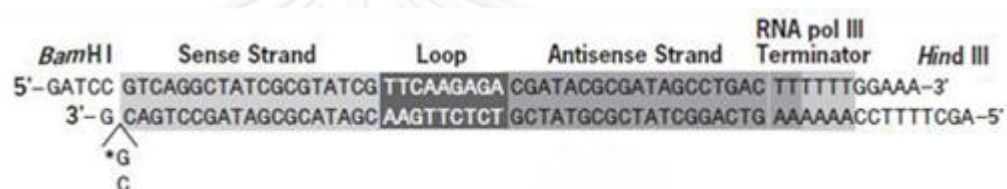
pSilencer 3.0-H1 ถูกใช้เป็น miRNA Expression Vector มี RNA polymerase III (pol III) promoters สำหรับให้ RNA pol III มาจับเพื่อเริ่มต้นการถอดรหัสสาย siRNA และมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อการ cloning สาย miRNA เข้าสู่ vector โดยมี ampicillin resistance gene เป็น selectable gene ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1

### 3.1 Oligonucleotide annealing

- (1) ออกแบบ miRNA ให้มีส่วนประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 15 ได้แก่ loop, sense strand คือเส้นที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาจาก mRNA target site, antisense strand คือเส้นที่มีเบสคู่สมกับเส้น sense strand, poly(T) ซึ่งเป็นตำแหน่งให้เอนไซม์ RNA pol III มาจับแล้วเริ่มปฏิบัติการสังเคราะห์ siRNA นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Bam*HI และ *Hind*III สำหรับการ cloning เข้าสู่ *pSilencer* ซึ่งใช้เป็น miRNA expression vector โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 15 แสดงตัวอย่างการออกแบบสาย miRNA [Ambion]

ตารางที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย miRNA

ชื่อ miRNA	ลำดับนิวคลีโอไทด์
hsa-miR-4645-3p_F	5' <u>GATCC</u> GAAACCAGGCAAGAAATATTGTCTCCTCAAGTTGCGACG AGACAGTAGTTCTTGCCTGGTTTCTTTTTTGGAAA 3'
hsa-miR-4645-3p_R	5' <u>AGCTTTT</u> CCAAAAAGAAACCAGGCAAGAACTACTGTCTCGTCG CAACTTGAGGAGACAATATTTCTTGCCTGGTTTCG 3'

\*ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ, อักษรตัวหนา แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ hsa-miR-4645-3p, อักษรตัวเอียง คือบริเวณที่เป็น loop

- (2) ละลายนิวคลีโอไทด์สายยาวแต่ละสายด้วย TE Buffer ให้ความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครโมลาร์
- (3) เจือจางนิวคลีโอไทด์สายยาวด้วย Nuclease-Free Water ให้ความเข้มข้นเป็น 10 ไมโครโมลาร์

- (4) วัดความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ที่  $A_{260}$  และปรับให้มีความเข้มข้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ด้วย TE buffer
- (5) เตรียม Annealing Mixture ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการ annealing สาย miRNA

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
Top-stranded oligonucleotide (10 $\mu$ M)	1
Bottom-stranded oligonucleotide (10 $\mu$ M)	1
Hybridization buffer	23
Total volume	25

- (6) บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง
- (7) เจือจางนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันแล้ว 10 เท่าใน Nuclease-Free Water

### 3.2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

- (1) เตรียมสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 8



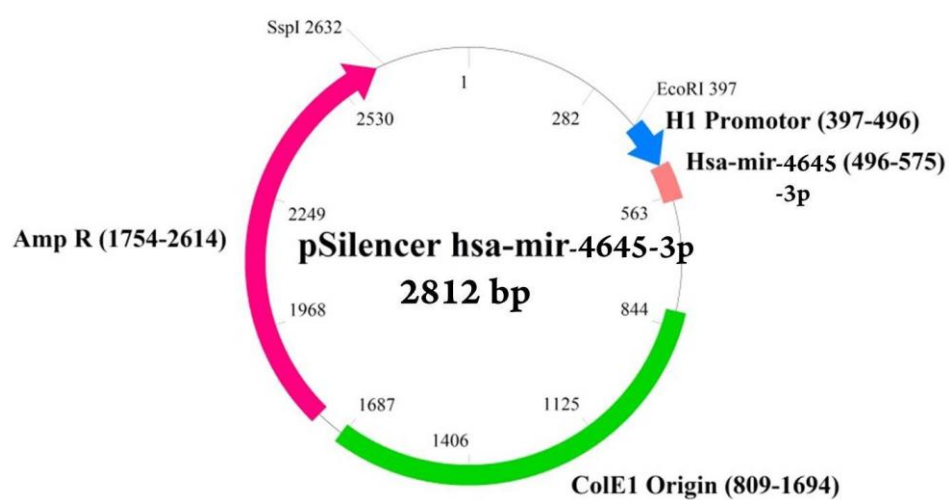
ตารางที่ 8 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการตัด miRNA expression vector

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	Final concentration
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	14	-
<i>pSilencer</i> 3.0-H1 (50 ng/ $\mu$ l)	10	1000 ng
10X Buffer Tango <sup>TM</sup>	3	1X
<i>Bam</i> HI (10 U/ $\mu$ l)	1	10 U
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu$ l)	2	20 U
ปริมาตรรวม	30	-

- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- (3) หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- (4) ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker และนำมาสกัดดีเอ็นเอจากเจลด้วยชุดสกัด HiYield<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit

## 3.3 Ligation

- (1) เชื่อมส่วนของ miRNA ที่สนใจไปยังบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (ตำแหน่งที่ 496) และ *Hind*III (ตำแหน่งที่ 557) ดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 ที่มี miRNA แทรกอยู่

- (2) เตรียมสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 7

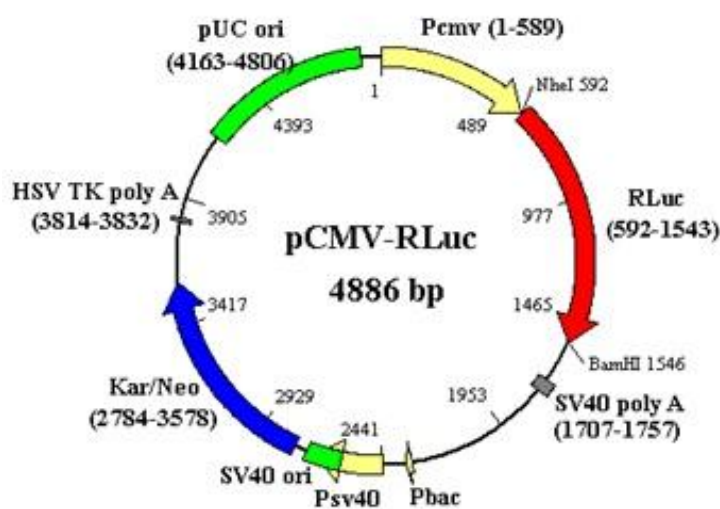
ตารางที่ 9 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมนิวคลีโอไทด์เข้ากับ miRNA expression vector

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	Final concentration
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	2	-
10X T4 DNA ligase Buffer	1	1X
Fermentus™ T4 DNA ligase (5U/μl)	1	5U
pSilencer 3.0-H1 (1μM)	1	1μM
Annealed hsa-miR-4645-3p (1μM)	5	5μM
ปริมาตร	10	

- (3) ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

#### 4. Control vector

Control Vector ที่ใช้คือ pCMV-RLuc ดังแสดงในรูปที่ 17 โดยมีพลาสมิด pCMV เป็น promoter มี kanamycin resistance gene เป็น selectable gene ภายในโครงสร้างของ vector ประกอบด้วยยีนที่สร้าง *Renilla luciferase* ซึ่งโดยส่วนมากจะใช้สัญญาณการแสดงออกของ *Renilla luciferase* เป็นตัว normalized กับ *Firefly luciferase* ในการวัดค่า Relative luciferase



รูปที่ 17 โครงสร้าง pCMV-RLuc ที่ใช้เป็น control vector

#### 5. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis

- (1) เตรียม 1% low-melting temperature agarose gel โดยชั่ง low-melting temperature agarose gel 1 กรัม ผสมกับ 1xTBE (5xTBE buffer; Tris-Base 54 กรัม, Boric Acid 27.5 กรัม, EDTA (pH 8.0) 4.16 กรัม )
- (2) นำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสเจลละลาย รอให้อุณหภูมิต่ำลงเล็กน้อย
- (3) เทอะกาโรสเจลที่อุ่นลงแล้วลงบนถาดเตรียมเจลที่ใส่หัวไว้แล้ว ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว
- (4) นำถาดที่มีอะกาโรสเจลใส่ลงไปใน chamber แล้วเติม 1xTBE ลงไปจนท่วมเจล
- (5) หยอดดีเอ็นเอที่ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (6x DNA loading dye) และ DNA Ladder ลงไปในแต่ละหลุมบนเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ประมาณ 50-60 นาที

- (6) นำ agarose gel บ่มใน Ethidium Bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วส่องด้วยเครื่อง Gel Documentation

## 6. วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (Gel Extraction) โดยชุดสกัด HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction kit

- (1) ตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- (2) เติม DF buffer 500 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ที่มีเจลอยู่ แล้วนำไป vortex
- (3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที จนกว่าอะกาโรสเจลจะละลายหมด โดยขณะที่บ่มเจลอยู่ให้กลับ microcentrifuge tube ไปมาทุกๆ 2-3 นาที
- (4) นำ DF column ใส่ลงใน collection tube นำสารละลายจาก ข้อ (3) ใส่ลงใน DF column
- (5) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- (6) เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง แล้วใส่ DF column กลับเข้าไปใหม่
- (7) เติม Wash Buffer (ที่เติม ethanol แล้ว) 600 ไมโครลิตร ลงใน DF column
- (8) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- (9) เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง แล้วใส่ DF column กลับเข้าไปใหม่
- (10) ทำซ้ำข้อที่ (7) - (9)
- (11) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- (12) นำ DF column ย้ายมาใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่
- (13) เติม elution buffer 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ DF column จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- (14) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- (15) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 7. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* โดยใช้ความร้อน (Transformation by heat shock)

- (1) นำ Competent cells ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ligation ปริมาณ 2 ไมโครลิตร นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที 2 นาที
- (3) เติม SOC Media (2% (w/v) Peptone, 0.55% (w/v) Yeast Extract, NaCl 10 มิลลิโมลาร์, KCl 10 มิลลิโมลาร์, MgCl<sub>2</sub> 10 มิลลิโมลาร์, MgSO<sub>4</sub> 10 มิลลิโมลาร์, Glucose 20 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 950 ไมโครลิตร และบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 90 นาที
- (4) ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที และเทส่วนใสออกเหลือประมาณ 50 ไมโครลิตร
- (5) ละลายตะกอนด้วยสารละลายที่เหลืออยู่ และนำมาเลี้ยงบน LB Agar ที่ผสม Ampicillin สำหรับ Reporter vector และ miRNA expression vector สำหรับ control vector เลี้ยงบน LB Agar ที่ผสม kanamycin
- (6) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- (7) นำโคลนที่ได้จากการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะผสมอยู่ โดยใช้ Ampicillin สำหรับ pGL3MS3/Basic และ pSilencer 3.0-H1 หรือ Kanamycin สำหรับ pMCV RLuc แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

## 8. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Real Genomic HiYield™ Plasmid Mini Kit

- (1) นำเชื้อที่บ่มไว้ในอาหารเหลว LB 16-18 ชั่วโมง ถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- (2) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
- (3) เติม PD1 Buffer (ที่เติม RNase แล้ว) 200 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- (4) เติม PD2 Buffer 200 ไมโครลิตร แล้วกลับ microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง (หลีกเลี่ยงการ vortex เพื่อป้องกันการสลายของสาย genomic DNA) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- (5) เติม PD3 Buffer 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที 10 ครั้ง (หลีกเลี่ยงการ vortex)
- (6) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- (7) เตรียม PD column ใส่ลงใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ดูดส่วนใสจาก microcentrifuge tube ใส่ลงใน PD column
- (8) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- (9) เทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (10) เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน PD column
- (11) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที
- (12) เทส่วนใสใน collection tube ทิ้งแล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (13) เติม wash buffer (ที่เติม ethanol แล้ว) 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column
- (14) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- (15) เทส่วนใสใน collection tube ทิ้ง แล้วใส่ PD column กลับเข้าไปใหม่
- (16) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- (17) ย้าย PD column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

## 9. การตรวจสอบพลาสמידด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

เพื่อตรวจสอบว่าภายในโครงสร้างของ vector มียีนที่เราสนใจแทรกอยู่หรือไม่หลังจากทำการ ligation

- (1) ใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 10 เพื่อเตรียมสารเคมีตามตารางที่ 11 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา (PCR condition) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 10 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด

พลาสมิด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
pGL3MS2/Basic	Luc_3F	CGTGGATTACGTCGCCAGTC	400
	SV40_R	TCTAGAGTTAACTTGTTTATTGCA	
pSilencer 3.0-H1	M13_F	GTTTTCCCAGTCACGAC	350
	pSilencer-H1_R	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	

ตารางที่ 11 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา

สารที่ใช้	ปริมาณ ( $\mu$ l)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer minus $Mg^{2+}$	2.5	1X
10mM dNTPs mixture each	0.5	0.2 mM
50mM $MgCl_2$	0.75	1.5 mM
Primer F (10 $\mu$ M)	1.25	0.5 $\mu$ M
Primer R (10 $\mu$ M)	1.25	0.5 $\mu$ M
Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.1	0.5 U
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	16.40	-
DNA template	1	-
Total	25	-

ตารางที่ 12 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

## 10. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

### 10.1 การเลี้ยงเซลล์

- (1) เมื่อมีเซลล์ปริมาณเต็ม flask เลี้ยงเซลล์ เท DMEM จากขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้ง
- (2) เติม PBS (Phosphate Buffered Saline) ให้พอท่วมเซลล์ แล้วเอียงขวดไปมา
- (3) ใส่ Trypsin (1X) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร หรือ 3 มิลลิลิตรในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร
- (4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 นาที
- (5) ตบเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของ flask แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเซลล์ยังหลุดไม่หมด นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วตบ flask จนเซลล์หลุดออกหมด
- (6) ดูดเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
- (7) เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม DMEM ประมาณ 10 มิลลิลิตรเพื่อละลายตะกอนเซลล์
- (8) ดูด cell suspension ประมาณ 2-5 มิลลิลิตร (จำนวนเซลล์ประมาณ 7 แสนเซลล์สำหรับ flask ขนาด T25 หรือ 2 ล้านเซลล์สำหรับ flask ขนาด T75) ใส่

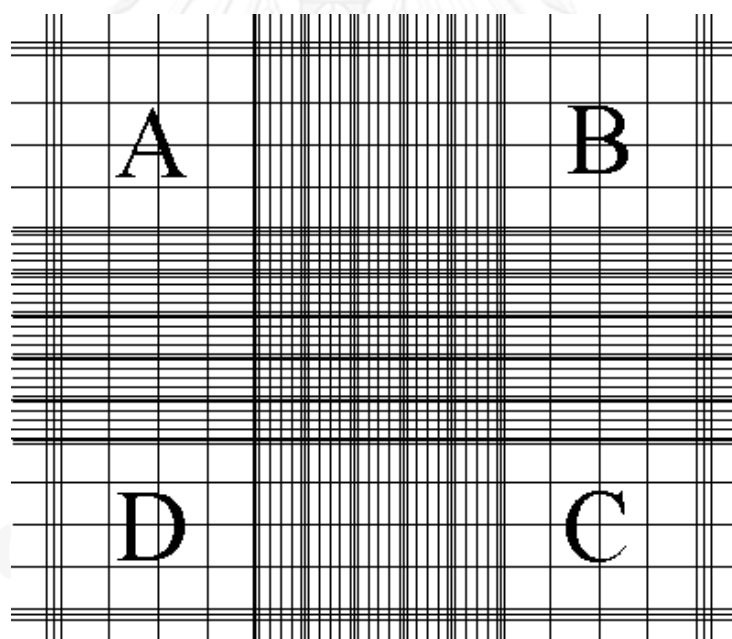


ในขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติม DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และ Antimicrotic antibiotic 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ให้มีปริมาตรเหมาะสม (ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร สำหรับ flask ขนาด T25 หรือ 10-20 สำหรับ flask ขนาด T75)

## 10.2 การนับปริมาณเซลล์ (Counting cells)

- (1) หลังจากที่ทำ การ passage cells ดูดสารละลายเซลล์ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Bromphenol Blue 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
- (2) นำเซลล์จากข้อ (1) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Hemacytometer จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในบริเวณทั้ง 4 ช่อง ดังรูปที่ 18 แล้วนำมาคำนวณตามสูตร

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



รูปที่ 18 แสดงตารางใน Hemacytometer(36)

### 10.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Seeding Cells)

หลังจากนับจำนวนเซลล์แล้วนำมาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน  $8 \times 10^3$  เซลล์ แล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate เติม DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 11. Transfection

- (1) ผสม Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตรลงใน Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium ใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร
- (2) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- (3) เจือจางความเข้มข้นพลาสมิดลงใน Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium แล้วผสมลงในส่วนของ Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent ดังนี้
  - a. pGL3MS2/Basic หรือ pGL3MS2/Basic HCV insert 100 นาโนกรัม,
  - b. pCMVRLuc 10 นาโนกรัม
  - c. pSilencer 3.0-H1 หรือ pSilencerFLuc หรือ pSilencer hsa-mir-4645-3p 50 นาโนกรัม
- (4) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-45 นาที
- (5) หยอดลงแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มี DMEM กับ FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีการเติม antibiotic

## 12. การเตรียม positive control สำหรับ Real time PCR

### 12.1 การเข้าคู่กันของลำดับนิวคลีโอไทด์

- (1) เตรียม annealing mixture ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมนิวคลีโอไทด์สำหรับเป็น positive control

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
T7C_miR_4645_3p (10 $\mu$ M)	4.35
Oligo T7 (10 $\mu$ M)	4.35
Nuclease-free water	1.3
Total	10

- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- (3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

## 12.2 *in vitro* transcription (RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7)

- (1) เตรียมสารดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ *in vitro* transcription

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
T7 transcription 5X buffer	4
rNTPs (25 mM ATP, CTP, GTP, UTP)	6
Linear DNA template (5-10 $\mu$ g total)	5
Plus nuclease-free water	3
Enzyme mix (T7)	2
Total	20

- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- (3) กำจัดสายดีเอ็นเอ (DNase treatment) โดยเติม RQ1 RNase free DNase 1 U/ 1  $\mu$ g ของสายดีเอ็นเอ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- (4) เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

### 13. การสกัดไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA extraction) ด้วยชุดสกัด microRNA Purification Kit)

- (1) เท DMEM ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทิ้ง
- (2) ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS
- (3) เติมสารละลาย Lysis Solution 100 ไมโครลิตร แล้วเคาะให้เซลล์หลุดจากผิว 96-well plate
- (4) ดูดใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- (5) เติม ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex 10 วินาที
- (6) เตรียม Large RNA Removal column ใส่ลงใน Collection tube
- (7) นำ lysate ผสมกับ ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ (5) ใส่ลง Large RNA Removal column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (8) ดูดส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- (9) เติม ethanol 96-100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 350 ไมโครลิตร นำไป vortex 10 นาที
- (10) เตรียม microRNA Enrichment column ใส่ลงใน Collection tube
- (11) นำ lysate ที่ผสมกับ ethanol ปริมาตรครึ่งหนึ่งของที่มีอยู่ ใส่ลง microRNA Enrichment column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (12) เทส่วนใสทิ้ง ดูด lysate ดูด lysate ที่ผสมกับ ethanol ที่เหลือใส่ลงใน microRNA Removal column
- (13) ทำซ้ำข้อ (11) และ (12) ตามลำดับ
- (14) เติม Wash Solution 400 ไมโครลิตร ลงใน microRNA Enrichment Column แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (15) เทส่วนใสทิ้ง แล้วใส่ microRNA Enrichment Column ใส่กลับลง Collection tube
- (16) ทำซ้ำข้อ (14) และ (15) ตามลำดับ
- (17) เติม Wash Solution 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- (18) เทส่วนใสทิ้ง ใส่ microRNA Enrichment Column กลับลงใน Collection tube
- (19) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
- (20) นำ microRNA Enrichment Column ใส่ลงในหลอด Elution tube ขนาด 1.7 มิลลิลิตร

- (21) ใส่ Elution buffer 30 ไมโครลิตร ลงใน microRNA Enrichment Column  
 (22) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ต่อด้วย 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที  
 (23) เก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

#### 14. การย่อยดีเอ็นเอ (DNase Treatment)

- (1) เตรียมสารเคมี ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการกำจัดดีเอ็นเอ

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

- (2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง  
 (3) ใส่ DNase Stop Solution ปริมาณ 10 ไมโครลิตร  
 (4) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 15. Polyuridylation

- (1) เติม UTP ที่บริเวณปลาย 3' ของอาร์เอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ Poly (U) Polymerase โดยเตรียมสารดังตารางที่ 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ polyuridylation

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอ (10 ng/ $\mu$ l)	2.5
10X NE Buffer 2	1.25
UTP (50 mM)	0.15
RNAse Inhibitor	0.5
Poly (U) Polymerase	0.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	8.1
ปริมาตรรวม	12.5

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

## 16. Reverse Transcription

(1) เตรียมสารเคมีดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ reverse transcription สำหรับ miRNA

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอ (10 ng/ $\mu$ l)	10
SL Poly A (ตารางที่ 18)	1
dNTP (10 mM)	1
ปริมาตรรวม	12

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

(3) บ่มที่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 1 นาที

(4) ใส่สารเคมี ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในกระบวนการ reverse transcription สำหรับ miRNA

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

- (5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- (6) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
- (7) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน
- (8) หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 17. การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค Real time PCR

- (1) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MicroRNA ดังแสดงในตารางที่ 18
- (2) หาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละยีนในการทำ real-time PCR
- (3) ใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 19 เพื่อเตรียมสารเคมีดังแสดงในตารางที่ 20 โดยอาศัยสภาวะของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 19 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ใน real-time PCR

ยีนเป้าหมาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
hsa-miR_4645_3p	miR_4645_3p_F	AGACAGTAGTCTTGCCTG
	miRNA_qPCR_R	GCAGGGTCCGAGGTATTC
	SL Poly A	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGA CTGGATACGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAVN

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการทำ real-time PCR

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X RBC ThermOne™ Real-Time PCR Premix	12.5	1X
Primer F (10 $\mu$ M)	0.75	0.3 $\mu$ M
Primer R (10 $\mu$ M)	0.75	0.3 $\mu$ M
cDNA	4	$\leq$ 500 ng
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	7	-
ปริมาตรรวม	25	

ตารางที่ 21 แสดงสถานะของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับ miRNA (real-time PCR condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	หมายเหตุ
Pre-denaturation	95	10 นาที	
Denaturation	95	15 วินาที	} 50 รอบ
Annealing	51	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Melting analysis	95	15 วินาที	
	60	1 นาที	
	95	15 วินาที	



### 18. การทดสอบ luciferase assay

- (1) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 96-well plate ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นดูด PBS ที่ทิ้ง
- (2) เติม 1X PLB ปริมาณ 20 ไมโครลิตร
- (3) เขย่า plate เบาๆ ประมาณ 15-20 นาที
- (4) เติม LARII 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate white opaque
- (5) ตั้งค่าเครื่อง Microplate reader เพื่อทำการวัด Luminescence
- (6) เติม PLB lysate 20 ไมโครลิตร, ผสมให้เข้ากัน
- (7) วัดค่า *Firefly* Luciferase Activity ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- (8) เติม Stop & Glow<sup>®</sup> ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- (9) วัด *Renilla* Luciferase Activity ที่ความยาวคลื่น 482 นาโนเมตร
- (10) หาค่า Relative Luciferase Activity โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Relative luciferase assay} = \frac{\text{FLuc expression}}{\text{RLuc expression}}$$

### 19. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยเลือก unpaired t-test เนื่องจากตัวแปร 2 กลุ่มเป็นอิสระต่อกัน จากเว็บไซต์ <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD> และ กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการหาบริเวณอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1-7



รูปที่ 19 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1-7

จาก whole genome ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ (~ 9.6 kb) เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเมนู ClustalW Multiple Alignment ในโปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) พบว่าบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์อยู่ประมาณตำแหน่งลำดับที่ 40—340 ซึ่งอยู่ในบริเวณ 5'UTR ของไวรัส (5' UTR ของไวรัสเริ่มตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1-338) ดังแสดงในรูปที่ 19

## 2. ผลการคัดเลือกไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีทั้ง 7 จีโนไทป์จากฐานข้อมูล miRBase และโปรแกรม RNAHybrid

เมื่อทำการวิเคราะห์หาไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์โดยการใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซี บริเวณอนุรักษ์ระหว่างจีโนไทป์ 1-7 โดยแบ่งความยาวเป็นท่อนๆละ 50 bp ซึ่งมี 25 bp ที่ overlap กัน ลงในฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Mature miRNAs ที่ได้จากฐานข้อมูล miRBase ดังแสดงในรูปที่ 20 ไปวิเคราะห์การเข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีด้วยโปรแกรม RNA Hybrid พบว่ามีไมโครอาร์เอ็นเอจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ hsa-miR-4645-3p และ hsa-miR-4658 ที่สามารถเข้าคู่กับไวรัสตับอักเสบซีตามรูปแบบของ Brennecke และคณะ ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงการเข้าคู่กันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์และไวรัสตับอักเสบซี

Human miRNAs	Gene Position *	Hybridization	MFE (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-4645-3p	5'UTR 45-65	target 5' CU G 3' CC GU AGGAACUACUGUCU GG CG UUCUUGAUGACAGA miRNA 3' UU UC 5'	-28.8	5'canonical
hsa-miR-4658	5'UTR 115-134	target 5' G C C C C G 3' CCUCCAGGA CC C CUC C GGAGGUCCU GG G GAG G miRNA 3' UAA A U U U 5'	-29.5	3'compensatory

\* หมายเหตุ ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์เทียบจาก Accession No. [genotype 6d]

จากนั้นทำการคัดเลือกไมโครอาร์เอ็นเอที่จะนำมาใช้ในการทดลองโดยในงานวิจัยนี้เลือก hsa-miR-4645-3p เนื่องจากมีรูปแบบการจับแบบ 5' canonical ซึ่งเป็นรูปแบบการจับที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดของไมโครอาร์เอ็นเอ

### 3. ผลการสร้าง vectors

#### 3.1 Reporter vector

ตารางที่ 23 แสดงนิวคลีโอไทด์สายยาวของยีนที่สนใจ (HCV-5' UTR)

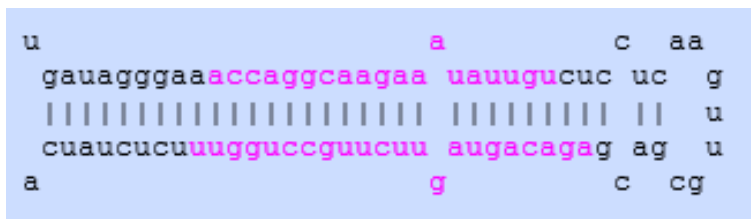
ตำแหน่ง	นิวคลีโอไทด์สายยาว
45-65	TS 5'-CTAGCCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGC-3' BS 3'-GGTGAGGGGACACTCCTTGATGACAGAAGTGCAGCT-5'

(ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ แสดงตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ, ตัวเอียง แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มจากส่วนที่ไม่โครอาร์เอ็นเอสามารถเข้าคู่ได้, ตัวหนา แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่โครอาร์เอ็นเอสามารถเข้าคู่ได้)

จากตารางที่ 23 ตำแหน่งที่สนใจคือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 45-65 ซึ่งเป็นบริเวณ 5' UTR ของไวรัสตับอักเสบซีทั้งสามจีโนไทป์ โดยตำแหน่งนี้มีไมโครอาร์เอ็นเอ hsa-miR-4645-3p ที่สามารถไปเข้าคู่ได้ สำหรับการทดลองนี้ได้มีการออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวของไวรัสตับอักเสบซีในบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของทั้ง 3 จีโนไทป์ และกำหนดให้มีตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *XhoI* และ *NheI*

#### 3.2 miRNA expression vector

ไมโครอาร์เอ็นเอที่เลือกมาคือ hsa-miR-4645-3p เนื่องจากเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่สามารถเข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ 1a, 3a และ 6 บนยีนที่สนใจได้ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวของไมโครอาร์เอ็นเอที่เป็นสาย mature miRNA ดังรูป มาออกแบบโดยอาศัยการออกแบบจาก Instruction Manual ของ pSilencer™ siRNA Expression Vectors (Ambion) ดังนั้นขั้นต่อไปจะทำการพิสูจน์ว่าไมโครอาร์เอ็นเอสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สนใจได้หรือไม่ โดยทำการ cloning HCV-5' UTR เข้า pGL3MS2/Basic และ hsa-miR-4645-3p เข้า pSilencer 3.0-H1



รูปที่ 20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ mature miRNA ของ hsa-miR-4645-3p

#### 4. การตัดต่อเข้าพลาสมิด (Plasmid Construction)

##### 4.1 การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

##### 4.1.1 การตัด pGL3MS2/Basic (Report vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากเพิ่มจำนวนพลาสมิด pGL3MS2/Basic (35) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 เอนไซม์ (Double digestion) ได้แก่ *XhoI* และ *NheI* ดังตารางที่ 4 ตามบทที่ 3 ในวิธีการทดลอง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1Kb DNA Ladder เป็น Marker ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดประมาณ 4200 bp

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

หลังจากเพิ่มจำนวนพลาสมิด pSilencer 3.0-H1 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ตำแหน่งที่ 496) และ *HindIII* (ตำแหน่งที่ 557) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% low-melting temperature agarose gel และใช้ 1Kb DNA Ladder เป็น Marker แล้วได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 2,700 bp

##### 4.1.3 การตัด pCMVRLuc (Internal control vector) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

pCMVRLuc ที่นำมาใช้เป็น Internal control vector มาจากพลาสมิดตั้งต้น pCMVRLuc NP จึงต้องนำมาตัดเพื่อนำยีน NP ออก ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* พบว่าได้ขนาดผลิตภัณฑ์ 2 ขนาด ได้แก่ขนาดประมาณ 5,000 bp คือ pCMVRLuc ที่ต้องการ และขนาดประมาณ 700 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีน NP

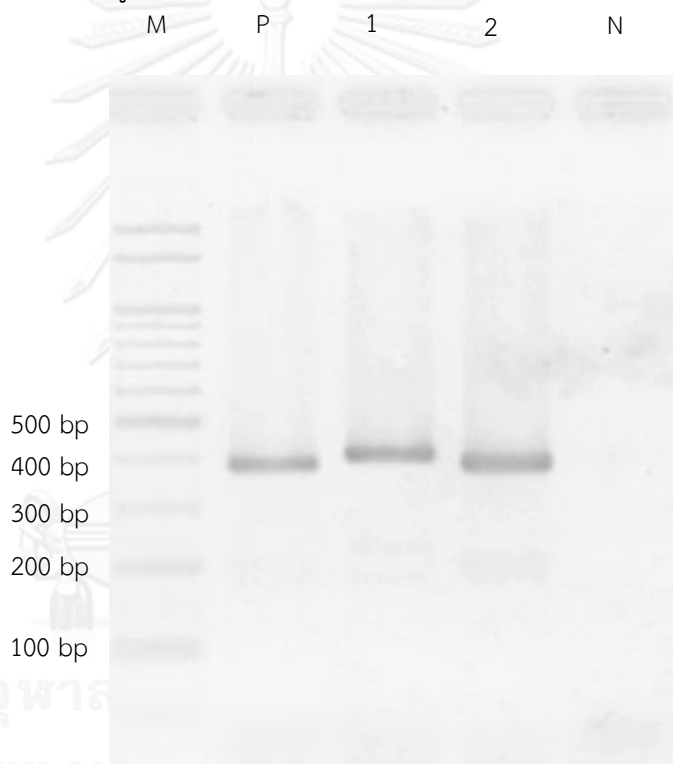
##### 4.2 ผลการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิด (Plasmid construction)

##### 4.2.1 Reporter vector

เมื่อทำการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจกับพลาสมิด pGL3MS2/Basic ในบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XhoI* แล้ว

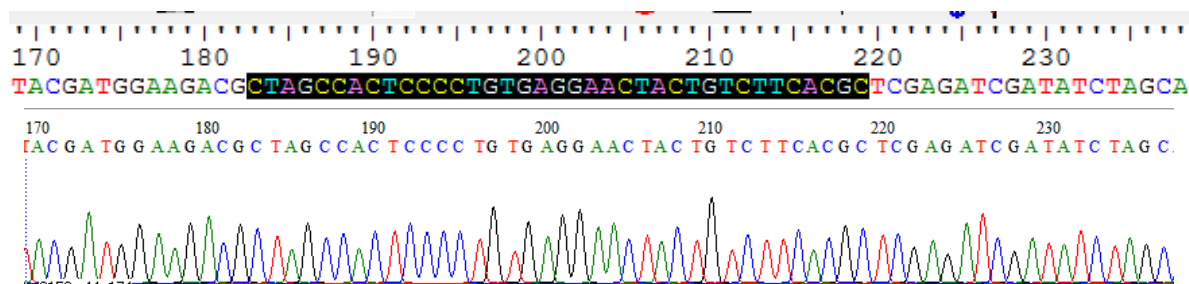
นำมาโอนถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ความร้อน (Heat shock) หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคลนที่ขึ้นบนอาหารแข็ง LB จึงนำโคลนนี้มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จากนั้นนำพลาสมิดที่มียีนที่สนใจมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี HiYield™ Plasmid Mini Kit และตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ Luc3\_F เป็น forward primer และSV40\_R เป็น reverse primer เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดประมาณ 400 bp ดังโคลนที่ 1 ในรูปที่ 21



รูปที่ 21 การตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ Luc3\_F และ SV40\_R primer โดย M; Marker, P; Positive control, 1; clone 1, 2; clone 2, Negative

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ขนาดตามที่ต้องการ แล้วนำพลาสมิดที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ไปตรวจสอบต่อยด้วยเทคนิค nucleotide sequencing เพื่อเป็นการยืนยันผล ดังรูปที่ 22 จากผลพบว่าใน pGL3MS2 มีชิ้นส่วนของ HVC-5' UTR แทรกอยู่ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้อง

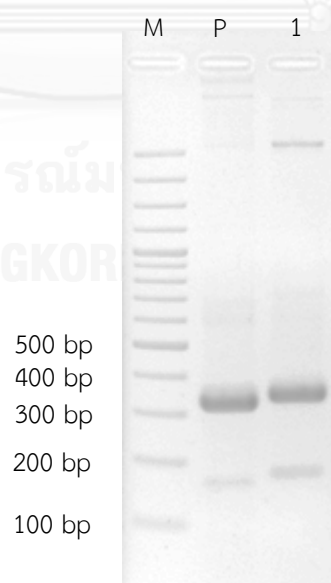


รูปที่ 22 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic HCV-5'UTR

#### 4.2.2 miRNA expression vector

hsa-miR-4645-3p จะถูกนำมาเชื่อมกับ miRNA expression vector ในบริเวณที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำมาโอนถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* โดยใช้ความร้อน (Heat shock) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีขึ้น นำโคโลนีไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธีเดียวกัน

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



รูปที่ 23 แสดงการตรวจสอบพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูซิเฟอเรสโดยใช้ M13\_F และ pSilencer-H1\_R primer โดย M; Marker, P; Positive control, 1; clone 1



จากรูปที่ 23 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโคลนีนีมีขนาดประมาณ 350 bp ซึ่งคาดว่าในพลาสมิดน่าจะมี hsa-miR-4645-3p อยู่ แต่ขนาดที่ได้มีความใกล้เคียงกับ pSilencer 3.0-H1 มาก เนื่องจากไมโครอาร์เอ็นเอที่ออกแบบมีความยาวเพียง 80 bp จึงต้องอาศัยการตรวจสอบเพื่อยืนยันด้วยเทคนิค sequencing (1<sup>st</sup> BASE) ดังรูปที่ 24 พบว่า pSilencer มี hsa-miR-4645-3p แทรกอยู่



รูปที่ 24 Chromatogram แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer hsa-miR-4645-3p

#### 5. การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs โดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR

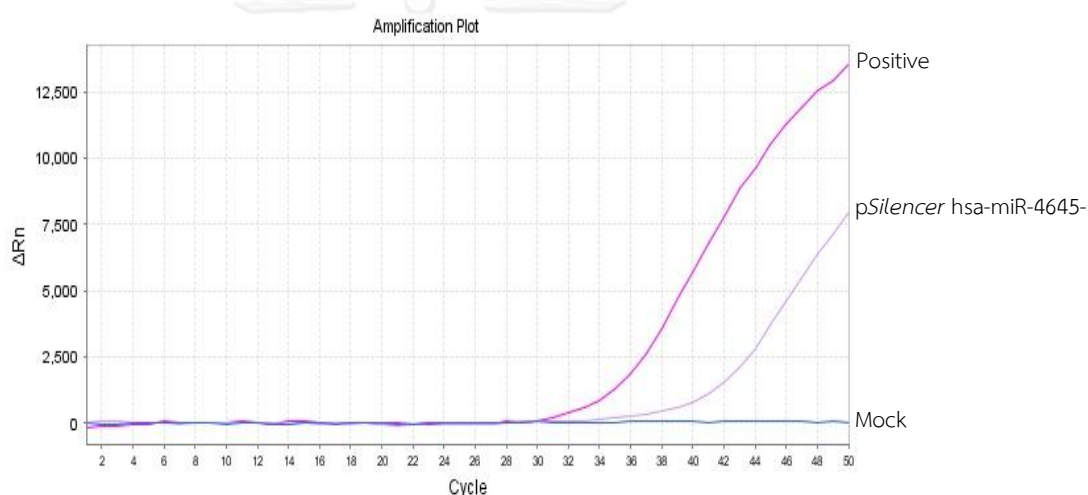
ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96-well plate หลุมละ  $8 \times 10^3$  เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ transfection พลาสมิด ด้วย Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 โดยใช้ความเข้มข้นพลาสมิดแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดที่ทำการ transfection

กลุ่มที่	ความเข้มข้นพลาสมิด (ng/ $\mu$ l)	
	positive	pSilencer hsa-miR-4645-3p
mock	-	-
positive	50	-
hsa-miR-4645-3p-transfected cells	-	50



หลังจากเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ทำการวัดระดับการแสดงออกของ miRNA ภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ทำการ transfection miRNA โดยอาศัยเทคนิคของ Mei และคณะในปี 2012 (34) ซึ่งใช้ universal poly(A) stem loop RT primers หรือ SL poly(A) เป็นไพรเมอร์สำหรับการทำ reverse transcription และวัดการแสดงออกในระดับ cDNA โดยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ที่ไม่ได้ทำการ transfection (mock) ไม่มีการแสดงออกของ hsa-miR-4645-3p เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pSilencer hsa-miR-4645-3p 50 ng/ $\mu$ l ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs ภายในเซลล์ โดยเทคนิค RT-qPCR

## 6. การทดสอบ Luciferase Assay

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน 96-well plate หลุมละ  $8 \times 10^3$  เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการ transfection พลาสมิด ด้วย Lipofectamine<sup>®</sup>2000 โดยใช้ความเข้มข้นพลาสมิดแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้ในการ transfection

กลุ่มที่	ความเข้มข้นของเวกเตอร์ (ng/ $\mu$ l)						ปริมาตรรวม
	pGL3MS2/Basic	pGL3MS2/Basic HCV insert	pCMV Rluc	pSilencer 3.0-H1	pSilencer Fluc	pSilencer hsa-miR-4645-3p	
1	100	-	10	50	-	-	160
2	100	-	10	-	50	-	160
3	-	100	10	50	-	-	160
4	-	100	10	-	50	-	160
5	-	100	10	-	-	50	160

เมื่อเวลาผ่านไปครบ 72 ชั่วโมง จะทำการเก็บเซลล์ที่ผ่านการ transfection แล้ว ด้วย 1x PLB ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Luciferase assay ซึ่งวัดค่า firefly luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และค่า renilla luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำมาหาค่า Relative luciferase activity

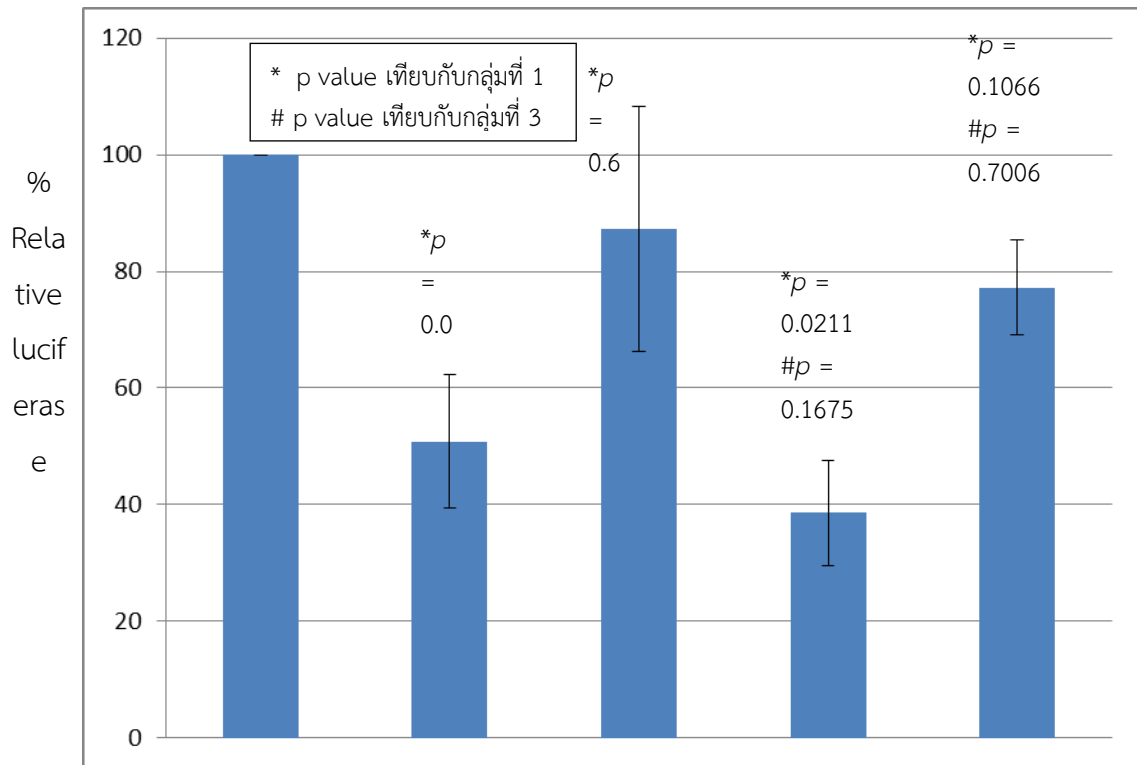
จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 26 กำหนดให้เซลล์ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งผ่านการ Transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0 H1 มีค่า Relative luciferase activity เป็น 100 เปอร์เซนต์ พบว่า

เซลล์ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งผ่านการ Transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic, และ pSilencerFLuc มีการแสดงออกของยีน Luciferase ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0497$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มที่ 1

สัญญาณ Relative luciferase ของเซลล์กลุ่มที่ 3 ซึ่งผ่านการ transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic HCV insert และ pSilencer 3.0-H1 ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.6042$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 เนื่องจาก ไม่มี endogenous miRNA จึงสามารถใช้กลุ่มนี้เป็นค่าพื้นฐานในการเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มต่างๆได้ เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน Luciferase ของเซลล์ในกลุ่มที่ 4 ที่ผ่านการ Transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic HCV Insert และ pSilencer FLuc ซึ่งมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.0211$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านการ Transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic และ pSilencer 3.0 H1 ในกลุ่มที่ 1 แต่ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.1675$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านการ Transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic HCV และ pSilencer 3.0 H1 ในกลุ่มที่ 3

สำหรับเซลล์ในกลุ่มที่ 5 ผ่านการ transfection ด้วย pCMVRLuc, pGL3MS2/Basic HCV Insert และ pSilencer hsa-miR-4645-3p มีค่าเปอร์เซ็นต์ของ Relative luciferase ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.1066$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ เซลล์ในกลุ่มที่ 1 และมีค่าลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.7066$ ) เช่นเดียวกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 3



	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5
pGL3MS2/Basic	+	+	-	-	-
pGL3MS2/Basic HCV insert	-	-	+	+	+
pSilencer 3.0-H1	+	-	+	-	-
pSilencer hsa-miR-4645-3p	-	-	-	-	+
pSilencer FLuc	-	+	-	+	-

รูปที่ 26 แสดงเปอร์เซ็นต์ Relative Luciferase Activity เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

#### การคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาทำการศึกษา

การคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีทั้ง 7 จีโนมป์ ได้คัดเลือก accession No. ดังแสดงในตารางที่ 1 เป็นตัวแทนของแต่ละจีโนมป์ในการศึกษา เนื่องจากเป็น accession No. ของไวรัสตับอักเสบบีที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (37-39) โดยบริเวณที่สนใจนำมาทำการศึกษาคือ บริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของไวรัสทั้ง 7 จีโนมป์ เพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอที่มีผลต่อไวรัสทั้ง 7 จีโนมป์ แล้วนำมาทำการแบ่งลำดับ

นิวคลีโอไทด์ออกเป็นท่อน ให้มีความยาวท่อนละ 50 bp โดยมี 25 bp ที่ overlap กัน เนื่องจาก mature miRNA มีความยาวประมาณ 21-23 bp ทำให้ได้บริเวณที่เลือกมาทำการศึกษาในครั้งนี้คือ (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 45-65 จัดอยู่ใน 5' UTR ของไวรัส ซึ่งยังไม่พบว่ามีการศึกษาในตำแหน่งนี้มาก่อน

#### การทำนายไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

จากการทำนายการเข้าคู่กันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) และยีนเป้าหมาย (target mRNA) ที่ผ่านมาพบว่ามีหลายโปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา เช่น miRanda, TargetScan เป็นต้น แต่การทำนายด้วยโปรแกรมเหล่านี้พบว่ามีความผิดพลาด (false positive) เกิดขึ้น (40, 41) ดังนั้นในการทำนายรูปแบบการเข้าคู่ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) และ ยีนเป้าหมาย (target mRNA) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการใช้โปรแกรมทาง bioinformatics 2 โปรแกรม ได้แก่ miRBase ซึ่งเป็นฐานข้อมูลออนไลน์ ที่มีหลักการในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโครอาร์เอ็นเอซึ่งมีในฐานข้อมูลที่มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่เราสนใจ ร่วมกับการใช้ RNA hybrid ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ทำนายลักษณะการเข้าคู่ของไมโครอาร์เอ็นเอและยีนเป้าหมายโดยอาศัย รูปแบบการเข้าคู่ และ minimum free energy (MFE) ซึ่งทำให้การศึกษาในครั้งนี้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

จากการทำนายรูปแบบในการเข้าคู่ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) และยีนเป้าหมาย (target mRNA) ของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณ 5' UTR ทั้ง 7 จีโนมป์ โดยใช้ RNA hybrid พบว่า มีไมโครอาร์เอ็นเอสองตัวที่สามารถเข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ตามการศึกษาของ Brennecke และคณะ ซึ่งประกอบไปด้วยรูปแบบ 5' canonical, 5' seed และ 3' compensatory (21) ได้แก่ hsa-miR-4645-3p ซึ่งมีรูปแบบการเข้าคู่แบบ 5' canonical มีค่า MFE -28.8 kcal/mol และ hsa-miR-4658 ซึ่งเข้าคู่กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5' UTR ของไวรัสตับอักเสบบีแบบ 3' compensatory มีค่า MFE -29.5 kcal/mol โดยค่า cut-off ของ MFE ที่ใช้ในการคัดเลือกการเข้าคู่

ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอและยีนเป้าหมายที่มีประสิทธิภาพ มีค่าเท่ากับ  $-17.5$  kcal/mol (42) ดังนั้นจึงได้มีการเลือก hsa-miR-4645-3p มาทำการศึกษาต่อไปเนื่องจากเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่มีการเข้าคู่กับยีนเป้าหมายในรูปแบบ 5'canonical ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งมีการวิเคราะห์รูปแบบการเข้าคู่ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอและยีนเป้าหมายโดยใช้โปรแกรมที่แตกต่างออกไป และเป็นการวิเคราะห์เฉพาะจีโนมทั้งจีโนมหนึ่ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงรูปแบบการเข้าคู่และค่าพลังงาน MFE จากการศึกษาก่อนหน้านี้

miRAN	pattern	Program	MFE (kcal/mol)	Ref
hsa-miR-122a	5'canonical	miRanda, Target scan	-14.30 -20.10	(42, 43)
hsa-miR-122a	5'canonical	miRanda, Target scan	-15.70 -24.10	(42, 43)

#### การทดสอบ hsa-miR-4645-3p ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน

การวัดการแสดงออกของยีน luciferase ที่ใช้ทำการศึกษาเป็นการวัดโดยใช้เทคนิค Dual-luciferase assay ซึ่งเป็นการวัดการแสดงออกของยีน Firefly luciferase โดยมียีน *Renilla luciferase* เป็นตัว normalized ซึ่งข้อดีของการวัดด้วยระบบ Dual-luciferase assay [Promega] คือค่าที่ได้จะเป็นค่าการวัดของแต่ละตัวอย่างอย่างแท้จริง เนื่องจากผ่านการ normalized ด้วย control จึงทำให้ลดความแปรปรวน และเพิ่มความน่าเชื่อถือของการทดลอง (44) โดย Reporter vector ที่นำมาใช้ในการศึกษาคั้งนี้คือ pGL3MS2/basic ซึ่งโครงสร้างประกอบด้วย Firefly (*Photinus pyralis*) luciferase เป็น reporter gene (45) ที่ใช้สำหรับวัดการแสดงออกเมื่อทำการ transfection เข้าไปในเซลล์ HepG2 cell ได้ และใช้ pCMVRLuc เป็น control vector เพราะในโครงสร้างประกอบด้วยยีน *Renilla luciferase* เป็น reporter gene เพื่อใช้เป็นตัว normalized กับการแสดงออกของ Firefly luciferase

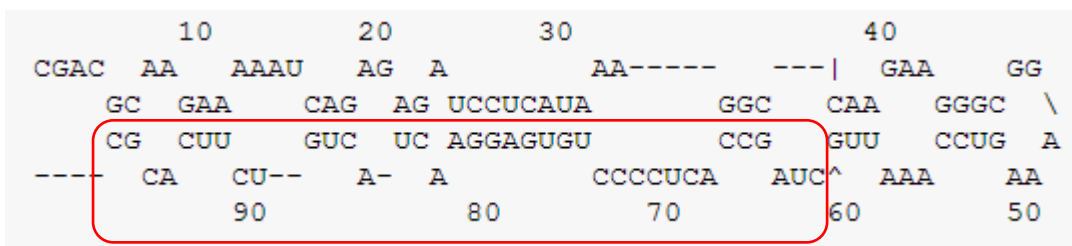
การ transfection มีหลายวิธีการ ได้แก่ polycations (46), calcium phosphate (47, 48), protoplast fusion (49), electroporation (50), microinjection (51), และ retroviruses

(52) แต่วิธีเหล่านี้ยังมีข้อเสีย เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์, เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากในการทำ, ให้ประสิทธิภาพต่ำและไม่คงที่ในแต่ละครั้งที่ทำการ transfection ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธี Lipofection ซึ่งเป็นวิธีการพาดีเอ็นเอเข้าเซลล์โดยนำดีเอ็นเอเข้าไปใน cationic lipid ได้เป็นอนุภาค liposome หลังจากนั้นจะไปรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วส่งดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีประสิทธิภาพสูง และนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (53)

ภายในเซลล์ HepG2 ที่นำมาศึกษาไม่พบการแสดงออกของ hsa-miR-4645-3p ภายในเซลล์ (endogenous miRNA) แต่เมื่อทำการ transfection เพื่อนำ miRNA expression vector เข้าไป พบว่า hsa-miR-4645-3p สามารถแสดงออกได้ภายในเซลล์นี้ พิสูจน์ได้จากการทำ Real-time PCR ดังแสดงในรูปที่ 25 จึงสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยต่อได้ จากการศึกษา microRNA profile ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1 และ 3 (12) และในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh 7.5 ที่มีการ infection ด้วย ไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์ 2a (54) พบว่า hsa-miR-4645-3p ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เนื่องจากระดับของไมโครอาร์เอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนติดเชื้อและหลังติดเชื้อไวรัส

เซลล์กลุ่มที่ผ่านการ transfection ด้วย pSilencer FLuc ได้แก่กลุ่มที่ 2 และ 4 สัญญาณ luciferase มีค่าลดลง เนื่องจาก pSilencer FLuc สร้าง shRNA ที่จะถูกตัดด้วย Dicer ภายในเซลล์ กลายเป็น siRNA ที่มีความจำเพาะในการยับยั้งการแสดงออก (gene silencing) ของยีน FLuc นอกจากนี้ผลการทดลองในกลุ่มที่ 4 ยังเป็นการแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีไปยังบริเวณ 3'-UTR ของยีน luciferase ไม่มีผลต่อการทำงานของ siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly luciferase นอกจากนี้ผลการทดลองข้างต้นพบว่า hsa-miR-4645-3p ที่มีการเข้าคู่กับ mRNA เป้าหมายของไวรัสแบบ 5' canonical ซึ่งเป็นการเข้าคู่แบบไม่สมบูรณ์ (partial complementary) ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) ได้ตามสมมติฐานที่ตั้งไว้

เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA (Firefly luciferase ที่มียีนของไวรัสตับอักเสบบีต่ออยู่ทางด้าน 3') โดยใช้โปรแกรม RNA folding form ใน The mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีที่ต่อกับยีนของ Firefly luciferase เกิดการเข้าคู่กัน ดังแสดงในรูปที่ 27 และมีค่าพลังงาน  $\Delta G = -23.10$  kcal/mol ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การเข้าคู่กันเองระหว่าง นิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีและยีนของ Firefly luciferase ทำให้ hsa-miR-4645-3p ไม่สามารถเข้าไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ เป็นผลให้ไม่เกิดกระบวนการ gene silencing จึงทำให้สัญญาณ Luciferase ไม่ลดลง



รูปที่ 27 แสดงผล RNA folding แสดงการเข้าคู่กันระหว่าง Firefly luciferase และ ยีนของไวรัสตับอักเสบบี โดยภายในกรอบคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี

ในการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ามีไมโครอาร์เอ็นเอที่สามารถยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้ เช่น hsa-miR-3065-3p ซึ่งไปยับยั้งยีน GP1 (ซึ่งตรงกับตำแหน่งในโปรตีนส่วนโครงสร้าง E2) ของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1 (29), การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1b โดย miR-130a (55) เป็นต้น แต่การศึกษาข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอกับไวรัสตับอักเสบบีเฉพาะจีโนไทป์เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากวัตถุประสงค์ของผู้วิจัย ที่ต้องการศึกษาผลการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอกับไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์

โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้ทำนายไมโครอาร์เอ็นเอภายในเซลล์ของมนุษย์ที่สามารถจับกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหลายจีโนไทป์ได้ ได้แก่ hsa-miR-4645-3p และ hsa-miR-4658 จากนั้นได้ทำการทดสอบ hsa-miR-4645-3p ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) พบว่า hsa-miR-4645-3p ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจากยีน Firefly luciferase เกิดการเข้าคู่กับยีนของไวรัสตับอักเสบบี ทำให้ hsa-miR-4645-3p ไม่สามารถเข้าไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ เป็นผลให้ไม่เกิดกระบวนการ gene silencing จึงทำให้สัญญาณ Luciferase ไม่ลดลง ดังนั้นหากต้องการศึกษาต่อในอนาคตเพื่อทดสอบ hsa-miR-4645-3p ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนของไวรัสตับอักเสบบี ควรเปลี่ยนไปใช้ reporter gene อื่น ๆ เช่น Green Fluorescent Protein (GFP), *Renilla luciferase* RLuc ที่ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะไปเข้าคู่กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้อาจนำ hsa-miR-4658 ซึ่งเป็นไมโครอาร์เอ็นเออีกหนึ่งตัวที่ผู้วิจัยทำนายได้จากการใช้ Bioinformatics มาทำการศึกษาเพิ่มเติม



## รายการอ้างอิง

1. Tang E. Hepatitis C virus. A review. *The Western journal of medicine.* 1991;155(2):164-8.
2. Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2001;44(2):159-82.
3. Song Y, Friebe P, Tzima E, Junemann C, Bartenschlager R, Niepmann M. The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site. *Journal of virology.* 2006;80(23):11579-88.
4. Tan SL, Pause A, Shi Y, Sonenberg N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nature reviews Drug discovery.* 2002;1(11):867-81.
5. Nakatani SM, Santos CA, Riediger IN, Krieger MA, Duarte CA, do Carmo Debur M, et al. Comparative performance evaluation of hepatitis C virus genotyping based on the 5' untranslated region versus partial sequencing of the NS5B region of brazilian patients with chronic hepatitis C. *Virology journal.* 2011;8:459.
6. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *International reviews of immunology.* 2008;27(6):497-517.
7. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine.* 2001;345(1):41-52.
8. Cenci M, Massi M, Alderisio M, De Soccio G, Recchia O. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) genotypes and increase of type 4 in central Italy: an update and report of a new method of HCV genotyping. *Anticancer research.* 2007;27(2):1219-22.
9. Kamal SM, Nasser IA. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology.* 2008;47(4):1371-83.
10. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *International journal of medical sciences.* 2006;3(2):41-6.
11. Akkarathamrongsin S, Praianantathavorn K, Hacharoen N, Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Tanaka Y, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotype 6 subtypes in Thailand. *Journal of medical virology.* 2010;82(2):257-62.

12. Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M, Ravishankar B, Khaja MN, Das S. Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Scientific reports*. 2013;3:1555.
13. Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *Journal of virology*. 2010;84(13):6615-25.
14. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*. 2006;55(9):1350-9.
15. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*. 2007;26(3):775-83.
16. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(12):1097-101.
17. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods in molecular biology*. 2006;342:33-47.
18. Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14(4):236-40.
19. Kumar A. MicroRNA in HCV infection and liver cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1809(11-12):694-9.
20. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic science international*. 2010;203(1-3):106-11.
21. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. 2005;3(3):e85.
22. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*. 2005;308(5721):557-60.
23. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, et al. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*. 2007;27(1):123-34.
24. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*. 2005;435(7042):682-6.
25. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*. 2005;2(4):269-76.

26. Omoto S, Ito M, Tsutsumi Y, Ichikawa Y, Okuyama H, Brisibe EA, et al. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology*. 2004;1:44.
27. Lo AK, To KF, Lo KW, Lung RW, Hui JW, Liao G, et al. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(41):16164-9.
28. Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Bukh J. MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):4991-6.
29. Khokhar A, Noorali S, Sheraz M, Mahalingham K, Pace DG, Khanani MR, et al. Computational analysis to predict functional role of hsa-miR-3065-3p as an antiviral therapeutic agent for treatment of triple infections: HCV, HIV-1, and HBV. *The Libyan journal of medicine*. 2012;7:19774.
30. [cited 2014]. Available from:  
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
31. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):209-19.
32. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003;299(5612):1540.
33. Liang RQ, Li W, Li Y, Tan CY, Li JX, Jin YX, et al. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic acids research*. 2005;33(2):e17.
34. Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PloS one*. 2012;7(10):e46890.
35. Rackham O, Brown CM. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *The EMBO journal*. 2004;23(16):3346-55.
36. [cited 2014]. Available from:  
<http://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/Haemocytometer.htm>.
37. Giangaspero M, Harasawa R, Zanetti A. Taxonomy of genus Hepacivirus. Application of palindromic nucleotide substitutions for the determination of genotypes of human hepatitis C virus species. *Journal of virological methods*. 2008;153(2):280-99.

38. Noppornpanth S, Poovorawan Y, Lien TX, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL. Complete genome analysis of hepatitis C virus subtypes 6t and 6u. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 5):1276-81.
39. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
40. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nature genetics*. 2006;38 Suppl:S8-13.
41. Yue D, Liu H, Huang Y. Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Current genomics*. 2009;10(7):478-92.
42. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.
43. Hsu PW, Lin LZ, Hsu SD, Hsu JB, Huang HD. ViTa: prediction of host microRNAs targets on viruses. *Nucleic acids research*. 2007;35(Database issue):D381-5.
44. Trista Schagat APaKK. Normalizing Genetic Reporter Assays: Approaches and Considerations for Increasing Consistency and Statistical Significance. *CELL NOTES*. 2077(17):4.
45. คล้ายพึ่งสินธุ์ อ. การตรวจสอบ microRNAs ของเซลล์ที่จำเพาะกับยีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ A-J. 2555.
46. Kawai S, Nishizawa M. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and cellular biology*. 1984;4(6):1172-4.
47. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973;52(2):456-67.
48. Loyer A, Scangos GA, Ruddle FH. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(2):422-6.
49. Schaffner W. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(4):2163-7.
50. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*. 1982;1(7):841-5.

51. Schlegel R, Lieber M. Microinjection of Culture Cells via Fusion with Loaded Erythrocytes. In: Sowers A, editor. *Cell Fusion*: Springer US; 1987. p. 457-78.
52. Cepko CL, Roberts BE, Mulligan RC. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*. 1984;37(3):1053-62.
53. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(21):7413-7.
54. Zhang X, Daucher M, Armistead D, Russell R, Kottlilil S. MicroRNA expression profiling in HCV-infected human hepatoma cells identifies potential anti-viral targets induced by interferon-alpha. *PloS one*. 2013;8(2):e55733.
55. Li S, Duan X, Li Y, Liu B, McGilvray I, Chen L. MicroRNA-130a inhibits HCV replication by restoring the innate immune response. *Journal of viral hepatitis*. 2014;21(2):121-8.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## 1. การเตรียม Annealing buffer

- 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 ของ Glucose และ 1 โมลาร์ของ KCl

## 2. การเตรียมสารสำหรับ Cloning

## a. 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

## b. LB broth

- Yeast extract      0.5    กรัม
- Tryptone            1.0    กรัม
- NaCl                 1.25    กรัม
- น้ำกลั่น             100    มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## c. 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 นาที แล้วเติม 2 โมลาร์ของ  $Mg^{2+}$ , 2 โมลาร์ของ Glucose และ 1 โมลาร์ของ KCl

## 3. การเตรียม 5X TBE (Tris-Boric-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	1.5	มิลลิลิตร
6. การเตรียม Competent cell
  - (1) ทำการเชื้อเชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli (E. coli) ลงบนอาหารแข็ง LB (Luria Bertani; 1% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl ) ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 16-18 ชั่วโมง
  - (2) เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว LB 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 16-18 ชั่วโมง
  - (3) ดูดเชื้อจากข้อ (2) มา 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มีอาหารเหลว LB 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.4-0.6
  - (4) นำไปแบ่งใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
  - (5) เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วย 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่เย็น หลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที
  - (6) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
  - (7) เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ที่มี 15% (v/v) glycerol หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่น้ำแข็ง 2-3 ชั่วโมง
  - (8) แบ่งใส่หลอด 100 มิลลิลิตร, เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส



#### 7. การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง (Cell Recovery)

- (1) นำเซลล์ใน freezing media มาตั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลาย แล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
- (2) เติม DMEM ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- (3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
- (4) เทส่วนใสทิ้ง เติม DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ และ Antimicrobial antibiotic 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นดูดใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
- (5) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

#### 8. การเก็บรักษาเซลล์ (Freezing cells)

หลังจากทำการ passage cells แล้วละลายเซลล์ด้วย Freezing media 1 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่หลอด Cryotube นำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศศิธร พลากุลมณฑล

วัน เดือน ปีเกิด 9 มิถุนายน 2531

สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 110 ม.13 ต.เมืองเก่า อ.กบินทร์บุรี จ.ปราจีนบุรี 25240

E-mail osiris\_isis\_horus@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)  
คณะสหเวชศาสตร์ (เทคนิคการแพทย์) ปี 2553

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

พ.ศ.2555 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาของราชกรีฑาสโมสร

พ.ศ.2556 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนของบัณฑิตวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

การประชุมวิชาการ

หัวข้อเรื่อง Analysis of hybridization patterns between human microRNAs and  
genome of hepatitis C virus

ชื่อผู้นิพนธ์ Sasitorn Plakunmonthon, Kritsada Khongnomnan, Apichaya  
Khlaiphuengsin, Yong Poovorawan, Sunchai Payungporn

ตีพิมพ์ใน Proceedings ของงานประชุมวิชาการสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่  
35 | ห้องประชุมคอนเวนชัน 2 โรงแรมท็อปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 20-22 มีนาคม พ.ศ.2556  
หน้า 75-77

ผลงานการตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

หัวข้อ Computational prediction of hybridization patterns between hepatitis  
C viral genome and human microRNAs

ชื่อผู้นิพนธ์ Sasitorn Plakunmonthon, Nattanan Panjaworayan T-Thienprasert,  
Kritsada Khongnomnan, Yong Poovorawan, Sunchai Payungporn

ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Computational Science (article in press)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**