

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ระดับการแสดงออกและการทำนายยีนเป้าหมายของ microRNA-155
และ microRNA-181 ในเซลล์สุกร

Expression Analysis and Gene Target Prediction of MicroRNA-155
and MicroRNA-181 in Porcine Cells

โดย

นางสาวจิรภัทร์ นิลสุวรรณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิรภัทร์ นิลสุวรรณ 2557: ระดับการแสดงออกและการทำนายยีนเป้าหมายของ
microRNA-155 และ microRNA-181 ในเซลล์สุกร ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต
(จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์วิน สุรเชษฐพงษ์, Ph.D.
75 หน้า

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA) เป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ไม่ถูกถอดรหัสไปเป็นโปรตีน
ขนาดประมาณ 18-24 นิวคลีโอไทด์ ไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ
ยีนในขั้นตอนกระบวนการหลังการถอดรหัส โดยยับยั้ง mRNA เป้าหมายไม่ให้ถอดรหัสไป
เป็นโปรตีน วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ ศึกษาคุณลักษณะทั่วไป ทำนายยีนเป้าหมาย
และศึกษาการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ของสุกร ผลการศึกษาพบว่า โครงสร้างทุติย
ภูมิของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรมีลักษณะจับกันเป็นสายคู่และเกิดเป็นห่วงบริเวณกลาง
สาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ คน, หนู, ไก่ และ ปลา นอกจากนี้ลำดับ
เบสของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 มีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นคิดเป็น 91.3-
95.8% โดยเฉพาะลำดับเบสบริเวณ seed region มีความเหมือนกันถึง 100% จากทำนายยีน
เป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ 3 โปรแกรม ได้แก่ DIANA-
micro T, miRmap และ PicTar ได้ผลการทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 คือ *BACH1*, *SOCS1*,
MAP3K14 และ *MPP5* และยีนเป้าหมายของ miR-181 คือ *DDX3X*, *NFAT5*, *FOXP1* การศึกษา
การแสดงออกของ ไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดพบว่า miR-181 มีการแสดงออกที่เท่ากันในทุก
ตัวอย่าง (ม้าม, กล้ามเนื้อ, เม็ดเลือดขาว และเซลล์ PK15) ขณะที่ miR-155 มีการแสดงออก
ปริมาณมากในเซลล์เม็ดเลือดขาวและ PK15 จากนั้นทำการทดสอบการแสดงออกของ miR-155
และ miR-181 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นพบว่า ไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดมี
ปริมาณการแสดงออกสูงสุดใน 12 ชั่วโมงแรกหลังได้รับการกระตุ้น และมีการแสดงออกลดลงใน
24 และ 48 ชั่วโมงต่อมา จากผลการศึกษาข้างต้นสันนิษฐานได้ว่า miR-155 และ miR-181 น่าจะมี
บทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสุกร

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Jirapat Ninsuwon 2014: Expression Analysis and Gene Target Prediction of MicroRNA-155 and MicroRNA-181 in Porcine Cells. Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Mr. Win Surachetpong, Ph.D. 75 pages.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules ranging between 18-24 nucleotides. MicroRNAs regulated gene expression through post transcriptional inhibition of target mRNA. The objective of this study is to characterized, predicted target genes and analyzed porcine miR-155 and miR-181 expression. Our results showed that porcine miR-155 and miR-181 had hairpin loop structure resemble to other species including human, mouse, rat, chicken and fish. In addition, the mature sequences of ssc-miR-155 and ssc-miR-181 shared 91.3-95.8% similarity and 100% similarity at the seed region with miR from other species. The miR-155 and miR-181 target genes were predicted by three webserver tool including DIANA-micro T, miRmap and PicTar. The top candidate genes for miR-155 were *BACH1*, *SOCS1*, *MAP3K14* and *MPP5*. The top candidate genes for miR-181 were *DDX3X*, *NFAT5*, *FOXP1* and *MPP5*. Expression analysis revealed that ssc-miR-181 equally expressed in all tissues (spleen, muscle, PBMC and PK15), while ssc-miR-155 highly expressed in PBMC and PK15. Moreover, both miRNAs highly expressed at 12 hours in stimulated peripheral blood mononuclear cells, while lower expression had been observed at 24 and 48 hours. In conclusion, these findings suggested that porcine miR-155 and miR-181 could play an important role in the porcine immune system.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

__/__/__

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก ดร. วิน สุรเชษฐพงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก สำหรับความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง สำหรับการศึกษาและทำงานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนการดำเนินการจัดทำเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ พรทิภา เล็กเจริญสุข สำหรับความช่วยเหลือ และคำแนะนำสำหรับการทำงานวิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. รุ่งโรจน์ ฆราวาส์นุเวช อาจารย์ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดสุกรสำหรับทำวิจัย และขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ สุศิขล สิทธิพันธ์ ในความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสุกรจากฟาร์มเบทาโกร จังหวัดนครปฐม

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก ศูนย์วิทยากรชั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเป็นพิเศษสำหรับกำลังใจจากครอบครัว ตลอดจนทุกๆท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

จิรภัทร์ นิลสุวรรณ

กรกฎาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	26
ผล	26
วิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	49
สรุป	49
ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก ลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอที่ใช้ในการวิจัย	59
ภาคผนวก ข การเตรียมสารและวิธีการทดลองที่ใช้ในการวิจัย	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน	11
2	แสดงไพรเมอร์ของ miR-155, miR-181 และ GAPDH	18
3	แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ pre-miR-155 ของสุกรเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	27
4	แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ pre-miR-181 ของสุกรเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	28
5	แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ mature miR-155 ของสุกรเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	29
6	แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ mature miR-181 ของสุกรเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น	30
7	แสดงยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 วิเคราะห์จากโปรแกรมทำนายยีนทั้งสามโปรแกรม คือ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar โดยยีนที่ถูกคัดเลือกนำมาแสดงในตาราง คือ ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และ ถูกทำนายได้จากสองโปรแกรมขึ้นไป	32
ตารางผนวกที่		
ก1	แสดงลำดับเบสของ pre-miR-155 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	60
ก2	แสดงลำดับเบสของ pre-miR-181 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	61
ก3	แสดงลำดับเบสของ mature miR-155 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	62
ก4	แสดงลำดับเบสของ mature miR-181 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	63

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กราฟแสดงจำนวนงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับไมโครอาร์เอ็นเอตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 จนถึงปัจจุบัน	5
2 แสดงลักษณะโครงสร้างของ pri-miRNA ซึ่งมีลักษณะเป็น stem-loop แบ่งได้เป็น 4 ส่วน คือ terminal loop, upper stem, lower stem และ basal segment	6
3 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ	7
4 แสดงตำแหน่งการจับกันระหว่าง miRNA และ mRNA	8
5 แสดงรูปแบบการจับระหว่าง miRNA และ mRNA	9
6 แสดงการทำหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอ; รูป ก รูปแบบการยับยั้งการถอดรหัส; รูป ข การสลาย mRNA เป้าหมาย	10
7 แผนผังสรุปบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอกับการพัฒนารูปร่างและการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด HSC: hematopoietic stem cell; เซลล์กึ่งกลางที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ CLP: common lymphocyte progenitor; เซลล์กึ่งกลางที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดไมอีลอยด์ CMP: common myeloid progenitor; เซลล์กึ่งกลางที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูล และ นิวเคลียสเดี่ยว GMP: granulocyte monocytic progenitor; เซลล์กึ่งกลางที่พัฒนาเป็นเดนไดรติกเซลล์ MDP: myeloid dendritic progenitor	14
8 แสดงขั้นตอนการสกัดเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ด้วยสารสกัดเม็ดเลือดขาว ficoll; รูป ก ลักษณะของเลือดผสม PBS อยู่บน ficoll; รูป ข ภาพการแยกชั้นขององค์ประกอบในเลือดและ ficoll; รูป ค ภาพถ่ายจริงของการแยกชั้น	20
9 แสดงวิธีการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในช่องสี่เหลี่ยม 4 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก)	21
10 แสดงขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ trizol; รูป ก ภาพการแยกชั้นหลังจากการปั่นชั้นของ RNA (aqueous phase) ชั้นของ DNA (interphase) และชั้นของโปรตีนไขมัน (organic phase); รูป ข ภาพผลึก RNA บริเวณก้นหลอด	22
11 แสดงขั้นตอนคร่าวๆของการโคลนและสกัดพลาสมิด	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ที่ทำนายได้จากโปรแกรม RNAfold web server	26
13 แผนภูมิแสดงจำนวนยื่นเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ที่ทำนายได้จากโปรแกรมทำนายยื่น 3 โปรแกรม คือ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar	31
14 แสดงการจับกันของลำดับเบสระหว่าง miR-155, miR-181 และยื่นเป้าหมาย	33
15 การแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์ของสุกร สกัด RNA จากเนื้อเยื่อและเซลล์ของสุกร ได้แก่ ม้าม (spl: spleen), เซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC: peripheral blood mononuclear cells), กล้ามเนื้อ (mus: muscle) และเซลล์ PK15 (PK15: porcine kidney cell lines) (M = marker และ N = negative control)	34
16 แสดงขนาดแถบ DNA ของ miR-155 และ miR-181 จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มีขนาด 72 และ 85 bp ตามลำดับ (M = marker และ N = negative control)	35
17 แสดงโคโลนีที่ไม่มีชิ้น DNA แทรกอยู่จะมีสีฟ้า (ในวงกลมที่ลูกศรชี้) และโคโลนีที่มีชิ้น DNA แทรกอยู่จะมีสีขาว	35
18 แสดงผลการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin วงกลมเชื้อ <i>E. coli</i> โคโลนีที่คาดว่ามีส่วนของ pGEM-miR-155	36
19 แสดงผลการเจริญของเชื้อ <i>E. coli</i> เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin วงกลมเชื้อ <i>E. coli</i> โคโลนีที่คาดว่ามีส่วนของ pGEM-miR-181	36
20 แสดงผลการทำ colony PCR screening ของ miR-155 และ miR-181 (M = marker และ N = negative control)	37
21 แสดงผลการทำ colony PCR screening ของ pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 (M = marker)	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-155 (amplification graph) ด้วย ten-fold serial dilution จำนวนพลาสมิด 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4 copy number	38
23 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-155 ค่า R^2 เท่ากับ 0.996	39
24 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-181 (amplification graph) ด้วย ten-fold serial dilution จำนวนพลาสมิด 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4 copy number	39
25 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-181 ค่า R^2 เท่ากับ 0.998	40
26 แสดง Melt Peak ของ miR-155 มีค่า T_m เท่ากับ 74°C	40
27 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บน 5% Nuseive gel ที่ได้จากการพัฒนาเทคนิคตรวจวัดการ แสดงออกของ miR-155 (M = marker และ N = negative control)	41
28 แสดง Melt Peak ของ miR-181 มีค่า T_m เท่ากับ 78°C	42
29 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บน 5% Nuseive gel ที่ได้จากการพัฒนาเทคนิคตรวจวัดการ แสดงออกของ miR-181 (M = marker 10 bp, N = negative control และ ten-fold serial dilution ของ pGEM-miR181 ตั้งแต่ 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4)	42
30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรที่สกัดด้วย ficoll ที่กำลังขยาย 20X (ซ้าย) และ 40X (ขวา) ตามลำดับ	43
31 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของ miR-155 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับการ กระตุ้นด้วย con A เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม	44
32 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของ miR-181 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับการ กระตุ้นด้วย con A เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม	44

ระดับการแสดงออกและการทำนายเป้าหมายของ microRNA-155
และ microRNA-181 ในเซลล์สุกร

Expression Analysis and Gene Target Prediction of MicroRNA-155
and MicroRNA-181 in Porcine Cells

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีเกษตรกรที่เลี้ยงและผลิตสุกรเพื่อการค้าเป็นจำนวนมาก ข้อมูลจากกลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ (ม.ป.ป.) พบว่าในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรทั้งสิ้น 258,462 ครัวเรือน มีสุกรเลี้ยงมากกว่า 10,000,000 ตัว รวมมูลค่าสูงถึง 80,000 ล้านบาท การผลิตสุกรเพื่อการส่งออกคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตทั้งหมด และเนื่องจากความต้องการในการบริโภคที่เพิ่มสูงขึ้น อุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทยจึงมีแนวโน้มในการขยายปริมาณการผลิตและยกระดับมาตรฐานการเลี้ยงสุกรให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งระบบการเลี้ยงสุกรให้มีมาตรฐานขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น การจัดการฟาร์ม สภาพแวดล้อม โรงเรือน อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์และแนวทางการป้องกันโรค ปัญหาสุขภาพของสุกรเลี้ยงมักเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส เช่น การติดเชื้อไวรัส PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome virus) มีผลให้สุกรที่ติดเชื้อมีอาการทางระบบทางเดินหายใจและระบบสืบพันธุ์ และยังเป็นเชื้อที่มีการระบาดที่รวดเร็วก่อให้เกิดความสูญเสียในระบบการผลิตสุกรเป็นจำนวนมาก อุตสาหกรรมการผลิตสุกรจึงมีแนวทางการควบคุมการเกิดโรคโดยการให้วัคซีน ซึ่งวัคซีนที่มีการผลิตและใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่น วัคซีนป้องกันโรค PRRS ยังไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ผลดี ดังนั้นการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาและหาแนวทางการป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA หรือ miRNA) เป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก มีหน้าที่จับกับยีนเป้าหมายเพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีนนั้น (Baltimore *et al.*, 2008; Lindsay, 2008) ไมโครอาร์เอ็นเอจะเข้าจับกับเบสคู่สมบริเวณด้าน 3' ของยีนเป้าหมาย เรียกว่าบริเวณที่จับกันนี้ว่า seed region ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสที่มีความจำเพาะ และมีความเหมือนของลำดับเบสที่สูงมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น คน, หนู mouse, หนู rat, สุนัขและไก่ (Lewis *et al.*, 2005) การจับกันของคู่เบสบริเวณ seed region ในสัตว์และพืชมีความแตกต่างกัน จากรายงานต่างๆ พบว่าบริเวณ seed

region ในสัตว์มักเกิดการจับคู่เบสผิดพลาด (mismatch) ต่างจากในพืชที่คู่เบสสามารถเข้ากันได้ครบทุกตำแหน่ง (Shabalina and Koonin, 2008) จากการค้นพบและศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอหลากหลายชนิดพบว่าไมโครอาร์เอ็นเอมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการทำงานของเซลล์ในระบบต่างๆ ของร่างกาย และยังมีบทบาทควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้เป็นไปอย่างสมดุลอีกด้วย (Baltimore *et al.*, 2008; Lindsay, 2008) ไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมีหลายชนิด เช่น miR-15a, miR-16, miR-21, miR-24, miR-32, miR-93, miR-122, miR-146, miR-155 และ miR-181 (Lindsay, 2008) โดยบทบาทของ miR-155 และ miR-146 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานเกี่ยวกับการส่งสัญญาณของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Toll-like receptor 4 (TLR4) (Schulte *et al.*, 2013) และ TLR3 (Li *et al.*, 2013) อีกทั้ง miR-155 ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยเป็นทั้งตัวควบคุมเชิงบวก (positive regulator) และตัวควบคุมเชิงลบ (negative regulator) ในการยับยั้งยีนเป้าหมาย MyD88, TAB2 และ IKK เพื่อลดการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง (Tang *et al.*, 2010; Tili *et al.*, 2007; Ceppi *et al.*, 2009) บทบาทของ miR-181 มีหน้าที่ควบคุมการพัฒนารูปร่างของ B cell และการคัดเลือก T cell โดยการยับยั้งยีนเป้าหมาย SHP-2, PTPN22, DUSP5 และ DUSP6 (Lindsay, 2008) และจากการศึกษา miR-181 กับการติดเชื้อไวรัสในสัตว์ทดลอง พบว่า miR-181 mimic สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส PRRS โดยเข้าจับกับบริเวณ open reading frame 4 (ORF4) (Guo *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตาม การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอส่วนใหญ่พบรายงานในหนูและคน ต่างจากการศึกษาในสุกรที่มีรายงานค่อนข้างจำกัด

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปของ miR-155 และ miR-181 ในสุกร ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ทำนายยีนเป้าหมายด้วยโปรแกรมทำนายยีนจาก 3 โปรแกรม (DIANA-microT, miRmap และ Pictar) เพื่อหาเป้าหมายที่จับกันอย่างจำเพาะกับ miR-155 และ miR-181 ได้ และศึกษาการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์ทั่วไปของสุกร เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร concanavalin A ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้ศึกษาหน้าที่การทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสุกรต่อไป

วัตถุประสงค์

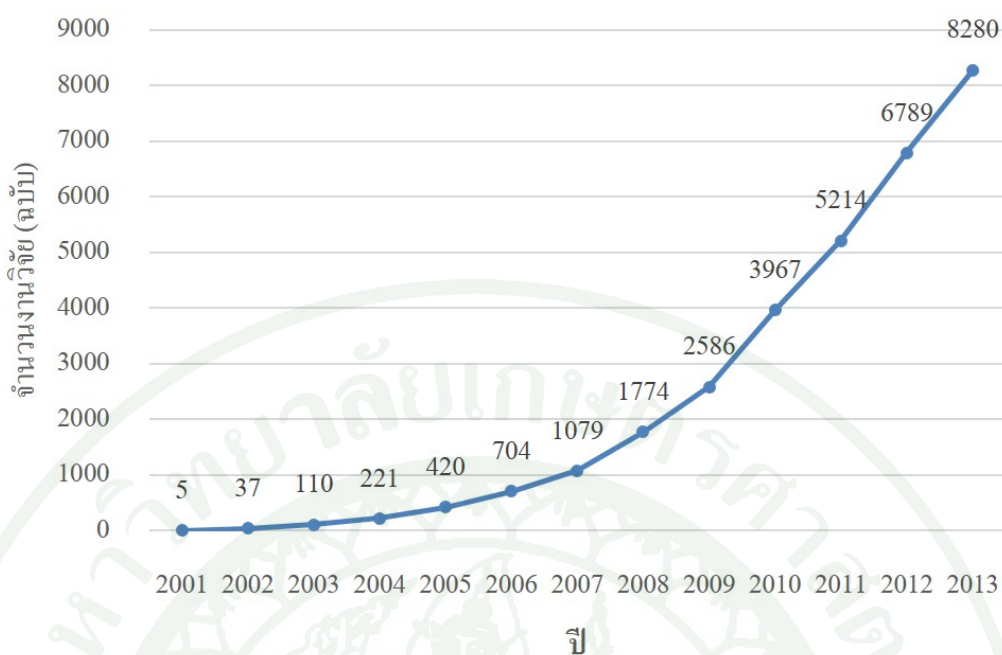
1. เพื่อศึกษาลักษณะและเปรียบเทียบลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น
2. เพื่อตรวจหาฮินเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน
3. เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์สุกรทั่วไป
4. เพื่อสร้างโคลนของ miR-155 และ miR-181 และผลิต *E. coli* ที่มีพลาสมิดของ miR-155 และ miR-181 สำหรับใช้ศึกษาหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอกลุ่มนี้ในอนาคต
5. พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ สร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181
6. เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรที่ได้รับการกระตุ้นด้วย con A

การตรวจเอกสาร

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA หรือ miRNA) คือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ ถอดรหัสมาจากจีโนมตำแหน่งที่ไม่กำหนดให้สร้างโปรตีน (non-coding region) พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น พืช สัตว์ หรือมนุษย์ มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ โดยยับยั้งหรือลดระดับการแสดงออกของยีน ไมโครอาร์เอ็นเอทำงานโดยเข้าจับกับเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA หรือ mRNA) บริเวณปลาย 3' UTR ของ mRNA เป้าหมาย โดยอาศัยหลักการการเข้าคู่กันของลำดับเบสอย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อยับยั้งหรือลดปริมาณ mRNA ที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน เมื่อโปรตีนมีการผลิตที่น้อยลงก็ส่งผลให้มีการแสดงออกที่ลดลงตามไปด้วย (สิทธิชัย, 2555)

1. ความเป็นมาของไมโครอาร์เอ็นเอ

ไมโครอาร์เอ็นเอค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 พบว่า lin-4 และโปรตีน LIN-14 มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) พบว่า lin-4 ถูกถอดรหัสจากจีโนมส่วนที่ไม่กำหนดให้สร้างโปรตีน และมีกลไกเข้าจับกับ lin-14 mRNA เพื่อยับยั้งการสร้างโปรตีนของ lin-14 ในช่วงระยะแรกของการพัฒนาของตัวอ่อนของหนอนตัวกลม (first larval stage, L1) (Lee *et al.*, 1993) และจากการศึกษาเพิ่มเติมใน *C. elegans* พบไมโครอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิด คือ let-7 มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ lin-41 และพบว่า *C. elegans* มีลำดับเบสของ let-7 เหมือนกันกับในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และคน (*Homo sapiens*) (Pasquinelli *et al.*, 2000) จากผลการศึกษาที่สนับสนุนนี้สามารถได้ว่า ไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาของเซลล์ โดยการยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้อง และไมโครอาร์เอ็นเอแต่ละชนิดยังมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกด้วย จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ส่งผลให้ไมโครอาร์เอ็นเอกลายเป็นหัวข้องานวิจัยที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น และมีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างแพร่หลาย (Lawrie, 2007) ดังจะเห็นจากรายงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับไมโครอาร์เอ็นเอในฐานข้อมูล PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กราฟแสดงจำนวนงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับไมโครอาร์เอ็นเอตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001 จนถึงปัจจุบัน

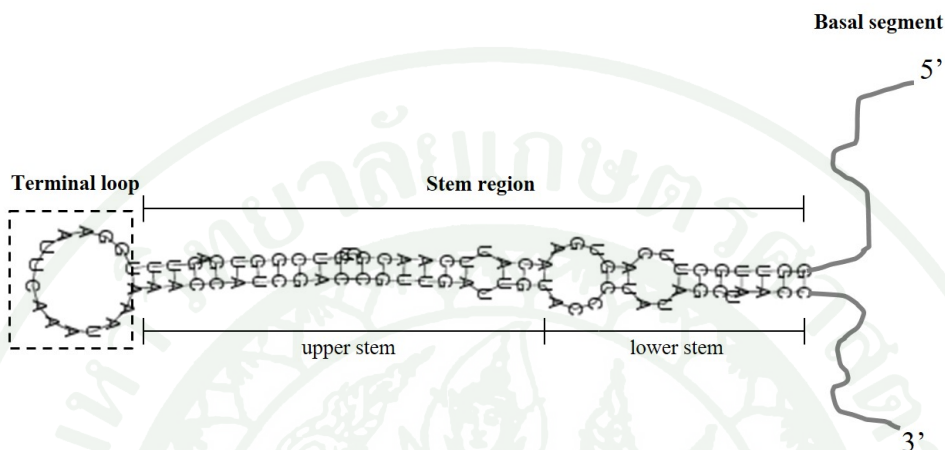
2. กระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอที่สร้างมาจากจีโนมส่วนที่ไม่แปลรหัสไปเป็นโปรตีน ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอเริ่มต้นขึ้นในนิวเคลียส ผ่านกระบวนการต่างๆ จนพัฒนาเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์และพร้อมทำงาน (สิทธิชัย, 2555) แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

2.1 การถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอขั้นต้น

ไมโครอาร์เอ็นเอถูกสร้างมาจากจีโนมส่วนที่ไม่แปลรหัสไปเป็นโปรตีน (intron) โดยการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสทู (RNA polymerase II) ได้เป็นไพรมารีไมโครอาร์เอ็นเอ (primary miRNA หรือ pri-miRNA) หลังจากการถอดรหัสบริเวณปลายสายทั้งสองด้านจะมีการเติม methyl-guanine cap ที่ปลาย 5' (5' cap) เติมนิวคลีโอไทด์เบส A ที่ปลาย 3' (3' poly-A tail) และเกิดการจับกันของลำดับเบสภายในสาย pri-miRNA จนได้โครงสร้างที่มีรูปแบบคล้ายปิ่นปักผม (hairpin loop) มีลักษณะผสมกันระหว่างบ่วงและก้าน (stem-loop) (ภาพที่ 2) โครงสร้างของ pri-miRNA แบ่งได้เป็น 4 ส่วน คือ ส่วนบ่วงบริเวณปลายสาย (terminal loop),

ก้านส่วนบน (upper stem), ก้านส่วนล่าง (lower stem) และส่วนฐาน (basal segment) (Yadava and Mukherjee, 2012: 508) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการนี้ pri-miRNA ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 80 นิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของ pri-miRNA ซึ่งมีลักษณะเป็น stem-loop แบ่งได้เป็น 4 ส่วน คือ terminal loop, upper stem, lower stem และ basal segment

2.2 การสังเคราะห์ precursor miRNA จาก pri-miRNA

จากนั้น pri-miRNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะผ่านกระบวนการตัดแต่งให้มีขนาดเล็กลง โดยการทำงานของโปรตีน Drosha (RNaseIII-type nuclease) ร่วมกับโปรตีน DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene) ทำหน้าที่ตัดลำดับเบสบริเวณปลายสายทั้งสองข้างออก ได้เป็น พรีเคอร์เซอร์ไมโครอาร์เอ็นเอ (precursor miRNA หรือ pre-miRNA) โครงสร้างของ pre-miRNA ยังคงมีลักษณะเป็น hairpin loop เช่นเดิม แต่มีขนาดเล็กลง ประมาณ 60-70 นิวคลีโอไทด์ และมี นิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 3' ยื่นออกมาประมาณ 1-4 นิวคลีโอไทด์

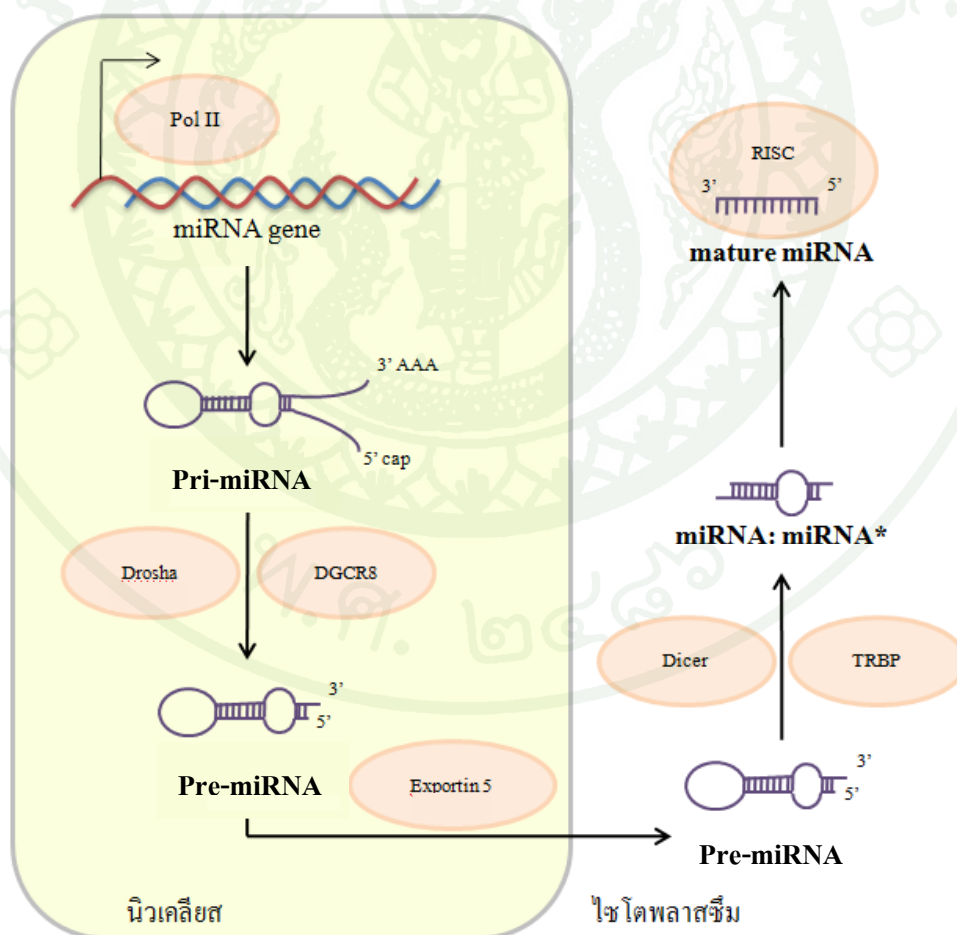
2.3 การขนส่ง pre-miRNA ออกนอกนิวเคลียส และกระบวนการตัดแต่ง pre-miRNA

Pre-miRNA ถูกขนส่งออกนอกนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึม โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน Exportin 5 หลังจาก pre-miRNA เข้าสู่ไซโตพลาสซึมแล้ว โปรตีน Dicer (RNaseIII) ร่วมกับโปรตีน TRBP (TAR RNA binding protein) ทำหน้าที่ตัดแต่ง pre-miRNA โดยตัด

โครงสร้างบริเวณ terminal loop ออก ได้เป็นไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ ที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันแบบไม่สมบูรณ์ (miRNA: miRNA*) มีขนาดประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์

2.4 กระบวนการพัฒนา mature miRNA ให้พร้อมทำงาน

miRNA: miRNA* จะถูกเอนไซม์ helicase ตัดแยกไมโครอาร์เอ็นเอสายคู่ออก เหลือไมโครอาร์เอ็นเอหนึ่งสายที่สมบูรณ์ (mature miRNA) โดยสาย mature miRNA ที่สมบูรณ์ คือไมโครอาร์เอ็นเอสายที่มีความเสถียรบริเวณปลาย 5' ต่ำ สามารถจับกับโปรตีนเชิงซ้อนขนาดใหญ่ที่อยู่ในรูป RNA-induce silencing complex (RISC) และมีโปรตีน Argonaute 2 เป็นส่วนประกอบได้ ส่วนไมโครอาร์เอ็นเออีกสายหนึ่งที่ไม่สามารถจับกับโปรตีนได้จะถูกทำลายทิ้ง มีเพียง mature RNA สายเดียวเท่านั้นที่จับกับโปรตีน Argonaute 2 (Ago 2) และสามารถทำหน้าที่ได้ต่อไป

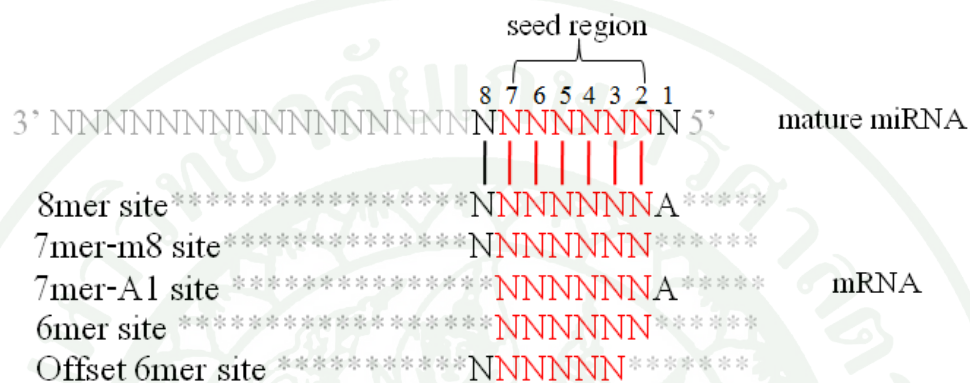


ภาพที่ 3 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไมโครอาร์เอ็นเอ

รูปแบบที่ 3 คือ 7mer-A1 site เกิดการเข้าคู่กันของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 ถึง 7 และมีเบส A 1 ตำแหน่งบนสาย mRNA

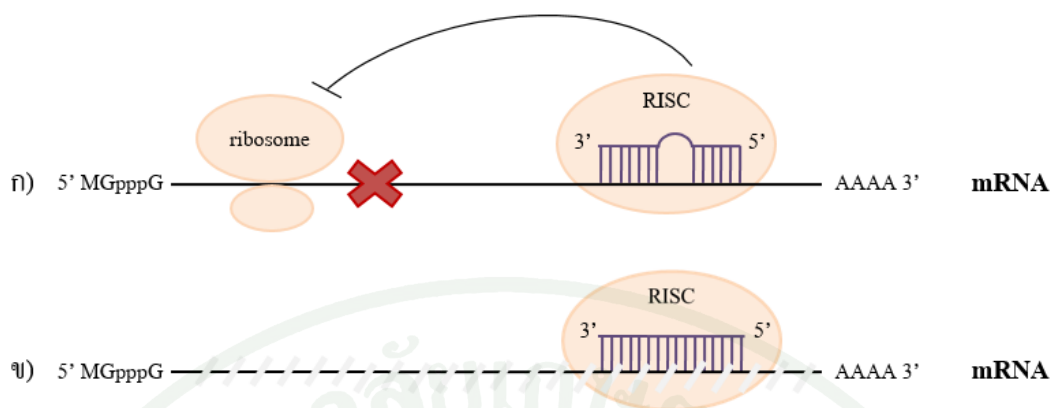
รูปแบบที่ 4 คือ 6mer site เกิดการเข้าคู่กันของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 ถึง 7

รูปแบบที่ 5 คือ offset 6mer site เกิดการเข้าคู่กันของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3 ถึง 8



ภาพที่ 5 แสดงรูปแบบการจับระหว่าง miRNA และ mRNA

เมื่อไมโครอาร์เอ็นเอเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายแล้ว ไมโครอาร์เอ็นเอจะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน เกิดกลไกการทำงานได้ 2 รูปแบบ คือ การยับยั้งการถอดรหัสไปเป็นโปรตีน (inhibit translation) หรือการสลาย mRNA เป้าหมาย (cleavage mRNA) รูปแบบของการควบคุมขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ในการเข้าคู่กันของ miRNA และ mRNA หากคู่เบสของทั้งสองสายเข้าคู่กันได้ไม่สมบูรณ์จะมีผลไปขัดขวางการทำงานของไรโบโซม (ribosome) ทำให้ mRNA เป้าหมายไม่ถูกถอดรหัสไปเป็นโปรตีน (Wightman *et al.*, 1993) (ภาพที่ 6ก) แต่ถ้าเบสเข้าคู่กันได้อย่างสมบูรณ์จะทำให้เกิดการสลายของ mRNA (ภาพที่ 6ข)



ภาพที่ 6 แสดงการทำหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอ ก) รูปแบบการยับยั้งการถอดรหัส ข) การสลาย mRNA เป้าหมาย

4. ไมโครอาร์เอ็นเอกับระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกัน คือ ระบบที่ทำหน้าที่ป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ควบคุมการทำงานของเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกายให้อยู่ในระดับสมดุล ระบบภูมิคุ้มกันแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิด (innate immune response) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune response)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันที่ติดตัวมาแต่กำเนิด จะเป็นระบบป้องกันอันตรายที่เริ่มทำงานเป็นอันดับแรก จะเกิดการเข้าจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยการกินและย่อยทำลายของเซลล์กลุ่มฟาโกไซต์ (phagocyte) เช่น โมโนไซต์ (monocyte), มาโครฟาจ (macrophage), อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และนิวโทรฟิล (neutrophil) นอกจากนี้รูปแบบโมเลกุลที่พบเหมือนกันในเชื้อโรค ที่เรียกว่า pathogen-associated molecular pattern (PAMP) อาจจับกับตัวรับเรียกว่า pattern-recognition receptor (PRR) ที่พบบนผิวและภายในเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกัน PRR ที่สำคัญได้แก่ Toll-like receptor (TLR) ซึ่งสามารถจับกับเชื้อได้อย่างครอบคลุมไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา ซึ่งเป็นตัวรับที่พบได้ทั้งบนผิวเซลล์ (TLR-1, 2, 4, 5 และ 6) และภายในเซลล์ (TLR-3, 7, 8 และ 9) แม้การตอบสนองแบบ innate จะเกิดอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดเรื่องความจำเพาะและไม่มีทรงจำ (memory) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immune response ไม่สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้เพียงระบบเดียว ระบบ

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจึงเข้ามาเป็นส่วนช่วยให้การทำลายเชื้อโรคมมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Hoebe *et al.*, 2004)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เป็นระบบต่อเนื่องจากการตอบสนองแบบ innate แต่สามารถตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้อย่างจำเพาะ และมีการจดจำลักษณะของสิ่งแปลกปลอม เพื่อให้กลไกพร้อมทำงานได้ทันทีเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิมในครั้งต่อไป เซลล์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ทีเซลล์ (T cell) และบีเซลล์ (B cell) โดย T cell จะทำหน้าที่กำจัดเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์ที่ติดเชื้อ และช่วยส่งเสริมกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ส่วน B cell ทำหน้าที่ผลิตและหลั่งภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) เพื่อเข้าจับกับแอนติเจน (antigen) ของเชื้อโรค ทำให้แอนติเจนหมดฤทธิ์หรือโดนกำจัดออกไปจากร่างกาย (Hoebe *et al.*, 2004)

การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนหนึ่งถูกควบคุมด้วยไมโครอาร์เอ็นเอ ตัวอย่างเช่น การพัฒนาของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมให้เป็นไปอย่างสมดุล (Lu and Liston, 2009) ไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมีหลายชนิด เช่น miR-17-92, miR-146, miR-155 และ miR-181 (ตารางที่ 1) ซึ่งบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอแต่ละชนิดต่อระบบภูมิคุ้มกันจะได้อธิบายต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงชนิดไมโครอาร์เอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

	Innate immune response	Adaptive immune response		อ้างอิง
		B cell	T cell	
ชนิดของไมโครอาร์เอ็นเอ	miR-146	miR-17-92	miR-17-92	Lindsay, 2008; Tsitsiou and Lindsay, 2009
	miR-155	miR-155	miR-155	
	miR-223	miR-181	miR-181	

MiR-17-92

กลุ่มของ miR-17-92 เป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 ประกอบด้วยไมโครอาร์เอ็นเอ 6 ชนิด ได้แก่ miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b

และ miR-92 (Lindsay, 2008) miR-17-92 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ B cell ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของ pro-B cell ไปเป็น pre-B cell (Ventura *et al.*, 2008) โดยยับยั้ง Bim และ PTEN ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Haafteen and Agami, 2010) และพบการแสดงออกของ miR-17-92 ที่มากกว่าปกติในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งในเต้านม, ปอด, ภาวะอาหาร, ลำไส้, ตับอ่อน และอัมพาต (Volinia *et al.*, 2006) นอกจากนี้ miR-17-92 ยังมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ T cell จาก pro-T cell เป็น pre-T cell อีกด้วย (Xiao *et al.*, 2008)

MiR-146

กลุ่มของ miR-146 ประกอบด้วย miR-146a อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 และ miR-146b อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 (Rusca and Monticelli, 2011) miR-146a และ miR-146b มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โดยควบคุมการทำงานของ NF- κ B ใน Toll-like receptor 4 (TLR-4) pathway โดยการทดลองกระตุ้นเซลล์ monocyte ของคนด้วย LPS ผ่าน TLR-4 pathway พบว่า miR-146a และ miR-146 มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น และมีบทบาทเป็น negative feedback จับกับ TRAF6 และ IRAK1 ยับยั้งการทำงานของ NF- κ B (Taganov *et al.*, 2006)

MiR-155

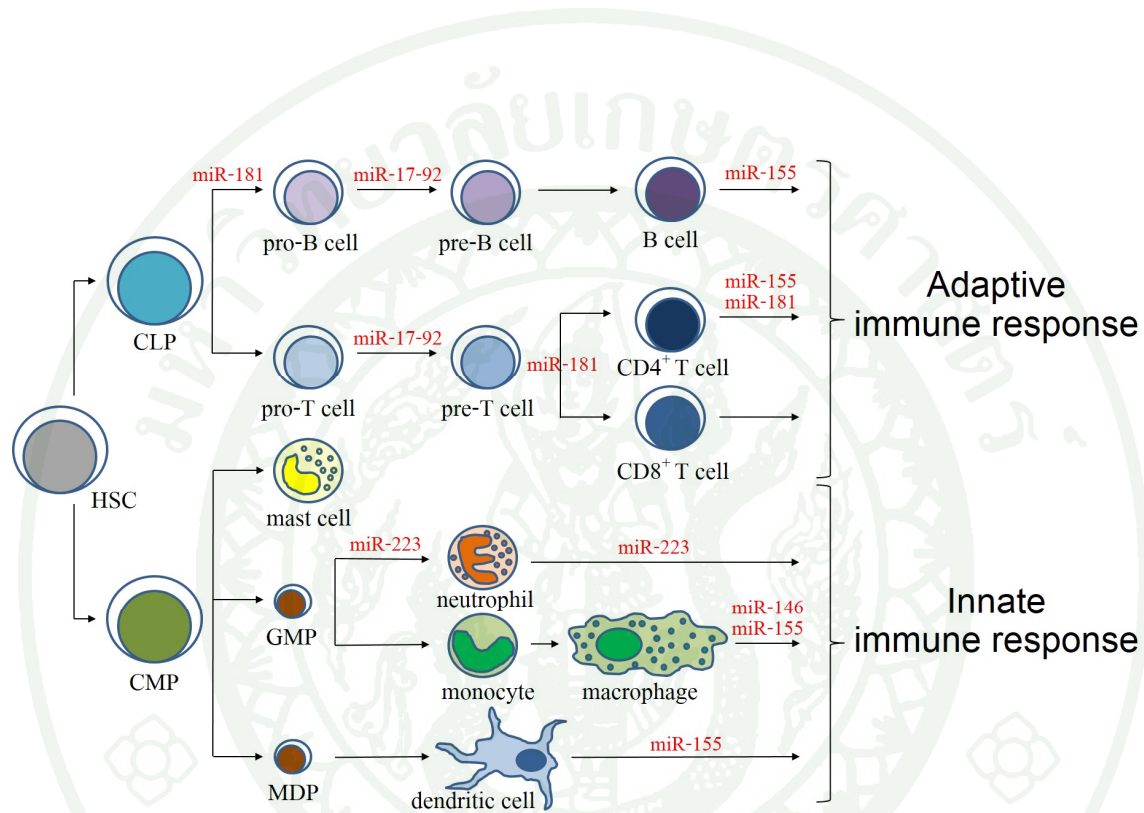
MiR-155 ถูกถอดรหัสจาก *MIR155HG* (MIR155 host gene) หรือเรียกว่ายีน *bic* ยีน *bic* ประกอบด้วย 3 แอ็กซอน (exon) miR-155 มีตำแหน่งอยู่บริเวณ exon ที่ 3 บนโครโมโซมคู่ที่ 21 (Tam, 2001) miR-155 มีการแสดงออกปริมาณมากในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell และ B cell ที่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนแล้ว (activated T และ B cell) และยังพบการแสดงออกใน activated macrophage และ dendritic cell อีกด้วย (Rodriguez *et al.*, 2007) บทบาทสำคัญของ miR-155 ในระบบภูมิคุ้มกัน จึงมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการตอบสนองของ T cell, B cell และ dendritic cell (Lindsay, 2008) เช่นการทดลองให้ tetanus toxin fragment C protein (TetC) ในหนูที่มีการตัดแปลงยีน *bic* พบว่าหนูมีการผลิต immunoglobulin M (IgM) ลดลงเมื่อเทียบกับหนูปกติ แสดงให้เห็นว่ายีน *bic* มีบทบาทควบคุมการตอบสนองของ B cell (Rodriguez *et al.*, 2007) และจากการศึกษาการตอบสนองของ T cell ใน splenocyte โดยวัดจากระดับของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ interleukin 2 (IL-2) และ interferon gamma (IFN- γ) พบว่าหนูที่มีการตัดแปลงยีน *bic* มีประสิทธิภาพในการผลิตไซโตไคน์ IL-2 และ IFN- γ ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับหนูที่มียีน *bic* ปกติ (Rodriguez *et al.*, 2007)

MiR-181

MiR-181 มีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ B cell โดยพบการแสดงออกของ miR-181 เป็นจำนวนมากในเซลล์ต้นกำเนิด (progenitor cell) ซึ่งทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้ progenitor cell แบ่งตัวเป็น pro-B cell เพื่อพัฒนาเป็น B cell ต่อไป (Chen *et al.*, 2004) miR-181 มีหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของ T cell โดยไปลดการแสดงออกของ CD8⁺ T cell และเพิ่มการแสดงออกของ CD4⁺ T cell แทน (Lindsay, 2008) นอกจากนี้ miR-181 ยังเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive regulator) ในการตอบสนองต่อแอนติเจนของตัวรับบน CD4⁺ T cell (T cell receptor: TCR) (Lindsay, 2008) โดย miR-181 จะยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มฟอสฟาเตส (phosphatase) ได้แก่ Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 22 (SHP-2), protein tyrosine phosphatase N22 (PTPN22), dual specificity phosphatases 5 (DUSP-5) และ DUSP-6 ซึ่ง phosphatase เหล่านี้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative regulator) ของสารส่งสัญญาณของ TCR (TCR signaling) ดังนั้นเมื่อ miR-181 ยับยั้ง phosphatase เหล่านี้จึงมีผลทำให้ TCR signaling ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Li *et al.*, 2007)

ไมโครอาร์เอ็นเอชนิดอื่นๆ

นอกจากไมโครอาร์เอ็นเอทั้ง 4 ชนิดที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีไมโครอาร์เอ็นเออีกหลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น miR-29 ที่มีบทบาทเป็น negative regulator ลดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียที่แบ่งตัวและเจริญในเซลล์ (intracellular bacteria) โดยมีอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (interferon gamma: IFN- γ) เป็นยีนเป้าหมาย จากการทดสอบกระตุ้น natural killer cell (NK cell), CD4⁺ T cell และ CD8⁺ T cell ด้วย intracellular bacteria พบว่า miR-29 ไปยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ IFN- γ ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการลดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Ma *et al.*, 2011) และใน miR-223 ที่มีบทบาทควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil จากการศึกษาในหนูที่ขาดไม่มีการแสดงออกของ miR-223 พบว่า granulocyte monocytic progenitor (GMP) และ neutrophil มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นผิดปกติ (hypermaturation) โดยมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากเกินไป (hypersensitive) miR-223 จึงเป็นตัวช่วยควบคุมให้ neutrophil มีจำนวนและการทำงานที่ปกติ (Johnnidis *et al.*, 2008)



ภาพที่ 7 แผนผังสรุปบทบาทของไมโครอาร์เอ็นเอกับการพัฒนารูปร่างและการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด HSC: hematopoietic stem cell, เซลล์ต้นกำเนิดที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ CLP: common lymphocyte progenitor, เซลล์ต้นกำเนิดที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดไมอีลอยด์ CMP: common myeloid progenitor, เซลล์ต้นกำเนิดที่พัฒนาเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดมีแกรนูลและนิวเคลียสเดี่ยว GMP: granulocyte monocytic progenitor, เซลล์ต้นกำเนิดที่พัฒนาเป็นเดนไดรติกเซลล์ MDP: myeloid dendritic progenitor)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และสารเคมีด้านสำหรับงานชีวโมเลกุล
 - 1.1 Trizol[®] reagent (Invitrogen, USA)
 - 1.2 เอนไซม์ reverse transcriptase (SuperScript[™] III; Invitrogen, USA)
 - 1.3 RNaseOUT[™] (Invitrogen, USA)
 - 1.4 DNA Taq polymerase (Thermo scientific, USA)
 - 1.5 NuSieve[®] 3: 1 Agarose (Lonza, USA)
 - 1.6 Ultra low range ladder (ULR ladder) (Thermo scientific, USA)
 - 1.7 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (NEB, USA)
 - 1.8 pGEM-T[®] easy vector (promega, USA)
 - 1.9 ชุดสกัดสำเร็จรูป (QIAEXII agarose Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)
 - 1.10 ชุดสกัดสำเร็จรูป (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit) (Axygen, USA)
 - 1.11 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Invitrogen, USA)
 - 1.12 GelStar[™] Nucleic Acid Gel Stain 10,000X (Cambrex, USA)
 - 1.13 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Ambresco, USA)
 - 1.14 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth)
 - 1.15 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (BIO Basic INC, USA)
 - 1.16 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal)
 - 1.17 iTaq Universal SYBR Green supermix (Biorad, USA)
 - 1.18 Automatic pipette ขนาด 0.2-2, 1-20, 20-200 และ 100-1000 μ l (Thermo scientific, USA)
 - 1.19 ที่บดเนื้อเยื่อ (Pastel and mortar)
 - 1.20 เครื่องชั่งสาร (Electrical balance) (Ohaus, USA)
 - 1.21 เครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (Heat block)
 - 1.22 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Mettler, Germany)
 - 1.23 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometer 2000) (ThermoScientific, USA)

- 1.24 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycler) รุ่น T100 (Biorad, USA)
 - 1.25 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Real time PCR) รุ่น CFX96 (Biorad, USA)
 - 1.26 เครื่องส่องเจล (UV transilluminator) (Geliance 200, PerkinElmer, USA)
 - 1.27 ชุดอิเล็กโตรโพลีซิสแนวนอน (Submarine electrophoresis instrument) (Hofer, USA)
 - 1.28 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation)
 - 1.29 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro Centrifuge) (Corning, USA)
 - 1.30 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) (Kubota 6900, Japan)
 - 1.31 เครื่องเขย่าสารละลายอัตโนมัติ (Incubator Shaker)
 - 1.32 ตู้ดูดควันไอกรดสารเคมี (Fume hood)
2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดเม็ดเลือดขาวและเพาะเลี้ยงเซลล์
- 2.1 สารสกัดเม็ดเลือดขาว (Ficoll-Hypaque Plus) (GE healthcare, USA)
 - 2.2 อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (RPMI medium) (Sigma, USA)
 - 2.3 สารกระตุ้นเม็ดเลือดขาว (Concanavalin A) (Sigma, USA)
 - 2.4 สารกำจัดเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell lysis solution)
 - 2.5 Phosphate buffered saline (PBS)
 - 2.6 Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, USA)
 - 2.7 ชุดกรองขนาด 0.20 μm (Corning, USA)
 - 2.8 ถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) (Thermo scientific, USA)
 - 2.9 Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 μl (Thermo scientific, USA)
 - 2.10 เครื่องดูดและปล่อยสารละลายอัตโนมัติชนิดที่ใช้กับไปเปต (Pipette aid)
 - 2.11 เครื่องชั่งสาร (Electrical balance) (Ohaus, USA)
 - 2.12 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) (Consort, Belgium)
 - 2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) (Kubota 6900, Japan)
 - 2.14 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood) (Astec SC 1800, England)
 - 2.15 ตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซคาร์บอน ไดออกไซด์ (CO_2)

Incubator) (Thermo scientific, USA)

2.16 ห้องปฏิบัติการ clean room เพื่อการปฏิบัติงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์

วิธีการ

1. ศึกษาลักษณะและเปรียบเทียบลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ของสุกร

1.1 ทำนายโครงสร้างของ pre-miR-155 และ pre-miR-181

ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ pre-miR-155 และ pre-miR-181 ของสุกร โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล miRBase (Sanger Institute, Cambridge, UK; www.mirbase.org) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่รวบรวมข้อมูลไมโครอาร์เอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลากหลายสายพันธุ์ (Griffiths-Jones *et al.*, 2006) จากฐานข้อมูลนี้ได้เลือกใช้ลำดับเบส pre-miRNA ของสุกร (*Sus scrofa*: ssc) ได้แก่ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 นำลำดับเบสที่ได้ไปทำนายโครงสร้าง ด้วยโปรแกรม RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ คน (*Homo sapiens*), หนู mice (*Mus musculus*), หนู rat (*Rattus norvegicus*), ไก่ (*Gallus gallus*) และ ปลา (*Danio rerio*)

1.2 เปรียบเทียบลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181

เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสในบริเวณ mature miRNA และ seed region ของ miR-155 และ miR-181 ใช้ข้อมูลลำดับเบสของสุกร (*Sus scrofa*) และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นจากฐานข้อมูล miRBase ได้แก่ คน (*Homo sapiens*), หนู mice (*Mus musculus*), หนู rat (*Rattus norvegicus*), ไก่ (*Gallus gallus*) และปลา (*Danio rerio*) มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม EMBOSS Needle (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html) เป็นโปรแกรมที่ใช้เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสแบบคู่ (pairwise alignment)

2. การทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181

ทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ด้วยโปรแกรมทำนายยีนสามโปรแกรม ได้แก่ DIANA-micro T (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT>), miRmap (<http://mirmap.ezlab.org>) และ PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi) เนื่องด้วยทั้งสามโปรแกรมไม่สามารถทำนายยีนโดยพื้นฐานข้อมูลจากสุกรได้ จึงเลือกใช้การทำนายยีนจากฐานข้อมูลของคนแทน ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากโปรแกรมเหล่านี้จึงเป็นการทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ในคน

นำยีนเป้าหมายที่ทำนายได้จากทั้งสามโปรแกรมไปตรวจสอบบทบาทหน้าที่และการทำงานจากฐานข้อมูล KEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) จากนั้นคัดเลือกยีนจากทั้งสามโปรแกรมที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน นำไปยืนยันผลการเข้าคู่กันของลำดับเบสระหว่างยีนที่ถูกทำนายได้กับ miR-155 และ miR-181 โดยใช้ลำดับเบสของสุกร

3. ออกแบบไพรเมอร์

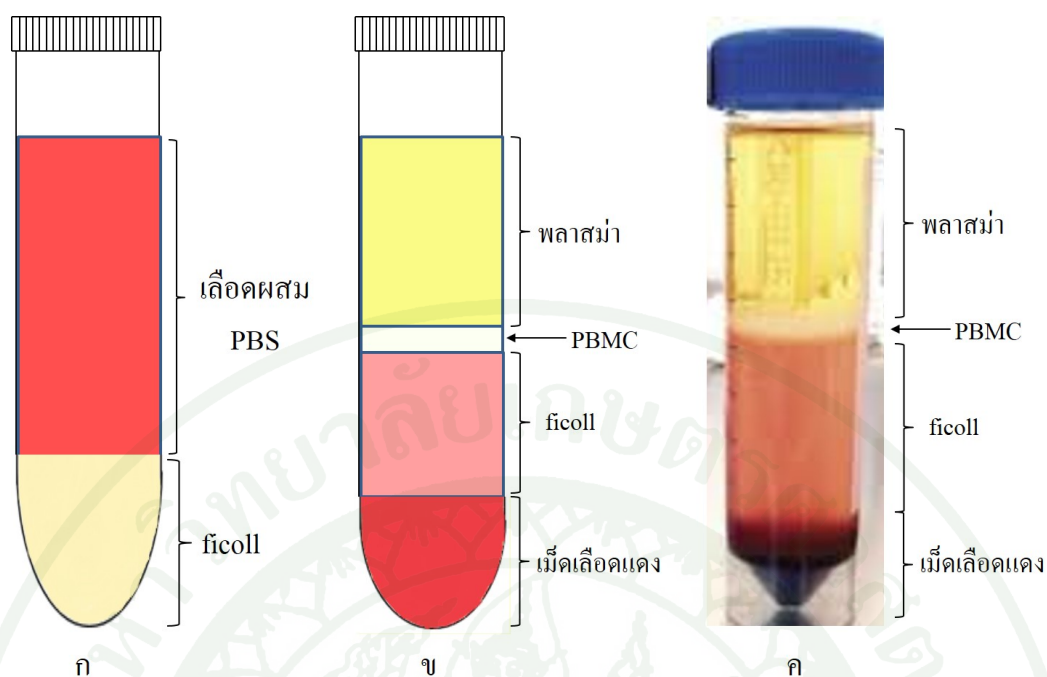
ออกแบบไพรเมอร์ (primer) miR-155 และ miR-181 ด้วยโปรแกรม Primer3 (v.0.4.0) ลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรนำมาจากฐานข้อมูล miRBase (www.mirbase.org) และใช้ GAPDH (Zhang *et al.*, 2012) เป็นยีนเปรียบเทียบ สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ของ miR-155, miR-181 และ GAPDH

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Accession number
miR-155	miR-155_F GTTAATGCTAATTGTGATAGGGG	72	MI0015907 (miRBase)
	miR-155_R CATCATACCCTGTTAATGCTAAC		
miR-181	miR-181_F CAGTGAACATTCAACGCTGTC	85	MI0010686 (miRBase)
	miR-181_R GCTGATGGTTGGCCATAGG		
GAPDH	GAPDH_F AGGTCATCCATGACAACCTTCGGCA	155	AF017079 (NCBI)
	GAPDH_R AGCACCAGTAGAAGCAGGGATGAT		

4. การสกัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดสุกร

นำตัวอย่างเลือดสุกรสุขภาพดีมาสกัดเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral blood mononucleated cell: PBMC) อาศัยหลักการความหนาแน่นที่แตกต่างกันของเซลล์แต่ละชนิด โดยใช้สารสกัดเม็ดเลือดขาว Ficoll-Hypaque Plus (GE healthcare, USA) นำตัวอย่างเลือดสุกรผสมกับ phosphate buffered saline (PBS) ในอัตราส่วน เลือด 1 ส่วน ต่อ PBS 1 ส่วน เพื่อลดความเข้มข้นของเลือด แล้วนำไปใส่ในหลอดปั่น 15 ml ที่มี ficoll ในอัตราส่วน เลือดผสม PBS 10 ส่วน ต่อ ficoll 3 ส่วน (ภาพที่ 8ก) ในขั้นตอนการเทเลือดผสม PBS ลงบน ficoll ควรทำอย่างระมัดระวังและเบามือ อย่าให้ลงไปปนกับ ficoll แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที (round per minute: rpm) ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากการปั่นเหวี่ยง องค์ประกอบต่างๆในเลือดและ ficoll จะแยกชั้นกัน (ภาพที่ 8ข และ 8ค) พลาสมาที่มีความหนาแน่นน้อยที่สุดก็จะอยู่ที่ชั้นบนของหลอด ชั้นของ PBMC จะอยู่ใต้ plasma มีลักษณะเป็นวงแหวนขาวขุ่น ลอยตัวอยู่ ถัดมาเป็นชั้นของ ficoll และชั้นของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความหนาแน่นมากที่สุดอยู่ที่ก้นหลอด ใช้ปิเปตดูดเก็บ PBMC ใส่ในหลอดปั่นอันใหม่ ล้าง PBMC ด้วย PBS 1 ครั้ง นำไปปั่นความเร็วรอบ 2500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งแล้วเติมสารกำจัดเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell lysis solution) 5 ml ลงไป วางหลอดลงบนน้ำแข็งบ่มเป็นเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยากำจัดเม็ดเลือดแดงโดยเติม PBS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง เติม PBS ปั่นล้าง PBMC ตามขั้นตอนที่กล่าวมาซ้ำอีก 2 รอบ จะได้ PBMC พร้อมนำไปทดสอบต่อไป โดย PBMC ที่จะนำไปสกัดอาร์เอ็นเอจะถูกเก็บใน Trizol® reagent (Invitrogen, USA) ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อคงสภาพอาร์เอ็นเอให้สมบูรณ์ที่สุด และ PBMC ส่วนที่ต้องการนำไปเลี้ยงเพื่อทำการทดลองต่อ จะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังจะอธิบายในขั้นตอนต่อไป

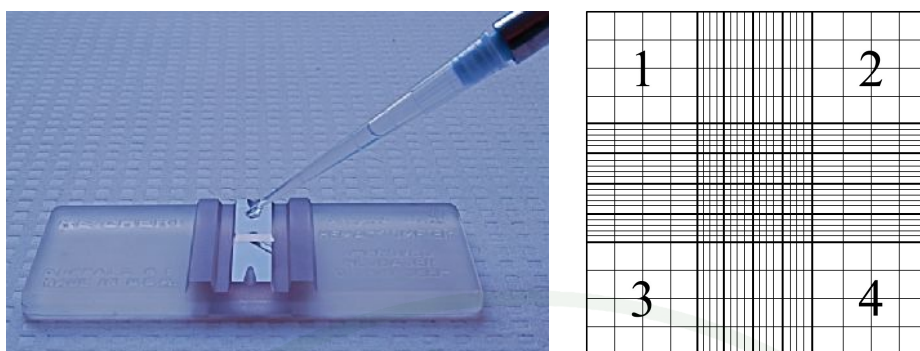


ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการสกัดเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ด้วยสารสกัดเม็ดเลือดขาว ficoll รูป ก ลักษณะของเลือดผสม PBS อยู่บน ficoll รูป ข ภาพการแยกชั้นขององค์ประกอบในเลือดและ ficoll รูป ค ภาพถ่ายจริงของการแยกชั้น

ที่มา: Barts and the London school of medicine and dentistry (2012)

การเลี้ยง PBMC ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (Sigma) ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum กับยาปฏิชีวนะ 100 U/ml penicillin/streptomycin และ 50 µg/ml gentamicin (Katial *et al.*, 1998) เลี้ยงในตู้บเพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37°C นับปริมาณ PBMC ที่สกัดได้ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบคุณภาพโดยนำไปย้อมสี 0.4% trypan blue ในอัตราส่วนเซลล์ 1 µl ต่อ trypan blue 5 µl โดยนับเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (เซลล์สีไม่ติดสีย้อม) ที่กระจายตัวอยู่ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ทั้ง 4 ช่อง (ใน 1 ช่องใหญ่มี 16 ช่องเล็ก) ดังภาพที่ 9 แล้วคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้สูตร

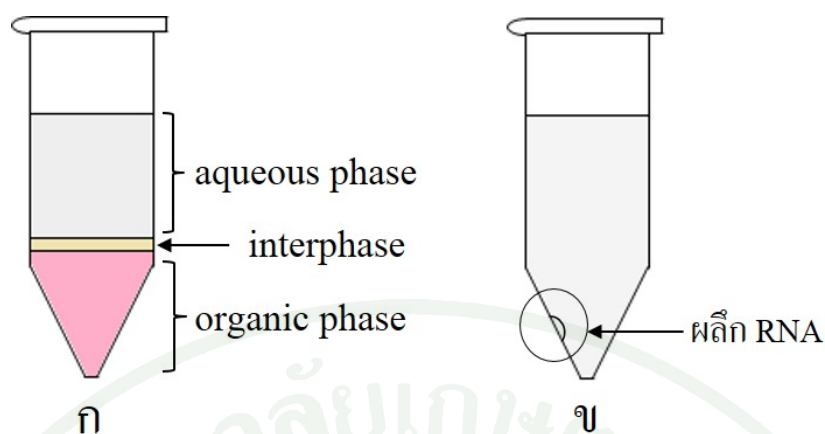
ปริมาณเซลล์ทั้งหมด = (ปริมาณเซลล์โดยเฉลี่ยที่นับได้ใน 4 ช่อง x dilution factor x 10⁴) เซลล์/ml



ภาพที่ 9 แสดงวิธีการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในช่องสี่เหลี่ยม 4 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก)

5. การสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ trizol ควรทำการสกัดโดยใช้ตู้ดูดควันไอกรดสารเคมี (fume hood) เนื่องจาก trizol เป็นสารที่มีกลิ่นฉุน มีฤทธิ์กัดกร่อนรุนแรง และควรระมัดระวังการปนเปื้อนของ RNase ในอุปกรณ์และบริเวณพื้นที่ที่ปฏิบัติงานด้วย ในการศึกษาทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อ (ม้ามและกล้ามเนื้อ) และเซลล์สุกร (PBMC และ PK15) ด้วย trizol ใช้วิธีตามคำแนะนำของผู้ผลิต การสกัดในบางขั้นตอนต้องใช้ความระมัดระวังมาก เช่น ขั้นตอนหลังจากเติม chloroform แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงจะเกิดการแยกชั้นของสารละลาย (ภาพที่ 10ก) เห็นเป็นชั้นของอาร์เอ็นเอ (aqueous phase) ชั้นของ DNA (interphase) และชั้นของโปรตีนและไขมัน (organic phase) ปิเปิดสารละลายตรงชั้น aqueous phase ให้ได้มากที่สุด ต้องระวังอย่าให้เกิดการฟุ้งจนทำให้ปนเปื้อน DNA จากชั้น interphase และขั้นตอนหลังจากเติม isopropyl alcohol บ่มในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง จะได้อาร์เอ็นเอตกผลึกอยู่ก้นหลอด (ภาพที่ 10ข) ให้ปิเปิดสารละลายทิ้ง ระวังอย่าให้โดนผลึกอาร์เอ็นเอหลุดออกไป ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัด ใช้น้ำปราศจากการปนเปื้อนของ DNase และ RNase เป็นตัวทำลายอาร์เอ็นเอและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer 2000 (ThermoScientific)



ภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ trizol รูป ก ภาพการแยกชั้นหลังจากการปั่นชั้นของอาร์เอ็นเอ (aqueous phase) ชั้นของ DNA (interphase) และชั้นของโปรตีนและไขมัน (organic phase) รูป ข ภาพผลึก RNA บริเวณก้นหลอด

6. การสังเคราะห์ cDNA

สังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (SuperScript III) (Invitrogen) วิธีตามคำแนะนำของผู้ผลิต โดยใช้ oligo dT primer (Promega) ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเซลล์ที่นำมาสังเคราะห์ cDNA จะใช้อาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 นาโนกรัม (ng) เท่ากันทุกตัวอย่าง

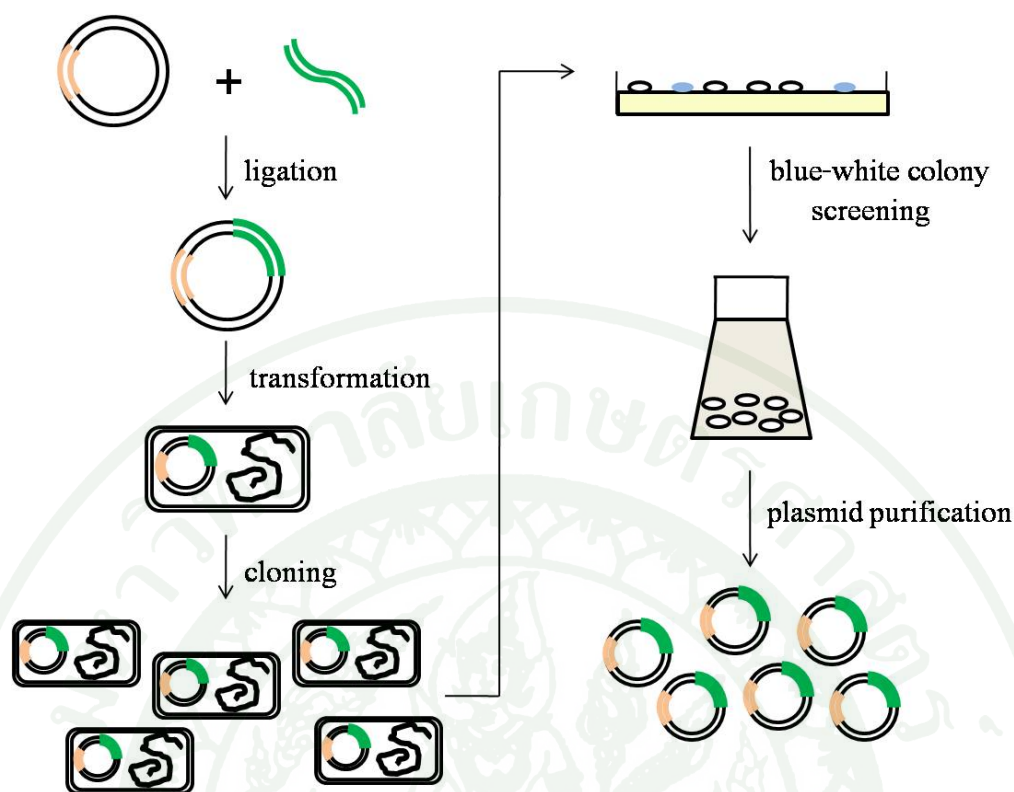
7. การทำ PCR และทดสอบผลิตภัณฑ์ในเจล

ศึกษาการแสดงออกของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์สุกร ได้แก่ ม้าม (spleen), กล้ามเนื้อ (muscle), เซลล์ PBMC และเซลล์เพาะเลี้ยง PK15 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ใช้เอนไซม์ DNA *Taq* polymerase (Thermo scientific) ปฏิกิริยารวม 20 μ l วงรอบการทำปฏิกิริยา เป็นดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation 95°C เวลา 5 นาที, denaturation 94°C เวลา 30 วินาที, annealing 58°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ miR-155) 60°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ miR-181) 55°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ GAPDH), extension 72°C เวลา 30 วินาที และ final extension 72°C เวลา 7 นาที ทั้งหมด 35 รอบ

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบในเจล (gel electrophoresis) ใช้ 5% Nusieve gel (Lonza) และ ultra low range (ULR) ladder เป็นเกณฑ์วัดขนาดของชิ้นส่วน DNA ตรวจสอบความเข้มของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation) ใช้โปรแกรม GeneTools version 3.07 (PerkinElmer, UK)

8. การโคลนและการสกัดพลาสมิด

เพิ่มปริมาณชิ้น miR-155 และ miR-181 ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการและใช้วงรอบการทำปฏิกิริยาตามที่กล่าวไว้ในวิธีการข้อที่ 7 แล้วทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ใน 5% Nusieve gel จากนั้นสกัดชิ้นส่วน DNA ของ miR-155 และ miR-181 ในเจลด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAEXII agarose Gel Extraction Kit (Qiagen) แล้วนำชิ้นส่วน DNA บริสุทธิ์ที่สกัดได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ (vector) เรียกขั้นตอนนี้ว่า ligation โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Invitrogen), ligation buffer, pGEM-T easy vector (promega) และชิ้นส่วน DNA บริสุทธิ์ ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 23°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้ชิ้นส่วน DNA เชื่อมกับเวกเตอร์ หรือที่เรียกว่า พลาสมิด (plasmid) จากนั้นนำ plasmid เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (transformation) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่ต้องการ (cloning) โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร Luria-Bertani (LB) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 16 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนี แบคทีเรียที่มีสีขาว (blue-white colony screening) ซึ่งเป็นโคโลนีที่คาดว่ามีชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการอยู่ใน plasmid จากนั้นใช้เทคนิค colony PCR screening คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้น DNA ที่ต้องการ (positive clone) แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 rpm ประมาณ 16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย (plasmid purification) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen) ได้พลาสมิดที่เรียกว่า pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 (ภาพที่ 11) แล้วนำไปทำ sequencing เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ต่อไป



ภาพที่ 11 แสดงขั้นตอนของการโคลนและสกัดพลาสมิด

9. การหากราฟมาตรฐาน และคำนวณ plasmid copy number

วิเคราะห์หากราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยทำการเจือจางแบบ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จาก pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 จำนวนปริมาณ copy number ที่ใช้ใน แต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4 โดยสูตรในการคำนวณปริมาณพลาสมิด (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>) ดังนี้

$$\text{copy number} = \text{plasmid concentration (g/}\mu\text{l)} \times 6.022 \times 10^{23} / \text{insert size (bp)} \times 650$$

(URI Genomics & Sequencing Center, University of Rhode Island, USA)

10. การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181

พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณ (qPCR) เพื่อใช้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 โดยใช้เอนไซม์ iTaq Universal SYBR green mastermix (Biorad)

ปฏิกิริยารวม 20 μ l วงรอบการทำปฏิกิริยาเป็นดังนี้ ขั้นตอน first denaturation 95°C เวลา 2 นาที 30 วินาที, denaturation 95°C เวลา 5 วินาที, annealing 58°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ miR-155) 60°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ miR-181) 55°C เวลา 30 วินาที (สำหรับ GAPDH) และ extension 72°C เวลา 30 วินาที ทั้งหมด 40 รอบ

11. การศึกษาการแสดงออกของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรที่ ถูกกระตุ้น

เก็บเลือดจากสุกรที่มีสุขภาพดีจำนวน 3 ตัว นำมาปั่นแยกเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Ficoll-Hypaque gradient centrifugation เม็ดเลือดขาวที่แยกได้ถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI medium ที่มีส่วนผสมของ 10% fetal bovine serum กับยาปฏิชีวนะ 100 U/ml penicillin/streptomycin และ 50 μ g/ml gentamicin (Katial *et al.*, 1998) เซลล์ที่ได้นำไปใส่ในถาด หลุมเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ถูก กระตุ้นด้วยสารกระตุ้นเม็ดเลือดขาว (concanavalin A: con A) (Sigma) ขนาด 10 mg/ml (Suradhat *et al.*, 2003) เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อตรวจดูการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธี melting curve analysis และทดสอบผลิตภัณฑ์บน 5% Nusieve gel

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

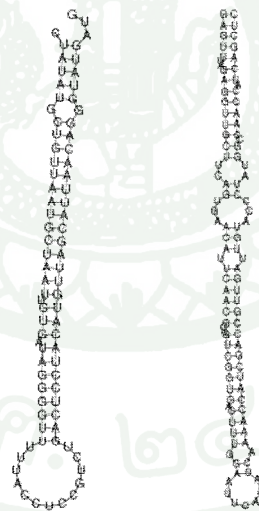
คำนวณค่า Δ Ct เพื่อดูการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 เปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร con A ด้วยโปรแกรม Prism (GraphPad Software, San Diego, CA)

ผลและวิจารณ์

ผล

1. โครงสร้างทุติยภูมิและผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ของ miR-155 และ miR-181

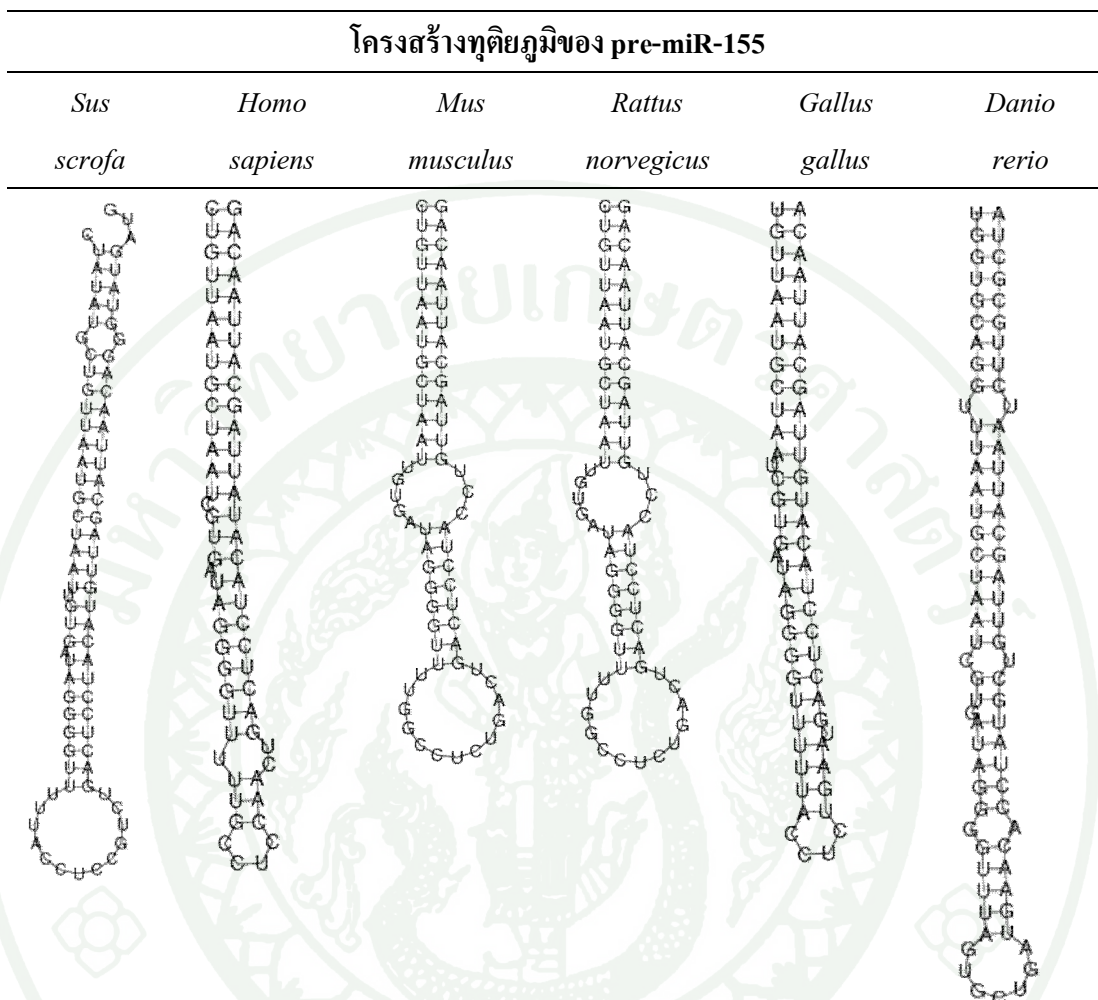
การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ pre-miR-155 และ pre-miR-181 ของสุกร ใช้ลำดับเบสจากฐานข้อมูล miRBase ด้วยโปรแกรม RNAfold web server ทำนายโครงสร้างใช้หลักการคำนวณจากค่า minimum free energy (MFE), ΔG and base pair complementary (Zuker, 2003) พบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ที่ทำนายได้มีลักษณะคล้ายปิ่นปักผม (hairpin loop) พบ terminal loop 1 ตำแหน่ง มีค่า free energy เท่ากับ -35.27 และ -35.29 kcal/mole ตามลำดับ (ภาพที่ 12) และยังมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่นำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ สุกร (*Sus scrofa*), คน (*Homo sapiens*), หนู mouse (*Mus musculus*), หนู rat (*Rattus norvegicus*), ไก่ (*Gallus gallus*) และปลา (*Danio rerio*) (ตารางที่ 3 และ 4)



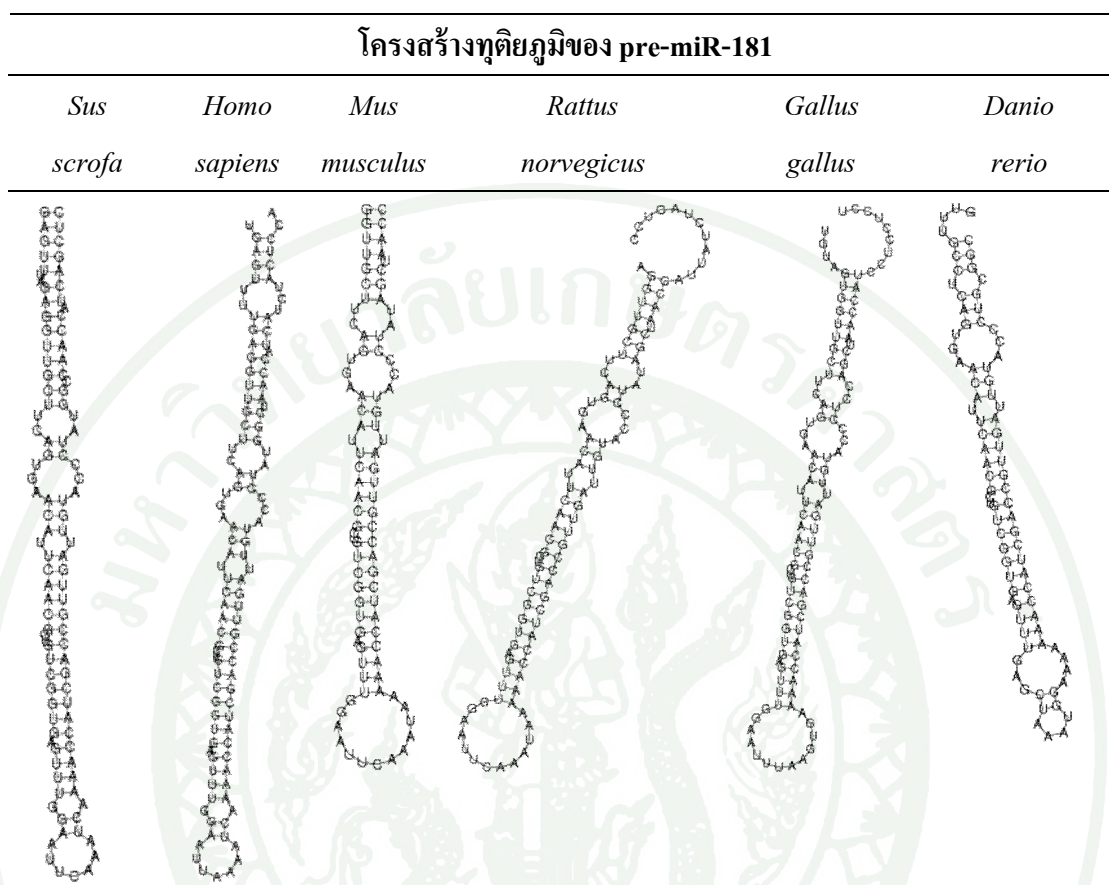
ssc-miR-155 ssc-miR-181

ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ที่ทำนายได้จากโปรแกรม RNAfold web server

ตารางที่ 3 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ pre-miR-155 ของสุกรเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น



ตารางที่ 4 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ pre-miR-181 ของสุกรเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น



จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ mature miR-155 และ miR-181 ของสุกรกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus* และ *Danio rerio* ด้วยวิธี pairwise alignment โดยใช้โปรแกรม EMBOSS Needle พบว่าลำดับเบสของ mature miR-155 ของ *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus* และ *Danio rerio* ที่นำมาเปรียบเทียบกับสุกรมิเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 91.3%, 95.7%, 95.7%, 95.7% และ 95.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และลำดับเบสของ mature miR-181 ของสิ่งมีชีวิตที่นำมาทดสอบเทียบกับสุกรมิเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 95.8% ในทุกสิ่งมีชีวิต (ตารางที่ 6) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบส seed region บริเวณปลาย 5' ของ miR-155 (5' UAAUGCU 3') และ miR-181 (5' ACAUCAA 3') พบว่า seed region ของสิ่งมีชีวิตทั้งหกชนิดที่นำมาเปรียบเทียบมีลำดับเบสที่เหมือนกันถึง 100%

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ mature miR-155 ของสุกรเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ลำดับเบสของ mature miR-155 (5'-3')	เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบ ความเหมือนของลำดับเบส (เทียบกับสุกร)	เลขทะเบียน
<i>Sus scrofa</i>	UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGG	100%	MIMAT0022959
<i>Homo sapiens</i>	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU	91.3%	MIMAT0000646
<i>Mus musculus</i>	UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU	95.7%	MIMAT0000165
<i>Rattus norvegicus</i>	UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU	95.7%	MIMAT0030409
<i>Gallus gallus</i>	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG	95.5%	MIMAT0001106
<i>Danio rerio</i>	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG	95.5%	MIMAT0001851

หมายเหตุ ตัวอักษรเน้นสีเข้ม คือ บริเวณ seed region ของไมโครอาร์เอ็นเอ

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ mature miR-181 ของสุกรเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

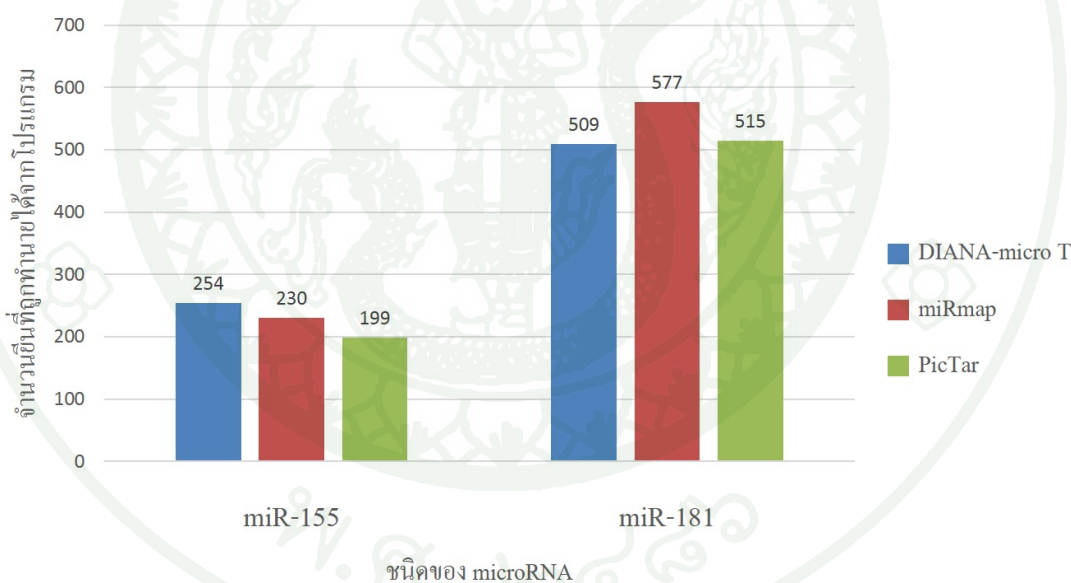
ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ลำดับเบสของ mature miR-181 (5'-3')	เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบ ความเหมือนของลำดับเบส (เทียบกับสุกร)	เลขทะเบียน
<i>Sus scrofa</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU	100%	MIMAT0010191
<i>Homo sapiens</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95.8%	MIMAT0000256
<i>Mus musculus</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95.8%	MIMAT0000210
<i>Rattus norvegicus</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95.8%	MIMAT0000858
<i>Gallus gallus</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95.8%	MIMAT0001168
<i>Danio rerio</i>	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	95.8%	MIMAT0001623

หมายเหตุ ตัวอักษรเน้นสีเข้ม คือ บริเวณ seed region ของไมโครอาร์เอ็นเอ



2. ทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181

ทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ด้วยโปรแกรมทำนายยีน 3 โปรแกรม คือ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar เนื่องจากทั้งสามโปรแกรมไม่สามารถทำนายยีนโดยใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลของสุครได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้โปรแกรมทำนายยีนจากฐานข้อมูลของคนแทน ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับเบสในข้างต้นพบว่าบริเวณ seed region ของสิ่งมีชีวิตทั้งหกชนิดที่นำมาศึกษามีลำดับเบสเหมือนกันถึง 100% จึงใช้ผลการศึกษาเบื้องต้นนี้คาดการณ์ว่าการทำนายยีนเป้าหมายจากทั้ง 3 โปรแกรมโดยใช้ข้อมูล seed region จากฐานข้อมูลของคนน่าจะสามารถนำมาใช้อ้างอิงการศึกษาเป้าหมายของสุครได้ จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้ผลการทำนายยีนดังนี้ ยีนเป้าหมายของ miR-155 ทำนายได้ 254, 230 และ 199 ยีน ขณะที่ยีนเป้าหมายของ miR-181 ทำนายได้ 509, 577 และ 515 ยีน (ภาพที่ 13) โดยเป็นผลการทำนายจากโปรแกรม DIANA-micro T, miRmap และ PicTar ตามลำดับ



ภาพที่ 13 แผนภูมิแสดงจำนวนยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ที่ทำนายได้จากโปรแกรมทำนายยีน 3 โปรแกรม คือ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar

ตารางที่ 7 แสดงยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 วิเคราะห์จากโปรแกรมทำนายยีนทั้งสาม โปรแกรม คือ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar โดยยีนที่ถูกคัดเลือกนำมาแสดงในตาราง คือยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และถูกทำนายได้จากสองโปรแกรมขึ้นไป

ชนิดไมโครอาร์เอ็นเอ	ชื่อยีน	หน้าที่ของยีน	DIANA-micro T	PicTar	miRmap
miR-155	BACH1	Transcription regulator protein BACH1 (transcription factor)		✓	✓
miR-155	SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1 (STAT-induced STAT inhibitor)	✓	✓	
miR-155	MAP3K14	NF-kappa-B-inducing kinase (NIK) (serine/threonine protein-kinase)	✓	✓	
miR-155	MPP5	peripheral membrane-associated guanylate kinase			✓
miR-181	DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X (RNA helicases)	✓		✓
miR-181	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5 (nuclear factor)	✓		✓
miR-181	FOXP1	forkhead box protein P1 (transcription factor)	✓	✓	
miR-181	MPP5	peripheral membrane-associated guanylate kinase	✓	✓	

จากนั้นนำยีนเป้าหมายที่ทำนายได้จากทั้งสามโปรแกรมไปตรวจสอบบทบาทหน้าที่และการทำงานจากฐานข้อมูล KEGG pathway เพื่อคัดเลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และถูกทำนายได้จากสองโปรแกรมขึ้นไป ได้ยีนเป้าหมายของ miR-155 คือ *BACH1*, *SOCS1* และ *MAP3K14* ยีนเป้าหมายของ miR-181 คือ *DDX3X*, *NFAT5* และ *FOXP1* โดย *MPP5* เป็นยีนเป้าหมายร่วมของทั้ง miR-155 และ miR-181 และถูกทำนายได้จากทั้ง 3 โปรแกรม (ตารางที่ 7)

ทำการทดสอบยืนยันผลการเข้าคู่กันของลำดับเบสของยีนที่ถูกทำนายได้กับลำดับเบสของ seed region ของ miR-155 (3' UCGUAAU 5') และ miR-181 (3' ACUUACA 5') โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของสุกรจากฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับเบสบริเวณ seed region ของ miR-155 และ miR-181 มีลำดับเบสที่เข้าคู่กันกับยีนเป้าหมายทั้ง 7 ยีนของสุกรได้ โดยลำดับเบสของ miR-181 สามารถเข้าคู่กับยีน *DDX3X*, *NFAT5*, *FOXP1* และ *MPP5* ได้ทั้ง 7 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ขณะที่ลำดับเบสของ miR-155 สามารถเข้าคู่กับยีน *SOCS1* และ *MAP3K14* ได้ 7 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ และเกิด mismatch 1 ตำแหน่งในยีน *BACH1* และ *MPP5* (ภาพที่ 14) จากผลการทดลองนี้ สันนิษฐานได้ว่า miR-155 และ miR-181 น่าจะมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสุกร

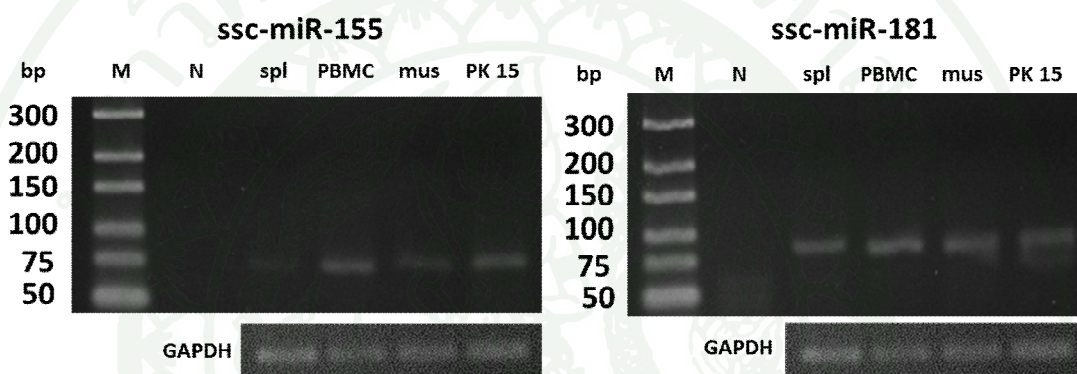
miR-155	3'...UCGUAAU...5'	miR-181	3'...ACUUACA...5'
SOCS1	5'...AGCAUUA...3'	DDX3X	5'...UGAAUGU...3'
MAP3K14	5'...AGCAUUA...3'	NFAT5	5'...UGAAUGU...3'
BACH1	5'...AGGAUUA...3'	FOXP1	5'...UGAAUGU...3'
MPP5	5'...AGAAUUA...3'	MPP5	5'...UGAAUGU...3'

ภาพที่ 14 แสดงการจับกันของลำดับเบสระหว่าง miR-155, miR-181 และยีนเป้าหมาย

3. การแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์สุกร

หลังจากการศึกษาลักษณะทั่วไปและทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูความเกี่ยวข้องของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดกับระบบภูมิคุ้มกันในสุกร โดยทำการตรวจสอบการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อ (ม้ามและกล้ามเนื้อ) และเซลล์ (PBMC และ PK15) ของสุกร

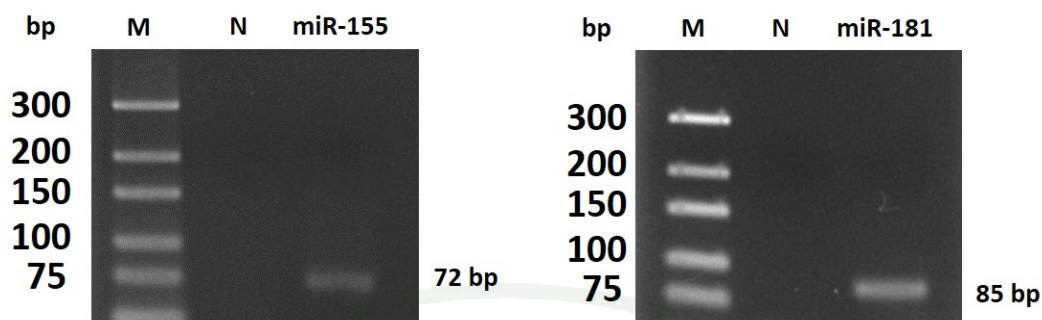
โดยใช้ยีน GAPDH เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control gene) ผลการทดสอบพบว่า miR-155 และ miR-181 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อและเซลล์สุกรที่นำมาทดสอบ ได้ผลแถบดีเอ็นเอของ miR-155 มีขนาดเท่ากับ 72 คู่เบส (bp) และ miR-181 มีขนาดเท่ากับ 85 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 15) โดย miR-155 มีการแสดงออกมากกว่าในเซลล์ PBMC และ PK15 ขณะที่ miR-181 มีการแสดงออกปริมาณมากใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า miR-155 และ miR-181 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อและเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ม้าม และเซลล์ PBMC ทั้งยังแสดงออกในเนื้อเยื่อและเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น กล้ามเนื้อ และเซลล์ PK15 อีกด้วย



ภาพที่ 15 การแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์ของสุกร สกัด RNA จากเนื้อเยื่อและเซลล์ของสุกร ได้แก่ ม้าม (spl: spleen), เซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC: peripheral blood mononuclear cells), กล้ามเนื้อ (mus: muscle) และเซลล์ PK15 (PK15: porcine kidney cell lines) (M = marker และ N = negative control)

4. การโคลนและสกัดพลาสมิดของ miR-155 และ miR-181

เพื่อทดสอบหาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอจาก PBMC และสังเคราะห์ cDNA แล้วเพิ่มปริมาณ miR-155 และ miR-181 ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการและใช้วงรอบการทำปฏิกิริยาตามที่กล่าวไว้ เพื่อนำมาใช้ในการทำโคลนและสกัดพลาสมิด เมื่อทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ใน 5% Nusieve gel ได้แถบ DNA ของ miR-155 และ miR-181 มีขนาด 72 และ 85 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

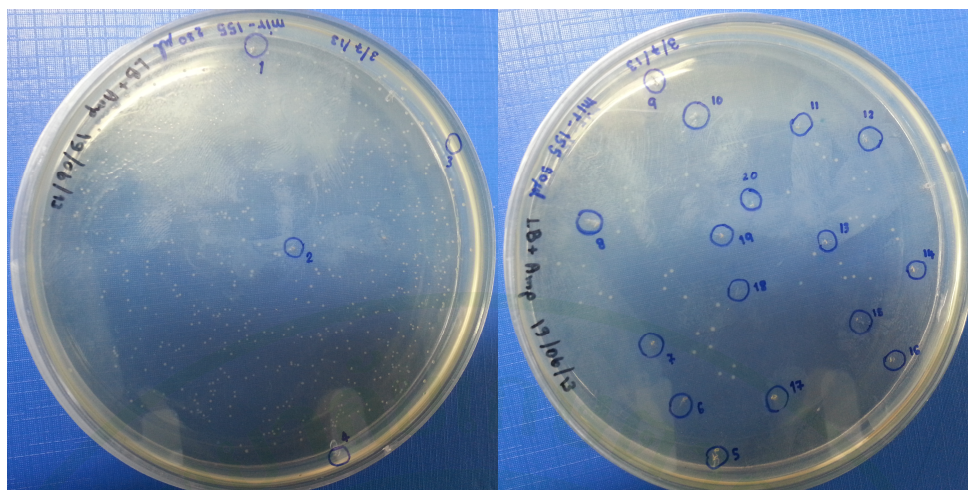


ภาพที่ 16 แสดงขนาดแถบ DNA ของ miR-155 และ miR-181 จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR มีขนาด 72 และ 85 bp ตามลำดับ (M = marker และ N = negative control)

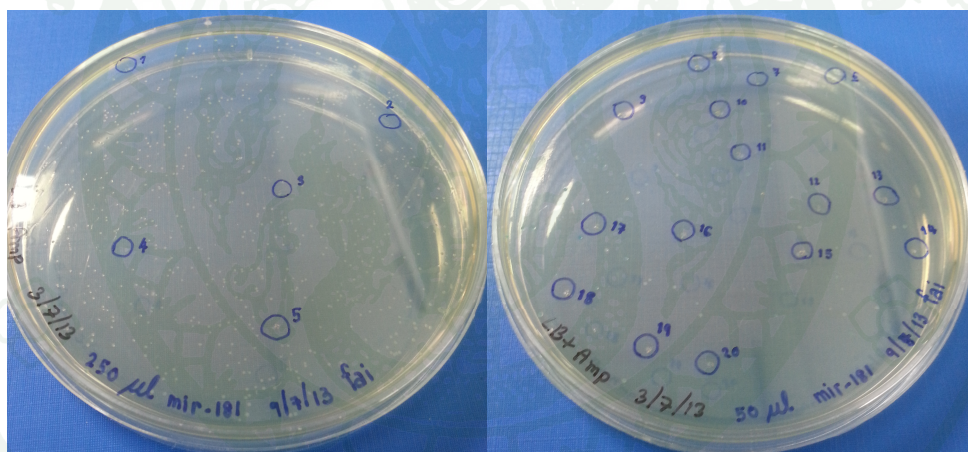
สกัดชิ้นส่วน DNA ของ miR-155 และ miR-181 ในเจลด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป QIAEXII agarose Gel Extraction Kit แล้วนำชิ้น DNA มาเชื่อมกับ pGEM-T easy vector นำ plasmid ที่ได้เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin, IPTG และ X-gal หลังบ่มจนครบ 16 ชั่วโมง แบคทีเรียที่เจริญได้จะเป็นแบคทีเรียที่มี pGEM-T easy vector อยู่ในเซลล์ เพราะ pGEM-T easy vector มียีนต้านทานต่อยา ampicillin ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่คาดว่ามีชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ เนื่องจากชิ้น DNA จะเข้าไปแทรกในบริเวณยีน *lac Z* ของ pGEM-T easy vector (ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ β -galactosidase มาย่อย X-gal ทำให้โคโลนีเกิดสีฟ้า) ทำให้ยีน *lac Z* ไม่สามารถทำงานได้ โคโลนีที่ได้จึงมีสีขาว (ภาพที่ 17) ในขั้นตอนนี้จะคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาว และเป็นโคโลนีเดี่ยวเท่านั้น คัดเลือกประมาณ 20 โคโลนี (ภาพที่ 18 และ 19)



ภาพที่ 17 แสดงโคโลนีที่ไม่มีชิ้น DNA แทรกอยู่จะมีสีฟ้า (ในวงกลมที่ลูกศรชี้) และโคโลนีที่มีชิ้น DNA แทรกอยู่จะมีสีขาว

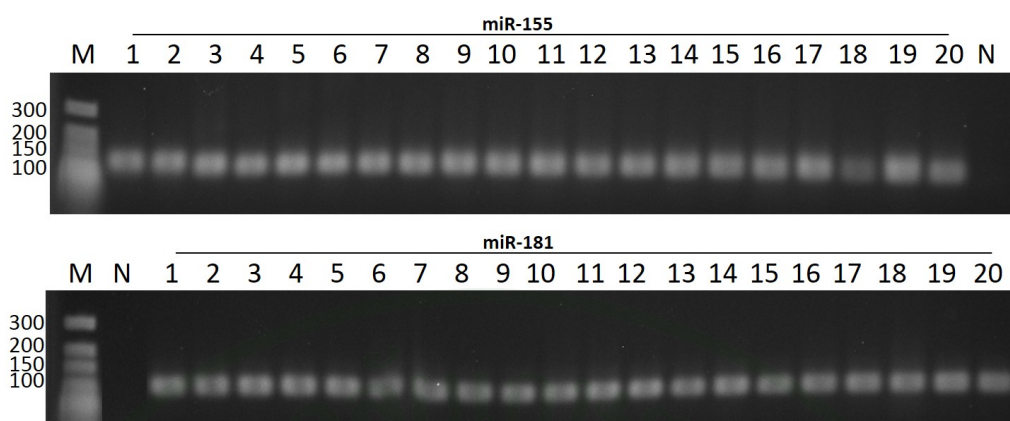


ภาพที่ 18 แสดงผลการเจริญของเชื้อ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin วงกลมเชื้อ *E. coli* โคลนีที่คาดว่ามีส่วนของ pGEM-miR-155



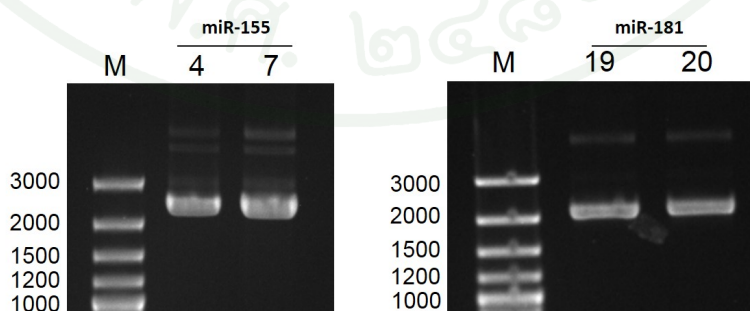
ภาพที่ 19 แสดงผลการเจริญของเชื้อ *E. coli* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin วงกลมเชื้อ *E. coli* โคลนีที่คาดว่ามีส่วนของ pGEM-miR-181

นำโคลนีที่คัดเลือกทั้งหมดมาตรวจสอบหาชิ้นส่วน miR-155 และ miR-181 โดยใช้เทคนิค colony PCR screening จากผลการทดสอบพบว่าทุกโคลนีที่เลือกมาเป็น positive clone ทั้ง 20 โคลนี (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 แสดงผลการทำ colony PCR screening ของ miR-155 และ miR-181 (M = marker และ N = negative control)

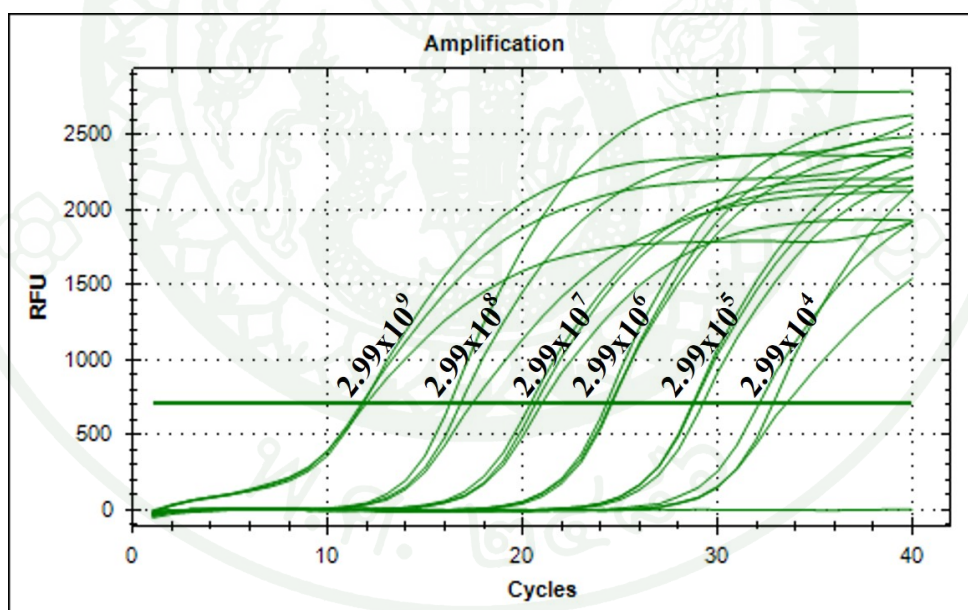
คัดเลือก positive clone ของ miR-155 และ miR-181 มาอย่างละ 2 ตัวอย่าง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ampicillin หลังจากบ่มครบ 16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป AxyPrep Plasmid Miniprep Kit ได้ พลาสมิดที่เรียกว่า pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่ง pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และเป็นพลาสมิดจึงมีรูปร่างเป็นทรงกลม เมื่อทำการทดสอบในเจลมีความเป็นไปได้ที่จะเคลื่อนที่เร็วกว่า DNA ที่เป็นเส้นตรง จึงเห็นแถบ DNA มีขนาดระหว่าง 2,000 ถึง 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 21) เพื่อการยืนยันผลที่แน่นอนจึงส่งพลาสมิดไปวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 พบว่ามีผลลำดับเบสที่ถูกต้องเหมือนกัน 100% เมื่อนำไปเทียบกับลำดับเบสจากฐานข้อมูล miRBase ด้วยวิธี pairwise alignment



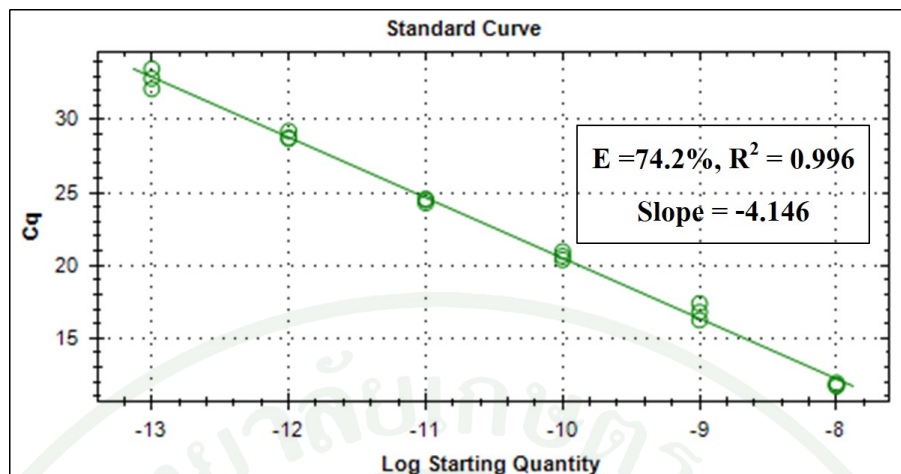
ภาพที่ 21 แสดงผลการทำ colony PCR screening ของ pGEM-miR-155 และ pGEM-miR-181 (M = marker)

5. พัฒนาเทคนิค qPCR เพื่อใช้ตรวจสอบการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181

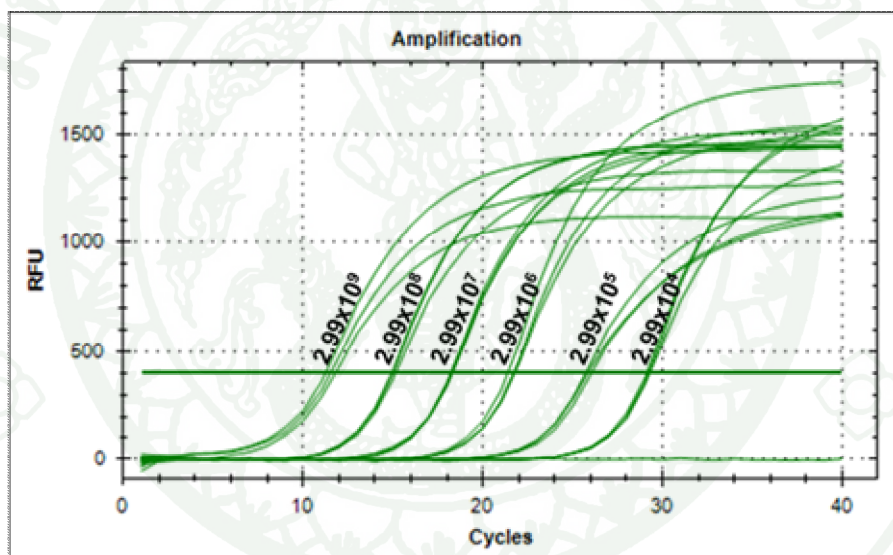
เพื่อการพัฒนาเทคนิค qPCR สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ miR-155 และ miR-181 ในสุกร จากนั้นทดสอบหาความจำเพาะของไพรเมอร์โดยใช้อาร์เอ็นเอที่แยกจากเม็ดเลือดขาวสุกรมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ก่อนนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้โคลนใส่ในเวกเตอร์ pGEM-T easy ยีนย่นลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ที่โคลนเข้าเวกเตอร์ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าลำดับเบสที่แยกได้เหมือนกัน 100% หลังจากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานจากการทำ ten-fold serial dilution ด้วยค่า quantification cycle (Cq) มาพล็อตเป็นกราฟเส้น ได้กราฟมาตรฐานของ pGEM-T miR-155 (ภาพที่ 22) มีค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.996, ค่าความชันของกราฟ (slope) เท่ากับ -4.14 และค่า amplification efficiency (E) เท่ากับ 74.2% (ภาพที่ 23) และได้กราฟมาตรฐานของ pGEM-T miR-181 (ภาพที่ 24) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.998, ค่า slope เท่ากับ -3.55 และค่า E เท่ากับ 91.2% (ภาพที่ 25)



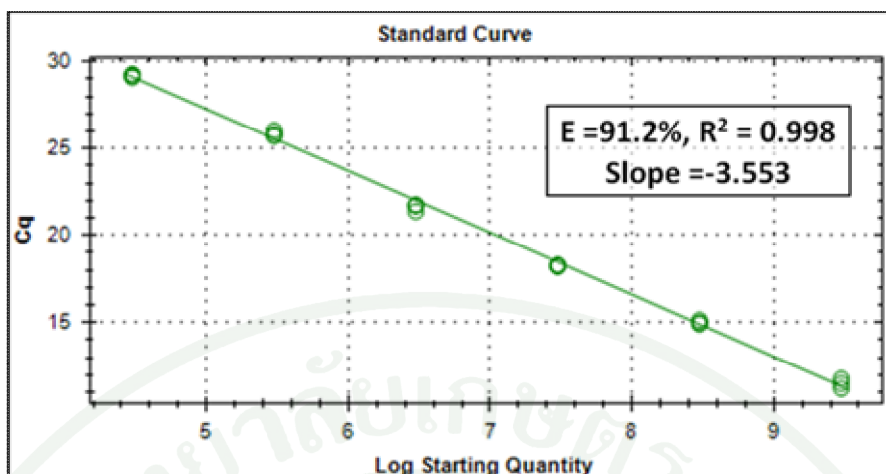
ภาพที่ 22 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-155 (amplification graph) ด้วย ten-fold serial dilution จำนวนพลาสมิด 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4 copy number



ภาพที่ 23 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-155 ค่า R^2 เท่ากับ 0.996

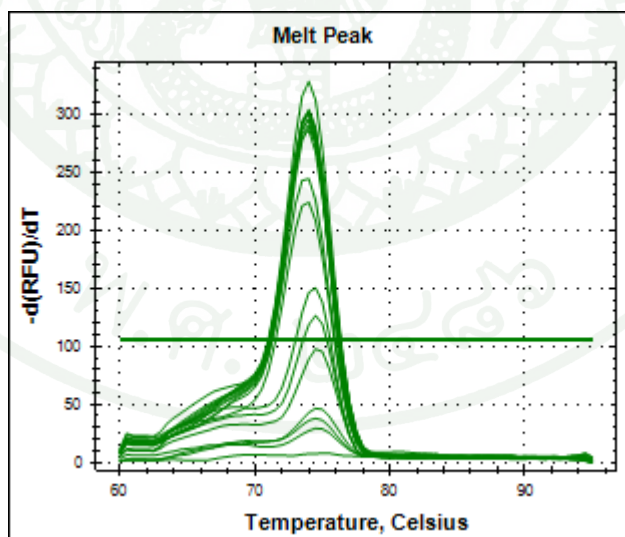


ภาพที่ 24 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-181 (amplification graph) ด้วย ten-fold serial dilution จำนวนพลาสมิด 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4 copy number

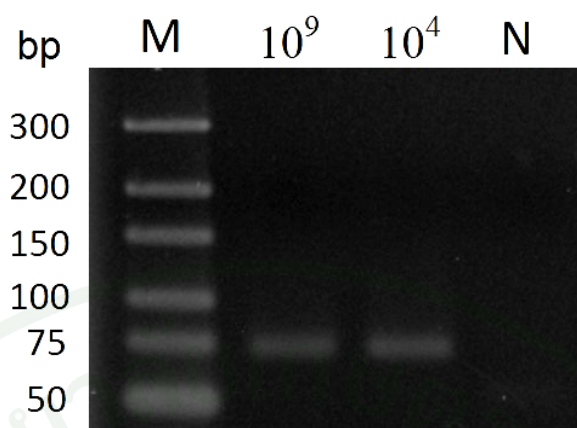


ภาพที่ 25 แสดงกราฟมาตรฐานของ pGEM-miR-181 ค่า R^2 เท่ากับ 0.998

เพื่อทดสอบความจำเพาะของวิธี qPCR ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ด้วยการหา melting curve analysis พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของ pGEM-miR-155 มี melt curve อยู่ที่ 74°C 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 26) คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ของ miR-155 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีพลาสติกปริมาณมากที่สุดและน้อยที่สุด 2.99×10^8 และ 2.99×10^4 ไปทดสอบผ่าน 5% NuSieve gel พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะขนาด 72 bp ซึ่งเป็นขนาดของ miR-155 (ภาพที่ 27)

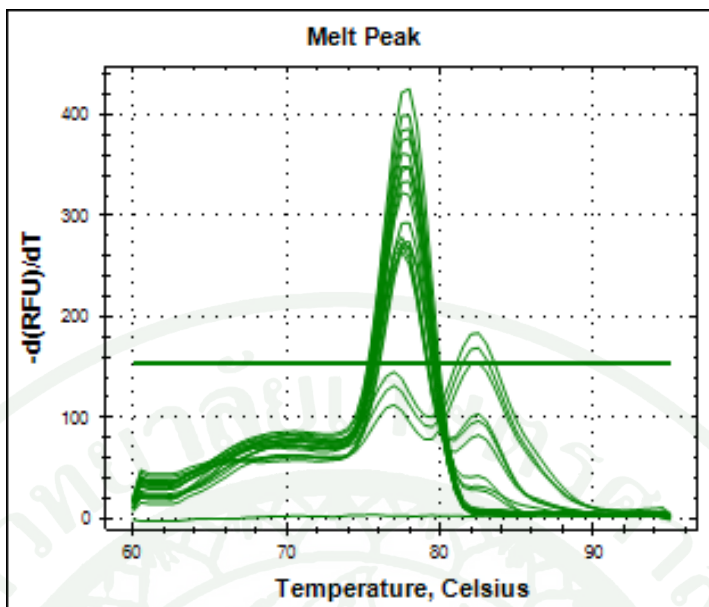


ภาพที่ 26 แสดง Melt Peak ของ miR-155 มีค่า T_m เท่ากับ 74°C

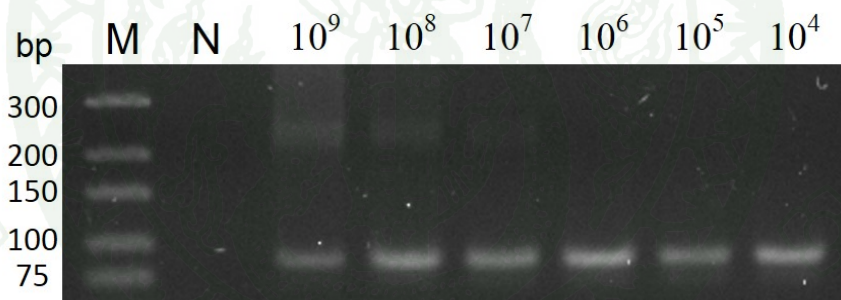


ภาพที่ 27 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บน 5% Nuseive gel ที่ได้จากการพัฒนาเทคนิคตรวจวัดการ
แสดงออกของ miR-155 (M = marker และ N = negative control)

ขณะที่ผลของ pGEM-miR-181 มี melt curve อยู่ที่ 78°C และมี melt peak ที่ไม่จำเพาะที่อุณหภูมิ 82°C ในตัวอย่างที่ความเข้มข้นสูง (2.99×10^9 , 2.99×10^8 และ 2.99×10^7) (ภาพที่ 28) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทดสอบผ่าน 5% NuSieve gel พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 85 bp ในทุกความเข้มข้น และเกิดรอยสเมียร์ยาวที่ขนาดประมาณ 200-300 bp ในกลุ่มที่ใช้พลาสติกปริมาณมาก 2.99×10^9 , 2.99×10^8 และ 2.99×10^7 ตามลำดับ (ภาพที่ 29) การพบผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะใน melt curve และบนเจลในกลุ่มที่ใช้พลาสติกปริมาณมาก อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ไปจับกับสายของ DNA ในบริเวณอื่น ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนที่มากเกินไป อย่างไรก็ตามในการวัดระดับ miR-181 ในตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกรพบว่าระดับ template ที่นำมาใช้มีปริมาณต่ำกว่าระดับพลาสติกที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานนี้มาก โดยอยู่ที่ระดับ 2.99×10^4 จึงไม่พบปัญหาลักษณะแบบที่ไม่จำเพาะดังกล่าว จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค qPCR ที่พัฒนาขึ้นใหม่นั้นสามารถนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ได้



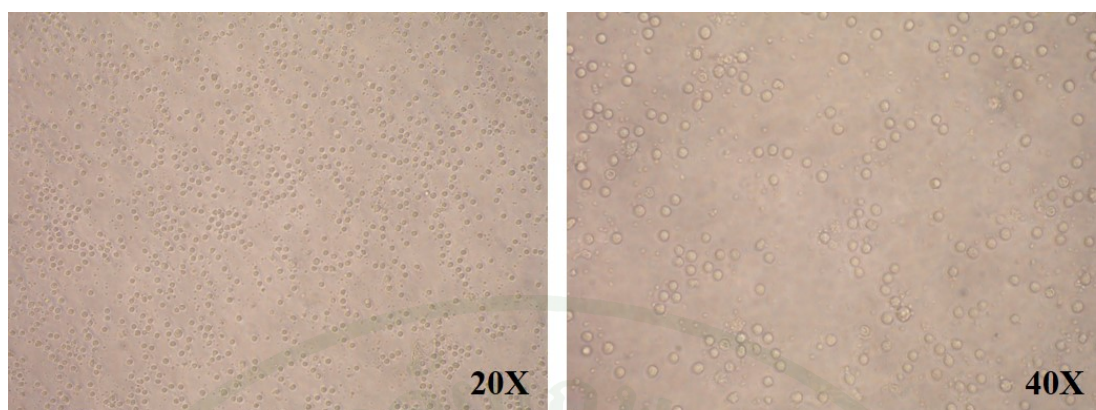
ภาพที่ 28 แสดง Melt Peak ของ miR-181 มีค่า T_m เท่ากับ 78°C



ภาพที่ 29 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บน 5% Nuseive gel ที่ได้จากการพัฒนาเทคนิคตรวจวัดการ แสดงออกของ miR-181 (M = marker 10 bp, N = negative control และ ten-fold serial dilution ของ pGEM-miR181 ตั้งแต่ 2.99×10^9 ถึง 2.99×10^4)

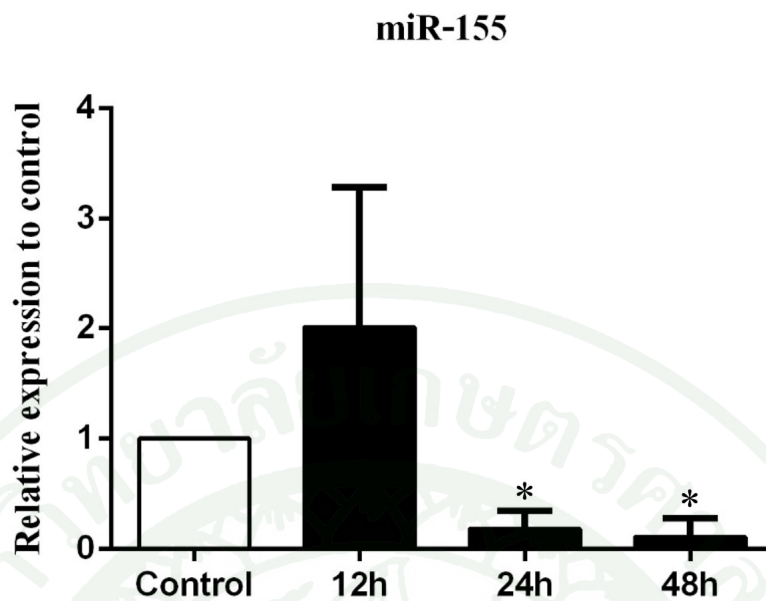
6. การแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย con A

นำเลือดของสุกรสุขภาพดีจำนวน 3 ตัว มาสกัดเม็ดเลือดขาวสุกร (PBMC) ด้วย ficoll นำไปเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม เลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI คุณภาพเซลล์ เม็ดเลือดขาวที่สกัดได้โดยนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวมีทรงกลม แต่ละเซลล์มีขนาดเท่าๆกัน ดังภาพที่ 30

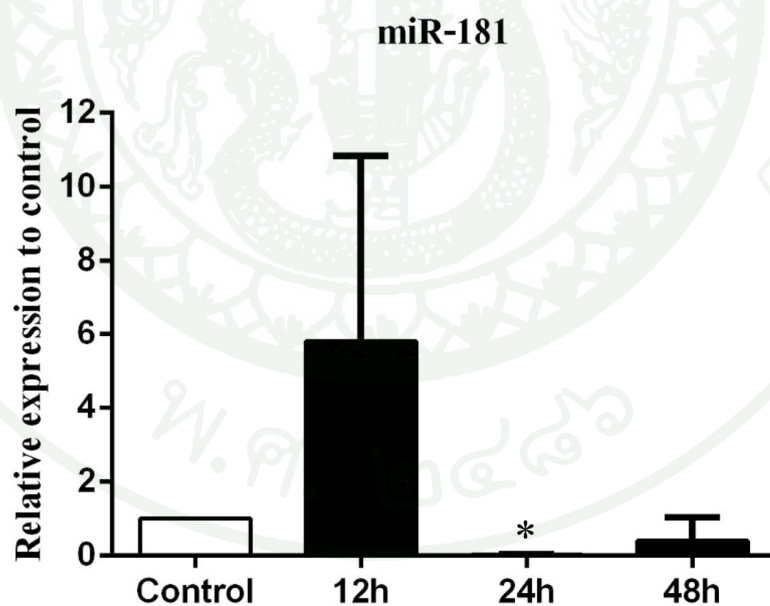


ภาพที่ 30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของสุกรที่สกัดด้วย ficoll ที่กำลังขยาย 20X (ซ้าย) และ 40X (ขวา) ตามลำดับ

จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร con A เก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวมาศึกษาการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ด้วยเทคนิค qPCR ที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า miR-155 และ miR-181 ในเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย con A มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยระดับของ miR-155 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น 2 เท่าภายใน 12 ชั่วโมงแรกหลังได้รับการกระตุ้น และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คิดเป็น 0.18 เท่า และ 0.11 เท่าในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ตามลำดับ (ภาพที่ 31) ขณะที่ระดับของ miR-181 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น 5.8 เท่าภายใน 12 ชั่วโมงแรก แล้วลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คิดเป็น 0.02 เท่าในชั่วโมงที่ 24 และลดลง 0.40 เท่าในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 32) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 จึงสันนิษฐานได้ว่า miR-155 และ miR-181 อาจมีบทบาทควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร



ภาพที่ 31 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของ miR-155 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับการกระตุ้นด้วย con A เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม (* $p < 0.05$)



ภาพที่ 32 กราฟแท่งแสดงระดับการแสดงออกของ miR-181 ใน PBMC ของสุกรที่ได้รับการกระตุ้นด้วย con A เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม (* $p < 0.05$)

วิจารณ์

ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีน โดยการยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Baltimore *et al.*, 2008; Lindsay, 2008) ไมโครอาร์เอ็นเอหลายชนิดมีความเกี่ยวข้องกับพัฒนาการและการทำงานของเซลล์ในร่างกาย และยังมีบทบาทควบคุมระบบภูมิคุ้มกันให้เป็นไปอย่างสมดุล (Baltimore *et al.*, 2008; Lindsay, 2008) เช่น miR-17-92, miR-146, miR-155 และ miR-181 (Lindsay, 2008) ซึ่งพบว่าการศึกษาลักษณะและหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอส่วนใหญ่พบรายงานในคนและหนู ขณะที่การรายงานในสุกรมีข้อมูลอยู่ค่อนข้างจำกัด ในรายงานฉบับนี้จึงให้ความสนใจในการศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอของสุกร โดยเฉพาะ miR-155, miR-181 และความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันในสุกร

ในการศึกษานี้ได้ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของไมโครอาร์เอ็นเอด้วยโปรแกรม RNAfold ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ใช้การวิเคราะห์ทำนายโครงสร้างจากค่า minimum free energy และการจับกันของกลุ่มเบสซึ่งมีค่าเฉลี่ยความถูกต้องของการจับกันของกลุ่มเบสอยู่ที่ 50-70 % (Eddy, 2004) จากการนำลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ สุกร (*Sus scrofa*), คน (*Homo sapiens*), หนู mouse (*Mus musculus*), หนู rat (*Rattus norvegicus*), ไก่ (*Gallus gallus*) และปลา (*Danio rerio*) มาทำนายโครงสร้างและทำการเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรมีรูปร่างคล้ายปิ่นปักผม มี terminal loop 1 ตำแหน่ง ซึ่งตรงตามที่ Zhang *et al.* (2010) รายงานว่าโครงสร้างของ pre-miRNA มีอยู่ 2 รูปแบบ แบบที่หนึ่งเป็นโครงสร้าง hairpin ที่มี terminal loop 1 ตำแหน่ง และแบบที่สองเป็นโครงสร้าง hairpin loop ที่มี terminal loop หลายตำแหน่ง จากการทดสอบ pre-miRNA ทั้ง 2729 ชนิด พบว่าโครงสร้างโดยส่วนมากจะมีลักษณะตามแบบที่หนึ่ง คือ พบ terminal loop 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 94.1% แตกต่างจากโครงสร้างของ rRNAs, tRNA, และ mRNAs ที่พบโครงสร้างในรูปแบบที่สองมากกว่า (Zhang *et al.*, 2010) และโครงสร้าง pre-miRNA ของสุกรยังมีลักษณะคล้ายกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเมื่อนำมาเปรียบเทียบโครงสร้าง pre-miRNA อีกทั้งลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดยังมีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 90% โดยเฉพาะบริเวณ seed region ที่มีลำดับเบสเหมือนกันถึง 100 % ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกันกับการศึกษาของ Reddy *et al.* (2009) ที่รายงานว่าไมโครอาร์เอ็นเอแต่ละชนิดของสุกร เช่น ssc-miR-17, ssc-miR-20, ssc-miR-29a, ssc-miR-181 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ได้แก่

กอริลลา (*Gorilla gorilla*) , ชิมแปนซี (*Pan troglodytes*), ลิงวอก (*Macaca mulatta*), ปลาปักเป้า (*Fugu rubripes*), โด (*Bos Taurus*), กบ (*Xenopus tropicalis*) และสุนัข (*Canis familiaris*)

หลังจากการวิเคราะห์โครงสร้างและลำดับเบสได้ศึกษาทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ซึ่งยีนเป้าหมายจะมีลำดับเบสเข้าคู่อย่างจำเพาะกับบริเวณ seed region ของไมโครอาร์เอ็นเอ ในการศึกษาทำนายยีนโดยใช้โปรแกรมทำนายยีน 3 โปรแกรม ได้แก่ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar โดยใช้หลักการทำนายยีนจากการเข้าคู่กันของ seed region แบบ 7mer หรือ 6mer ที่มี G:U wobble 1 ตำแหน่ง (Witkos *et al.*, 2011; Peterson, 2014) การทำนายยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอโดยใช้โปรแกรมที่หลากหลายเพื่อประโยชน์ในด้านการลดข้อจำกัดหรือจุดด้อยบางประการของแต่ละโปรแกรม โดยทำการชดเชยจุดด้อยนั้นด้วยจุดเด่นของโปรแกรมอื่นที่นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน (Witkos *et al.*, 2011; Peterson, 2014) ดังเช่นการศึกษาของ Sethupathy *et al* (2006) รายงานว่าการทำนายยีนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์หลายโปรแกรมร่วมกัน ทำให้ได้ผลการทำนายที่มีค่าความไวของการทดสอบ (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่สูงขึ้น โปรแกรมทำนายยีนที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 3 โปรแกรม ได้แก่ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar มีหลักการวิเคราะห์และจุดเด่นที่แตกต่างกันดังนี้ โปรแกรม PicTar เป็นโปรแกรมที่ใช้หลักการการเข้าคู่กันของไมโครอาร์เอ็นเอและบริเวณ 3' UTR ของยีนเป้าหมาย โดยทำการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลร่วมจากฐานข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้อง (Krek *et al.*, 2005; Witkos *et al.*, 2011) ปัจจุบัน โปรแกรม PicTar ได้รับการพัฒนาให้สามารถทำนายยีนได้โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันในสิ่งมีชีวิตหลายสายพันธุ์เพื่อหาบริเวณที่เข้าคู่กันของยีนเป้าหมายและ seed region โดยใช้ฐานข้อมูล doRiNA (Ander *et al.*, 2012) สำหรับ DIANA-micro T เป็นโปรแกรมที่ยินยอมให้ผลทำนายยีนที่มีรูปแบบจับกันแบบไม่เข้าคู่กัน (wobble pairing) เช่น G:U (Kiriakidou *et al.*, 2004) ทำให้ผลการจับกันของ miRNA: mRNA ที่ได้มีค่า affinity หลายระดับ ตั้งแต่ค่าต่ำสุดจนถึงค่าสูงที่สุด (Lim *et al.*, 2003) และท้ายสุด โปรแกรม miRmap ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ จึงทำให้ไม่มีข้อมูลรายงานมากพอที่จะนำมาเทียบกับโปรแกรมอื่นที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ได้

ยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรที่ทำนายจากโปรแกรม DIANA-micro T, miRmap และ PicTar ได้รับการตรวจสอบกลไกการทำหน้าที่ด้วยโปรแกรม KEGG pathway แล้วทำการคัดเลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และถูกทำนายได้จากสอง โปรแกรมขึ้นไป พบว่ายีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 ที่ถูกทำนายได้บางยีนมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ยีน *BACH1*, *SOCS1* และ *FOXP1* ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งเป็นผลสอดคล้องกับรายงานพบการยับยั้งการแสดงออกของ miR-155 มีผลไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *BACH1*

ทำให้ลดการเจริญและลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไต (Li *et al.*, 2012) นอกจากนี้ miR-155 ยังมีหน้าที่สนับสนุนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส hepatitis B (HBV) ผ่าน JAK/STAT pathway โดยลดการแสดงออกของยีน *SOCS1* ทำให้อินเตอร์เฟอรอนซึ่งเป็นสารที่ใช้ควบคุมการติดเชื้อไวรัสมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (Su *et al.*, 2011) และยีน *FOXP1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของ miR-181 ที่มีรายงานพบค่าการแสดงออกของ miR-181 ว่ามีความสัมพันธ์กับเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด B cell (DLBCL lymphoma) ซึ่งมีบทบาทช่วยในการทำนายโรคเพื่อวิเคราะห์แนวทางการรักษาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น (Alencar *et al.*, 2011) อีกทั้ง miR-181 มีบทบาทควบคุมการติดเชื้อไวรัส PRRS โดยมีกลไกเข้าจับกับจีโนมของไวรัสบริเวณ ORF4 และลดการตอบสนองของตัวรับ CD163 บนโมโนไซต์และ porcine alveolar macrophages (PAMs) (Gao *et al.*, 2013) นอกจากนี้ miR-181 ยังมีหน้าที่กระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อต้านไวรัส PRRS พบว่า miR-181 มีการแสดงออกปริมาณสูงในมาโครฟาจและโมโนไซต์ในเยื่อช่องท้อง ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไวต่อการติดเชื้อไวรัส PRRS (Guo *et al.*, 2013) จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไมโครอาร์เอ็นเอมีบทบาทควบคุมการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนของไวรัสในโฮสต์

การศึกษาระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเนื้อเยื่อและเซลล์ของสุกร พบระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่นำมาทดสอบ จากผลการแสดงออกในเบื้องต้นคาดว่า miR-155 และ miR-181 น่าจะมีบทบาทควบคุมการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อสุกรที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2013) ที่รายงานว่า miR-155 มีการแสดงออกปริมาณมากในเนื้อเยื่อ้าม, ไขมัน และกล้ามเนื้อ แต่ในเนื้อเยื่อหัวใจกลับมีการแสดงออกที่ลดลง และจากรายงานของ Guo *et al.* (2013) พบว่า miR-181 มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำในเนื้อเยื่อปอด, ต่อมน้ำเหลือง และ้าม และพบปริมาณไวรัส PRRS จำนวนมากในเนื้อเยื่อเหล่านี้ ขณะที่ในเนื้อเยื่อไต, สมอง และกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่เป้าหมายของไวรัส PRRS กลับพบการแสดงออกของ miR-181 ที่สูงกว่า และมีการแสดงออกของ miR-181 ในต่อมไทมัสสูงกว่าในเนื้อเยื่อตับและหัวใจ (Reddy *et al.*, 2009)

การศึกษากครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค qPCR สำหรับใช้ตรวจสอบการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ได้รับการกระตุ้นด้วย con A โดยใช้การติดฉลากด้วย SYBR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และใช้ศึกษาแสดงออกของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิค qPCR ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่มีการตรวจสอบความแม่นยำโดยการทำ

การวิเคราะห์ melting curve และทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ในเจล ซึ่งผลที่ได้พบว่าเทคนิคนี้สามารถให้ผลแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะและชัดเจนดี และจึงนำเทคนิค qPCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ศึกษาการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย con A เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นจะมีผลให้ระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 เปลี่ยนแปลงไป โดยระดับของ miR-155 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น 2 เท่าภายใน 12 ชั่วโมงแรก และลดลงอย่างมีนัยสำคัญคิดเป็น 0.18 เท่า และ 0.11 เท่าในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ดังภาพที่ 29 ขณะที่ระดับของ miR-181 มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น 5.8 เท่าที่ 12 ชั่วโมงแล้วลดลงอย่างมีนัยสำคัญคิดเป็น 0.02 เท่า ภายใน 24 ชั่วโมง แต่กลับมาเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อยใน 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 30 จากผลการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดในเบื้องต้นสันนิษฐานได้ว่า miR-155 และ miR-181 น่าจะมีบทบาทควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดขาวสุกร ซึ่งมีผลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ *Nantakhruea et al* (2013) ที่ทำการกระตุ้นเซลล์ PBMC ด้วย con A เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงพบว่า miR-29a มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่อินเตอร์เฟอรอนแกมมามีการแสดงออกที่สูงขึ้นทั้งที่ 12 และ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการแสดงออกของ miR-155 ในเซลล์ PBMC ที่ถูกกระตุ้นด้วย con A และทดสอบในผิวหนังคนที่ได้รับ superantigen (สารกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด T cell) และ allergen (สารก่อภูมิแพ้) พบว่า miR-155 มีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (Sonkoly *et al.*, 2010)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ไมโครอาร์เอ็นเอ คือ อาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน เป้าหมาย มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำงานของเนื้อเยื่อและเซลล์ต่างๆในสิ่งมีชีวิต การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษา miR-155, miR-181 ในสุกร โดยเริ่มจากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของไมโครอาร์เอ็นเอ ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิและเปรียบเทียบลำดับเบสของ miR-155 และ miR-181 ของสุกรกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ คน, หนู mouse, หนู rat, ไก่ และปลา ผลการศึกษาพบโครงสร้างของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 ที่มีลักษณะคล้ายปิ่นปักผม หรือ hairpin loop และมีลำดับเบสของ pre-miRNA ที่คล้ายกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยเฉพาะบริเวณ seed region ของ ssc-miR-155 และ ssc-miR-181 มีลำดับเบสเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำนายยีนเป้าหมายของ miR-155 และ miR-181 โดยใช้โปรแกรมทำนายยีน 3 โปรแกรม ได้แก่ DIANA-micro T, miRmap และ PicTar แล้วนำยีนเป้าหมายที่ได้ไปตรวจสอบกลไกการทำหน้าที่ด้วยโปรแกรม KEGG pathway และคัดเลือกยีนเป้าหมายที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้ยีนเป้าหมายของ miR-155 คือ *BACH1*, *SOCS1* และ *MAP3K14* ยีนเป้าหมายของ miR-181 คือ *DDX3X*, *NFAT5* และ *FOXP1* โดยมี *MPP5* เป็นยีนเป้าหมายร่วมของทั้ง miR-155 และ miR-181 จากนั้นนำยีนเป้าหมายทั้ง 7 ยีนมาทดสอบการเข้าสู่ของลำดับเบสกับ seed region ของ ss-miR-155 และ ssc-miR-181 พบว่าลำดับเบสบริเวณ seed region ของไมโครอาร์เอ็นเอทั้งสองชนิดสามารถเข้าคู่กันกับยีนเป้าหมายทั้ง 7 ยีนของสุกรได้ ยกเว้นการเข้าคู่กันของ ssc-miR-155 กับยีน *BACH1* และ *MPP5* ที่เกิด mismatch เพียง 1 ตำแหน่ง หลังจากทำการศึกษาไมโครอาร์เอ็นเอด้วยวิธีทางคอมพิวเตอร์แล้วต่อมาจึงทดสอบหาระดับการแสดงออกในเนื้อเยื่อและเซลล์สุกร พบว่า miR-181 มีการแสดงออกเท่ากันในทุกตัวอย่าง (ม้าม, กล้ามเนื้อ, PBMC และ PK15) ขณะที่ miR-155 มีการแสดงออกใน PBMC และ PK15 มากกว่าในม้ามและกล้ามเนื้อ การศึกษาครั้งนี้ยังได้พัฒนาเทคนิค qPCR เพื่อใช้ตรวจวัดระดับการแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 ในเซลล์ PBMC ของสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วย con A ผลการศึกษาพบว่าเมื่อ PBMC ได้รับการกระตุ้นด้วย con A ทำให้การแสดงออกของ miR-155 และ miR-181 เปลี่ยนแปลงไป จากข้อมูลเบื้องต้นจึงสันนิษฐานได้ว่า miR-155 และ miR-181 น่าจะมีบทบาทควบคุมระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในเซลล์สุกรเช่นเดียวกับที่มีรายงานในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับสมมติฐานที่ว่า miR-155 และ miR-181 มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และมีระดับการ

แสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเซลล์ PBMC ถูกกระตุ้นด้วย con A ทำยที่สุดนี้ผลจากการศึกษาเบื้องต้นที่ได้สามารถนำข้อมูลไปเป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับหน้าที่และกลไกการทำงานของ miR-155 และ miR-181 ในสุกรต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

เพื่อความเข้าใจในบทบาทหน้าที่ของ miR-155 และ miR-181 ในระบบภูมิคุ้มกันของสุกรให้ดียิ่งขึ้น ควรทำการศึกษากการทำงานของไมโครอาร์เอ็นเอ เพื่อยืนยันผลการทำหน้าที่ของไมโครอาร์เอ็นเอในเซลล์หรือในสิ่งมีชีวิตว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องจริง โดยทำการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ทดสอบเซลล์ PBMC กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย con A โดยศึกษาในระดับของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นอินเตอร์เฟอรอน และอินเตอร์ลิวคิน หรือการศึกษาเกี่ยวกับยีนเป้าหมายของไมโครอาร์เอ็นเอแต่ละชนิด เช่น การทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยทำการยับยั้งหรือเพิ่มการแสดงออกของยีนนั้น แล้วศึกษาความสัมพันธ์ของระดับไมโครอาร์เอ็นเอที่ได้ ทำให้ทราบว่าไมโครอาร์เอ็นเอชนิดนั้นๆ จะมีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการทำหน้าที่ของยีนเป้าหมายนั้นอย่างไร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. ม.ป.ป. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยง
กระบือ สุกร รายภาคปีงบประมาณ 2555. แหล่งที่มา : [http://ict.dld.go.th/th2/index.php
/th/report/195-report-thailand-livestock/reportservey2555/588-animal2555-country](http://ict.dld.go.th/th2/index.php/th/report/195-report-thailand-livestock/reportservey2555/588-animal2555-country), 9
กรกฎาคม 2557.

สิทธิชัย ปัญญาใส. 2555. ไมโครอาร์เอ็นเอ: ชีววิทยาการสร้าง การทำหน้าที่และบทบาทสำคัญ
ในกระบวนการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง. **J Med Tech Phy Ther** 24: 235-243.

Alencar, A.J., R. Malumbres, G.A. Kozloski, R. Advani, N. Talreja, S. Chinichian, J. Briones,
Y. Natkunam, L.H. Sehn, R.D. Gascoyne, R. Tibshirani and I.S. Lossos. 2011.
MicroRNAs Are Independent Predictors of Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma
Patients Treated with R-Chop. **Clin Cancer Res** 17: 4125-4135.

Anders, G., S. Mackowiak, M. Jens, J. Maaskola, A. Kuntzagk, N. Rajewsky, M. Landthaler
and C. Dieterich. doRiNa: A Database of RNA Interactions in Posttranscriptional
Regulation. 2012. **Nucleic Acids Res** 40: 180-186.

Baltimore, D., M.P. Boldn, R.M. O'Connell, D.S. Rao and K.D. Taganov. 2008. MicroRNAs:
New Regulators of Immune Cell Development and Function. **Nat Immunol** 9: 839-
845.

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell** 136: 215-
233.

Barts and The London School of Medicine and Dentistry. 2012. **Cognitive Deficit Research.**
Avaliable Source: [http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2012/08/cognitive-
deficit-research.html](http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2012/08/cognitive-deficit-research.html), July 15, 2014.

- Ceppi, M., P.M. Pereira, I. Dunand-Sauthier, E. Barras, W. Reith, M.A. Santos and P. Pierre. 2009. MicroRNA-155 Modulates the Interleukin-1 Signaling Pathway in Activated Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 106: 2735-2740.
- Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, D.P. Bartel. 2004. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. **Science** 303: 83-86.
- Eddy, S.R. 2004. How Do Rna Folding Algorithms Work. **Nat Biotechnol** 22: 1457-1458.
- Gao, L., X.K. Guo, L. Wang, Q. Zhang, N. Li, X.X. Chen, Y. Wang and W.H. Feng. 2013. MicroRNA 181 Suppresses Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection by Targeting PRRSV Receptor CD163. **J Virol** 87: 1-5.
- Griffiths-Jone S., R.J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, A.J. Enright. 2006. Mirbase: MicroRNA Sequences, Targets and Gene Nomenclature. **Nucleic Acids Res** 34: 140-144.
- Guo, X.K., Q. Zhang, L. Gao, N. Li, X.X. Chen and W.H. Feng. 2013. Increasing Expression of Mir-181 Inhibits Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication and Has Implications for Controlling Virus Infection. **J Virol** 87: 1159-1171.
- Haafte, G.V. and R. Agami. 2010. Tumorigenicity of the Mir-17-92 Cluster Distilled. **Genes & Dev** 24: 1-4.
- Hoebe, K., E. Janssen and B. Beutler. 2004. The Interface between Innate and Adaptive Immunity. **Nat Immunol** 5: 971-974.
- Johnnidis, J.B., H.M. Harris, R.T. Wheeler, S.S. Sun, M.H. Lam, O. Kirak, T.R. Brummelkamp, M.D. Fleming and F.D. Camargo. 2008. Regulation of Progenitor Cell Proliferation and Granulocyte Function by MicroRNA-223. **Nature** 451: 1125-1129.

- Katyal, R.K., D. Sachanandani, C. Pinney and M.M. Lieberman. 1998. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. **Clin Diagn Lab Immunol** 5:78-81.
- Kiriakidou, M., P.T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos and A. Hatzigeorgiou. 2004. A Combined Computational-Experimental Approach Predicts Human MicroRNA Targets. **Genes Dev** 18: 1165-1178.
- Krek, A., D. Grun, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, da P. I, K.C. Gunsalus, M. Stoffel and N. Rajewsky. 2005. Combinatorial MicroRNA Target Predictions. **Nat Genet** 37: 495-500.
- Lawrie, C.H. 2007. MicroRNAs and Haematology: Small Molecules, Big Function. **BJH** 137: 503-512.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum and V. Ambros. 1993. The *C. Elegans* Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small Rnas with Antisense Complementarity to Lin-14. **Cell** 75 (5): 843-854.
- Lewis, B.P., C.B. Burge and D.P. Bartel. 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. **Cell** 120: 15-20.
- Li, C., H. He, M. Zhu, S. Zhao and X. Li. 2013. Molecular Characterisation of Porcine Mir-155 and Its Regulatory Roles in the TLR3/TLR4 Pathways. **Dev Comp Immunol** 39: 110-116.
- Li, Q.J., J. Chau, P.J.R. Ebert, G. Sylvester, H. Min, G. Liu, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, P. Skare, L.O. Klein, M.M. Davis and C.Z. Chen. 2007. Mir-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. **Cell** 129: 147-161.

Li, S., T. Chen, Z. Zhong, Y. Wang, Y. Li and X. Zhao. 2012. MicroRNA-155 Silencing Inhibits Proliferation and Migration and Induces Apoptosis by Upregulating BACH1 in Renal Cancer Cells. **Mol Med Rep** 5: 949-954.

Lim, L.P., N.C. Lau, E.G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M.W. Rhoades, C.B. Burge and D.P. Bartel. 2003. The MicroRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes & Dev** 17: 991-1008.

Lindsay, M.A. 2008. MicroRNAs and the Immune Response. **Trends Immunol** 29: 343-351.

Lu, L.F. and A. Liston. 2009. MicroRNA in the Immune System, MicroRNA as an Immune System. **Immunology** 127: 291-298.

Ma, F., S. Xu, X. Liu, Q. Zhang, X. Xu, M. Liu, M. Hua, N. Li, H. Yao and X. Cao. 2011. The MicroRNA Mir-29 Controls Innate and Adaptive Immune Responses to Intracellular Bacterial Infection by Targeting Interferon- γ . **Nat Immunol** 12: 861-869.

Nantakhruea, S., P. Lekcharoensuk and W. Surachetpong. 2013. Analysis of Mirna-29a Expression in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. **Thai J Vet Med** 43: 595-600.

Pasquinelli, A.E., B.J. Reinhart, F. Slack, M.Q. Martindale, M.I. Kuroda, B. Maller, D.C. Hayward, E.E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun. 2000. Conservation of the Sequence and Temporal Expression of let-7 Heterochronic Regulatory Rna. **Nature** 408: 86-89.

Peterson, S.M., J.A. Thompson, M.L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw and C.B. Congdon. 2014. Common Features of MicroRNA Target Prediction Tools. **Front Genet** 5: 1-10.

- Reddy, A.M., Y. Zheng, G. Jagadeeswaran, S.L. Macmil, W.B. Graham, B.A. Roe, U. Desilva, W. Zhang and R. Sunkar. 2009. Cloning, Characterization and Expression Analysis of Porcine Micornas. **Bmc Genomics** 10: 1-15.
- Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S.V. Dongen, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetric, K. Okkenhaug, A.J. Enright, G. Dougan, M. Turner and A. Bradley. 2007. Requirement of Bic/Microrna-155 for Normal Immune Function. **Science** 316: 608–611.
- Rusca, N., S. Monticelli. 2011. Mir-146a in Immunity and Disease. **Mol Biol Int** 2011: 1-7.
- Schulte, L.N., A.J. Westermann and J. Vogel. 2013. Differential Activation and Functional Specialization of Mir-146 and Mir-155 in Innate Immune Sensing. **Nucleic Acids Res** 41: 542-553.
- Sethupathy, P., B. Corda and A.G. Hatzigeorgiou. 2006. TarBase: A Comprehensive Database of Experimentally Supported Animal MicroRNA Targets. **RNA** 12: 192-197.
- Shabalina, S.A., E.V. Koonin. 2008. Origins and Evolution of Eukaryotic Rna Interference. **Trends Ecol Evol** 23: 578-587.
- Sonkoly, E., P. Janson, M.L. Majuric, T. Savinkoc, N. Fyhrquisc, L. Eidsmo, N. Xu, F. Meisgena, T. Wei, M. Bradley, J. Stenvang, S. Kauppinen, H. Alenius, A. Lauerma, B. Homey, O. Winqvist, M. Stahle and A. Pivarcsi. 2010. Mir-155 Is Overexpressed in Patients with Atopic Dermatitis and Modulates T-Cell Proliferative Responses by Targeting Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. **J Allergy Clin Immunol** 126: 581-589.
- Su, C., Z. Hou, C. Zhang, Z. Tian and J. Zhang. 2011. Ectopic Expression of Microrna-155 Enhances Innate Antiviral Immunity Against Hbv Infection in Human Hepatoma Cells. **Virology** 438: 1-11.

- Suradhat, S., R. Thanawongnuwech and Y. Poovorawan. 2003. Upregulation of IL-10 Gene Expression in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. **J Gen Virol** 84: 453-459.
- Taganov, K.D., M.P. Boldin, K.J. Chang, D. Baltimore. 2006. Nf-Kappab-Dependent Induction of MicroRNA Mir-146, an Inhibitor Targeted to Signaling Proteins of Innate Immune Responses. **Proc Natl Acad Sci USA** 103: 12481-12486.
- Tam, W. 2001. Identification and Characterization of Human Bic, a Gene on Chromosome 21 That Encodes a Noncoding Rna. **Gene** 274: 157-167.
- Tang, B., B. Xiao, Z. Liu, N. Li, E.D. Zhu, B.S. Li, Q.H. Xie, Y. Zhuang, Q.M. Zou and X.H. Mao. 2010. Identification of MyD88 as a Novel Target of Mir-155, Involved in Negative Regulation of Helicobacter Pylori-Induced Inflammation. **Febs Lett** 584: 1481-1486.
- Tili, E., J.J. Michaille, A. Cimino, S. Costinean, C.D. Dumitru, B. Adair, M. Fabbri, H. Alder, C.G. Liu, G.A. Calin and C.M. Croce. 2007. Modulation of Mir-155 and Mir-125b Levels Following Lipopolysaccharide/Tnf-Alpha Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. **J Immunol** 179: 5082-5089.
- Tsitsiou, E., M.A. Lindsay. 2009. MicroRNAs and the Immune Response. **Curr Opin Pharmacol** 9: 514-520.
- Ventura, A., A.G. Young, M.M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S.J. Erkland, J. Newman, R.T. Bronson, D. Crowley, J.R. Stone, R. Jaenisch, P.A. Sharp and T. Jacks. 2008. Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the Mir-17-92 Family of Mirna Clusters. **Cell** 132: 875-886.

- Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C.Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M.Negrini, C.C. Harris, and C.M. Croce. 2006. A MicroRNA Expression Signature of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets. **Proc Natl Acad Sci USA** 103: 2257-2261.
- Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in *C. Elegans*. **Cell** 75: 855-862.
- Witkos, T.M., E. Koscianska and W.J. Krzyzosiak. 2011. Practical Aspects of MicroRNA Target Prediction. **Curr Mol Med** 11: 93-109.
- Xiao, C., L. Srinivasan, D.P. Calado, H.C. Patterson, B. Zhang, J. Wang, J.M. Henderson, J.L. Kutok, and K. Rajewsky. 2008. Lymphoproliferative Disease and Autoimmunity in Mice with Increased MiR-17-92 Expression in Lymphocytes. **Nat Immunol** 9: 405-414.
- Yadava, P. and S.K. Mukherjee. 2012. Artificial MicroRNA and Its Applications, pp. 508. *In* B. Mallick and Z. Ghosh, eds. **Regulatory RNAs: Basics, Methods and Applications**. ISBN: 978-3-642-22516-1.
- Zhang, X., X. Song and H. Wang. 2010. Characteristic Comparison between Two Types of MiRNA Precursors in Metazoan Species. **Biosystems** 100: 144-149.
- Zuker, M. 2003. Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction. **Nucleic Acids Res.** 31: 3406-3415.





ลำดับเบสของไมโครอาร์เอ็นเอ

ลำดับเบสของ pre-miR-155 (ตารางผนวกที่ ก1) และ pre-miR-181 (ตารางผนวกที่ ก2) ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 6 ชนิดที่นำมาใช้ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิ ประกอบด้วย สุนัข, คน, หนู mouse, หนู rat, ไก่ และปลา ข้อมูลลำดับเบสที่นำมาจากฐานข้อมูล miRBase

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงลำดับเบสของ pre-miR-155 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ชนิดของ สิ่งมีชีวิต	เลขทะเบียน	ลำดับเบส pre-miRNA-155
<i>Sus scrofa</i>	MI0015907	>ssc-mir-155 CUAUAUGCUGUUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGUUUUUACCUC CGUCUGACUCCUACAUGUUAGCAUUAACAGGGUAUGAUG
<i>Homo sapiens</i>	MI0000681	>hsa-mir-155 CUGUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUUUUGCCUCCAACUGA CUCCUACAUAUUAGCAUUAACAG
<i>Mus musculus</i>	MI0000177	>mmu-mir-155 CUGUUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGUUUUUUGCCUCUGACUGA CUCCUACCUGUUAGCAUUAACAG
<i>Rattus norvegicus</i>	MI0025509	>rno-mir-155 CUGUUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGUUUUUUGCCUCUGACUGA CUCCUACCUGUUAGCAUUAACAG
<i>Gallus gallus</i>	MI0001176	>gga-mir-155 UGUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUUUACCUCUGAAUGAC UCCUACAUGUUAGCAUUAACA
<i>Danio rerio</i>	MI0002023	>dre-mir-155 UGGUGCAGGUUUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUUUAGUGCUG AUGAACACCUAUGCUGUUAGCAUUAUCUUGCGCUA

ตารางผนวกที่ ๒ แสดงลำดับเบสของ pre-miR-181 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ชนิดของ สิ่งมีชีวิต	เลขทะเบียน	ลำดับเบส pre-miRNA-181
<i>Sus scrofa</i>	MI0010686	>ssc-mir-181a-1 GAGUUUAGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGU CGGUGAGUUUGGAAUUCAAAUCAAAACCAUCGACCGU UGAUUGUACCCUAUGGCCAACCAUCAGCUC
<i>Homo sapiens</i>	MI0000289	>hsa-mir-181a-1 UGAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUG UCGGUGAGUUUGGAAUUAUUUUUCAAAACCAUCGACCG UUGAUUGUACCCUAUGGCCAACCAUCAUCUACUCCA
<i>Mus musculus</i>	MI0000697	>mmu-mir-181a-1 GGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU UGGAAUUCAAAUAAAAACCAUCGACCGUUGAUUGUAC CCUAUAGCUAACC
<i>Rattus norvegicus</i>	MI0000953	>rno-mir-181a-1 AGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU UUGGAAUUCAAAUAAAAACCAUCGACCGUUGAUUGUA CCCUAUAGCUAACCAUUAUCUACUCC
<i>Gallus gallus</i>	MI0001218	>gga-mir-181a-1 UGUAGUGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGG UGAGUUUGGAAUUUAAGUGAAAACCAUCGACCGUUGA UUGUACCCUCCAGCUAACCAUCCUCCUCCU
<i>Danio rerio</i>	MI0001380	>dre-mir-181a-1 GUUUGCCUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU UGAGCUAAAUGGAAAAAACCAUCGACCGUUGAUUGU ACCCUGCGGC

ลำดับเบสของ mature miR-155 (ตารางผนวกที่ ก3) และ mature miR-181 (ตารางผนวกที่ ก4) สิ่งมีชีวิตทั้ง 6 ชนิดที่นำมาใช้เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส ประกอบด้วย สุกร, คน, หนู mouse, หนู rat, ไก่ และปลา ข้อมูลลำดับเบสที่ใช้นำมาจากฐานข้อมูล miRBase

ตารางผนวกที่ ก3 แสดงลำดับเบสของ mature miR-155 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	เลขทะเบียน	ลำดับเบส pre-miRNA-155
<i>Sus scrofa</i>	MIMAT0022959	>ssc-miR-155-5p UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGG
<i>Homo sapiens</i>	MIMAT0000646	>hsa-miR-155-5p UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU
<i>Mus musculus</i>	MIMAT0000165	>mmu-miR-155-5p UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU
<i>Rattus norvegicus</i>	MIMAT0030409	>rno-miR-155-5p UUAAUGC UAAUUGUGAUAGGGGU
<i>Gallus gallus</i>	MIMAT0001106	>gga-miR-155 UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG
<i>Danio rerio</i>	MIMAT0001851	>dre-miR-155 UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG

ตารางผนวกที่ ก4 แสดงลำดับเบสของ mature miR-181 ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	เลขทะเบียน	ลำดับเบส pre-miRNA-181
<i>Sus scrofa</i>	MIMAT0010191	>ssc-miR-181a AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU
<i>Homo sapiens</i>	MIMAT0000256	>hsa-miR-181a-5p AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
<i>Mus musculus</i>	MIMAT0000210	>mmu-miR-181a-5p AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
<i>Rattus norvegicus</i>	MIMAT0000858	>rno-miR-181a-5p AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
<i>Gallus gallus</i>	MIMAT0001168	>gga-miR-181a-5p AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
<i>Danio rerio</i>	MIMAT0001623	>dre-miR-181a-5p AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU



การเตรียมสารกำจัดเม็ดเลือดแดง

สารเคมีที่ใช้

(ปริมาตรสารละลายรวม 1,000 ml)

	ปริมาณ	ความเข้มข้น
1. NH_4Cl	8.29 g	155 mM
2. NaHCO_3	0.84 g	10 mM
3. EDTA (disodium salt)	0.037 g	0.1 mM
4. น้ำกลั่น	1,000 ml	
5. HCl และ NaOH (สำหรับปรับค่า pH)		

ขั้นตอน

1. ชั่งสารทั้งหมดตามสัดส่วนข้างต้น
2. เติมน้ำกลั่น 500 ml และสารทั้งหมดลงในขวด
3. ผสมน้ำกลั่นและสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลาย
4. วัดค่าความเป็นกรดด่าง (ค่า pH ที่ได้ประมาณ 7.4)
5. เติมน้ำกลั่น 500 ml ที่เหลือลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน
6. นิ่งมาเชื้อและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

● Basal RPMI

สารเคมีที่ใช้

(ปริมาตรสารละลายรวม 100 ml)

ปริมาตร

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. ผง RPMI | 1.64 g (16.4 g/ media 1,000 ml) |
| 2. NaHCO ₃ | 0.2 g (2 g/ media 1,000 ml) |
| 3. น้ำกลั่น | 100 ml |
| 4. HCl และ NaOH (สำหรับปรับค่า pH) | |

ขั้นตอน

1. ชั่งผง RPMI ตามสัดส่วนข้างต้น
2. เติมผง RPMI และน้ำกลั่น 50 ml ลงในขวด
3. ผสมผง RPMI และน้ำกลั่นให้เข้ากัน
4. ชั่ง NaHCO₃ 0.2 g แล้วเติมลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน
5. ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (ค่า pH ที่ได้ประมาณ 7.2)
6. เติมน้ำกลั่น 50 ml ที่เหลือลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน
7. นำ basal RPMI ที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรองที่มีรูขนาด 0.2 μm ลงในขวดใบใหม่
8. เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (ต่อ)

- **Complete RPMI**

สารเคมีที่ใช้

(ปริมาตรสารละลายรวม 100 ml)

ปริมาตร

- | | |
|-------------------------|--|
| 1. basal RPMI | 100 ml |
| 2. Heat inactivated FBS | 10 ml (10 ml/ media 100 ml) |
| 3. Gentamicin | 125 μ l (50 μ g/ media 100 ml) |
| 4. Penicillin | |
| 5. Streptomycin | |

ขั้นตอน

1. เติม heat inactivated FBS 10 ml ลงใน basal media 100 ml
2. เติม gentamicin, penicillin และ streptomycin ตามสัดส่วนข้างต้นแล้วผสมให้เข้ากัน
3. เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

การสกัดอาร์เอ็นเอ

สารเคมีที่ใช้

(ตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาด 50-100 mg)

	ปริมาณ
1. trizol	1,000 μ l
2. chloroform	200 μ l
3. isopropyl alcohol	ปริมาณเท่ากับส่วน aqueous phase ที่ไปเปิดได้
4. 75% ethanol	1,000 μ l
5. น้ำปราศจาก DNase และ RNase	20-50 μ l

ขั้นตอน

1. ตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 50-100 mg (ในงานวิจัยนี้ใช้เนื้อเยื่อขนาด 70 mg)
2. ใส่เนื้อเยื่อและเติม trizol 1,000 ml ลงในโกรงบดเนื้อเยื่อ
3. บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดเข้ากันกับ trizol
4. ไปเปิดน้ำเนื้อเยื่อมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที
5. เติม chloroform 200 μ l เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จนได้สารละลายสีชมพูเข้ม
6. บ่มที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที
7. ไปเปิดสารละลายส่วนในด้านบนหรือส่วน aqueous phase ลงไปใส่ในหลอดใหม่ (มักจะไปเปิดได้ประมาณ 700 μ l)
8. เติม isopropyl alcohol ปริมาณเท่ากับ aqueous phase ที่ไปเปิดได้ (ประมาณ 700 μ l) ลงในหลอด
9. ผสมสารละลายให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที
10. หลังจากการปั่นอาร์เอ็นเอจะเป็นผลึกใสติดอยู่ข้างหลอด ไปเปิดสารละลายใส่ทิ้งให้หมด ระวังอย่าให้โดนผลึกอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ (ต่อ)

ขั้นตอน (ต่อ)

11. เติม 75% ethanol 1,000 μ l เขย่าหลอดทดลองให้ผลึกอาร์เอ็นเอกระจายตัวออก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,200 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที
12. หลังจากการปั่นอาร์เอ็นเอจะเป็นผลึกใสติดอยู่ข้างหลอด ไปเปิดสารละลายใส่ทิ้งให้หมด ระวังอย่าให้โดนผลึกอาร์เอ็นเอ
13. เปิดฝาหลอดทดลองเพื่อให้ ethanol ที่เหลืออยู่ระเหยออกไปให้หมด
14. เติมน้ำปราศจาก DNase และ RNase ลงไป 20-50 μ l เพื่อให้เป็นตัวแทนทำลายอาร์เอ็นเอ (ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำ 20 μ l)
15. นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 30-60 นาที แล้วนำไปวัดปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop

การสังเคราะห์ cDNA

สารเคมีที่ใช้

(ใช้อาร์เอ็นเอตั้งต้น 500 ng ต่อ 1 ปฏิกริยา)

	ปริมาณ	
1. 50 pmol/ μ l oligo dT	1 μ l	} ปริมาตรรวม 13 ml
2. 10 mM dNTP	1 μ l	
3. อาร์เอ็นเอตั้งต้น 500 ng	จากการคำนวณ	
4. น้ำปราศจาก DNase และ RNase	จากการคำนวณ	
5. 5X-FS buffer	4 μ l	} ปริมาตรรวม 7 ml
6. 0.1 M DTT	1 μ l	
7. RNaseOUT	1 μ l	
8. Superscript III	1 μ l	

ขั้นตอน

- ตั้งอุณหภูมิของเครื่อง heat block 2 เครื่อง โดยเครื่องที่ 1 อุณหภูมิ 65°C และเครื่องที่ 2 อุณหภูมิ 50°C ควรตั้งค่าอุณหภูมิก่อนใช้งานจริง 15 นาที
- ไปเปิดปริมาณอาร์เอ็นเอตามที่ต้องการใช้ (500 ng) แล้วเติมน้ำปราศจาก DNase และ RNase ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 11 μ l ต่อ 1 ปฏิกริยา (1 ตัวอย่าง)
- เตรียม mastermix A โดยเติม oligo dT และ dNTP ตามสัดส่วนข้างต้น (เพิ่มปริมาตรตามจำนวนตัวอย่างที่ทำ) ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดทดลองตามจำนวนตัวอย่างที่ทำ หลอดละ 2 μ l
- บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มต่อในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที
- เตรียม mastermix B โดยเติม 5X-FS buffer, DTT, RNaseOUT และ Superscript III ตามสัดส่วนข้างต้น (เพิ่มปริมาตรตามจำนวนตัวอย่างที่ทำ) ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง ตัวอย่างละ 7 μ l
- บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 50 นาที แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 15 นาที
- บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที ก่อนเก็บ cDNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C

ปฏิกิริยา PCR

สารเคมีที่ใช้

(ปฏิกิริยารวม 20 μ l ต่อ 1 ปฏิกิริยา)

	ปริมาณ
1. 10X buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 μ l
2. 25 mM MgCl_2	1.6 μ l
3. 10 mM dNTP	0.4 μ l
4. 10 pmol forward primer	0.4 μ l
5. 10 pmol reverse primer	0.4 μ l
6. <i>Taq</i> polymerase	0.1 μ l
7. น้ำปราศจาก DNase และ RNase	13.1 μ l
8. cDNA	2 μ l

ขั้นตอน

- เตรียม mastermix โดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , dNTP, forward primer, reverse primer, *Taq* polymerase และน้ำปราศจาก DNase และ RNase ตามสัดส่วนข้างต้น (เพิ่มปริมาณตามจำนวนตัวอย่างที่ทำ) ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด PCR หลอดละ 18 μ l โดยเพิ่มหลอด negative control 1 ปฏิกิริยา
- เติม cDNA 2 μ l ลงไปในหลอด PCR แต่ละตัวอย่าง โดยหลอด negative control ใช้น้ำปราศจาก DNase และ RNase แทน cDNA ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- นำหลอด PCR ทั้งหมดเข้าเครื่องแล้วตั้งค่าอุณหภูมิ ตามตารางด้านล่าง

ปฏิกิริยา PCR (ต่อ)

ขั้นตอน (ต่อ)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°c)	เวลา
Initial denaturation	95	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing		
miR-155	58	30 วินาที
miR-181	60	30 วินาที
GAPDH	55	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
Final extension	72	7 นาที
Cooling	4	ไม่จำกัด

ทั้งหมด 35 รอบ

ปฏิกิริยา qPCR

สารเคมีที่ใช้

(ปฏิกิริยารวม 10 μ l ต่อ 1 ปฏิกิริยา)

	ปริมาณ
1. iTaq Universal SYBR Green supermix	5.0 μ l
2. 10 pmol forward primer	0.3 μ l
3. 10 pmol reverse primer	0.3 μ l
4. น้ำปราศจาก DNase และ RNase	2.4 μ l
5. cDNA	2 μ l

ขั้นตอน

- เตรียม mastermix โดยเติม iTaq SYBR Green supermix, forward primer, reverse primer และ น้ำปราศจาก DNase และ RNase ตามสัดส่วนข้างต้น (เพิ่มปริมาณตามจำนวนตัวอย่างที่ทำ) ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอด qPCR หลอดละ 8 μ l โดยเพิ่มหลอด negative control 1 ปฏิกิริยา
- เติม cDNA 2 μ l ลงไปในหลอด qPCR แต่ละตัวอย่าง โดยหลอด negative control ใช้น้ำปราศจาก DNase และ RNase แทน cDNA ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- นำหลอด qPCR ทั้งหมดเข้าเครื่องแล้วตั้งค่าอุณหภูมิ ตามตารางด้านล่าง

ปฏิกิริยา qPCR (ต่อ)

ขั้นตอน (ต่อ)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°c)	เวลา
First denaturation	95	2 นาที 30 วินาที
Denaturation	95	5 วินาที
Annealing		
miR-155	58	30 วินาที
miR-181	60	30 วินาที
GAPDH	55	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
Cooling	4	ไม่จำกัด

ทั้งหมด 40 รอบ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวจิรภัทร์ นิลสุวรรณ
เกิดวันที่	20 กันยายน 2531
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. เทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ จิรภัทร์ นิลสุวรรณ และ วิน สุรเชษฐพงษ์. 2557. การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เชิงปริมาณเพื่อตรวจระดับ microRNA-181 ในเม็ดเลือดขาวสุกร, น. 153-159. ใน รายงานการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 (สาขาสัตวแพทยศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. ผลงานโปสเตอร์ นำเสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ หัวข้อ Molecular characterization and target analysis of microRNAs in pigs ในการประชุมวิชาการสุดยอดมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ครั้งที่ 3
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา