

การวิเคราะห์ microRNAs ของเซลล์มนุษย์สำหรับการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่



นายกฤษฎา คงมนาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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.

ANALYSIS OF HUMAN microRNAs FOR INHIBITION OF INFLUENZA A VIRUS

Mr. Kritsada Khongnomnan



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ microRNAs ของเซลล์มนุษย์สำหรับการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่
โดย	นายกฤษฎา คงมนาน
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พงษ์ภร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐ ทรัพย์วัฒนะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัญชัย พงษ์ภร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ซาลิสยา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐนันท์ ต.เทียนประเสริฐ)

กฤษฎา คงมนาน : การวิเคราะห์ microRNAs ของเซลล์มนุษย์สำหรับการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่. (ANALYSIS OF HUMAN microRNAs FOR INHIBITION OF INFLUENZA A VIRUS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สัญชัย พยุภร, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. ยง ภูววรรณ, 76 หน้า.

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่แปลรหัสขนาดเล็กประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ตลอดจนสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ได้ การศึกษาครั้งนี้ได้นำข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 3 สายพันธุ์ที่พบการระบาดในมนุษย์ ได้แก่ สายพันธุ์ pH1N1, H5N1 และ H3N2 มาวิเคราะห์ทางชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ซึ่งอาศัยฐานข้อมูล miRBase และ RNAhybrid ในการทำนายไมโครอาร์เอ็นเอของเซลล์มนุษย์ที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยพิจารณาจากค่าพลังงานและรูปแบบในการจับกันระหว่างไมโครอาร์เอ็นเอและยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ หลังจากนั้นจึงทำการเลือก miRNA เพื่อนำมาสร้าง miRNA Expression Vector และ Reporter-target Vector (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อกับ 3'-UTR ของยีน Firefly Luciferase) แล้วทำการศึกษาการทำงานในเซลล์ A549 ด้วยวิธี 3'UTR Reporter Assay โดยแปลผลจากค่า Relative Luciferase Assay

ผลการศึกษาทางชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์พบว่าไมโครอาร์เอ็นเอของมนุษย์ 76 ชนิดที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในจำนวนนี้มีไมโครอาร์เอ็นเอ 70 ชนิดที่จับอย่างจำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์เดียว โดยแบ่งออกเป็น 21 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H1N1 27 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H5N1 และ 22 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H3N2 ทั้งนี้พบว่ามีไมโครอาร์เอ็นเอ 6 ชนิดที่สามารถจับกับยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ทั้งนี้ hsa-miR-3145 เป็นไมโครอาร์เอ็นเอเพียงชนิดเดียวที่สามารถจับบริเวณยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ครบทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ด้วยวิธี 3'UTR Reporter Assay ในเซลล์ A549 พบว่าค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.007$) ในกลุ่มที่มีการเพิ่มการแสดงออกของ hsa-miR-3145 แสดงให้เห็นว่า hsa-miR-3145 สามารถจับอย่างจำเพาะกับยีน PB1 ที่ต่ออยู่กับส่วน 3'-UTR ของยีน Firefly Luciferase จึงมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase ซึ่งเป็น reporter gene ได้ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า miR3145 น่าจะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ และส่งผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5374676130 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: MIRNAS / INFLUENZA A VIRUS / H1N1 / H5N1 / H3N2

KRITSADA KHONGNOMNAN: ANALYSIS OF HUMAN MICRORNAS FOR INHIBITION OF INFLUENZA A VIRUS. ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 76 pp.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs with approximately 22 nucleotides in length which play an important role in regulation of gene expression. Mature miRNAs are involved in many cellular processes including inhibition of infected viral replication. In this study, three subtypes of influenza A viruses (pH1N1, H5N1 and H3N2) which naturally infected human were analyzed by computational approaches to find candidate human cellular miRNAs targeting viral genomes. Candidate human miRNAs were predicted by two human miRNA prediction databases: miRBase and RNAhybrid. The candidate human miRNAs were analyzed based on minimum free energy (MFE) and hybridization patterns between the selected mature miRNAs and viral target genes. The candidate miRNA was selected for constructing miRNA expression vector and reporter-target vector (viral gene at 3'-UTR of Firefly Luciferase). In vitro analysis was done by 3'UTR reporter assay in A549 cells. Relative luciferase activity was measured from transfected cells.

According to the in silico analysis, there were 76 miRNAs targeting influenza A viruses. Among these candidates, 70 miRNAs were specifically targeting each subtype of influenza A virus including 21 miRNAs targeted H1N1 subtype, 27 miRNAs targeted H5N1 subtype and 22 miRNAs targeted H3N2 subtype. The remaining 6 miRNAs targeted on multiple subtypes of influenza A viruses. Obviously, most of the candidate miRNAs are targeting on polymerase complex genes (PB2, PB1 and PA) of influenza A viruses. Interestingly, hsa-miR-3145 is the only candidate miRNA targeting PB1 gene of all three subtypes of influenza A viruses. The ability of hsa-miR-3145 inhibiting viral PB1 was tested by 3'UTR reporter assay in A549 cells. The results found that relative luciferase activity was decreased significantly in A549 cells transfected with miRNA expression vector (p-value=0.007). hsa-miR-3145 specifically targeting to viral PB1 gene which inserted at 3'UTR of firefly luciferase resulted in the reduction of relative luciferase activity. It indicated that hsa-miR-3145 targeting viral PB1 gene may downregulate the expression of viral PB1 gene and inhibit the replication of influenza A virus.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สัญญาชัย พยุงบวร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ให้โอกาสในการดำเนินการวิจัย ตลอดจนความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ สำหรับคำแนะนำ และตัวอย่างไวรัสที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย ทำให้สามารถดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณัฐนันท์ ต.เทียนประเสริฐ สำหรับการอนุเคราะห์ pGL3MS2/Basic ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความรู้ และการดูแลเอาใจใส่อย่างดีตลอดระยะเวลาที่ศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาชีวเคมีทางการแพทย์

ขอขอบคุณฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือต่างๆ สำหรับการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) สถานบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) สำหรับการสนับสนุนการเดินทางไปนำเสนอผลงาน ในงานประชุม ICBCBBE 2012: International Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedical Engineering ระหว่างวันที่ 14-16 พฤศจิกายน 2555 ณ เมืองเวนิส ประเทศอิตาลี

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 อาคารแพทย์พัฒนาสำหรับความช่วยเหลือ และมิตรภาพที่ดีตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์.....	2
สมมติฐาน.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่.....	5
2. microRNAs.....	12
3. Dual Luciferase assay.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
รูปแบบการวิจัย.....	18
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
1. การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ.....	23
2. การออกแบบ primers สำหรับเพิ่มปริมาณ viral gene ที่สนใจ.....	27

3. การเตรียม cDNA ของ viral gene.....	28
4. การสร้าง Reporter (FLuc) / target (viral gene) vector.....	31
5. การออกแบบและสร้าง miRNA expression vector และ siLuc expression vector.	36
6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture).....	42
7. การ Transfection	44
8. การทดสอบความสามารถของ miRNAs ที่คัดเลือกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน.....	45
ใน Reporter target vector	45
9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	46
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	47
การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ ต่างๆ.....	47
การสร้าง Reporter (FLuc) target (PB1) vector	55
การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน PB1 ที่เป็นเป้าหมายของ miR-3145.....	55
การเชื่อมยีน PB1 กับ pGL3MS2/Basic ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XhoI</i> และ <i>NheI</i>	56
การสร้าง miRNA expression vector.....	58
Dual Luciferase assay.....	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ.....	62
สรุปผลการวิจัย	62
การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่	62
การสร้าง Reporter (FLuc) target (PB1) vector, miRNA expression vector และ siRNA_FLuc expression vector.....	62
การศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของ ไวรัส.....	63
อภิปรายผล	63
ข้อเสนอแนะ	68
รายการอ้างอิง	69
ภาคผนวก.....	73
การเตรียมสารเคมี.....	74

1.การเตรียม LB Agar	74
2.การเตรียม LB Broth	74
3.การเตรียม Soc Medium	74
4.การเตรียม 5X TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer)	75
5.การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์	75
6.การเตรียม Freezing Medium	75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	76



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารพันธุกรรม โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสสารพันธุกรรมของไวรัส Influenza A	8
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย	20
ตารางที่ 3 Accession numbers ของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์	24
ตารางที่ 4 primers ที่ออกแบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน PB1	28
ตารางที่ 5 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการ Reverse Transcription	30
ตารางที่ 6 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	30
ตารางที่ 7 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการตัด pGL3MS2/Basic ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
ตารางที่ 8 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำ Ligation	33
ตารางที่ 9 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	36
ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้าง miRNA expression vector	38
ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอไทด์สายยาวที่ใช้สร้าง miRNA expression vector	38
ตารางที่ 12 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Annealing mixture	39
ตารางที่ 13 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการตัด pSilencer 3.0-H1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	40
ตารางที่ 14 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ Ligation	40
ตารางที่ 15 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	41
ตารางที่ 16 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1	48
ตารางที่ 17 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1	50
ตารางที่ 18 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2	52
ตารางที่ 19 แสดงการเข้าคู่ระหว่าง miR-3145 และยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 สายพันธุ์	54
ตารางที่ 20 ค่า Firefly Luciferase, Renilla Luciferase และ Relative Luciferase Activity	60

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 อัตราการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และการจำแนกตามสายพันธุ์ต่างๆ แยกตาม
ภูมิภาคของโลก..... 6

รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไวรัส Influenza A (15) 9

รูปที่ 3 แสดงการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัส Influenza เมื่อเกิดการติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน..... 11

รูปที่ 4 กระบวนการสร้างและการยับยั้งการแสดงออกของยีนของ miRNAs 13

รูปที่ 5 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมาย (26)..... 14

รูปที่ 6 ปฏิกิริยาการเปล่งแสงของ Firefly และ Renilla Luciferase 16

รูปที่ 7 การตัดแบ่ง viral RNA ให้เป็นขนาด 50 bp โดยแต่ละท่อนซ้อนทับกับท่อน
ด้านหน้า 25 bp 23

รูปที่ 8 ฐานข้อมูล miRBase สำหรับการค้นหา miRNAs ที่สนใจ..... 24

รูปที่ 9 ตัวอย่าง miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ viral RNA 25

รูปที่ 10 โปรแกรม RNAHybrid เพื่อจำลองภาพการเข้าคู่ ระหว่าง microRNAs และ viral
RNA..... 25

รูปที่ 11 แสดงการเข้าคู่ และทำนาย minimum free energy (MFE) ระหว่าง
microRNAs 26

รูปที่ 12 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบ PB1_F1457 27

รูปที่ 13 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบ B1_R1749 27

รูปที่ 14 การตรวจสอบ self-hybridization และ primers dimers ของ primers ที่
ออกแบบ..... 28

รูปที่ 15 โครงสร้างของ Target Reporter vector (pGL3MS2/Basic_PB1) หลังการ
insertion ด้วยยีน PB1 ของไวรัส 31

รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA-3145 precursor สำหรับเป็นต้นแบบในการสร้าง
miRNA expression vector (สีชมพูคือส่วนที่เป็น mature miRNA) 37

รูปที่ 17 ตัวอย่างการออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวสำหรับสร้าง pSilencer vector 37

รูปที่ 18 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1 39

รูปที่ 19 ตารางใน Hemocytometer 43

รูปที่ 20 โครงสร้างของ control reporter vector (pCMV-RLuc)..... 45

รูปที่ 21 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์หา miRNAs ที่จับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 สาย
พันธุ์..... 53

รูปที่ 22 ภาพจำลองการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA ของยีน PB1 55

รูปที่ 23 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน PB1 ที่สนใจ 56

รูปที่ 24 ผลิตรหัสจากการตรวจสอบ pGL3MS2/Basic ที่เชื่อมด้วยยีน PB1 ด้วยปฏิกิริยา
 ลูซิเฟอเรส โดยใช้ Luc3_F และ Sv40_R เป็น primers57

รูปที่ 25 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic_PB1 เทียบกับลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ของยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N157

รูปที่ 26 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer_miR314558

รูปที่ 27 Relative Luciferase ของเซลล์ A549 ที่ผ่านการ transfection ด้วยพลาสมิด
 ต่างๆ.....61

รูปที่ 28 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ66

รูปที่ 29 จำลองการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA ของยีน PB1 ด้วย RNAHybrid.....67



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
3'-UTR	3' untranslated region
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
bp	base pair
FLuc	firefly luciferase
RLuc	<i>Renilla</i> luciferase
°C	degree Celsius
aa	amino acids
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
NaCl	sodium chloride
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
μL	microliter
mM	millimolar
ng	nanogram
nm	nanometer

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) เป็นไวรัสที่อยู่ในสกุล *Orthomyxoviridae* ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับโลก (1) ดังที่ปรากฏเป็นข่าวรายงานการระบาดในภูมิภาคต่างๆ เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 ในปี ค.ศ. 2004 (2) ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ในปี ค.ศ. 2009 (3) และไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 ในปี ค.ศ. 2011 (4)

แม้ว่าในปัจจุบันจะมีวัคซีนป้องกันไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ แล้ว แต่เนื่องจากไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ต้องมีการพัฒนาปรับปรุงวัคซีนอยู่เสมอ อาจทำให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง (5) นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ทั้งยาในกลุ่ม M2 inhibitor เช่น Amantadine และ Rimantadin หรือยาในกลุ่ม Neuraminidase inhibitor เช่น Zanamivir และ Oseltamivir ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ก็พบว่ายากลุ่มดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพดีต่อเมื่อมีการใช้ใน ช่วง 2 วันแรกของการติดเชื้อเท่านั้น ทำให้เกิดข้อจำกัดของการรักษาและป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (6)

microRNAs (miRNAs) เป็นโมเลกุล RNAs สายสั้นๆ สร้างจาก non-coding region ภายในจีโนมของเซลล์ มีขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทด์ มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยอาศัยการเข้าคู่ (complementary) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ miRNAs กับ 3'-UTR ของ mRNAs เป้าหมาย ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ด้วยการยับยั้งการแปลรหัส (translational repression) หรือการสลาย RNAs (RNA degradation) (7) บทบาทของ miRNAs เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การควบคุมสมดุลต่างๆของเซลล์ การตายของเซลล์ (apoptosis) เป็นต้น (8) นอกจากนี้ยังพบว่า miRNAs ยังมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ด้วย เช่น ยับยั้งเชื้อไวรัส primate foamy virus type 1 (PRV-1) (9) ยับยั้งไวรัส vesicular stomatitis (10) รวมไปถึงการยับยั้งเชื้อไวรัส HIV (11) เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่าอาจมี miRNAs ที่มีอยู่ภายในเซลล์มนุษย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์หา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs ต่างๆ ที่พบในเซลล์มนุษย์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมทั้ง 8 ท่อนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์

ต่างๆ ได้แก่ H5N1, H1N1 และ H3N2 แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆ ของไวรัสด้วยวิธี 3'-UTR reporter assay โดยการเพิ่มการแสดงออกของ miRNAs ที่สนใจ แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีนของไวรัสที่เป็นเป้าหมาย ซึ่งต่ออยู่กับส่วน 3'-UTR ของ reporter gene แล้ววัดการแสดงออกของ reporter gene เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้มีการเพิ่มการแสดงออกของ miRNAs ที่สนใจ

คำถามงานวิจัย

1. ในเซลล์มนุษย์มี miRNAs ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมาะสมต่อการจับกับ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (H5N1, H1N1 และ H3N2) หรือไม่
2. miRNAs ในเซลล์มนุษย์ มีความสามารถในการยับยั้งยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (H5N1, H1N1 และ H3N2) ได้หรือไม่

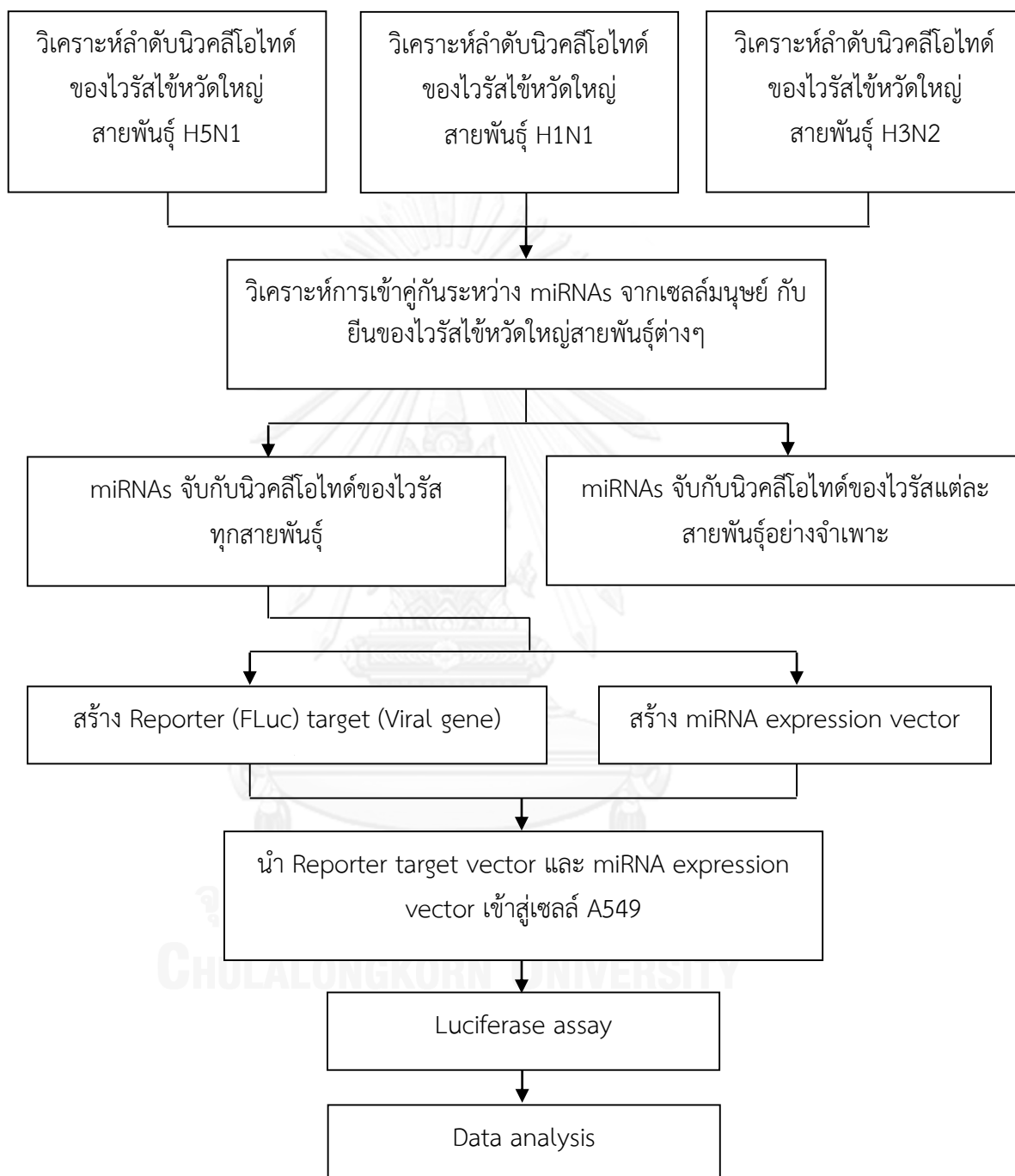
วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์หา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่สามารถจับกับ RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (H5N1, H1N1 และ H3N2)
2. เพื่อตรวจสอบว่า miRNAs จากเซลล์มนุษย์มีความสามารถในการยับยั้งยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ (H5N1, H1N1 และ H3N2) ได้

สมมติฐาน

1. ในเซลล์มนุษย์มี miRNAs ที่สามารถเข้าคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ สอดคล้องตามรูปแบบ 5'canonical หรือ 5' seed หรือ 3'compensatory
2. miRNAs ของเซลล์มนุษย์ที่เข้าคู่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนไวรัส ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้

วิธีดำเนินการวิจัย



คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

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

FLuc คือ ยีน Firefly Luciferase

RLuc คือ ยีน *Renilla* Luciferase

คำสำคัญ

Influenza A virus, H1N1, H5N1, H3N2, miRNAs

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถหา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัส
ใช้หัตถ์ใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้
2. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

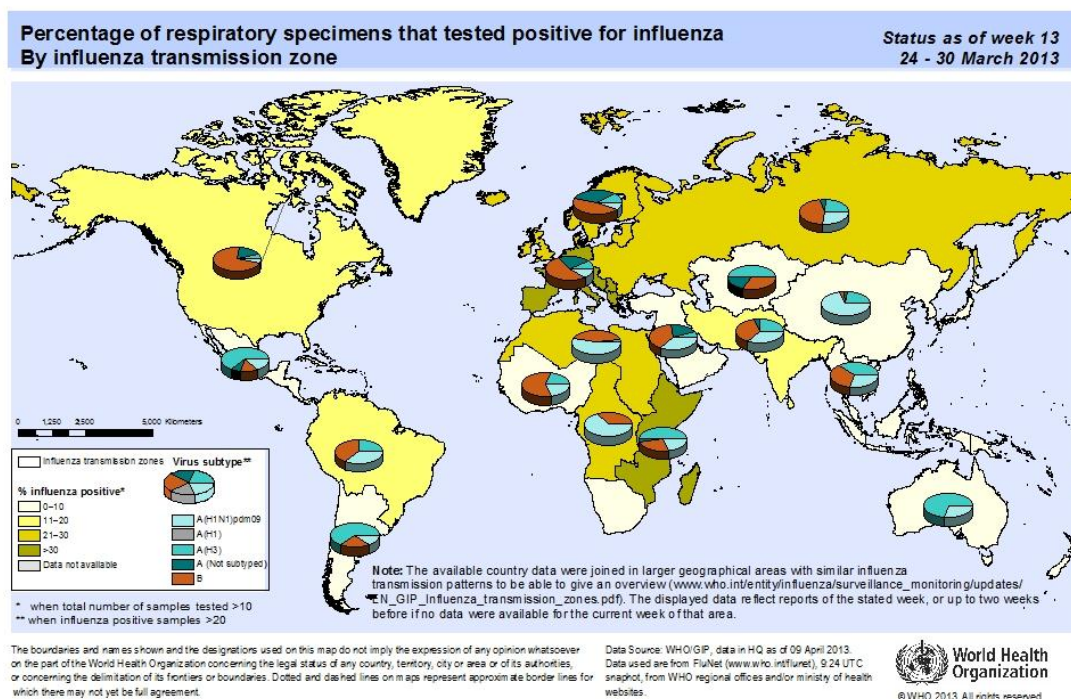
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) เป็นไวรัสที่อยู่ในวงศ์ *Orthomyxoviridae* ทำให้เกิดโรกระบบทางเดินหายใจ โดยผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลียอย่างเฉียบพลัน เบื่ออาหาร คลื่นไส้ ปวดศีรษะอย่างรุนแรง ปวดตามแขนขา ปวดข้อ ปวดรอบดวงตา มีไข้สูง 39-40°C เจ็บคอ มีน้ำมูกใส ไอแห้งๆ หรือมีอาการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย โดยไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 ชนิดคือ สายพันธุ์ A, สายพันธุ์ B และสายพันธุ์ C ซึ่งมีตามความแตกต่างของแอนติเจนในส่วน nucleoprotein (NP) และ matrix protein (M) (1)

จากการศึกษาพบว่าไวรัสชนิดที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขในมนุษย์อย่างมาก คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (Influenza A virus) ซึ่งสามารถแบ่งสายพันธุ์ย่อยได้โดยอาศัยความแตกต่างของไกลโคโปรตีนสำคัญ 2 ชนิดที่อยู่บนเปลือกผิวชั้นนอกของเชื้อไวรัส ได้แก่ Hemagglutinin (HA) แบ่งออกเป็น 17 ชนิด (H1-H17) และ Neuraminidase (NA) แบ่งออกเป็น 9 ชนิด (N1-N9) (12) ดังนั้นในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A จึงต้องมีการระบุทั้งชนิดของ HA และ NA ควบคู่กัน เช่น H5N1, H1N1 หรือ H3N2 เป็นต้น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะในการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ แตกต่างกันไปโดยทั่วไปพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ทุกสายพันธุ์สามารถพบได้ในสัตว์ปีก สำหรับมนุษย์พบว่าการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2 และล่าสุด H7N9 ที่พบการติดเชื้อเป็นครั้งแรกในมนุษย์ โดยพบที่สาธารณรัฐประชาชนจีน (13) เป็นต้น สำหรับสายพันธุ์ H1N1 และ H3N2 พบว่าเป็นเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่มีการระบาดเป็นฤดูกาลเป็นประจำทุกปี แต่สำหรับสายพันธุ์อื่นๆ เป็นการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์จากสัตว์ปีกมาสู่มนุษย์ พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A สายพันธุ์ต่างๆ มีอัตราการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการที่ค่อนข้างเร็ว



รูปที่ 1 อัตราการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และการจำแนกตามสายพันธุ์ต่างๆ แยกตามภูมิภาคของโลก (http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2013_04_12_influenza_update_183_week_13_main.jpg)

ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่าสายพันธุ์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A ที่ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ดังที่พบรายงานการระบาดใหญ่ในภูมิภาคต่างๆ ของโลก ได้แก่ สายพันธุ์ H5N1 สายพันธุ์ H1N1 และสายพันธุ์ H3N2 ทั้งนี้มีการคาดการณ์โดยองค์การอนามัยโลกว่ามีประชากรทั่วโลกติดเชื้อไวรัสกลุ่มดังกล่าวสูงถึงร้อยละ 15 ของประชากรทั่วทั้งโลก และยังทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูงถึง 250,000 – 500,000 ราย (14)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A มีลักษณะเป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (Envelope) ลักษณะกลม หรือเป็นท่อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคไวรัส ประมาณ 80-120 นาโนเมตร และมีสารพันธุกรรมเป็น Negative single stranded RNA (-ssRNA) ที่มีลักษณะเป็นท่อน ๆ จำนวนทั้งสิ้น 8 ท่อน ซึ่งสามารถแปลรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างเป็นโปรตีนของไวรัสได้อย่างน้อย 10 ชนิด ดังตารางที่ 1 ได้แก่

- Polymerase basic protein (PB2), polymerase basic protein (PB1) และ polymerase acid protein (PA) อยู่ใน polymerase complex ทำหน้าที่ในกระบวนการ transcription และ replication

- Hemagglutinin (HA) เป็น glycoprotein บริเวณผิวของอนุภาคไวรัส จับกับ sialic acid receptor บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน อาศัยความจำเพาะของการจับกันดังกล่าวเป็นตัวกำหนดความจำเพาะการติดเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

- Nucleoprotein (NP) อยู่ร่วมกับอาร์เอ็นเอของไวรัส เป็น ribonucleoproteins (RNPs) เพิ่มความเสถียรให้กับโมเลกุลอาร์เอ็นเอของไวรัส และยังมีส่วนช่วยในการขนส่งอาร์เอ็นเอ ดังกล่าวจากไซโทพลาสซึม เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน และช่วยในการแยกความแตกต่างระหว่างอาร์เอ็นเอ ของไวรัสและเซลล์เจ้าบ้าน

- Neuraminidase (NA) อาจเรียกว่า sialidase เป็นเอนไซม์สำหรับตัด sialic acid ที่ยึดอนุภาคไวรัสที่เชื่อมเซลล์ ทำให้ปล่อยไวรัสออกจากเซลล์ดั้งเดิม และแพร่กระจายต่อไปได้

- Matrix protein (M1) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างด้านในอนุภาคของไวรัส

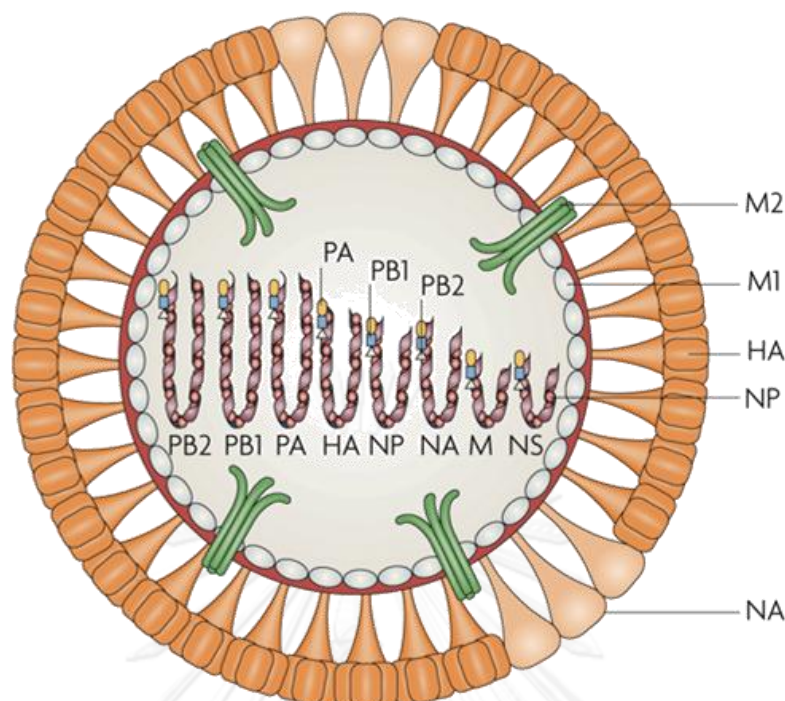
- Ion channel (M2) เป็นโปรตีนที่เกิดจาก alternative splicing จากยีน M แทรกอยู่ใน transmembrane protein ทำหน้าที่ปั๊มโปรตอน (H^+) เข้าสู่อนุภาคของไวรัส เพื่อเพิ่มความเป็นกรด ทำให้เกิดการแตกตัวของอนุภาคไวรัส (uncoating)

- Non-structural protein 1 (NS1) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA splicing และการแปลรหัส (translation) และมีบทบาทต่อการยับยั้งระบบ interferon response ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์เจ้าบ้านใช้ต่อต้านไวรัส

- Nuclear export protein (NEP, NS2) เป็นโปรตีนที่เกิดจาก alternative splicing ของยีน NS ทำหน้าที่ขนส่ง RNPs จากนิวเคลียส ของเซลล์เจ้าบ้านไปยังไซโทพลาสซึม

ตารางที่ 1 สารพันธุกรรม โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสสารพันธุกรรมของไวรัส Influenza A

RNA segment	นิวคลีโอ-ไทด์ (bp)	โปรตีน	ความยาวของโปรตีน (aa)	หน้าที่
1	2350	Polymerase basic protein (PB2)	759	Cap binding, endonuclease
2	2350	Polymerase basic protein (PB1)	757	RNA polymerase
3	2250	Polymerase acid protein (PA)	716	RNA polymerase subunit, proteolysis
4	1780	Hemagglutinin (HA)	560	Attachment to sialic acid, membrand fusion
5	1575	Nucleoprotein (NP)	498	Encapsidates RNAs, nuclear import of RNA
6	1420	Neuraminidase (NA)	450	Sialidase activity, release of virus
7	1050	Matrix protein (M1)	252	Major structural protein, virus assembly
		Ion channel (M2)	96	Proton ion channel, viral uncoating
8	900	Nonstructural protein (NS1)	230	Down-regulate anti-viral response
		Nuclear export protein (NEP)	121	Nuclear export of RNPs



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของไวรัส Influenza A (15)

(รูปจาก <http://www.nature.com/nri/journal/v7/n4/images/nri2054-f1.jpg>)

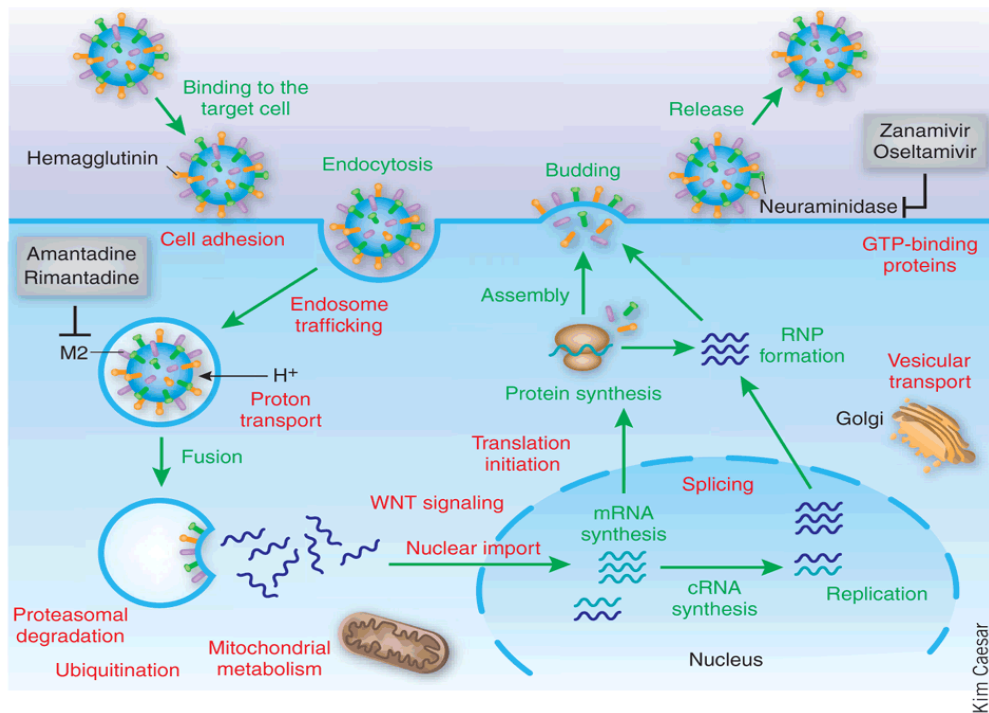
การที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A มีสารพันธุกรรมเป็นท่อน ๆ ทำให้เมื่อมีไวรัสต่างสายพันธุ์ติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน เดียวกัน อาจเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนจากไวรัสสายพันธุ์หนึ่ง กับยีนของไวรัสอีกสายพันธุ์หนึ่งในระหว่างการเพิ่มจำนวน (replication) กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า antigenic shift ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสร้างไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้น และทำให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงและแพร่หลายในมนุษย์ (Pandemic outbreak) (16) (17) เช่น การระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H2N2 ในปี ค.ศ. 1957 หรือ Asian Influenza ที่มีจุดเริ่มต้นการระบาดจากตอนใต้ของประเทศจีน ก่อนจะกระจายไปอย่างรวดเร็วในสหรัฐอเมริกาและยุโรป ทำให้เกิดการเสียชีวิตของผู้ป่วยทั่วทั้งโลกมากกว่า 1 ล้านคน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไวรัสดังกล่าวเกิดจากการรวมกันระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ติดเชื้อในสัตว์ปีก และไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ติดในมนุษย์ (16) เช่นเดียวกับไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2: Hong Kong Influenza ซึ่งระบาดในปี ค.ศ. 1968 ทั้งนี้พบว่าไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวมีเยื่อ Hemagglutinin (HA) แบบ H3 จากไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ติดในสัตว์ปีก เช่นเดียวกับยีน PB1 แต่พบว่ามียีนอื่นๆ มาจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่ติดเชื้อในมนุษย์ (18)

นอกจากกระบวนการ antigenic shift ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ทำให้เกิดการสร้างไวรัสสายพันธุ์ใหม่ๆ แล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงโดยการกลายพันธุ์แบบผ่าเหล่า (mutation) ภายในจีโนมของไวรัส อันมีสาเหตุจากการขาดกระบวนการตรวจสอบความถูกต้อง (proofreading function) ของ Viral RNA polymerase ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ง่าย เรียกว่า antigenic drift การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเหนี่ยวนำให้เกิดความรุนแรงของการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น และทำให้เกิดการระบาดตามฤดูกาลเป็นประจำทุก ๆ ปี (Epidemic outbreak) (19)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่เมื่อเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์จะใช้ hemagglutinin (HA) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่บริเวณผิวของอนุภาคไวรัส เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย HA₁ และ HA₂ ซึ่งเชื่อมกันเป็น trimer ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เริ่มต้นจาก HA₀ precursor มีขนาดประมาณ 550 กรดอะมิโน แปรรหัสมาจากยีน HA จากนั้นจะถูกตัดให้เป็นหน่วยย่อย HA₁ และ HA₂ แล้วปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการ N-glycosylation ที่ร่างแหเอนโดพลาสมิก (endoplasmic reticulum, ER) ก่อนที่จะถูกส่งผ่านมาจากกอลจิ คอมเพล็กซ์ (golgi complex) และเยื่อหุ้มเซลล์ตามลำดับ ซึ่งหาก HA₀ precursor ไม่ถูกตัดแบ่งออกเป็น 2 หน่วยย่อยแล้ว การรวมกันของอนุภาคไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้านจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากปลาย N-terminus ของหน่วยย่อย HA₂ ที่มีสมบัติเป็น hydrophobic เป็นตำแหน่งที่สำคัญในการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (20)

HA ที่ผิวของอนุภาคไวรัสจับกับตัวรับ (Sialic acid receptor) ที่ผิวเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน อาศัยกระบวนการ Receptor-mediated endocytosis เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน เกิดเป็น endosome จากนั้นจะมีการปั๊มโปรตอน (H⁺) เข้าสู่อนุภาคไวรัสผ่านทาง M2 Ion channel ทำให้ภายในอนุภาคไวรัสมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น โดยมี pH อยู่ที่ประมาณ 5.0-5.5 (21) โปรตีน M1 จึงสูญเสียสภาพการยึดติดกันระหว่างโปรตีน เกิดกระบวนการ uncoating ส่งผลให้อาร์เอ็นเอของไวรัสหลุดออกจากอนุภาคไวรัส และเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้านเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยอาศัย viral polymerase complex เกิดเป็น positive strand RNA ส่วนหนึ่งจะนำไปใช้ในกระบวนการแปลรหัส (translation) สร้างโปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นต่อไป อีกส่วนหนึ่งจะใช้เป็นแม่แบบ (template) สำหรับการสร้างจีโนม (negative strand RNA) ของอนุภาคไวรัสใหม่ กระบวนการ transcription อาจแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ในช่วงต้นการจำลองสารพันธุกรรมได้ mRNA แล้วเกิดการแปลรหัสสร้างเป็นโปรตีน (translation) เช่น PB1, PB2, PA, NP อีกชั้นคือช่วงปลาย โดยเมื่อมีสารพันธุกรรมของไวรัสมากขึ้น ย่อมทำให้เกิดการแปลรหัสมากขึ้น มีการสร้างโปรตีนทั้ง 10 ชนิด โดยโปรตีน PB1, PB2, PA, NP จะกลับเข้าไปในนิวเคลียสเพื่อรวมตัวกับสาย -ssRNA ส่วนโปรตีนโครงสร้าง HA, NA และ M2 จะถูกสร้างที่ร่างแหเอนโดพลาสม (endoplasmic reticulum) ก่อนจะเคลื่อนไปยัง Golgi complex และส่งไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ตามลำดับ จากนั้นสารพันธุกรรมและโปรตีนต่างๆ จะถูกส่งออกมายังเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อสร้างอนุภาคไวรัสใหม่ด้วย

กระบวนการ assembly จากนั้นเกิดกระบวนการ budding ซึ่งจะอาศัยการทำงานของ Neuraminidase ในการตัดแยกอนุภาคไวรัสออกจาก Sialic acid receptor ที่ผิวเซลล์ของเจ้าบ้าน (ดังรูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัส Influenza เมื่อเกิดการติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน

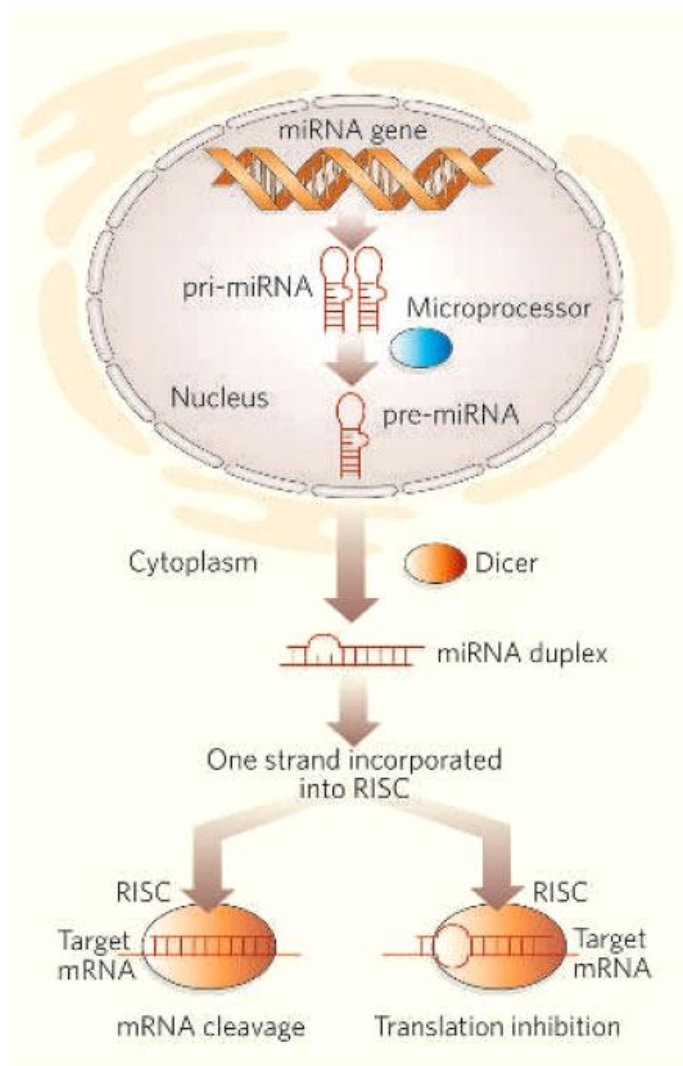
(รูปจาก <http://www.nature.com/nbt/journal/v28/n3/images/nbt0310-239-F1.gif>)

สำหรับยาในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส Influenza แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ M2 inhibitor ได้แก่ Amantadine และ Rimantadine โดยยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของ M2 Ion channel ทำให้โปรตอน (H^+) ไม่สามารถเข้าสู่ภายในอนุภาคของไวรัสได้ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ uncoating สารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสจึงไม่สามารถออกมาจากอนุภาคไวรัสได้ โดย Amantadine มีผลต่อการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A เท่านั้น แต่ไม่มีผลในการยับยั้งไข้หวัดใหญ่ชนิด B และยังมีผลข้างเคียง เช่น อาการนอนไม่หลับ ปวดศีรษะ วิงเวียน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบภาวะการดื้อยา โดยมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน M2 ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 26, 27, 30, 31 หรือ 34 จึงเกิดภาวะดื้อยาขึ้น (22)

สำหรับยาอีกกลุ่มหนึ่งคือ Neuraminidase inhibitor ได้แก่ Zanamivir และ Oseltamivir ยับยั้งกระบวนการ budding โดยการยับยั้งการทำงานของ Neuraminidase ทำให้อนุภาคของไวรัสไม่สามารถหลุดออกจาก Sialic acid receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน ไวรัสจึงไม่สามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่นๆ ต่อไปได้ (รูปที่ 3) นอกจากนี้ยังพบการดื้อยา oseltamivir ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 จากรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 2008 ที่ประเทศนอร์เวย์ และกลุ่มประเทศในทวีปยุโรป โดยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 275 (H275Y) ของ Neuraminidase (23) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากประเทศญี่ปุ่นถึงการพบการดื้อยา oseltamivir ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 และ H1N1 (24) และจากรายงานของ Dijkstra และคณะ ในปี ค.ศ. 2011 ได้รายงานการพบภาวะดื้อยา Oseltamivir ในประเทศเนเธอร์แลนด์ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการใช้ยา โดยยาจะมีประสิทธิภาพต่อเมื่อมีการให้ยาแก่ผู้ป่วยใน 2 วันแรกของการติดเชื้อ (6)

2. microRNAs

microRNAs เป็นอาร์เอ็นเอสายสั้นๆ ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้าน มีขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทด์ สร้างขึ้นจากกระบวนการถอดรหัส (transcription) ด้วยเอนไซม์ RNA polymerase II (RNA pol II) เป็นส่วนใหญ่ หรือ RNA polymerase III (RNA pol III) เป็นส่วนน้อย เกิดเป็น primary miRNA (pri-miRNA) มีลักษณะเป็น hairpin loop RNA เนื่องจากการเกิด self complementary นอกจากนี้ยังมีการเติม 5' capping ที่ปลายด้าน 5' และเติม poly A tail ที่ปลาย 3' จากนั้นจะถูกตัดให้มีขนาดเล็กลงด้วย RNase III domain ใน Microprocessor หรือ Drosha โดยตำแหน่งที่ตัดจะอยู่ประมาณ 11 นิวคลีโอไทด์จากส่วนที่เป็น hairpin loop เกิดเป็น precursor-miRNAs (pre-miRNAs) มีขนาดประมาณ 70 นิวคลีโอไทด์ แล้วจึงถูกส่งไปยังไซโทพลาสซึมผ่านทางโปรตีน Exportin-5 จากนั้น pre-miRNAs จะถูกตัดบริเวณส่วนที่เป็น loop ออกด้วยเอนไซม์ RNase III dicer เกิดเป็น RNA สายคู่ (duplex) ที่มีบางส่วนไม่เข้าคู่กัน จากนั้นเกิดการแยกสายเป็นสายเดี่ยว ซึ่งจะไปรวมตัวกับ RNA-inducing silencing complex (RISC) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยมีปฏิสัมพันธ์กับ mRNAs เป้าหมายใน 2 ลักษณะ คือ หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs สามารถเข้าคู่สมบูรณ์ (perfect complementary) กับ mRNAs เป้าหมาย จะทำให้เกิดการสลาย mRNAs ผ่านกระบวนการ RNA degradation และหากเข้าคู่ไม่สมบูรณ์ (partial complementary) ก็จะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (translational repression) (7, 25) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 กระบวนการสร้างและการยับยั้งการแสดงออกของยีนของ miRNAs

(รูปจาก <http://herb4cancer.files.wordpress.com/2007/11/microrna.jpg>)

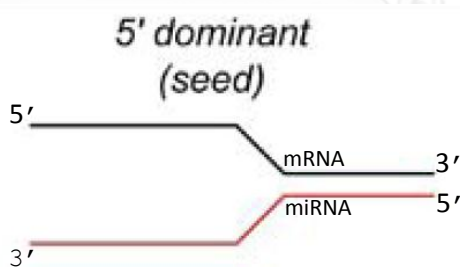
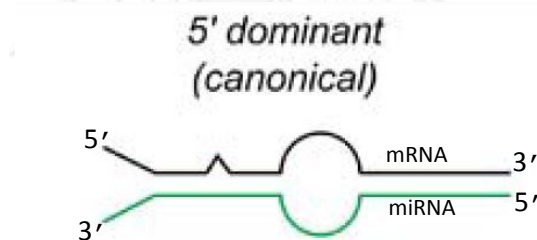
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากการศึกษาของ Brennecke และคณะในปี 2005 (26) พบว่าความจำเพาะของ miRNA และ mRNA เป้าหมาย ขึ้นอยู่กับบริเวณที่ miRNA จับกับ mRNA (target binding site) ซึ่งมักอยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 จากทางด้านปลาย 5' ของ miRNA เรียกว่า seed region มีตำแหน่งเป้าหมายบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) ของ mRNA เป้าหมาย โดยรูปแบบในการเข้าคู่กันของ miRNA และ mRNA เป้าหมาย อาจแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังรูปที่ 5

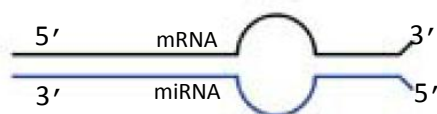
5'canonical คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้านปลาย 5'-miRNA ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 และมีบางส่วนของด้านปลาย 3'-miRNA จับกับ mRNA เป้าหมายด้วย การจับกันในลักษณะนี้ทำให้ miRNA จับกับ mRNA เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่ารูปแบบอื่นๆ

5' seed คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้านปลาย 5'-miRNA ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 2-8 แต่ไม่มีส่วนด้าน 3'-miRNA จับกับ mRNA ทำให้ประสิทธิภาพในการจับกับ mRNA น้อยกว่าแบบ 5'canonical

3'compensatory คือ การเข้าคู่กันโดยอาศัยด้าน 3'-miRNA จับกับ mRNAs โดยมีบางส่วนของด้าน 5'-miRNA จับกับ mRNA ด้วย รูปแบบนี้พบได้น้อยที่สุด



3' compensatory



รูปที่ 5 รูปแบบของการเข้าคู่กันระหว่าง miRNA และ mRNA เป้าหมาย (26)

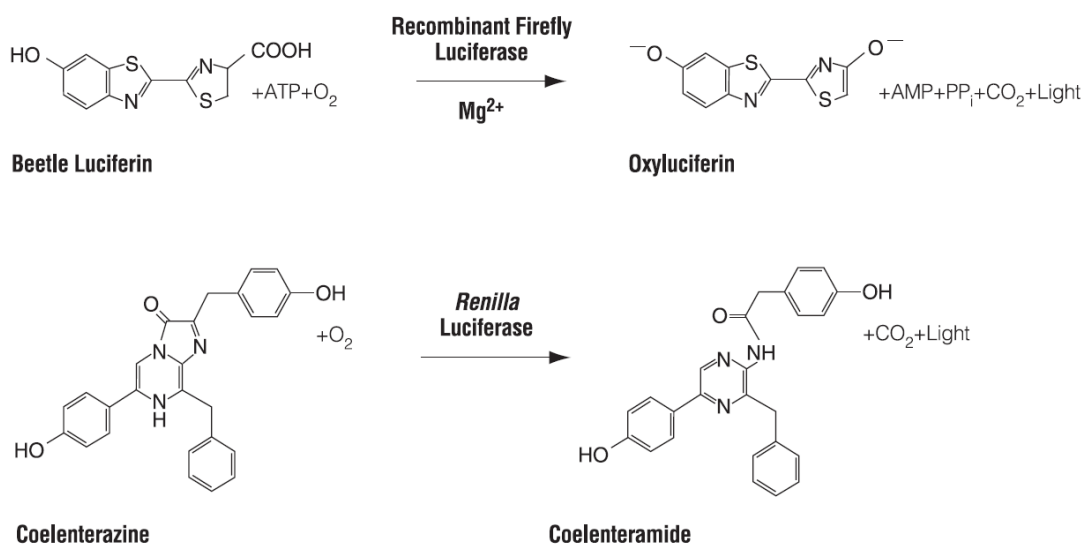
จากหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนทำให้ miRNAs มีส่วนสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ เช่น การเจริญของเซลล์ (cellular proliferation) การตายของเซลล์ (apoptosis) การรักษาสมดุลภายในเซลล์ (homeostasis)

นอกจากนี้ยังพบว่า miRNAs ของไวรัสยังมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น Simian virus 40 ซึ่งอยู่ในสกุล polyomavirus สามารถสร้าง miRNAs มีเป้าหมายเป็น T antigen ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) การที่ miRNAs ของไวรัสไปจับกับ T antigen ส่งผลให้เกิดการลดลงของกลไกการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านต่อการติดเชื้อ (27) จากการศึกษาของ Gupta และคณะในปี 2006 พบว่าเชื้อไวรัส herpes simplex type 1 (HSV-1) เป็นอีกหนึ่งตัวอย่างของไวรัสที่มีการสร้าง miRNAs ที่สามารถจับกับยีนของเซลล์เจ้าบ้านได้ โดย miRNAs ดังกล่าวสร้างจาก latency-associated transcript (LAT) สามารถจับกับ mRNAs ของ TGF และ SMAD3 ซึ่งควบคุมการอยู่รอดของเซลล์และกระบวนการ apoptosis การที่ miRNAs ของไวรัสสามารถจับกับ mRNAs ของเซลล์เจ้าบ้านจึงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดกระบวนการต่อต้านไวรัสของเซลล์เจ้าบ้านได้ (28)

ในทางกลับกัน miRNAs ที่สร้างจากเซลล์ของมนุษย์ก็พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อได้ เช่น การศึกษาของ Lecellier และคณะในปี 2005 พบว่า miR-32 ที่สร้างจากเซลล์มนุษย์สามารถจับกับจีโนมของ primate foamy virus type 1 (PFV-1) ส่งผลให้เกิดการลดลงของปริมาณไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ (9) miR-24 และ miR-93 จากเซลล์ของมนุษย์สามารถจับกับ viral large protein (L protein) และ phosphoprotein (P protein) ของเชื้อไวรัส vesicular stomatitis virus (VSV) ทั้งนี้พบว่าหากมีการลดลงของ miR-24 และ miR-93 จะทำให้มีส่วนในการเพิ่มกระบวนการ replication ของเชื้อไวรัส VSV ได้ (10) Huang และคณะได้รายงานในปี 2007 ว่า miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 และ miR-382 ซึ่งเป็น miRNAs ที่พบใน CD4 T cells สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัส HIV-1 ได้ โดยจับกับบริเวณปลายด้าน 3' ของ mRNAs ของ HIV-1 (29) และการศึกษาของ Liping Song และคณะในปี ค.ศ. 2010 ที่วิเคราะห์หา miRNAs จากเซลล์ MDCK พบว่า miRNA-323, miR-491 และ miR-654 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (A/WSN/33) ได้ (30) อีกทั้งยังพบว่าในบางกรณี miRNAs ที่สร้างจากเซลล์ของมนุษย์มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเชื้อไวรัสได้ เช่น ในการศึกษาของ Chang และคณะในปี ค.ศ. 2008 ที่พบว่า miR-122 ที่สร้างจากเซลล์ตับของมนุษย์มีส่วนในการเพิ่มการเจริญของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิด C (Hepatitis C virus, HCV) (31)

3. Dual Luciferase assay

เป็นวิธีการทดสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้ reporter gene ที่แตกต่างกัน 2 ยีน คือ firefly (*Photinus pyralis*) luciferase และ *Renilla* (*Renilla reniformis*) luciferase ซึ่งยีนทั้งสองมีช่วงความยาวคลื่นในการเปล่งแสงที่ต่างกัน โดย firefly luciferase เปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น 560 nm และ *Renilla* luciferase เปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น 482 nm ทำให้สามารถวัดความเข้มของแสงที่เปล่งออกมาเปรียบเทียบกันเพื่อแสดงการแสดงออกของยีน ในการใช้วิธีนี้จะต้องสร้าง vector ที่มี reporter gene หนึ่งร่วมกับยีนที่สนใจ และอีก reporter gene จะเป็นยีนควบคุม (control gene)



รูปที่ 6 ปฏิกิริยาการเปล่งแสงของ Firefly และ Renilla Luciferase

(รูปจาก Dual Luciferase Assay Promega® Protocol)

ทั้งนี้สามารถเปรียบเทียบความเข้มของแสงที่เปล่งขึ้น จากการแสดงออกของยีน เปรียบเทียบเป็นอัตราส่วน Relative Luciferase activity ด้วยสูตร

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

ค่าที่ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจและยีนควบคุม สามารถเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจในภาวะที่ต่างกันได้ วิธีการดังกล่าวจึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาการโครงสร้างของ promoter การศึกษา cell signaling pathways การศึกษาตัวยับยั้ง หรือเพิ่มการแสดงออกของยีน เป็นต้น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ใช้การวิจัยในรูปแบบการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) และได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว เมื่อวันที่ 26 มีนาคม 2555 เพิ่มเลข IRB 121/55

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับเตรียม Annealing Buffer
 - Tris (AMRESCO)
 - NaCl (Merck)
 - EDTA (Sigma)
2. สารเคมีสำหรับการตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion)
 - *NheI* (Thermo Scientific)
 - *XhoI* (Thermo Scientific)
 - *BamHI* (Thermo Scientific)
 - *HindIII* (Thermo Scientific)
 - 10X Tango™ Buffer (Thermo Scientific)
 - 10X *BamHI* Buffer (Thermo Scientific)
3. สารเคมีสำหรับการโคลนนิ่งและการสกัดพลาสมิด
 - T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)
 - Difco™ Agar Technical (Becton Dickinson)
 - Bacto™ Tryptone (Becton Dickinson)
 - Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson)

- NaCl (Merck)
- *E. coli* strain DH-5 α (RBC Bioscience)
- Ampicillin (General Drug House)
- Kanamycin (General Drug House)
- RBE Real Genomic HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience)
- Shaking Incubator รุ่น ES-10 (BIOSAN)
- pCMV-RLuc vector ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. สัตย์ชัย พยุงภร
- pSilencer 3.0 H1 vector ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ
- pGL3MS2/Basic ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ

4. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR)

- เครื่อง Thermal Cycler รุ่น Master Cycler (Eppendorf)
- น้ำกลั่น (Distilled water; DW)
- Master mix (5 PRIME)
- oligonucleotide primers (1st Base)
- 0.2 mL PCR tube (Axygen)
- primers

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ต่างๆ ที่ใช้ในการวิจัย

primer	Sequences
PB1_F1457	TTGCTAGCGGATCCGACAGGGACATTTGAATTCAC
PB1_R1749	ACGGATCCTCGAGGTTTGATCCCACAGCTTCTT
Luc3_F	CGTGGATTACGTGCCAGTC
SV40_R	TCTAGAGTTAACTTGTTTATTGCA
M13_F	GTTTTCCCAGTCACGAC
pSilencer-H1_R	GAGTTAGTCTCACTCATTAGGC

5. สารเคมีสำหรับ Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose (Invitrogen)
- TBE buffer
- Ethidium Bromide (AMRESCO)
- DNA marker ขนาด 1kbp และ 100 bp (RBC Bioscience)
- เครื่อง Transilluminator (VILBER LOURMAT)
- เครื่อง Gel Electrophoresis รุ่น Minis-150 (Major Science)
- DNA loading dye

6. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA จาก Agarose gel

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

7. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเซลล์

- DMEM (Thermo Scientific)
- Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific)
- Antibiotic-Antimycotic (Gibco)
- Trypsin 0.25% (Gibco)
- Tissue culture flask (TPP)
- 96-well plate (TPP)

- Serological pipette (TPP)
- หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 mL (Axygen Scientific)
- ตู้บ่ม (incubator) สำหรับควบคุมอุณหภูมิและปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ รุ่น CCL-170B-8 (ESCO)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- Lamina flow รุ่น AC2-6D1 (Airstream DUO®)
- Hemecytometer (HBG)
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Eclipse TS100 (Nikon)

8. สารเคมีสำหรับ Transfection

- Lipofectamine® 2000 reagent (Invitrogen)
- Opti-MEM® (1X) Reduced Serum Medium (Gibco)
- Nanodrop รุ่น Nanodrop1000 (Thermo)

9. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับ Dual-Luciferase Assay

- Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
- 96-well plate White Opaque (Coastar)
- เครื่อง Microplate Reader รุ่น Synergy HT (BioTek)

10. วัสดุ และอุปกรณ์ทั่วไปสำหรับงานวิจัย

- Heat box (Bioer Technology)
- Mini Centrifuge (Eppendorf)
- ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Biosan)
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.2 และ 1.5 mL (Axygen)
- Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 μ L (Nepture)
- Autopipette ขนาด 3, 10, 20, 100, 200 และ 1,000 μ L (Biohit)

11. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การทดลอง

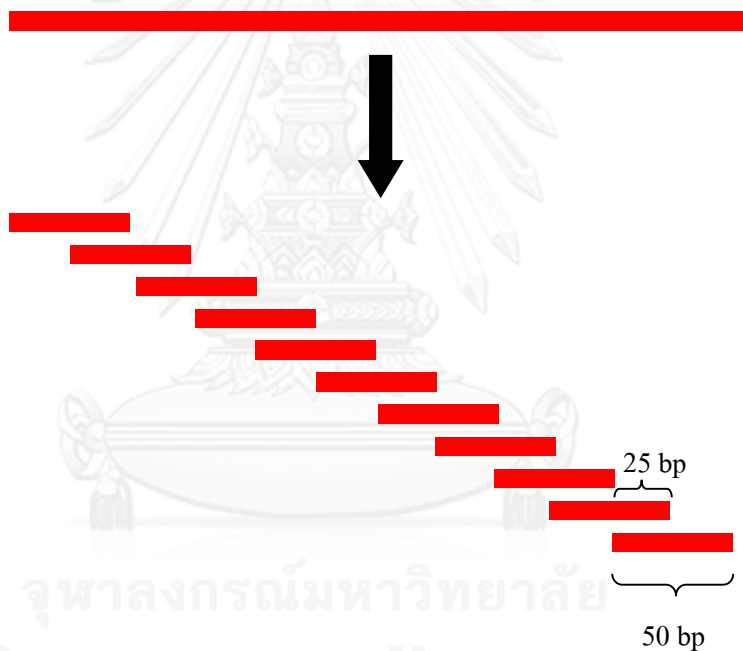
- miRBASE (<http://www.mirbase.org>)
- RNAhybrid
(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)
- BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.4.1 (Website)
- Oligos version 9.1 (Website)



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ

- ใช้ reference sequences ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ A/Thailand/NK165/2005 (H5N1), A/Thailand/104/2009 (H1N1) และ A/Thailand/CU-H187/2010 (H3N2) ดังตารางที่ 3
- ตัดแบ่ง viral RNA ให้เป็นท่อน ๆ ที่มีขนาด 50 bp โดยแต่ละท่อนมีลำดับ nucleotide ที่ซ้อนทับกับท่อนด้านหน้า 25 bp (ดังรูปที่ 7)



รูปที่ 7 การตัดแบ่ง viral RNA ให้เป็นขนาด 50 bp โดยแต่ละท่อนซ้อนทับกับท่อนด้านหน้า 25 bp

ตารางที่ 3 Accession numbers ของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์

สายพันธุ์ ยีน	H1N1 (A/Thailand/ 104/2009)	H5N1 (A/Thailand/ NK165/2005)	H3N2 (A/Thailand/ CU-H187/2010)
PB2	GQ205443	DQ372598	CY074963
PB1	GQ259597	DQ372597	CY074964
PA	GQ169383	DQ372596	CY074965
HA	GQ169382	DQ372591	CY074966
NP	GQ169385	DQ372594	CY074967
NA	GQ169381	DQ372593	CY074968
M	GQ169384	DQ372592	CY074969
NS	GQ229379	DQ372595	CY074970

- เปรียบเทียบความคล้ายกันระหว่าง viral RNA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, H5N1 และ H3N2 กับ miRNAs ของเซลล์มนุษย์ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ viral RNA แต่ละท่อนที่ตัดไว้ (ขนาด 50 bp) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs ของเซลล์มนุษย์ ด้วยชุดคำสั่ง ssearch จากฐานข้อมูล www.mirbase.org (32-35) (ดังรูปที่ 8 และรูปที่ 9)

The image shows the miRBase search interface. It includes a navigation bar with 'Home', 'Search', 'Reverse', 'Help', 'Download', 'FAQ', and 'Contact'. The main content area is titled 'Search miRBase' and contains several search methods:

- By miRNA identifier or keyword:** A text input field for entering a miRNA accession, name, or keyword, with 'Go', 'Advanced', and 'Example' buttons.
- By genomic location:** A section for selecting organism, chromosome, and start/end coordinates. It includes dropdowns for 'Choose species', 'Chr.', 'Start', and 'End', and a 'Get sequences' button.
- For clusters:** A section for selecting organisms and the desired inter-miRNA distance. It includes a 'Choose species' dropdown, an 'Inter-miRNA distance' input field (set to 1000), and a 'Get clusters' button.
- By tissue expression:** A section for selecting organism and tissue. It includes a 'Choose species' dropdown, a 'Select tissue' dropdown, and a 'Get experiments' button.
- By sequence:** A section for single sequence searches. It includes a text area for pasting a sequence, a 'Search sequences' dropdown (set to 'miRNA miRNAs'), a 'SEARCH' button, and options for 'E value cutoff' (set to 10), 'Maximum no. of hits' (set to 100), and 'Show results only from specific organisms' (with checkboxes for human, mouse, worm, fly, Arabidopsis).

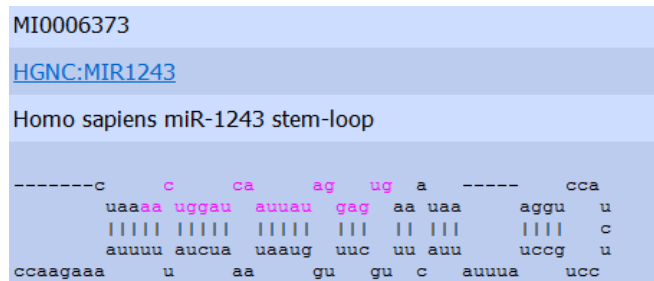
รูปที่ 8 ฐานข้อมูล miRBase สำหรับการค้นหา miRNAs ที่สนใจ

(<http://www.mirbase.org/search.shtml>)

Query: 25-36 **hsa-miR-1243** : 1-12 score: 106.3 evaluate: 8

```

UserSeq          50  UGCUCGUCUCUCCCGCUUACUAUCAACUGGAUCAAUUCCUGGUUGCCUU  1
hsa-miR-1243    1    AACUGGAUCAAUUUAUAGGAGUG  22
    
```



รูปที่ 9 ตัวอย่าง miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ viral RNA

- จำลองภาพการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA และทำนาย minimum free energy (MFE) ในการเข้าคู่ดังกล่าว ด้วยโปรแกรม RNAhybrid (36) จาก <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html> เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยชุดคำสั่ง ssearch ในฐานข้อมูล miRBASE เป็นการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs กับยีนที่สนใจ ในการวิเคราะห์การเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA จึงใช้ mature miRNA ที่เป็น complementary กับ miRNA ที่วิเคราะห์ได้จากฐานข้อมูล miRBASE

รูปที่ 10 โปรแกรม RNAHybrid เพื่อจำลองภาพการเข้าคู่ ระหว่าง microRNAs และ viral RNA

(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)



รูปที่ 11 แสดงการเข้าคู่ และทำนาย minimum free energy (MFE) ระหว่าง microRNAs

- พิจารณาตำแหน่งในการเข้าคู่ (complementary) ระหว่าง miRNAs และ viral RNA เพื่อจำแนกรูปแบบในการเข้าคู่กันของ miRNAs และ mRNAs เป้าหมาย โดยใช้เกณฑ์ดังนี้
 - 5'canonical พิจารณานิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (seed region) จากทางด้าน 5' ของ miRNA เทียบกับ mRNA ต้องมีนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันอย่างน้อย 6 ตำแหน่ง และมีการเข้าคู่กันในปลายด้าน 3' ด้วย
 - 5'seed พิจารณานิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2-8 (seed region) จากทางด้าน 5' ของ miRNA เทียบกับ mRNA ต้องมีนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันอย่างน้อย 6 ตำแหน่ง แต่ไม่มีการเข้าคู่กันในปลายด้าน 3'
 - 3'compensatory นิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' ของ miRNAs มีการเข้าคู่กันกับ mRNAs อย่างน้อย 10 ตำแหน่ง
- สร้างแผนภาพเวนน์ ออยเลอร์ miRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่สามารถเข้าคู่กับเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ
- เลือก miRNAs ที่สามารถเข้าคู่ได้กับ mRNAs ของไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนไวรัสต่อไป

2. การออกแบบ primers สำหรับเพิ่มปริมาณ viral gene ที่สนใจ

หลักในการออกแบบ primers

- primers จะต้องมีความจำเพาะกับยีนที่สนใจ มักเป็นส่วนที่เป็น conserve region
- ควรเป็น oligonucleotide ที่มีจำนวนลำดับ nucleotide ประมาณ 18-24 bp
- มี %GC content ประมาณ 30-80%
- Melting temperature (Tm) ไม่ควรสูงหรือต่ำเกินไป มักอยู่ในช่วง 60-70 °C
- หลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จะทำให้เกิด secondary structure ของ primers ได้แก่ Self-hybridization, Hair pin และ primers dimers
- เต็ม recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* สำหรับ forward primer และ *XhoI* สำหรับ reverse primer

จากการวิเคราะห์หา miRNAs ที่สนใจในขั้นต้น พบว่า miR-3145 จากเซลล์มนุษย์สามารถจับกับยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ H1N1, H5N1 และ H3N2 การทดสอบความสามารถของ miRNAs ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนของไวรัส จึงต้องออกแบบ primers สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน PB1 ในตำแหน่งที่ครอบคลุมบริเวณที่สามารถจับกับ miR-3145 ดังรูปที่ 12 และ 13

a) PB1_F1458

	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520
(A/Thailand/104/2009 (H1N1))	AGCAAAAAGAGT	CCTATATAAA	TAAAGACAGGGACATT	TGAA	TCA	CAAGCTTTTTT	TATCGGTATGGATT
(A/Thailand/CU32/2006 (H1N1))A.....T.....C.....G.....A.....T.....G.....
(A/Thailand/CU23/2006 (H3N2))G.....T.....C.....G.....A.....T.....G.....
(A/Thailand/NK165/2005 (H5N1))G.....T.....C.....G.....A.....T.....G.....

รูปที่ 12 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบ PB1_F1457

b) PB1_R1749

	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790
(A/Thailand/104/2009 (H1N1))	AATTCAGACG	GAGAGATC	ATTGAGTTA	AAGAAGCTG	GGGATCA	AACCAATCA	AAAGGTAGGGCTATTAGTA
(A/Thailand/CU32/2006 (H1N1))A.....A.....CC.....G.....A.....A.....C.....
(A/Thailand/CU23/2006 (H3N2))C.....C.....C.....G.....G.....C.....A.....
(A/Thailand/NK165/2005 (H5N1))C.....A.....A.....G.....C.....G.....T.....

รูปที่ 13 แสดงการเลือกบริเวณของนิวคลีโอไทด์สำหรับการออกแบบ B1_R1749

จากการออกแบบ primers PB1_F1458 และ PB1_R1749 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดมีขนาด 292 bp เมื่อตรวจสอบการจับกันระหว่าง primers ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1 พบว่าไม่เกิด secondary structure ของ primers ได้ผลดังรูปที่ 14

ACAGGGACATTTGAATTCAC Tm: 47.7 base: 20

GT TT TGATCCCACAGCTTCTT Tm: 49.9 base: 20

Ta: 55.74 59.45

รูปที่ 14 การตรวจสอบ self-hybridization และ primers dimmers ของ primers ที่ออกแบบ

จากนั้นจึงเพิ่มตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* สำหรับ forward primer และ *XhoI* สำหรับ reverse primer เพื่อใช้เชื่อมส่วนของยีนไวรัสที่เพิ่มปริมาณเข้ากับ pGL3MS2/Basic ทำให้ได้ primers 1 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 primers ที่ออกแบบสำหรับเพิ่มปริมาณยีน PB1

primer	sequence	product size
PB1_F1457	TTGCTAGCGGATCCGACAGGGACATTTGAATTCAC	301 bp
PB1_R1749	ACGGATCCTCGAGTTTGTATCCCACAGCTTCTT	

3. การเตรียม cDNA ของ viral gene

3.1 การสกัด viral RNA ด้วยวิธี Guanidium-isothiocyanate method ซึ่งมีวิธีการดังนี้

- เตรียมหลอดขนาด 1.5 mL ใส่ GTC mix (GTC 9000 μ L + ME 70 μ L) 500 μ L
- ใส่ตัวอย่างไวรัส 100 μ L ผสมด้วยการ vortex เป็นเวลา 15 วินาที
- เติม 2M NaOAC 50 μ L, phenol 500 μ L, $CHCl_3$: IAA (49:1) 100 μ L

- ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 15 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- เตรียมหลอดขนาด 1.5 mL ใหม่ เติม glycogen (20mg/mL) 4 µL
- ปิเปตต์ supernatant ที่ได้จากขั้นตอน ใสในหลอดที่เตรียมไว้
- เติม isopropanol 600 µL
- ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- เทส่วน supernatant ทิ้ง
- เติม 70% Ethanol 500 µL ใน pellet ผสมให้เข้ากัน
- ทำให้อแห้งเหวระเหย เป็นเวลา 5 นาที
- ละลายด้วย DEPC water 12 µL ผสมให้ละลาย

3.2 Reverse Transcription ด้วย SuperScript® III Reverse Transcriptase

- เตรียม reagent ดังตารางที่ 5 โดยเตรียม universal primers for influenza, dNTP และ template RNA ก่อน
- บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที
- เติม First-strand buffer, DTT, RNase OUT™ และ SuperScript™ II RT

ตารางที่ 5 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการ Reverse Transcription

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ความเข้มข้นสุทธิ
10 μ M universal primer for Influenza	1 μ L	0.5 μ M
10 mM dNTP	1 μ L	0.5 mM
template RNA	11 μ L	-
5x First-strand buffer	4 μ L	1x
0.1 M DTT	1 μ L	0.05 mM
RNase OUT™(40 units/ μ L)	1 μ L	40 units
SuperScript™ II RT (200 units/ μ L)	1 μ L	200 units
ปริมาตรสุทธิ	20 μ L	-

- ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา
- บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา
- บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ primers ที่ออกแบบโดย reagent ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นไปตามตารางที่ 6 ดังนี้

ตารางที่ 6 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ความเข้มข้นสุทธิ
2.5x Master mix (5 PRIME™)	10 μ L	1x
Distilled water	12 μ L	-
10 μ M Forward primer	1.0 μ L	0.4 μ M
10 μ M Reverse primer	1.0 μ L	0.4 μ M
cDNA	1.0 μ L	-
ปริมาตรสุทธิ	25 μ L	-

Condition of PCR

Pre-denaturation	94 °C	3.00 min	} 40 รอบ
Denaturation	94 °C	0.30 นาที	
Annealing	60 °C	0.30 นาที	
Extension	72 °C	1.00 นาที	
Post-extension	72 °C	7.00 นาที	

3.4 Agarose Gel Electrophoresis

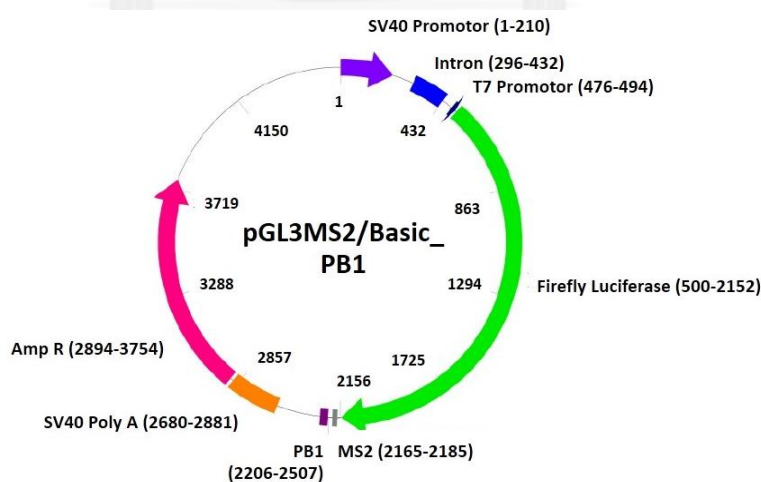
ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่ได้

ด้วยการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis และใช้ 100 bp DNA Ladder

เป็น Marker

4. การสร้าง Reporter (FLuc) / target (viral gene) vector

ในการสร้าง Reporter target vector ใช้ยีน Firefly Luciferase (FLuc) เป็น reporter gene และต่อส่วน 3'-UTR ของยีน FLuc ด้วย DNA ของยีนไวรัสที่สนใจ โดยใช้ pGL3MS2/Basic (37) เป็น vector ตั้งต้น โดยเมื่อต่อยีนของไวรัสที่สนใจ (PB1) เข้าสู่ส่วน 3'-UTR ของยีน Luc แล้ว จะได้ Reporter target vector ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 โครงสร้างของ Target Reporter vector (pGL3MS2/Basic_PB1) หลังการ insertion ด้วยยีน PB1 ของไวรัส

4.1 ตัด reporter vector (pGL3MS2/Basic) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NheI* และ *XhoI*

- เตรียม reagent ดังนี้

ตารางที่ 7 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการตัด pGL3MS2/Basic ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction
Distilled water	14 μ L
pGL3MS2/Basic	10 μ L
10X Tango™ buffer	3 μ L
<i>XhoI</i> (10 units/ μ L)	2 μ L
<i>NheI</i> (10 units/ μ L)	1 μ L
ปริมาตรสุทธิ	30 μ L

- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มด้วยอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที
- หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose Gel และใช้ 1kbp DNA Ladder เป็น Marker

4.3 ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ ด้วย HiYield™ Gel Extraction ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ

ดังนี้

- ตัด agarose gel ที่มี DNA ที่สนใจ
- ใส่ชิ้น agarose gel ที่ได้ลงใน microcentrifuge tube
- เติม DF Buffer 500 μ L ลงใน microcentrifuge tube ดังกล่าวผสมให้เข้ากัน ด้วยการ vortex
- บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C 10-15 นาที หรือจนกระทั่ง agarose gel ละลายหมด โดยระหว่างบ่มนั้นควรกลับ microcentrifuge tube ทุกๆ 2-3 นาที
- นำสารละลายที่ได้เติมลงใน DF column ที่วางอยู่ใน collection tube
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm 30 วินาที

- ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก ใส่ DF column กลับไปใน collection tube
- เติม Wash Buffer 600 μL ลงใน DF column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm 30 วินาที
- ถ่ายของเหลวใน collection tube ออก ใส่ DF column ใน collection tube
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm 2 นาที
- ถ่าย DF column ไปยัง microcentrifuge อันใหม่
- เติม Elution Buffer 20-50 μL ลงไปใน column
- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Elution Buffer ดูดซึมบนเยื่อใน DF column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm 2 นาที

4.4 การเชื่อมพลาสมิดกับผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product)

- เตรียม reagent ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการทำ Ligation

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ปริมาณสุทธิ
Distilled water	4 μL	-
10X T4 DNA ligase Buffer	1 μL	1x
Fermentus™ T4 DNA ligase (5u/ μL)	1 μL	5 units
pGL3MS2/Basic ที่ตัดด้วย <i>NheI</i> และ <i>XhoI</i> แล้ว (20ng/ μL)	1 μL	20 ng
PCR product (20ng/ μL)	3 μL	60 ng
ปริมาตรสุทธิ	10 μL	

- บ่มที่อุณหภูมิ 22 °C ซ้ำมคืน แล้วทำการ Transformation ใส่ใน E. coli ด้วยวิธี Heat Shock method

4.5 Transformation

- เตรียม competent cells (ซึ่งเตรียมในห้องปฏิบัติการ) ปริมาตร 50 μL ในหลอด 1.5 mL microcentrifuge tube จากนั้นเติม สารละลาย ligation 2 μL
- นำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
- นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 50 วินาที
- นำกลับมาแช่ในน้ำแข็งอีกครั้ง เป็นเวลา 2 นาที
- เติม SOC medium ปริมาตร 950 μL
- เขย่าที่ความเร็วประมาณ 200 rpm อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง
- นำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จนเหลือ pellet ประมาณ 50 μL
- spread plate บน LB agar plate ซึ่งมี ยาปฏิชีวนะ (Kanamycin หรือ Ampicillin) บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ ซ้ำมคืน
- เลือก colony ของ *E. coli* ที่มี insertec DNA ถ่ายลงใน LB broth ปริมาตร 2 mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ ซ้ำมคืน

4.6 Plasmid Extraction ด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ถ่าย LB broth ที่มีแบคทีเรีย 1.5 mL ลงใน microcentrifuge tube
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้ง supernatant ออก
- เติม PD1 Buffer 200 μL ผสมให้ทั่วโดยการ vortex
- เติม PD2 Buffer 200 μL ผสมโดยการกลับ microcentrifuge tube ไปมา
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- เติม PD3 Buffer 300 μL ผสมโดยการกลับ microcentrifuge tube ไปมา
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- เตรียม PD column ลงใน 2 mL Collection tube แล้วถ่ายส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากขั้นตอนลงใน PD column

- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- ถ่ายสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ที่ใส่ PD column กลับเข้าไปอีกครั้ง
- เติม W1 Buffer 400 μ L ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- ถ่ายสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ที่ใส่ PD column กลับเข้าไปอีกครั้ง
- เติม Wash Buffer 600 μ L ลงใน PD column
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- ถ่ายสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ที่ใส่ PD column กลับเข้าไปอีกครั้ง
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- ย้าย PD column ไปยัง 1.5 mL microcentrifuge tube
- เติม Elution Buffer 50 μ L ลงใน PD column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

4.7 การตรวจสอบ Reporter target vector ที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

- เตรียมสารที่ใช้ ดังตารางที่ 8 ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วใช้สภาวะของปฏิกิริยา (condition of PCR) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ความเข้มข้นสุทธิ
2.5x Master mix (5 PRIME™)	10 µL	1x
Distilled water	12 µL	-
10µM Luc3_F (forward primer)	1.0 µL	0.4 µM
10µM SV40_R (Reverse primer)	1.0 µL	0.4 µM
Plasmid (dilute 1:100)	1.0 µL	
ปริมาตรสุทธิ	25 µL	

Condition of PCR

Pre-denaturation	94 °C	3.00 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	94 °C	0.30 นาที	
Anneling	60 °C	0.30 นาที	
Extension	72 °C	0.30 นาที	
Post-extension	72 °C	7.00 นาที	

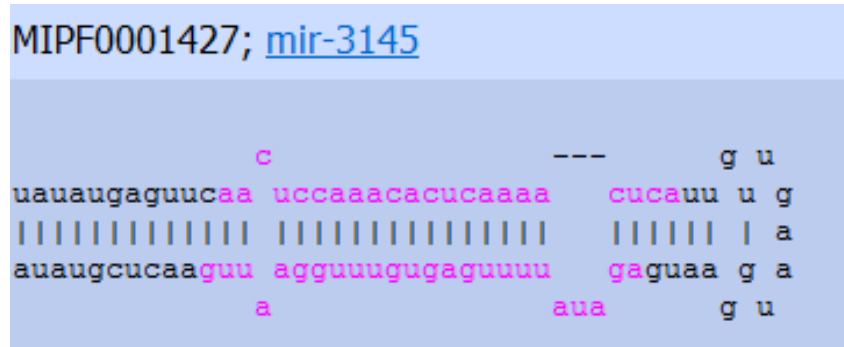
3.4 Agarose Gel Electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่ได้ด้วยการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น Marker

5. การออกแบบและสร้าง miRNA expression vector และ siLuc expression vector

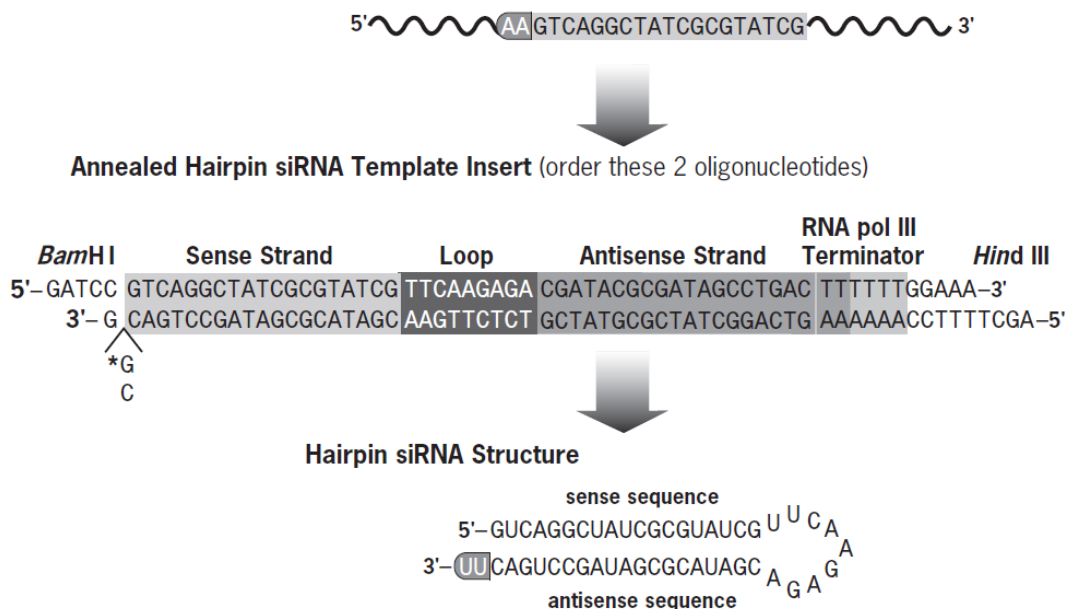
5.1 ออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวสำหรับสร้าง miRNA โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากฐานข้อมูล miRBASE โดย miRNA ที่สนใจคือ miR-3145



รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA-3145 precursor สำหรับเป็นต้นแบบในการสร้าง miRNA expression vector (สีชมพูคือส่วนที่เป็น mature miRNA)

- เพิ่มส่วนที่สามารถเชื่อมกับ restriction site โดยอาศัยการออกแบบจาก Instruction manual ของ pSilencer™ siRNA Expression Vector (Ambion) ที่ใช้เป็นเวกเตอร์ตั้งต้นดังรูปที่ 17 ได้นิวคลีโอไทด์สายยาว 2 เส้น ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 10



รูปที่ 17 ตัวอย่างการออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวสำหรับสร้าง pSilencer vector (รูปจาก pSilencer™ siRNA Expression Vector Instruction manual)

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สร้าง miRNA expression vector

Oligo nucleotides	sequence
miR-3145 สายบน	5'GATCCGTTCAACTCCAAACACTCAAAACTCATTGTTGAATGGAA TGAGATATTTTGAGTGTGGGAATTGAATTTTTGGAAA3'
miR-3145 สายล่าง	5'AGCTTTTCCAAAAAATTC AATTC CAAACACTCAAATATCTCAT TCCATTCAACAATGAGTTTTGAGTGTGGAGTTGAACG3'

5.2 ออกแบบนิวคลีโอไทด์สายยาวสำหรับสร้าง siRNA สำหรับยับยั้งยีน Firefly Luciferase (Luc) เพื่อเป็น positive control สำหรับการทดสอบความสามารถของ miRNA ด้วยการวัดการ แสดงออกของยีน Luc ซึ่งเป็น reporter gene โดยออกแบบให้นิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นคู่สม (Complementary) กับยีน Luc แล้วเพิ่มส่วนที่สามารถเชื่อมกับ restriction site โดยอาศัยการ ออกแบบจาก Instruction manual ของ pSilencer™ siRNA Expression Vector (Ambion) เช่นเดียวกับการออกแบบ miRNA expression vector

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวคลีโอไทด์สายยาวที่ใช้สร้าง miRNA expression vector

Oligo nucleotides	sequence
siLuc สายบน	5'GATCCGCGCTGCTGGTGCCAACCCTTCAAGAGAGGGTTGGCAC CAGCAGCGCTTTTTTGGAAA3'
siLuc สายล่าง	5'AGCTTTTCCAAAAAAGCGCTGCTGGTGCCAACCCTCTCTTGAA GGGTTGGCACCAGCAGCGCG3'

5.3 การเข้าคู่ของนิวคลีโอไทด์สายยาว (Oligo nucleotide annealing)

- ละลายนิวคลีโอไทด์สายยาวที่ออกแบบแต่ละสายด้วย 100 μ L Nuclease-Free Water และเจือจาง 1 μ L ของนิวคลีโอไทด์แต่ละสายด้วย TE buffer ในอัตราส่วน 1:100
- วัดความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ที่ A260 แล้วปรับความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์สาย ยาวให้เป็น 1 μ g/ μ L ด้วย TE buffer
- เตรียม Annealing mixture ปริมาตรสุทธิ 25 μ L ดังตารางที่ 12

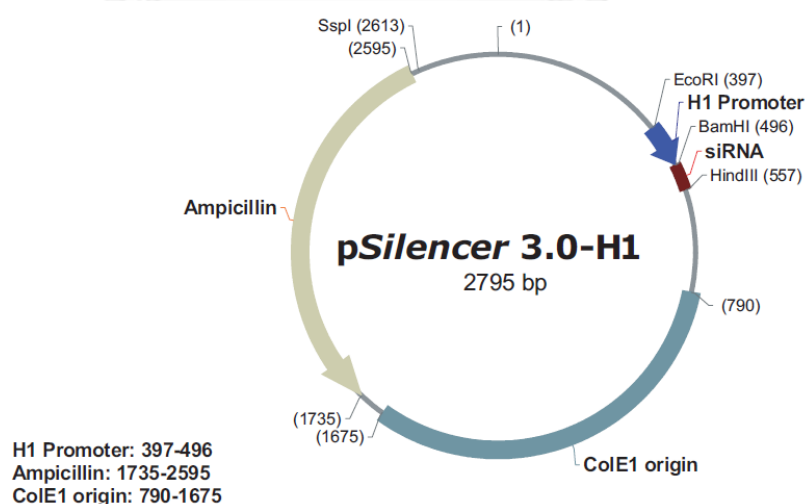
ตารางที่ 12 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Annealing mixture

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ปริมาณสุทธิ
นิวคลีโอไทด์สายยาว สายบน (Top strand) ความเข้มข้น 1 µg/µL	1 µL	40 ng
นิวคลีโอไทด์สายยาว สายล่าง (Bottom strand) ความเข้มข้น 1 µg/µL	1 µL	40 ng
1X annealing buffer	23 µL	
ปริมาตรสุทธิ	25 µL	

- บ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 3 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที
- เจือจางนิวคลีโอไทด์สายยาวที่เข้าคู่กันแล้ว 5 µL ใน Nuclease-free water 45 µL สำหรับใช้เชื่อมต่อกับ vector ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

5.4 ตัด vector ตั้งต้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

miRNA expression vector ที่สร้างขึ้น ใช้ pSilencer 3.0-H1 ดังรูปที่ 18 เป็น vector ตั้งต้น โดยต้องนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III



รูปที่ 18 โครงสร้างของ pSilencer 3.0-H1

(รูปจาก pSilencer™ siRNA Expression Vector Instruction manual)

- เตรียม reagent ดังตารางที่ 13
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มด้วยอุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 13 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการตัด pSilencer 3.0-H1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction
Distilled water	14 μ L
pSilencer 3.0-H1	10 μ L
10X Tango™ buffer	3 μ L
<i>Bam</i> HI (10 units/ μ L)	2 μ L
<i>Hind</i> III (10 units/ μ L)	1 μ L
ปริมาตรสุทธิ	30 μ L

- หาขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% Agarose Gel และใช้ 1kbp DNA Ladder เป็น Marker

5.5 การเชื่อม pSilencer 3.0-H1 กับนิวคลีโอไทด์สายยาว (Oligo nucleotides)

- เตรียม reagent ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ทำ Ligation

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ปริมาณสุทธิ
Distilled water	2 μ L	
10X T4 DNA ligase Buffer	1 μ L	1x
Fermentus™ T4 DNA ligase (5u/ μ L)	1 μ L	5 units
pSilencer 3.0-H1 ที่ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III (20ng/ μ L)	1 μ L	20 ng
Duplex oligo nucleotides (20ng/ μ L)	5 μ L	100 ng
ปริมาตรสุทธิ	10 μ L	

- บ่มที่อุณหภูมิ 22 °C ซ้ำมคืน แล้วทำการ Transformation ใส่ใน *E. coli* ด้วย Heat Shock method
- เพิ่มจำนวน miRNA expression vector ด้วยการ cloning โดยการ transformation ใน *E. coli* แล้วจึงสกัด plasmid ด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit

5.6 การตรวจสอบ miRNA Expression vector ที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

- เตรียมสารที่ใช้ ดังตารางที่ 12 ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL แล้วใช้สภาวะของปฏิกิริยา (condition of PCR) ดังแสดง

ตารางที่ 15 ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารที่ใช้	ปริมาตรต่อ 1 reaction	ความเข้มข้นสุทธิ
2.5x Master mix (5 PRIME™)	10 µL	
Distilled water	12 µL	
10 µM M13_F (forward primer)	1.0 µL	0.4 µM
10 µM pSilencer-H1_R (Reverse primer)	1.0 µL	0.4 µM
Plasmid (dilute 1:100)	1.0 µL	
ปริมาตรสุทธิ	25 µL	

Condition of PCR

Pre-denaturation	94 °C	3.00 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	94 °C	0.30 นาที	
Anneling	60 °C	0.30 นาที	
Extension	72 °C	0.30 นาที	
Post-extension	72 °C	7.00 นาที	

5.7 Agarose Gel Electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่ได้ด้วยการทำ 2% Agarose Gel Electrophoresis และใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น Marker

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

6.1 การนำเซลล์ออกมาเพาะเลี้ยง (cell recovery)

- นำเซลล์ที่อยู่ใน Freezing media 1 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 mL
- เติมน้ำ DMEM ปริมาตร 9 mL ผสมให้เข้ากัน
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติมน้ำ DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ปริมาตร 5 mL เพื่อละลายเซลล์ที่ตกตะกอน แล้วจึงปิเปตใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm²
- บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5%

6.2 การเลี้ยงเซลล์

- เมื่อเซลล์มีการเพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นที่ขวดเลี้ยงเซลล์ เท DMEM ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์
- ใส่ PBS (Phosphate Buffered Saline) ให้ท่วมเซลล์ เอียงขวดไปมาเพื่อชะล้างเซลล์
- เติมน้ำ 0.05% Trypsin ปริมาตร 1 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² (และใช้น้ำ 0.05% Trypsin ปริมาตร 3 mL สำหรับการเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm²)
- บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% เป็นเวลา 5 นาที

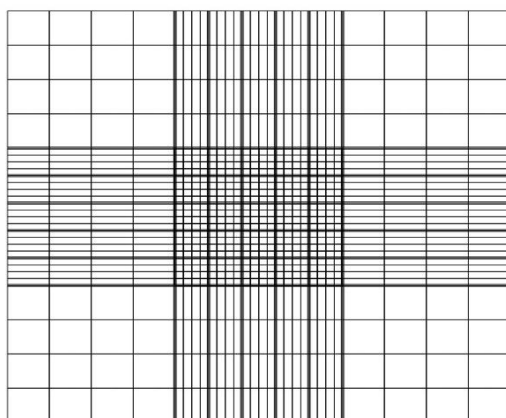
- ดูดเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 15 mL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ปริมาตร 3 mL เพื่อละลายเซลล์ที่ตกตะกอน
- ปิเปตต์เซลล์ปริมาตร 1 mL ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ แล้วเติม DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ปริมาตร 9 mL

6.3 การเก็บรักษาเซลล์ (Cell Freezing)

- ปิเปตต์เซลล์ที่จะเก็บลงในหลอดทดลองขนาด 15 mL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็น เวลา 5 นาที
- ทิ้งส่วนใส แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย Freezing media ปริมาตร 1 mL
- ปิเปตต์ใส่หลอด Cryotube นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C 60 นาที
- เก็บรักษาเซลล์ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

6.4 การนับจำนวนเซลล์ (Cell counting)

- ปิเปตต์เซลล์ที่ละลายอยู่ใน DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ปริมาตร 10 μL ผสมสีย้อม Bromphenol blue ปริมาตร 10 μL
- นำเซลล์ที่ผสมสีย้อมแล้วปริมาตร 10 μL ใส่ลงใน Hemocytometer
- ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับเซลล์ที่มีอยู่ในบริเวณทั้ง 4 ช่องดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 ตารางใน Hemocytometer

- คำนวณปริมาณเซลล์จากสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้จากทั้ง 4 ช่อง} \times 2 \times 10^4}{4} \text{ เซลล์/mL}$$

6.5 การเพาะเซลล์ (Cell seeding)

- หลังจากนับจำนวนเซลล์แล้ว เจือจางเซลล์ด้วย DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ให้ได้ปริมาณรวม 8×10^3 เซลล์ แล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate
- เติม DMEM ที่มี 10% FBS และ 1%v/v Antibiotic-Antimicrotic ให้มีปริมาตรรวม 100 μ L
- บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. การ Transfection

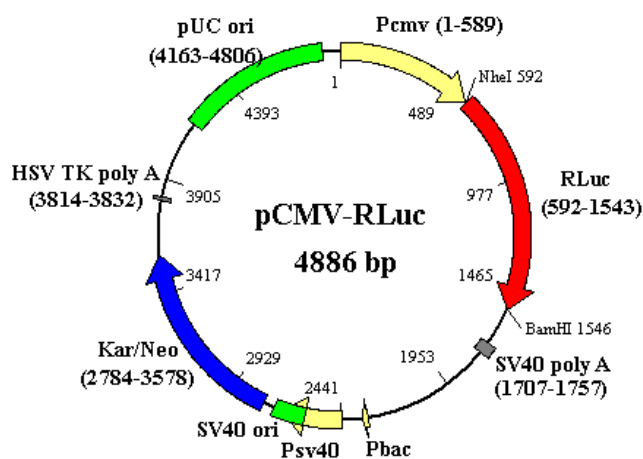
- ผสม Lipofectamine®2000 Reagent ปริมาตร 0.5 μ L กับ Opti-MEM® Reduced Serum Medium ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL
- บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
- เติม plasmid ที่ต้องการ transfect ได้แก่

Reporter target vector (pGL3MS2/Basic_PB1 หรือ pGL3MS2/Basic)	100 ng
miRNA expression vector (pSilencer_H1 หรือ pSilencer_miR3145 หรือ pSilencer_siLuc)	50 ng
Control reporter vector (pCMV_RLuc)	10 ng

ซึ่ง control vector มียีน Renilla Luciferase เป็น reporter gene ดังรูปที่ 20)

- บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

- หยอด mixture ที่เตรียมลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มีเซลล์อยู่ใน DMEM ที่มี 10% FBS แต่ไม่มี Antibiotic หรือ Antimicrotic



รูปที่ 20 โครงสร้างของ control reporter vector (pCMV-RLuc)

8. การทดสอบความสามารถของ miRNAs ที่คัดเลือกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน

ใน Reporter target vector

- เท media ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์
- ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS แล้วเทสารละลายทิ้ง
- เติม 1X PLB 20 μ L
- ค่อยๆ เขย่า plate เป็นเวลา 15 นาที
- เติม LARII 50 μ L ลงใน 96-well plate white opaque
- ตั้งค่าเครื่อง luminometer
- เติม PLB lysate 20 μ L ผสมให้เข้ากัน
- วัด Firefly luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 560 nm
- เติม Stop & Glow® 100 μ L
- วัด Renilla luciferase activity ที่ความยาวคลื่น 482 nm

- หาค่า relative luciferase โดยคำนวณจาก

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

- เปรียบเทียบค่า relative luciferase activity ของ miRNAs ในแต่ละชุดการทดลอง

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธี Student's *t*-test เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ Relative Luciferase Activity ในแต่ละชุดการทดลองเป็นอิสระต่อกัน โปรแกรมทางสถิติที่ใช้วิเคราะห์คือ IBM SPSS Statistics Version 20.0 และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ

ผลการศึกษาพบว่า miRNAs ของมนุษย์ 76 ชนิดที่สามารถจับกับยีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ในจำนวนนี้มี miRNAs 70 ชนิดที่สามารถจับอย่างจำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์เดียว แบ่งออกเป็น 21 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H1N1 (ตารางที่ 16), 27 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H5N1 (ตารางที่ 17) และ 22 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H3N2 (ตารางที่ 18) ทั้งนี้พบว่ามี miRNAs 6 ชนิดที่สามารถจับกับยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ (รูปที่ 21) ได้แก่

- hsa-miR-216b สามารถจับกับยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2 และ H5N1
- hsa-miR-3145 สามารถจับกับยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, H5N1 และ H3N2
- hsa-miR-3682 สามารถจับกับยีน NA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2
- hsa-miR-4513 สามารถจับกับยีน PA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H3N2
- hsa-miR-4753 สามารถจับกับยีน PA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 และ H5N1
- hsa-miR-5693 สามารถจับกับยีน PA ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1 และ H3N2

เป็นที่น่าสังเกตว่ายีนของไวรัสที่ miRNAs ของมนุษย์สามารถจับได้ส่วนใหญ่เป็นยีนในกลุ่ม polymerase complex (PB2, PB1 และ PA) สิ่งที่น่าสนใจคือ hsa-miR-3145 เป็น miRNAs ชนิดเดียวที่สามารถจับบริเวณยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ครบทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 21 และ 22) จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลของ hsa-miR-3145 ที่ทำนายไว้ในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อไป

ตารางที่ 16 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-26a-2	NP 196-215	target 5' U C C C C 3' GGACGA UAAUC AGAAUAG UUUGUU AUUAG UCUUUAUC miRNA 3' C C U C 5'	-20.5	5'canonical
hsa-miR-105	NP 104-122	target 5' A AGA C 3' CAGA AAUC GCAUCUGU GUCU UUAG CGUAGACA miRNA 3' CUUCA C A U 5'	-23.1	5'canonical
hsa-miR-128	PA 364-382	target 5' C A A A 3' AAAGAG ACCGGUUCAUUG UUUCUC UGSCCAAGUGAC miRNA 3' ACU 5'	-31.8	3'-compen
hsa-miR-129	PB1 2276-2295	target 5' G AA G U 3' AAG CUCAGAC GCAAAA UUC GGGUCUC CGUUUUU miRNA 3' CG G C 5'	-25.2	5'canonical
hsa-miR-136	NP 58-78	target 5' A G AU A 3' C AUCAU GAACAAUUGGAG G UAGUA UUUGUUUACCCU miRNA 3' A G GU A 5'	-28.2	5'canonical
hsa-miR-150	PB2 1104-1132	target 5' AUGAAGAAUUC U A 3' GGU ACAA GGUUGGGAGA CCA UGUU CCAACCCUCU miRNA 3' GUGA C 5'	-29.1	5'canonical
hsa-miR-186	PB2 2098-2122	target 5' U AU UCA A 3' CCUGAGAGG UUC UUUUGGGC GGGUUUUUU AAG GAAACCCG miRNA 3' UG 5'	-25.2	5'canonical
hsa-miR-520d	PA 2022-2043	target 5' U C UU UUC A 3' GCUU UCA G AGGCACUU UGGG GGU C UUCUGGAA miRNA 3' U UU UC A 5'	-19.5	5'canonical
hsa-miR-556	PB2 955-993	target 5' A GCAAG GCAAUAGGGUUGAGG U U 3' CAUUA GCA AU AGCUCAUC GUADA UGU UA UCGAGUAG miRNA 3' GA A C 5'	-20.3	5'canonical
hsa-miR-581	NA 681-692	target 5' U G 3' GAGAACACAGA miRNA 3' UGACUAGAU CUCUUUGUUUCU 5'	-23.8	5'seed
hsa-miR-876	PB1 915-933	target 5' A U CAC G 3' GAUU CUUU AUACAU UUAA GAAA UUGGUGG miRNA 3' AC U CAU U 5'	-14.2	5'canonical
hsa-miR-1243	PB2 1161-1179	target 5' A AGGA G 3' CC GAUUGAUCCAGUU miRNA 3' GUGA AUA UUAACUAGGUCAA 5'	-24.3	5'seed
hsa-miR-1245b	HA 1055-1067	target 5' A U 3' AUCUAGAGGCCUA miRNA 3' AAAUUCAC UAGA UUUCCGGAU 5'	-25.3	5'seed
hsa-miR-1255b	NS 708-736	target 5' G CAGAAUU G U A 3' GGA UCAG AAA AAGSUGSUU CCU ACUC UUU UUUACCAA miRNA 3' A G C 5'	-25.4	5'canonical
hsa-miR-1289	PB1 2004-2027	target 5' U ACUACAC C 3' UGCA AUUCCUGGAUUC ACGU UAAGGACCUAGAGG miRNA 3' UUUU C U 5'	-29.0	5'canonical
hsa-miR-3145*	PB1 1552-1569	target 5' A C G 3' CC AGC UUUGGAGUGUCU miRNA 3' GUUAA U U GG UUG GAGUUUUUAUGA 5'	-18.2	5'seed
hsa-miR-3155a	PA 1374-1392	target 5' A G A 3' AGU UCCCACUGCAGGGCU miRNA 3' UCA AGGGUGACGUCUCGG ACC 5'	-36.9	3'compen
hsa-miR-3155b	PA 1378-1392	target 5' G A 3' UCCCACUGCAGGGCU miRNA 3' AGGGUGACGUCUCGG ACC 5'	-35.4	3'compen
hsa-miR-3160	NS 841-860	target 5' A A C A 3' G GCUUUCU GUUUCAGCUU C CGAAGA CAGAGUCGAG miRNA 3' A C U A 5'	-30.7	5'canonical
hsa-miR-3682*	NA 1011-1028	target 5' G UG GG U 3' U U UCCA GUUUCGUC A G AGGU CAUAGUAG miRNA 3' G UG GGA U 5'	-19.1	5'canonical

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-4278	PB2 245-262	target 5' A A A 3' CAAGG CAAACCCUCUGG GUUCC GUUUGGGGAUC miRNA 3' C 5'	-31.2	5'canonical
hsa-miR-4507	PB1 212-228	target 5' G C A 3' CA CCCAGCUCACCCG GU GGGUCGGGUUGGGU miRNA 3' GG C C 5'	-34.4	5'seed
hsa-miR-4513*	PA 588-608	target 5' U A UU C 3' AUGGG UUCC UCGUCAGUC UACCC GAGG GGCAGUCAG miRNA 3' G UC A 5'	-32.3	5'canonical
hsa-miR-4653	NP 529-553	target 5' C U GG AAC C 3' UCUCUAA GCAA UUC ACUUC AGAGGUU CGUU GGG UGAGG miRNA 3' AAU U 5'	-20.1	3'compen
hsa-miR-4753*	PA 1091-1114	target 5' C AC ACAUG C 3' CAAGG AAAGA AAGAGAA GUUCC UUUCU UUCUCUU miRNA 3' UGU GA 5'	-20.9	5'canonical

* หมายถึง สามารถจับกับยีนของไวรัสได้มากกว่า 1 สายพันธุ์

ตารางที่ 17 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-92a	PB2 305-324	target 5' A C G 3' AUGGGCCGG GACAAGUGCA UGUCCGGCC CUGUUCACGU miRNA 3' UAU 5'	-39.2	5'canonical
hsa-miR-127	PB1 1614-1638	target 5' G GCAAC C U 3' GGCCA AGCUCAGAUGG UCU UCGGU UCGAGUCUGCC AGG miRNA 3' U CU 5'	-33.8	3'compen
hsa-miR-146a	PB2 948-964	target 5' G A C 3' UCUG GGA UCAGUUCUU GGGU CCU AGUCAAGAG miRNA 3' UU A UA U 5'	-21.7	5'canonical
hsa-miR-216b*	NA 822-842	target 5' A G G A 3' UCACAU UGU UGCAGGGAU AGUGUA ACG ACGUCUCUA miRNA 3' A G AA 5'	-31.3	5'canonical
hsa-miR-300	PB1 1844-1864	target 5' G CA CA C 3' GAUGAAGAUUAC GGG GA CUACUUCUAAUG CCC CU miRNA 3' A CC UC 5'	-25.4	3'compen
hsa-miR-367	PB2 1186-1208	target 5' U GCAAU UG G 3' GAG CAU UAGCAUUGU CUC GUA AUGGUUGUCA miRNA 3' U AAC UA 5'	-21.0	5'canonical
hsa-miR-371b	PB1 2065-2086	target 5' A A A A 3' GAAGUGCUGC AUCU UUUGAG UUUCACGGCG UAGA AAACUC miRNA 3' G A 5'	-30.8	5'canonical
hsa-miR-432	HA 280-298	target 5' A A CA C 3' GUGGAG AGCC AUCCAG UACCUC UCGG UAGGUC miRNA 3' UCUG C 5'	-28.6	5'canonical
hsa-miR-520e	PB2 1010-1035	target 5' U G AAGGAA A 3' CC UCAAA GAGGAAGUGCUU GG AGUUU UUCUUCUGGAA miRNA 3' G A 5'	-27.1	5'canonical
hsa-miR-548c	NS 380-401	target 5' A CUUCAG U A 3' GCAAA UG GAUUUUUG CGUUU AC CURAAAAAC miRNA 3' UCAUUA U 5'	-17.6	5'canonical
hsa-miR-548y	PB1 2259-2272	target 5' C A 3' GGCAAAAAUAGUGA CCGUUUUUUGUCACU miRNA 3' AAUGAAAA 5'	-25.0	3'compen
hsa-miR-550a	PB2 1417-1437	target 5' A A A G 3' AUGU C CUGAG GGAGUAAGA UACA G GACUC CCUCAUUCU miRNA 3' C GU 5'	-29.7	5'canonical
hsa-miR-550b	PB2 1412-1437	target 5' A AAA CA A G 3' CAG UGU CUGAG GGAGUAAGA GUC ACG GACUC CCUCAUUCU miRNA 3' G 5'	-29.0	5'canonical
hsa-miR-576	HA 1542-1570	target 5' A AAUUA UA C 3' GAGGA GUGGAG AAAUUGGAU UUUCU CACCUC UUUAUCUUA miRNA 3' G 5'	-25.7	5'canonical
hsa-miR-660	PA 682-704	target 5' A A ACC G A 3' AACUUU GA UAUGU GAUGG UUGAGG CU AUACG UUACC miRNA 3' G CAU 5'	-16.9	5'canonical
hsa-miR-670	M 876-892	target 5' U G U 3' GCC GC UACG CAGGGG UGG UG AUGU GUCCCU miRNA 3' G U GA G 5'	-21.3	5'canonical
hsa-miR-1248	PA 1307-1329	target 5' G U AA A 3' AGCACA UGC GUAUGAGAAGG UCGUGU ACG UAUGUUUCUCC miRNA 3' AAA C AA A 5'	-32.3	5'canonical
hsa-miR-1282	PB1 686-712	target 5' U AAUUGAAGA G 3' GCAGAAAGAGGCA GACGA CGUCUUUUUCGU UUUCU miRNA 3' UU 5'	-30.1	3'compen
hsa-miR-3145*	PB1 1504-1540	target 5' C UAUGGAGUCGCC GU CAAUUUCAG A CUUGGAGUGUCI GUUAAGGUU U GAGUUUUUAUG miRNA 3' GU 5'	-20.7	5'canonical
hsa-miR-3189	PB2 1532-1568	target 5' G UAUCUCCGAAAGAG CGAA UACUCU GUCAG ACCCAGGC AUGGGG UAGUC UGGGUUCC miRNA 3' G 5'	-27.6	5'canonical

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-3916	NP 433-449	target 5' A AC C 3' ACUGCUGGUCU UCA UGACGACCAGAA AGU miRNA 3' GUC CCCGGU 5'	-27.9	3'compen
hsa-miR-3925	PB2 978-991	target 5' G A 3' AGGCUUCACUUUCA UCCGAGGUGAAGU miRNA 3' CAAGAGAA 5'	-27.7	3'compen
hsa-miR-3975	PB1 2267-2281	target 5' A A C 3' UAGUG AUUAGCUUC AUCAC UAAUCGGAG miRNA 3' CACUUC G U 5'	-22.1	5'seed
hsa-miR-4260	NA 927-946	target 5' C A AC C U 3' GG GAC UCCA GCCCCAA CC CUG AGGU CGGGGU miRNA 3' A A C 5'	-30.3	5'canonical
hsa-miR-4646	PB1 559-576	target 5' A A U C 3' G GAAGGG GAGGGACAA C CUUCCC CUCCUUGU miRNA 3' GA C U A 5'	-33.7	5'canonical
hsa-miR-4668	NP 663-681	target 5' U U A 3' CUGGAGAGCGAAAA GGA GACCUUUUUUUUUU CCU miRNA 3' AAAAG 5'	-26.0	3'compen
hsa-miR-4728	HA 427-446	target 5' A U C U 3' GUAGGAG GAG UCAGCAUG CGUCCUC CUC AGUCGUAC miRNA 3' GACCC C C 5'	-33.3	5'canonical
hsa-miR-4753*	PB1 542-563	target 5' A UUU C G 3' ACACA C AGAGAAAGAGAA UGUGU G UUUUUUUUCUU miRNA 3' UCC A 5'	-20.9	5'canonical
hsa-miR-4769	HA 1052-1078	target 5' C UUUUAUA G 3' AGG GAGGGAGGAUUGCCAGG UCC CUCCCUUACCGUCU miRNA 3' CA C 5'	-40.0	5'canonical
hsa-miR-5006	PB2 609-630	target 5' U AUACAUGU C 3' UGC UGGAAAGGGAA ACG ACCUUUCCUU miRNA 3' G GUCCU U 5'	-26.2	5'canonical
hsa-miR-5693*	PA 1354-1369	target 5' C G A 3' CAUU CAGGCCACUG GUAA GUCUCGGUGAC miRNA 3' CUCAA A G 5'	-28.7	5'canonical

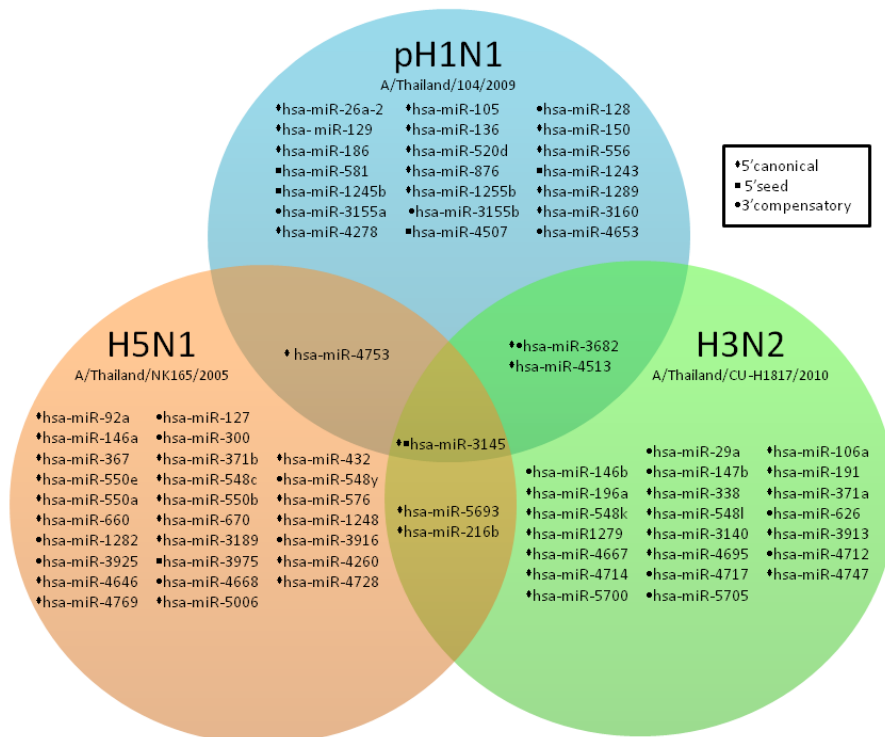
* หมายถึง สามารถจับกับยีนของไวรัสได้มากกว่า 1 สายพันธุ์

ตารางที่ 18 ผลการทำนาย miRNAs ที่สามารถจับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-29a	HA 1540-1569	target 5' C AACC GGUUUCAGAU GG GAGUUGA A 3' UUGGCUAAAGUCUA CC GCUG CGAU 5'	-29.0	3'compen
hsa-miR-106a	PB2 1006-1028	target 5' G A U AAA G 3' UCA UC G CAAA GAAGAAGA AGU AG C GUUU CUUCUUCU	-18.4	5'canonical
hsa-miR-146b	PA 556-578	target 5' A CU G G 3' GGCCU AUGGGAUUC UUC UCA UCGGAUACCUUAAG AAG AGU	-31.7	3'compen
hsa-miR-147b	PB1 776-799	target 5' U G AAAA U 3' UAGC AGAAGCAUUU CG GC AUCG UUCUGUAAA GC UG	-27.1	3'compen
hsa-miR-191	PA 553-566	target 5' C C U 3' AGAGGC UAUGGGA UUUCCG AUAUCCU	-19.6	5'canonical
hsa-miR-196a	HA 1306-1338	target 5' U U CAUACAACGCGG C C 3' CUC GGU AG UUCUUGUUGCC GAG CCG UC AAGAACAACGG	-28.0	5'canonical
hsa-miR-216b*	NA 873-891	target 5' G G G C 3' UCA AU UGUCUGCAGAGA AGU UA ACGGACGUCUCU	-30.1	5'canonical
hsa-miR-338	PB2 237-255	target 5' G G G U 3' UAAAA A UGAUGUCUGGA GUUUUA U ACUACGACCU	-28.0	5'canonical
hsa-miR-371a	PB2 2002-2023	target 5' U AA C U 3' CUCGSA AGAUG CGGCACUU GAGUUU UCUAC GCCUGSAA	-29.3	5'canonical
hsa-miR-548k	PB2 1307-1337	target 5' A UUUUCAGAA G A U 3' GSCA AGAU CG AAGUGCUUUU UCGU UUA GC UUCAUGAAAA	-22.0	5'canonical
hsa-miR-548l	PB1 940-959	target 5' C U G 3' CAAAACCC CGAAUGUUUUU GUUUUGGG GUUUUUGAAAA	-22.5	5'canonical
hsa-miR-626	PB2 1305-1325	target 5' U AAGAU G 3' AAGGCAUUUCAGA GC UUCUGUAAAAGUCU CG	-25.4	3'compen
hsa-miR-1279	PA 1165-1181	target 5' C UUU U 3' GA GAAGCAAUUGA CU CUUCGUUADACU	-22.9	5'canonical
hsa-miR-3140	PB1 1994-2012	target 5' C ACU CCUGSAUCCCAAGAG G 3' UGA GACUUUAGGGUUUUC GA 5'	-33.0	5'canonical
hsa-miR-3145*	PB1 1531-1549	target 5' C U U G 3' CCAG UUUUGGAGUGUCU GSSU GAGUUUUUUAUGA	-18.1	5'canonical
hsa-miR-3682*	NS 985-1006	target 5' A UUC C 3' AUGAUACACAG GAGU UACUAUUGUGUC UUCA	-22.6	3'compen
hsa-miR-3913	NP 580-600	target 5' U A UGGC G 3' GACAUCAA AUCA GUCCCAA CUGUAGUU UAGU CAGGGUU	-29.9	5'canonical
hsa-miR-4513*	PA 25-50	target 5' U A UU C 3' AUGGG UUC UCGUCAGUC UACCC GAGG GCGAGUCAG	-32.3	5'canonical
hsa-miR-4667	PA 560-582	target 5' U UG C A 3' UGGG A AAGGAGGGA ACCCC U UUCUCCUU	-35.1	5'canonical
hsa-miR-4695	NS 359-378	target 5' A G GAAAUCCUA U 3' UUGUU GC CCAUUGCCUUCU GACGA CG GUGACCGGAGGA	-30.1	5'canonical

Human miRNAs	Target viral gene	Hybridization	Pairing energy (kcal/mol)	Pairing pattern
hsa-miR-4712	PB2 484-514	target 5' C AAAUGAGAGAC U A 3' UUUACUCUCUG GUAC UGGG miRNA 3' C GA ACCU 5'	-27.9	3'compen
hsa-miR-4714	PB1 1804-1825	target 5' A AUCAACCUGAG U U A 3' UAGUUGGAUUC CC ACAGA miRNA 3' C CAA 5'	-30.4	3'compen
hsa-miR-4717	NS 168-198	target 5' C UAGACAUCAAA U 3' GGUC GCAGCCACCAUGU miRNA 3' U UGUCGGUGGUACA CA 5'	-36.0	5'canonical
hsa-miR-4747	NA 1053-1075	target 5' A U G U 3' UGGGG GAAAG CUGGGCCUU miRNA 3' G C G GCGCCGAA 5'	-38.1	5'canonical
hsa-miR-5693*	PA 1353-1370	target 5' C G A 3' CAUU UAGAGCCACUG miRNA 3' CUCAA A GUCUCGGUAC 5'	-27.9	5'canonical
hsa-miR-5700	PA 2126-2146	target 5' CUGACAC A 3' CCUUC AUGCAUUA miRNA 3' GGAAG UACGUAAU 5'	-17.2	5'canonical
hsa-miR-5705	NA 1375-1400	target 5' A U GA GG G 3' ACAGGC CAUG GCCU UG GCG miRNA 3' G UGUCG GUAC CCGG GC UGU 5'	-33.6	3'compen

* หมายถึง สามารถจับกับยีนของไวรัสได้มากกว่า 1 สายพันธุ์

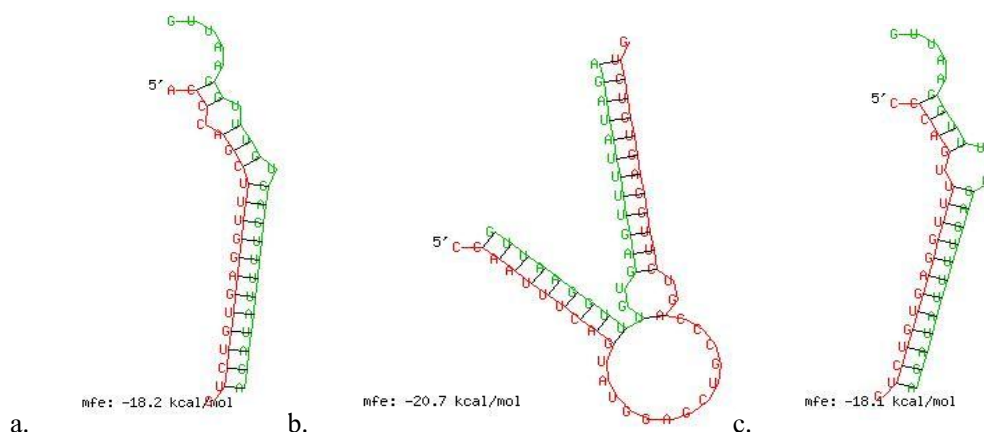


รูปที่ 21 แผนภูมิแสดงผลการวิเคราะห์หา miRNAs ที่จับได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 สายพันธุ์

จากผลการวิเคราะห์หา miRNAs ด้วยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงระหว่างจีโนมของไวรัสกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNAs ของเซลล์มนุษย์จากฐานข้อมูล miRBASE พบว่า miR-3145 เป็น miRNA เพียงชนิดเดียวที่สามารถเข้าคู่ได้กับยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบการเข้าคู่ ระหว่าง microRNAs และ viral RNA และ minimum free energy (MFE) ที่ทำนายได้ ได้ผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงการเข้าคู่ระหว่าง miR-3145 และยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ทั้ง 3 สายพันธุ์

Viral subtype	Hybridization of miR-3145	Pattern	MFE (kcal/mol)
H1N1	<pre> target 5' A C G 3' CC AGC UUUGGAGUGUCU GG UUG GAGUUUUUAUAGA miRNA 3' GUUAA U U 5' </pre>	5'seed	-18.2
H5N1	<pre> target 5' C UAUGGAGCUGCCC GU G 3' CAAUUUCAG A CUUGGAGUGUCU GUUAAGGUU U GAGUUUUUAUAGA miRNA 3' GU 5' </pre>	5'canonical	-20.7
H3N2	<pre> target 5' C U G 3' CCAG UUUGGAGUGUCU GGUU GAGUUUUUAUAGA miRNA 3' GUUAA UGU 5' </pre>	5'seed	-18.1



รูปที่ 22 ภาพจำลองการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA ของยีน PB1

a. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

b. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1

c. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2

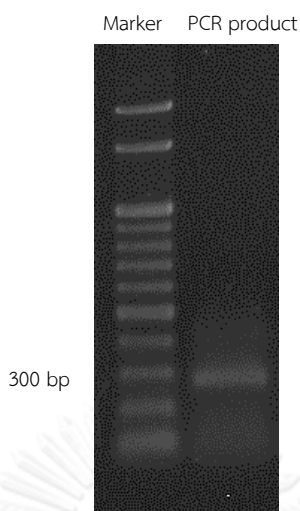
(สีเขียว คือ hsa-miR-3145 และสีแดงคือยีน PB1 ของไวรัสสายพันธุ์ต่าง)

การสร้าง Reporter (FLuc) target (PB1) vector

ในการทดสอบความสามารถของ miRNA-3145 ในการจับกับยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ครั้งนี้ ใช้วิธีทดสอบแบบ 3'UTR reporter assay ด้วยการสร้าง Reporter target vector คือ การต่อส่วนของยีน PB1 ที่เป็นเป้าหมายของ miRNA-3145 เข้ากับส่วน 3'UTR ของยีน reporter นั่นคือ Firefly Luciferase (FLuc)

การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน PB1 ที่เป็นเป้าหมายของ miR-3145

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เป็นแม่แบบของยีน PB1 โดยภายหลังการสกัด RNA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วจึงทำการสร้าง cDNA ด้วยกระบวนการ Reverse Transcription โดยใช้ Influenza universal primers ซึ่งเป็น primers ที่สามารถจับกับจีโนมของไวรัสไข้หวัดใหญ่ จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนที่เป็นเป้าหมายของ miRNA-3145 ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ด้วยการใช้ primers PB1_F1457 และ PB1_R1749 ตามที่ได้ออกแบบไว้ในขั้นตอน ตารางที่ 4 ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ด้วยการทำ Agarose Gel Electrophoresis ได้ผลดังรูปที่ 23



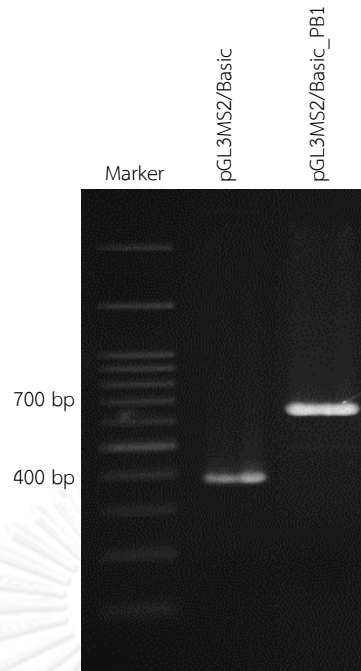
รูปที่ 23 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน PB1 ที่สนใจ
โดยใช้ primers PB1_F1458 และ PB1_R1749

พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 300 bp ตรงกับการออกแบบที่จะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 292 bp จากนั้นจึงสกัด DNA ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel Extraction แล้วดำเนินการเชื่อมส่วนของยีน PB1 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส กับ pGL3MS2/Basic เพื่อสร้างเป็น Reporter Target Vector ต่อไป

การเชื่อมยีน PB1 กับ pGL3MS2/Basic ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NheI*

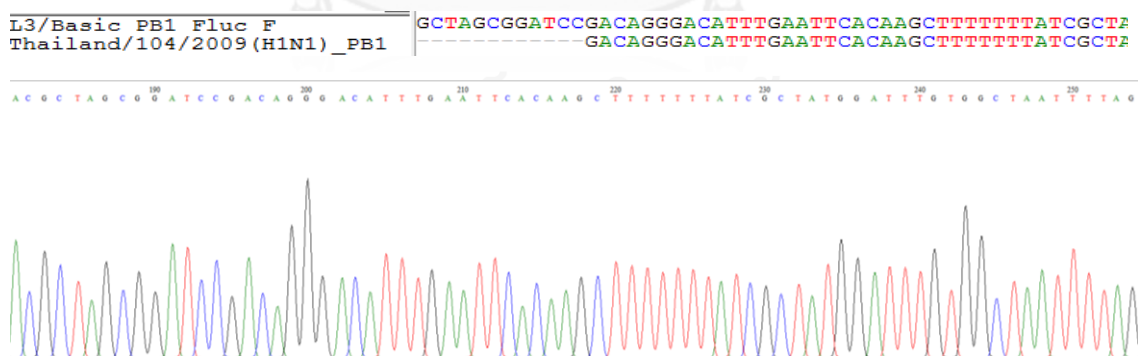
หลังจากที่เชื่อมส่วนของยีน PB1 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส กับ pGL3MS2/Basic ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *NheI* แล้วนำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี Heat Shock จากนั้นเลือกโคโลนีเดียวที่มีคุณสมบัติต้านยา Ampicillin นำไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 2 mL เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

สกัดพลาสมิดด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ Luc3_F และ Sv40_R เป็น primers ดังตารางที่ 2 จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย 2% Agarose Gel Electrophoresis พบว่าได้ขนาดประมาณ 700 bp ดังรูปที่



รูปที่ 24 ผลิตร่วมกันจากการตรวจสอบ pGL3MS2/Basic ที่เชื่อมด้วยยีน PB1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ-เมอเรส โดยใช้ Luc3_F และ Sv40_R เป็น primers

จากการนำพลาสมิดที่สกัดได้ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) พบว่ามีส่วนของยีน PB1 ที่เป็นเป้าหมายของ miR-3145 ต่ออยู่ที่ส่วน 3'-UTR ของยีน Firefly Luciferase ดังรูปที่ 25 และเรียก Reporter Target Vector ที่ได้ว่า GL3MS2/Basic_PB1



รูปที่ 25 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGL3MS2/Basic_PB1 เทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

การสร้าง miRNA expression vector

หลังจากที่เชื่อมส่วนนิวคลีโอไทด์สายยาว ดังตารางที่ 10 สำหรับสร้าง miRNA expression vector และ siRNA_FLuc expression vector โดยใช้ pSilencer 3.0-H1 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี Heat Shock จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีคุณสมบัติต้านยา Ampicillin นำไปเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 2 mL เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

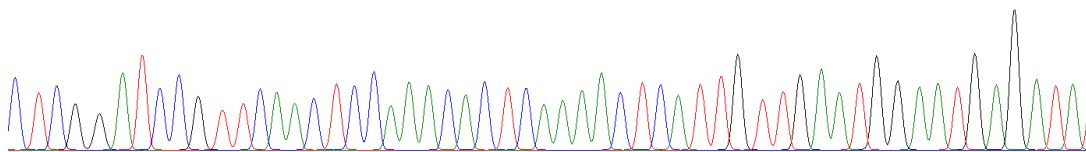
สกัดพลาสมิดด้วย HiYield™ Plasmid Mini Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ M13_F และ pSilencer-H1_R เป็นprimers จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) พบว่ามีส่วนของ miRNA-3145 ต่ออยู่กับ pSilencer ดังรูปที่ 26 และเรียก Reporter Target Vector ที่ได้ว่า pSilencer_miR3145

```

1067174 pSilencer miR3145 ACCACTCGGATCCGTTCAACTCCAAACACTCAAAACTCATTTGTTGAAATGGAATGAGATATTTTGAGTGTGGAAATGAAATTTTTGGAAAAGC1
miR-3145 top strand -----GATCCGTTCAACTCCAAACACTCAAAACTCATTTGTTGAAATGGAATGAGATATTTTGAGTGTGGAAATGAAATTTTTGGAAA-----

```

C T C G A T C C G T T C A A C T C C A A A C A C T C A A A A C T C A T T T G T T G A A T G G A A T G A G A T A T T T T G A G T G T T G G A A T G A A T T T T T T G G A A A A G C T



รูปที่ 26 แสดงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pSilencer_miR3145

Dual Luciferase assay

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ A549 จำนวน 8×10^3 เซลล์ ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการ transfection โดยอาศัย Lipofectamine®2000 reagent ในการนำพลาสมิดต่างๆ เข้าสู่เซลล์ ได้แก่

- pGL3MS2/Basic_PB1 หรือ pGL3MS2/Basic 100 ng
- pSilencer_miR3145 หรือ pSilencer_siRNA_FLuc หรือ pSilencer-H1 50 ng
- pCMV_RLuc 10 ng

โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_H1
- กลุ่มที่ 2: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_siRNA_FLuc
- กลุ่มที่ 3: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_miR3145
- กลุ่มที่ 4: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer-H1
- กลุ่มที่ 5: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_siRNA_FLuc
- กลุ่มที่ 6: transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_miR3145

เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง นำมาวัดการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase และ *Renilla* Luciferase โดยวัดการเปล่งแสง (Luminescent) ที่ความยาวคลื่น 560 nm และ 480 nm ตามลำดับ โดยค่าการเปล่งแสงของยีน Firefly Luciferase และ *Renilla* Luciferase ของทุกกลุ่มการทดลองจะต้องนำมาลบด้วยกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการ transfection (MOCK) หลังจากนั้นนำมาหาค่า Relative Luciferase Activity ได้ผลดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า Firefly Luciferase, Renilla Luciferase และ Relative Luciferase Activity

	1	2	3	4	5	6
FLuc	10815	5214	10938	7217	2934	3472
	10075	6254	9856	8198	2399	3568
	9237	6308	9104	9043	2900	2483
Average	10042.33	5925.33	9966	8152.66	2744.33	3174.33
Error bar	455.82	356.01	532.27	527.61	172.95	346.78
RLuc	115687	151742	109128	104104	106715	109166
	123814	156141	118747	95646	98530	93897
	106380	112622	96364	101883	130292	120011
Average	115294	140168	108080	100544	111846	107670
Error bar	5036.60	13831.58	6482.64	2531.70	9521.01	7574.44
FLuc/RLuc	0.093	0.034	0.100	0.069	0.027	0.032
	0.081	0.040	0.083	0.857	0.024	0.038
	0.087	0.056	0.094	0.089	0.022	0.020
Average	0.087	0.043	0.093	0.081	0.025	0.030
Error bar	0.004	0.006	0.005	0.006	0.002	0.005

1= pGL3MS2/Basic+pSilencer_H1,

2=pGL3MS2/Basic+pSilencer_siRNA_FLucsiRNA_FLuc

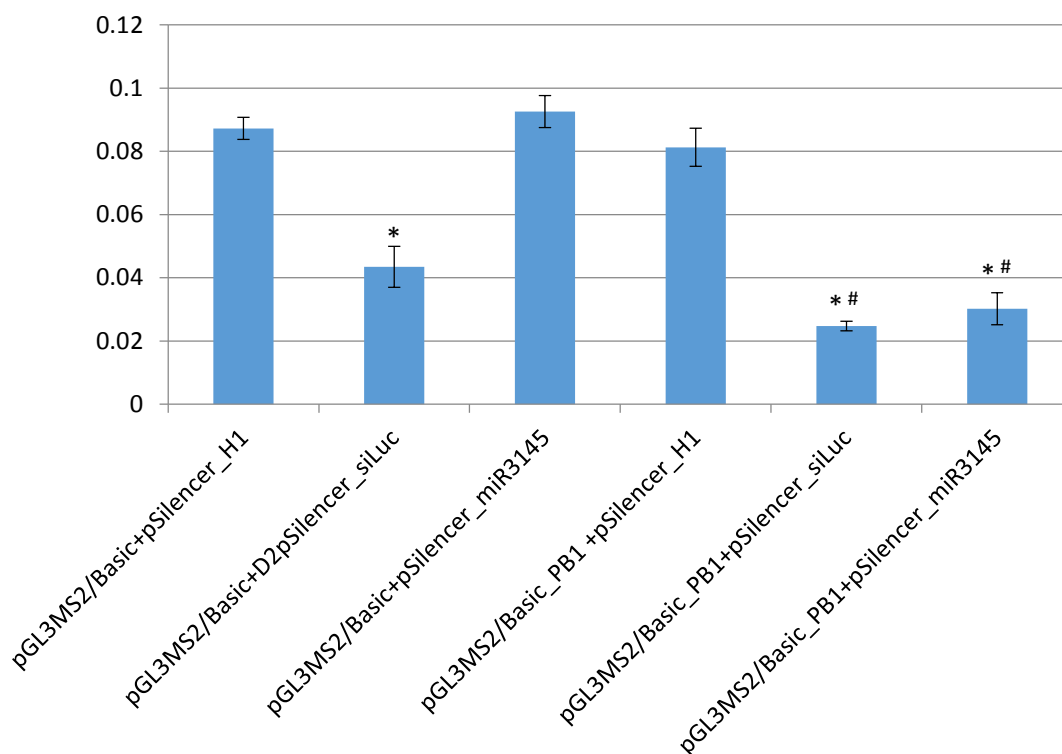
3=pGL3MS2/Basic+pSilencer_miR3145

4= pGL3MS2/Basic_PB1+pSilencer-H1

5=pGL3MS2/Basic_PB1+pSilencer_siRNA_FLuc

6= pGL3MS2/Basic_PB1+pSilencer_miR3145

พบว่าเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1, pSilencer_siRNA_FLuc และเซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1, pSilencer_miR3145 มีค่า Relative Luciferase Activity น้อยกว่าเซลล์ในชุดควบคุม ซึ่งผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1, pSilencer-H1 และ pGL3MS2/Basic, pSilencer_miR3145 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 Relative Luciferase ของเซลล์ A549 ที่ผ่านการ transfection ด้วยพลาสมิดต่างๆ
 (* คือมีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ
 เซลล์ชุดควบคุมที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic+pSilencer_H1
 # คือมีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ
 เซลล์ชุดควบคุมที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1+pSilencer_H1)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์และคัดเลือก miRNAs ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่

ผลการคัดเลือก miRNAs ของมนุษย์ที่สามารถจับกับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1, H5N1 และ H3N2 โดยใช้ฐานข้อมูล miRBASE และโปรแกรม RNAHybrid พบว่ามี miRNAs ทั้งหมด 76 ชนิด ที่สามารถเข้าคู่ได้กับไวรัสไข้หวัดใหญ่ใน 3 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี miRNAs 70 ชนิดที่เลือกจับอย่างจำเพาะต่อไวรัสสายพันธุ์เดียว (แบ่งออกเป็น 21 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H1N1, 27 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H5N1 และ 22 ชนิดจับกับสายพันธุ์ H3N2) ทั้งนี้พบว่ามี miRNAs 6 ชนิดที่สามารถจับกับยีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ สิ่งที่น่าสนใจคือ hsa-miR-3145 เป็น miRNAs ชนิดเดียวที่สามารถจับบริเวณยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ครบทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงเลือก miRNA-3145 ใช้ในการศึกษาต่อไป

การสร้าง Reporter (FLuc) target (PB1) vector, miRNA expression vector และ siRNA_FLuc expression vector

เพื่อศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ต่อการยับยั้งการแสดงของออกยีน PB1 ของไวรัส จึงทำการสร้าง Reporter -target vector โดยใช้ยีน Firefly Luciferase Activity (FLuc) เป็น reporter gene ต่อส่วนยีน PB1 ของไวรัสในบริเวณที่เป็นเป้าหมายของ hsa-miR-3145 เข้ากับส่วน 3'-UTR ของยีน FLuc เรียกชื่อว่า pGL3MS2/Basic_PB1 ทำการยืนยันผลโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ sequencing พบว่าสามารถสร้าง Reporter (Luc) target (PB1) vector ได้

การสร้าง miRNA expression vector เพื่อใช้เพิ่มการแสดงออกของ hsa-miR-3145 และสร้าง siRNA_FLuc expression vector เพื่อใช้เป็น positive control ของการยับยั้ง reporter gene (FLuc) โดยใช้ pSilencer™ siRNA Expression Vector (Ambion) เป็นเวกเตอร์ตั้งต้น และเรียกชื่อว่า pSilencer_miR3145 และ pSilencer_siRNA_FLuc ตามลำดับ ทำการยืนยันผลโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ sequencing พบว่าสามารถสร้าง miRNA expression vector และ siRNA_FLuc expression vector ได้

การศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของไวรัส

ในการศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของไวรัส ดังตารางที่ 20 โดยอาศัยการหาค่า Relative Luciferase Activity ของเซลล์ A549 กลุ่มที่ 6 ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 + pSilencer_miR3145 พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ 4 ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 + pSilencer-H1 แสดงให้เห็นว่า hsa-miR-3145 มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase ที่ต่ออยู่กับยีน PB1 ได้ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ค่า Relative Luciferase Activity ของเซลล์ A549 กลุ่มที่ 6 ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 + pSilencer_miR3145 พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ 3 ที่มีการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic + pSilencer_miR3145 แสดงให้เห็นว่า miR3145 ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase ที่ไม่มียีน PB1 แสดงว่า miR3145 ไม่สามารถจับกับยีน Firefly Luciferase ได้

กล่าวโดยสรุปคือ miR3145 สามารถจับอย่างจำเพาะกับส่วนของยีน PB1 ที่ต่ออยู่กับส่วน 3'-UTR ของยีน Firefly Luciferase จึงมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน Firefly Luciferase ซึ่งเป็น reporter gene ได้ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า miR3145 น่าจะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ และส่งผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาผลการ miR3145 ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ต่อไป

อภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้วิเคราะห์หา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ H1N1, H5N1 และ H3N2 ตามที่ได้แสดง Accession numbers ไว้ในตารางที่ 3 นำมาวิเคราะห์หา miRNAs ของมนุษย์จากฐานข้อมูล miRBASE และ RNAHybrid โดยอาศัยหลักการคัดเลือก miRNA จากรูปแบบการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และ target RNA ซึ่งแบ่งออกเป็น 5' canonical, 5' seed และ 3' compensatory ตามการศึกษาของ Brennecke และคณะในปี 2005 (26) ข้อดีของการใช้วิธีนี้คือ มีการพิจารณาการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และ target RNA ตามหลักการที่เหมาะสม แตกต่างจากโปรแกรมการทำนาย เช่น miRANDA และ TargetScan ซึ่งใช้เงื่อนไขในการทำนายเฉพาะส่วน seed region หรือพลังงานในการจับระหว่าง miRNA และ target RNA เท่านั้น โดยไม่ได้พิจารณาการเข้าคู่โดยรวม เป็นผลทำให้โปรแกรมการทำนายข้างต้นได้ผลการทำนายที่คลาดเคลื่อนเชิงบวก (false positive) ค่อนข้างมาก (38) อย่างไรก็ตามการทำนายโดยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้จะใช้

เวลาในการพิจารณาค่อนข้างมาก เนื่องจากต้องใช้ความละเอียดรอบคอบในการพิจารณารูปแบบการเข้าคู่ระหว่าง miRNA และ target RNA แต่ละคู่ ในขณะที่โปรแกรมการทำนาย เช่น miRANDA และ TargetScan สามารถทำนายได้อย่างอัตโนมัติและรวดเร็ว

จากการวิเคราะห์หา miRNAs จากเซลล์มนุษย์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสใช้หวัดใหญ่ พบว่า hsa-miR-3145 เป็น miRNAs ชนิดเดียวที่สามารถจับกับไวรัสใช้หวัดใหญ่ได้ครบทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ H1N1, H5N1 และ H3N2 โดยจับในส่วนของยีน PB1 ของไวรัสทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาบทบาทและหน้าที่ของ miRNA ดังกล่าวต่อไป

สำหรับ hsa-miR-3145 เป็น miRNA ที่สร้างจากบริเวณ intron ของยีน NHSL1 ในโครโมโซมที่ 6 ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า hsa-miR-3145 นี้ควบคุมการแสดงออกของยีนใดภายในเซลล์มนุษย์ หรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการใด การศึกษาที่ผ่านมาพบเพียงการพบ hsa-miR-3145 ในการทำ deep sequencing ในเซลล์ Melanoma เท่านั้น (39)

การทดสอบความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ใช้วิธี 3'-UTR reporter assay โดยการต่อยีน PB1 ในบริเวณที่สามารถจับได้กับ hsa-miR-3145 เข้ากับส่วน 3'-UTR ของ reporter gene คือ Firefly Luciferase (FLuc) หาก hsa-miR-3145 สามารถจับกับยีน PB1 ได้ จะทำให้การแสดงออกของยีน Luc ลดลง เปรียบเทียบจากค่า Relative Luciferase Activity ที่ได้จากสัดส่วนการเปล่งแสงเมื่อเทียบกับ control reporter gene คือ Renilla Luciferase ในการทดลองแบ่งเซลล์ A549 ออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer-H1

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_siRNA_FLuc

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_miR3145

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer-H1

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_siRNA_FLuc

เซลล์ที่ผ่านการ transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_miR3145

โดยทุกกลุ่มจะมีการ transfection ด้วย pCMV_RLuc ซึ่งเป็น control reporter vector ด้วย

เซลล์ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3M /Basic และ pSilencer-H1 เป็นการใช่วิวECTOR ตั้งต้น ทั้งในส่วนของ pGL3M /Basic ที่ใช้สร้าง target reporter vector และ pSilencer-H1 ที่ใช้สร้าง miRNA expression vector โดยค่า Relative Luciferase Activity ที่ได้จากเซลล์ในกลุ่มนี้จะเป็นค่าพื้นฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ทดลองอื่นๆ

เซลล์ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_siRNA_FLuc พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity น้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ 1 เนื่องจากมีการใช้ pSilencer_siRNA_FLuc เพื่อสร้าง siRNA ที่จำเพาะสำหรับยับยั้งการแสดงออกของยีน FLuc ซึ่งเป็น reporter gene เซลล์ในกลุ่มนี้จึงจัดเป็น positive silencing control เพื่อยืนยันว่าเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน FLuc ได้จริง

เซลล์ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic และ pSilencer_miR3145 พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มที่ 1 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าเซลล์ในกลุ่มนี้จะมี pSilencer_miR3145 ที่สามารถสร้าง hsa-miR-3145 แต่ miR-3145 ที่สร้างได้ไม่สามารถจับกับยีน FLuc ซึ่งเป็น reporter gene ของ pGL3MS2/Basic PB1 แสดงว่า miR3145 ไม่สามารถจับกับยีน Firefly Luciferase ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้งการแสดงออกของ reporter gene

เซลล์ในกลุ่มที่ 4 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer-H1 พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มที่ 1 เล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) เนื่องจาก pGL3MS2/Basic_PB1 มีส่วนของยีน PB1 ของไวรัสต่อกับส่วน 3'-UTR ของ reporter gene ถึงแม้ว่าไม่มีการสร้าง hsa-miR-3145 เพิ่มจากพลาสมิดที่ transfection เข้าไป แต่อาจเป็นผลมาจาก hsa-miR-3145 ที่แสดงออกอยู่แล้วภายในเซลล์ (endogenous miRNA) สามารถจับกับยีน PB1 ของ pGL3MS2/Basic_PB1 และจะใช้ค่า Relative Luciferase Activity ของเซลล์ในกลุ่มนี้ เป็นค่าพื้นฐานสำหรับเปรียบเทียบกลุ่มเซลล์อื่นๆ ที่ใช้ pGL3MS2/Basic_PB1 เป็น target reporter vector

เซลล์ในกลุ่มที่ 5 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_siRNA_FLuc พบว่ามีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับค่าพื้นฐานที่ได้จากเซลล์ในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 เนื่องจาก pSilencer_siRNA_FLuc สามารถสร้าง siRNA สำหรับยับยั้งการแสดงออกของยีน FLuc ได้ และมีค่า Relative Luciferase Activity ที่แตกต่างจาก กลุ่มที่ 2 เล็กน้อย (อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของ hsa-miR-3145 ที่แสดงออกอยู่แล้วภายในเซลล์ (endogenous miRNA) จับกับยีน PB1 ใน pGL3MS2/Basic_PB1

เซลล์ในกลุ่มที่ 6 ซึ่งถูก transfection ด้วย pGL3MS2/Basic_PB1 และ pSilencer_miR3145 มีค่า Relative Luciferase Activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับค่าพื้นฐานที่ได้จากเซลล์ในกลุ่มที่ 4 ที่มี pGL3MS2/Basic_PB1 เป็น target reporter vector เช่นเดียวกัน เนื่องจากมี pSilencer_miR3145 ที่สามารถสร้าง hsa-miR-3145 เพิ่มขึ้น และ miRNA ดังกล่าวสามารถจับกับส่วนของยีน PB1 ใน pGL3MS2/Basic_PB1 ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออก

ของยีน FLuc ได้จึงสามารถแปลผลได้ว่า hsa-miR-3145 สามารถจับกับยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ และเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน FLuc ซึ่งเป็น reporter gene

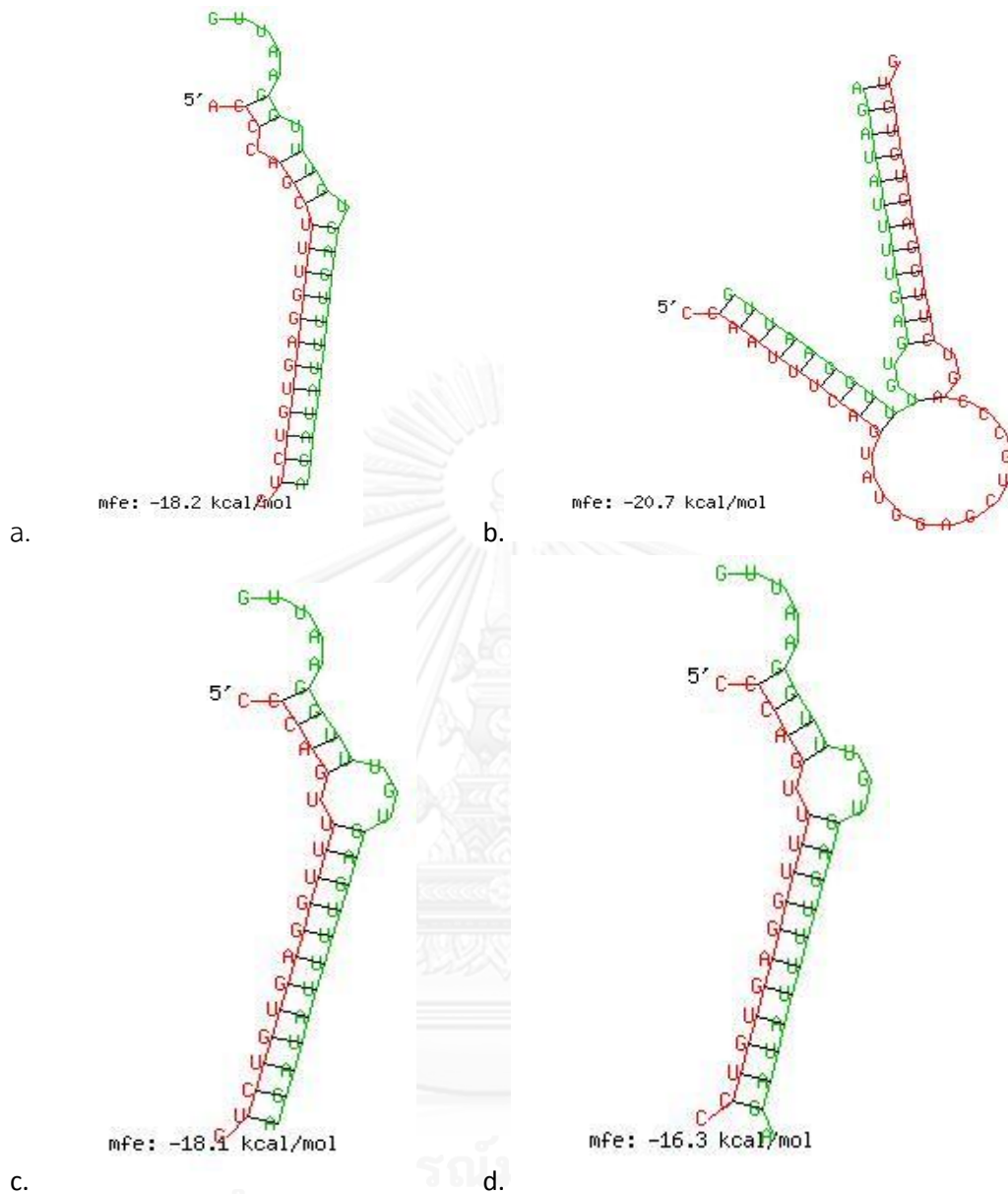
จากการศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการจับกับยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ด้วยวิธี 3'-UTR reporter assay ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ Liping Song และคณะได้ศึกษาหา miRNAs จากเซลล์ MDCK ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (A/WSN/33) (30) พบว่าเป็นวิธีการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากสามารถแสดงให้เห็นบทบาทของ miRNA ในการจับกับยีนของไวรัส และทำให้การแสดงออกของ reporter gene ลดลงได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ Liping Song และคณะ ยังได้ทำการทดสอบ miRNAs ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าว คือ miRNA-323, miR-491 และ miR-654 ในเซลล์ MDCK ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (A/WSN/33) พบว่า miRNAs ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสได้จริง แต่ทั้งนี้ในการวิจัยครั้งนี้มีความแตกต่างกับการศึกษาของ Liping Song คือสายพันธุ์ของไวรัสที่ใช้ในการวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ใช้สายพันธุ์ที่พบการระบาดในปี 2009 และชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาของ Liping Song เป็นเซลล์ MDCK ซึ่งเป็นเซลล์ไตจากสุนัข แต่ในการวิจัยครั้งนี้ใช้เซลล์ A549 ซึ่งเป็นเซลล์ปอดของมนุษย์ ทำให้ miRNA ที่ได้จากการวิเคราะห์แตกต่างกัน นอกจากนี้ hsa-miR-3145 ที่วิเคราะห์ได้ ยังสามารถจับกับยีน PB1 ของไวรัสได้หลายสายพันธุ์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB1 ในไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ H1N1, H5N1, H3N2 และที่พบล่าสุด คือ ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N9 (13) มาเปรียบเทียบความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีการอนุรักษ์บริเวณที่เป็นเป้าหมายของ hsa-miR-3145 โดยเฉพาะในส่วน seed region ดังรูปที่ 28 และรูปที่ 29 แสดงภาพจำลองการจับกันระหว่าง hsa-miR-3145 และยีน PB1 ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน และมีค่า MFE ที่ใกล้เคียงกัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่า hsa-miR-3145 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ได้

A/California/WRAIR1502P/2009 (H1N1) TGGAGCTACCCAGCTTTGGAGTGTCTGGAGTAAATGAATCAGCTGAC
 A/California/04/2009 (H1N1)G.....T.....A.....C.....G.....T
 A/Thailand/CU23/2006 (H3N2)G.....TC.....A.....T.....G.....C.....
 A/Thailand/NK165/2005 (H5N1)t.g.....t.....c.g.a.t.....g.....
 A/Anhui/1/2013 (H7N9)

รูปที่ 28 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ

(กรอบสีแดงแสดงแสดงบริเวณ seed region ที่ใช้เป็นเป้าหมายของ hsa-miR-3145)



รูปที่ 29 จำลองการเข้าคู่ระหว่าง miRNAs และ viral RNA ของยีน PB1 ด้วย RNAHybrid

- a. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1
- b. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H5N1
- c. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H3N2
- d. เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H7N9

(สีเขียว คือ hsa-miR-3145 และสีแดงคือยีน PB1 ของไวรัสสายพันธุ์ต่าง)

ข้อเสนอแนะ

ในการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความสามารถของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้ง ยีน PB1 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยใช้วิธี 3'-UTR Reporter Assay ด้วยการเชื่อมส่วนของยีน PB1 ที่ได้จากการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เพื่อให้การวิจัยมีความครอบคลุม ถึงไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์อื่นๆ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำส่วนของยีน PB1 จากไวรัสไข้หวัด ใหญ่สายพันธุ์อื่นๆ มาศึกษาด้วย ทั้งนี้หากมีข้อจำกัดเรื่องที่มาของตัวอย่างไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ ต่างๆ อาจใช้วิธีการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์สายยาว (oligo nucleotides) ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกับส่วนของยีน PB1 ที่เป็นเป้าหมายของ hsa-miR-3145 แล้วนำมาเชื่อมต่อเข้ากับส่วน 3'- UTR ของยีน Firefly Luciferase เช่นเดียวกับการวิจัยครั้งนี้

ทั้งนี้เพื่อให้เห็นถึงบทบาทของ hsa-miR-3145 ในการยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ต่างๆ ควรมีการศึกษาในเซลล์ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ แล้วเพิ่มการแสดงออกของ hsa-miR-3145 โดยการ transfection ด้วย pSilencer_miR3145 จากนั้นวัดปริมาณของไวรัส ไข้หวัดใหญ่ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้มีการเพิ่มการแสดงออกของ hsa-miR-3145

นอกจากนี้ควรมีการศึกษาระดับการแสดงออกของ hsa-miR-3145 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส เปรียบเทียบกัน เพื่อให้เห็นว่าในสภาวะปกติ และสภาวะที่มี การติดเชื้อไวรัส มีการแสดงออกของ hsa-miR-3145 แตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร และมีกระบวนการ เหนี่ยวนำอย่างไรให้เกิดการแสดงออกของ hsa-miR-3145 เพิ่มขึ้น เพื่อยับยั้งการเพิ่มปริมาณของ ไวรัสในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

รายการอ้างอิง

1. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1733-45. PubMed PMID: 14643124.
2. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, Luong TS, Pham PM, Nguyen v V, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *The New England journal of medicine*. 2004 Mar 18;350(12):1179-88. PubMed PMID: 14985470.
3. Novel Swine-Origin Influenza AVIT, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England journal of medicine*. 2009 Jun 18;360(25):2605-15. PubMed PMID: 19423869.
4. Centers for Disease C, Prevention. Update: Influenza A (H3N2)v transmission and guidelines - five states, 2011. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2012 Jan 6;60(51-52):1741-4. PubMed PMID: 22217624.
5. Minor PD. Vaccines against seasonal and pandemic influenza and the implications of changes in substrates for virus production. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010 Feb 15;50(4):560-5. PubMed PMID: 20085485.
6. Dijkstra F, Jonges M, van Beek R, Donker GA, Schellevis FG, Koopmans M, et al. Influenza A(H1N1) Oseltamivir Resistant Viruses in the Netherlands During the Winter 2007/2008. *The open virology journal*. 2011;5:154-62. PubMed PMID: 22253652. Pubmed Central PMCID: 3249654.
7. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. PubMed PMID: 14744438.
8. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001 Dec 28;107(7):823-6. PubMed PMID: 11779458.
9. 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 Apr 22;308(5721):557-60. PubMed PMID: 15845854.
10. 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 Jul;27(1):123-34. PubMed PMID: 17613256.

11. 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. PubMed PMID: 15601474. Pubmed Central PMCID: 544868.
12. Labella AM, Merel SE. Influenza. *The Medical clinics of North America*. 2013 Jul;97(4):621-45, x. PubMed PMID: 23809717.
13. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *The New England journal of medicine*. 2013 May 16;368(20):1888-97. PubMed PMID: 23577628.
14. Fleming DM, Zambon M, Bartelds AI. Population estimates of persons presenting to general practitioners with influenza-like illness, 1987-96: a study of the demography of influenza-like illness in sentinel practice networks in England and Wales, and in The Netherlands. *Epidemiology and infection*. 2000 Apr;124(2):245-53. PubMed PMID: 10813150. Pubmed Central PMCID: 2810908.
15. Subbarao K, Joseph T. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nature reviews Immunology*. 2007 Apr;7(4):267-78. PubMed PMID: 17363960.
16. Kilbourne ED. Influenza pandemics: can we prepare for the unpredictable? *Viral immunology*. 2004;17(3):350-7. PubMed PMID: 15357901.
17. Palese P. Influenza: old and new threats. *Nature medicine*. 2004 Dec;10(12 Suppl):S82-7. PubMed PMID: 15577936.
18. Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, et al. Influenza pandemics: past, present and future. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2006 Jan;105(1):1-6. PubMed PMID: 16440064.
19. Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annual review of immunology*. 1990;8:737-71. PubMed PMID: 2188678.
20. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 1975 Dec;68(2):426-39. PubMed PMID: 173078.
21. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 1994 Sep 1;371(6492):37-43. PubMed PMID: 8072525.
22. Turner D, Wailoo A, Nicholson K, Cooper N, Sutton A, Abrams K. Systematic review and economic decision modelling for the prevention and treatment of influenza A and B. *Health technology assessment*. 2003;7(35):iii-iv, xi-xiii, 1-170. PubMed PMID: 14609480.

23. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerging infectious diseases*. 2009 Feb;15(2):155-62. PubMed PMID: 19193257. Pubmed Central PMCID: 2657637.
24. Aoki FY, Boivin G, Roberts N. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir. *Antiviral therapy*. 2007;12(4 Pt B):603-16. PubMed PMID: 17944268.
25. Ying SY, Chang DC, Lin SL. The MicroRNA. *Methods in molecular biology*. 2013;936:1-19. PubMed PMID: 23007495.
26. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA-Target Recognition. *PLoS Biology*. 2005;3(3):e85.
27. 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 Jun 2;435(7042):682-6. PubMed PMID: 15931223.
28. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*. 2006 Jul 6;442(7098):82-5. PubMed PMID: 16738545.
29. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature medicine*. 2007 Oct;13(10):1241-7. PubMed PMID: 17906637.
30. Song L, Liu H, Gao S, Jiang W, Huang W. Cellular microRNAs inhibit replication of the H1N1 influenza A virus in infected cells. *Journal of virology*. 2010 Sep;84(17):8849-60. PubMed PMID: 20554777. Pubmed Central PMCID: 2919005.
31. Chang J, Guo JT, Jiang D, Guo H, Taylor JM, Block TM. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *Journal of virology*. 2008 Aug;82(16):8215-23. PubMed PMID: 18550664. Pubmed Central PMCID: 2519557.
32. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic acids research*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11. PubMed PMID: 14681370. Pubmed Central PMCID: 308757.
33. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-4. PubMed PMID: 16381832. Pubmed Central PMCID: 1347474.
34. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8. PubMed PMID: 17991681. Pubmed Central PMCID: 2238936.

35. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*. 2011 Jan;39(Database issue):D152-7. PubMed PMID: 21037258. Pubmed Central PMCID: 3013655.
36. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*. 2004 Oct;10(10):1507-17. PubMed PMID: 15383676. Pubmed Central PMCID: 1370637.
37. Rackham O, Brown CM. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *The EMBO journal*. 2004 Aug 18;23(16):3346-55. PubMed PMID: 15282548. Pubmed Central PMCID: 514514.
38. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nature genetics*. 2006 Jun;38 Suppl:S8-13. PubMed PMID: 16736023.
39. Stark MS, Tyagi S, Nancarrow DJ, Boyle GM, Cook AL, Whiteman DC, et al. Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. *PloS one*. 2010;5(3):e9685. PubMed PMID: 20300190. Pubmed Central PMCID: 2837346.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม LB Agar

- Agar	3.75	g
- Yeast Extract	1.25	g
- Tryptone	2.5	g
- NaCl	1.25	g
- น้ำกลั่น	250	mL

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียม LB Broth

- Yeast Extract	0.5	g
- Tryptone	1.0	g
- NaCl	0.5	g
- น้ำกลั่น	100	mL

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียม Soc Medium

- Yeast Extract	0.5	g
- Tryptone	1.0	g
- NaCl	0.5	g
- น้ำกลั่น	100	mL

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วใส่ 2M Mg²⁺, 2M Glucose และ 2M KCl

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

- Tris	54	g
- Boric acid	27.5	g
- EDTA	4.16	g
- น้ำกลั่น	1,000	mL

5.การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์

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

6.การเตรียม Freezing Medium

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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกฤษฎา คงมนาน เกิดเมื่อวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2531 มีภูมิลำเนาอยู่จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาชีววิทยา เกียรตินิยมอันดับ 2 จากคณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีพ.ศ. 2552 ศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีทางการแพทย์ สังกัดภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย งานวิจัยที่ผ่านมาคือการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของปลากัดป่า ในประเทศไทย การตรวจหา Corona Virus จากมูลค้างคาวที่เก็บจากถ้ำค้างคาว จ.ราชบุรี ช่วงปีพ.ศ. 2551 การวิเคราะห์หา microRNAs จากเซลล์มนุษย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัส ใช้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ปัจจุบันเป็นนักเรียนทุนโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษ ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY