



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
การระบุและการศึกษาหน้าที่ของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องกับ  
ภูมิคุ้มกันในกุ่มก้ามกราม

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา

ตุลาคม 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
การระบุและการศึกษาหน้าที่ของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องกับ  
ภูมิคุ้มกันในกุ่มก้ามกราม

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**บทคัดย่อ**

รหัสโครงการ : MRG5980010

ชื่อโครงการ : การระบุและการศึกษาหน้าที่ของอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันใน  
กิ้งก่ามกราม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อีเมล : amnatpht@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี 6 เดือน

**บทคัดย่อ :**

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของ miRNAs กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่าน PRR-signaling pathway ในกิ้งก่ามกราม (*Macrobrychium rosenbergii*) ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ miRNAs ในกิ้งที่ถูกฉีดด้วย NaCl (กลุ่ม C), LPS และ poly IC (กลุ่ม ic) เพื่อระบุชนิดของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ผลการทดลองพบว่าจากลำดับทั้งหมด 19,157,854, 13,916,666 และ 32,346,034 clean reads ที่พบใน C, LPS และ IC libraries มีลำดับที่มีขนาด 18-32 นิวคลีโอไทด์เป็นจำนวน 509,371, 451,521 และ 888,863 unique sequences ตามลำดับ หลังจากเปรียบเทียบลำดับดังกล่าวกับฐานข้อมูล miRBase พบว่าสามารถระบุชนิดของ miRNAs ได้ 1,723, 1,580 และ 1,933 ชนิดใน C, LPS และ IC libraries ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNAs พบว่ามี miRNAs 173 ชนิดที่แสดงออกมากขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญและ 234 ชนิดที่แสดงออกลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญในกิ้งที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS และมี miRNAs 450 ชนิดที่แสดงออกมากขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญและ 314 ชนิดที่แสดงออกลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญในกิ้งที่ฉีดกระตุ้นด้วย poly IC เมื่อคัดเลือก miRNAs 4 ชนิดมาตรวจยืนยันการแสดงออกด้วย stem-loop qPCR พบว่า การแสดงออกของ miRNAs ที่ตรวจสอบด้วย stem-loop qPCR นั้นสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย high-throughput sequencing และยังเป็นที่น่าสนใจว่า miRNAs ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเหล่านี้หลายชนิดมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ การระบุยีนเป้าหมายของ miRNAs เหล่านี้จะทำให้องค์ความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ miRNAs กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่าน PRR-signaling pathway ในกิ้งก่ามกรามมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

คำหลัก : กิ้งก่ามกราม ไมโครอาร์เอ็นเอ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

## Abstract

---

**Project Code :** MRG5980010

**Project Title :** Genome-wide identification and functional characterization of the immune-related microRNAs from the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

**Investigator :** Assistant Professor Dr. Amnat Phetrungnapha  
Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University

**E-mail Address :** amnatpht@gmail.com

**Project Period :** 2 years 6 months

### **Abstract:**

This study aimed to elucidate the relationship of miRNAs and immune response mediated by PRR-signaling pathway in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. To identify the immune-related miRNA, we conducted a miRNAs analysis on the hepatopancreas of *M. rosenbergii* injected with NaCl (C), LPS, and poly IC (IC). In total 19,157,854, 13,916,666, and 32,346,034 clean reads representing 509,371, 451,521, and 888,863 unique sequences of 18-32 nt length were obtained from the C, LPS and IC libraries, respectively. After comparing the miRNA sequences with the miRBase database, 1,723, 1,580, and 1,933 known mature miRNAs were identified from the C, LPS and IC libraries, respectively. Differential expression analysis revealed that 173 miRNAs were up-regulated significantly and 234 miRNAs were down-regulated significantly upon LPS, and 450 miRNAs were up-regulated significantly and 314 miRNAs were down-regulated significantly upon poly IC. Then, four differentially expressed miRNAs upon LPS and poly IC were selected for validation by stem-loop qPCR. The expression trend of most the miRNAs from stem-loop qPCR were consistent with the high-throughput sequencing data. Interestingly, several differentially expressed miRNAs were reported to be involved in innate immune response. Identification of the target genes of these miRNAs will provide better understanding in the relationship of miRNAs and immune response in prawn.

**Keywords :** miRNA, LPS, poly IC, innate immune response, giant freshwater prawn

## บทที่ 2

### บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

#### 2.1. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายและส่งออกอย่างแพร่หลายจึงจัดว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมหาศาล จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมงศูนย์สารสนเทศ กรมประมงในปี 2549-2559 พบว่ามูลค่าการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยมีมูลค่าเฉลี่ยมากกว่า 3,000 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามโรคติดเชื้อจากจุลชีพในกุ้งก้ามกรามเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรเป็นอย่างมาก ทำให้สูญเสียรายได้อย่างมหาศาล และยังมีผลกระทบทำให้อัตราการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยลดลงอีกด้วย ตัวอย่างของโรคติดเชื้อจากจุลชีพในกุ้งก้ามกรามที่มีผลกระทบมาก ได้แก่ โรคติดเชื้อที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus และ Extra small virus ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค White tail disease และแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. เช่น *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกราม และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome หรือ EMS) เป็นต้น ปัญหาดังกล่าวจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นเพื่อรองรับปัญหาที่เกิดขึ้น องค์ความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามจึงมีความสำคัญและจำเป็นต่อการพัฒนาวิธีป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อจากจุลชีพในกุ้งก้ามกราม

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) คือโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ lipotechoic acid (LTA) ของแบคทีเรียแกรมบวก และ  $\beta$ -1,3- glucan ของเชื้อราและยีสต์ นอกจากนี้ยังรวมถึง unmethylated CpG DNA single-strand RNA และ double-strand RNA ของไวรัสอีกด้วย โมเลกุลดังกล่าวจะถูกจดจำอย่างจำเพาะโดยโปรตีนในกลุ่ม pattern recognition receptors (PRRs) ที่เป็นตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์เจ้าบ้านและนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านกลไกที่เรียกว่า pathogen recognition receptors (PRRs) signaling pathways ทำให้เกิดการส่งสัญญาณแบบต่างๆ เช่น Toll pathway และ Immune Deficiency (IMD) pathway นำไปสู่การ

ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) แบบต่างๆ ทั้งภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cell-based immunity) และแบบสารน้ำ (humoral immunity) (X. W. Wang & Wang, 2013)

MicroRNAs (miRNAs) เป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (non-coding RNA) ขนาดประมาณ 20-24 นิวคลีโอไทด์ ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ post-transcription ในยูคาริโอต โดยจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายอย่างจำเพาะโดยเข้าจับที่บริเวณ 3'-untranslated regions (3'UTR) ของ Messenger RNA (mRNA) และส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือกระตุ้นการสลาย mRNA จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์มากมาย เช่น กระบวนการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน กระบวนการเมแทบอลิซึม ระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงกระบวนการ homeostasis ต่างๆ ภายในเซลล์ เป็นต้น (Gebert & MacRae, 2018) จากรายงานการศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดพบว่า miRNAs มีความสำคัญและมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ มีรายงานการศึกษา miRNAs ในกิ้งก่าชนิดต่างๆ เช่น กิ้งก่าดำ (*Panaeus monodon*) กิ้งก่าแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) กิ้งก่าจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) และกิ้งก่ากรม (*Kaewkascholkul et al., 2016; Li et al., 2017; Sun, Liu, Yang, & Huang, 2016*) แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์และหน้าที่ของ miRNAs ในระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ายังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดมากนัก และแม้จะมีรายงานว่า miRNAs เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกิ้งก่า แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่เข้าใจว่า miRNAs เกี่ยวข้องกับ PRRs signaling pathways ในกิ้งก่าอย่างไร

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ากรม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของ miRNAs กับ PRRs signaling pathways ในกิ้งก่ากรม โดยทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกิ้งก่าผ่าน PRRs signaling pathways ด้วย PAMPs และทำการศึกษาเชิงเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อ PAMPs ชนิดต่างๆ ซึ่งหวังเป็นอย่างยิ่งว่า องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาเพื่อที่จะต่อยอดไปสู่วิธีป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อจากจุลชีพในกิ้งก่ากรมในอนาคต

## 2.2. ทบพทวนวรรณกรรม

### 2.2.1. กุ้งก้ามกราม ความสำคัญเชิงเศรษฐกิจ และปัญหาโรคติดต่อจากจุลชีพ

กุ้งก้ามกราม (Giant Freshwater Prawn) (รูปที่ 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Macrobrachium rosenbergii* เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Arthropoda ชั้น Crustacea อันดับ Decapoda วงศ์ Palaemonidae จัดเป็นสัตว์น้ำจืดขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบทวีปเอเชียใต้ เช่น บังกลาเทศ อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า เวียดนาม เขมร มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และบางส่วนของหมู่เกาะแปซิฟิก



รูปที่ 1 กุ้งก้ามกราม (Giant Freshwater Prawn)

(ที่มา: [https://www.sentangsedtee.com/career-channel/article\\_29021](https://www.sentangsedtee.com/career-channel/article_29021) สืบค้นเมื่อวันที่ 13 ตุลาคม 2561)

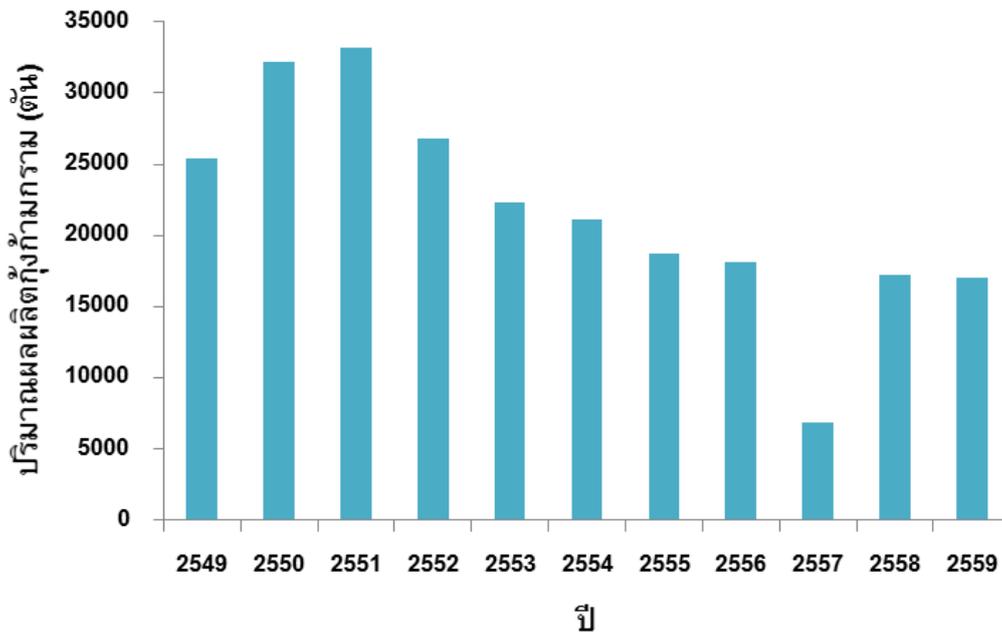
กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของโลก โดยมูลค่าการเพาะเลี้ยงเฉลี่ยต่อปีมากกว่า 700 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ด้วยเหตุนี้จึงมีการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างแพร่หลายทั่วโลก สำหรับประเทศไทย มีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในปริมาณมากและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในแถบภาคกลาง ได้แก่ ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม จากการสำรวจของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง ในปี 2560 พบว่า เนื้อที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยมีประมาณ 78,628 ไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 2.5 จากปีที่ผ่านมา ผลผลิตจึงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น 3.8% มากที่สุดในรอบ 10 ปี ทำให้รายได้ในการจำหน่ายสูงถึง 5,113 ล้านบาท (ตาราง 1)

### ตารางที่ 1 เนื้อที่ ผลิตผล และมูลค่ากึ่งกัมกรวม ปี 2550-2560

ปี พ.ศ.	จำนวน		เนื้อที่		ผลิตผล		มูลค่า	
	ฟาร์ม	%Δ	ไร่	%Δ	ตัน	%Δ	ล้านบาท	%Δ
2550	6,915		96,628		32,148		3,989	
2551	7,143	+3.3	97,991	+1.4	33,189	+3.2	4,178	+4.7
2552	6,888	-3.6	95,891	-2.1	26,785	-19.3	3,511	-16.0
2553	6,824	-0.9	94,477	-1.5	22,350	-16.6	3,438	-2.1
2554	6,193	-9.2	86,188	-8.8	21,080	-5.7	4,094	19.1
2555	6,339	+2.4	89,351	3.7	18,702	-11.3	4,094	0
2556	5,811	-8.3	85,399	-4.4	18,168	-2.9	4,475	+9.3
2557	5,503	-5.3	78,030	-8.6	16,906	-6.9	4,201	-6.1
2558*	5,434	-1.3	77,055	-1.2	16,218	-4.1	4,293	+2.2
2559*	5,409	-0.5	76,691	-0.5	16,079	-0.9	4,685	+9.1
2560*	5,545	+2.5	78,628	2.5	16,693	+3.8	5,133	+9.6

(ที่มา: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง)

ปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรทั่วโลกและทำให้ผลผลิตกึ่งกัมกรวมลดลง และขาดทุน คือ ปัญหาโรคติดเชื้อจากจุลชีพ สำหรับปี 2559 ได้ประมาณการว่าปริมาณผลผลิตกึ่งกัมกรวมโลกลดลงร้อยละ 1.40 จากปีที่ผ่านมาเนื่องจากประเทศผู้ผลิตหลัก ได้แก่ อินเดีย ประสบปัญหาจากโรคไมโครสปอริเดียน ส่วนเวียดนาม และจีนยังประสบปัญหาโรคตายด่วน สำหรับประเทศไทยก็ประสบปัญหานี้เช่นกัน จากการสำรวจของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลผลผลิตกึ่งกัมกรวมในปี 2549-2559 (รูปที่ 2) พบว่า ผลผลิตกึ่งกัมกรวมลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะในปี 2557 โดยมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แม้ว่าในปีต่อมาจะมีการแก้ปัญหาจนผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นแต่ก็ยังต่ำกว่าช่วงปี 2549-2555 จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปัญหาโรคติดเชื้อจากจุลชีพ ยังคงส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งกัมกรวมมาอย่างยาวนาน และนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญที่ต้องหาทางแก้ไข



รูปที่ 2 ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามทั่วโลก ตั้งแต่ปี 2549-2559

(ที่มา: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง)

สำหรับโรคติดเชื้อจากจุลชีพในกุ้งก้ามกรามที่พบบ่อยส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย โรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามที่มีสาเหตุมาจากไวรัส ได้แก่ โรคเอ็มเอ็มวี มีสาเหตุมาจากไวรัส Parvo-like virus มักจะติดเชื้อในลูกกุ้ง หลังติดเชื้อเนื้อเยื่อจะกลายเป็นสีทึบและตายภายใน 2-3 วัน โรคจุดขาว (White spot syndrome) มีสาเหตุมาจากไวรัส White spot syndrome virus หลังติดเชื้อจะพบจุดสีขาว และทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอและตาย โรคหางขาว (White tail disease) มีสาเหตุมาจากไวรัสในกลุ่ม Nodavirus ที่ทำให้กุ้งมีอาการกล้ามเนื้อตายเป็นสีขาวขุ่น โรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp early mortality syndrome หรือ EMS) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งกุ้งที่ได้รับเชื้อมักจะมีอาการตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลัน และล้มตายเป็นจำนวนมาก โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง (Shell disease) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และโรคเรืองแสง (Luminescence disease) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยกุ้งที่ได้รับเชื้อมีอาการเรืองแสงบริเวณตัวสังเกตเห็นในเวลากลางคืน ซึ่งมีผลทำให้กุ้งอ่อนแอและตายในที่สุด โรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม สาเหตุ และอาการ แสดงในตาราง

## ตารางที่ 2: โรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม สาเหตุ และอาการ

โรค	จุลชีพที่เป็นสาเหตุ	อาการ
โรคเอ็มเอ็มวี ( <i>Macrobrachium Muscle Virus</i> )	Parvo-like virus	กล้ามเนื้อมีสีทึบและตายใน 2-3 วัน พบในลูกกุ้ง
โรคจุดขาว (White Spot Syndrome)	White spot syndrome virus	จะพบรอยโรคเป็นจุดสีขาวใต้เปลือกทั่วบริเวณพบบ่ออยู่ในลูกกุ้ง
โรคหางขาว (White tail disease)	Nodavirus	อาการกล้ามเนื้อตายเป็นสีขาวขุ่นบริเวณหางจะมีสีขาว
โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome; EMS)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ตับและตับอ่อนตายเฉียบพลัน เกิดภายใน 20 - 30 วันหลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อ
โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง (Shell Disease)	<i>Vibrio, Pseudomonas, Aeromonas</i>	พบรอยดำหรือน้ำตาลบนเปลือกบริเวณหัวลำตัวของกุ้ง พบในกุ้งได้ทุกระยะการเจริญเติบโต
โรคเนื้อตายจากแบคทีเรีย (Bacterial Necrosis)	<i>Pseudomonas, Leucothrix</i>	กุ้งมีสีออกน้ำตาลหรือซีด กุ้งที่อ่อนแอมักจะนอนกันบ่อและมีจุดสีน้ำตาลบนรยางค์และหนวด
โรคเรืองแสง (Luminescence Disease)	<i>Vibrio harveyi</i>	มีการเรืองแสงบนตัวกุ้งที่เป็นโรคซึ่งเห็นได้ในเวลากลางคืน กุ้งว่ายน้ำเฉื่อยชาและอัตราการตายอาจสูงถึง 100 %

(ที่มา: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง)

## 2.2.2. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งมีลักษณะคล้ายกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง คือ มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) เป็นระบบหลักที่ใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อ และกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immune response) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response) (Tassanakajon, Somboonwiwat, Supungul, & Tang, 2013) โดยการตอบสนองทั้งสองรูปแบบนี้จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด หรือ hemocyte โดยสามารถแบ่งเซลล์เม็ดเลือดตามลักษณะการมีแกรนูลในไซโทพลาซึมของเซลล์ได้เป็น 3 ชนิด คือ hyaline cells (ไม่มีแกรนูล) semi granulocyte (แกรนูลขนาดเล็ก) และ granulocyte (แกรนูลขนาดใหญ่) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่เฉพาะหรือทำหน้าที่ร่วมกันในหลายกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกัน (ตาราง 3) (Zhan, Wei, Xing, & Zhang, 2008)

**ตารางที่ 3** ชนิดและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

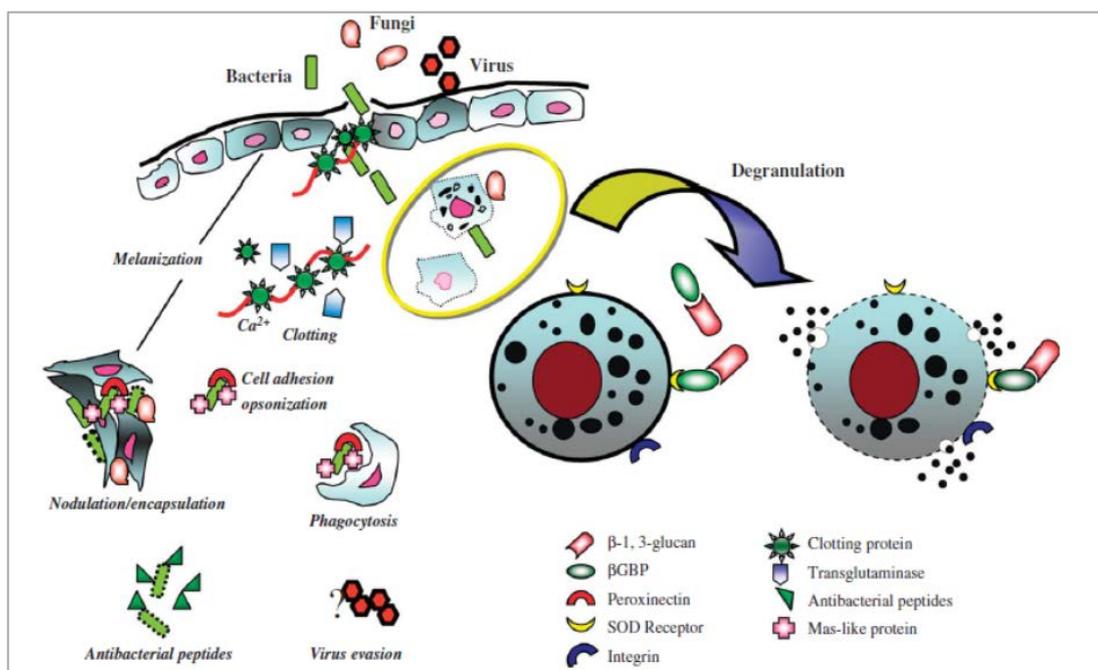
ชนิดเซลล์เม็ดเลือด	หน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน
Hyaline cells	Phagocytosis
Semi granulocyte	Encapsulation, phagocytosis, prophenoloxidase (ProPO) system
Granulocyte	Prophenoloxidase (ProPO) system and cytotoxicity

ที่มา: Zhan et al., 2008

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะเริ่มต้นจากการเกิดกลไก PRRs signaling pathways โดยโปรตีนในกลุ่ม pattern recognition receptors (PRRs) จะจดจำ Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ซึ่งเป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์ของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ lipotechoic acid (LTA) ของแบคทีเรียแกรม

บวก และ  $\beta$ -1,3- glucan ของเชื้อราและยีสต์ นอกจากนี้ยังรวมถึง unmethylated CpG DNA, single-strand และ double-strand RNA ของ viruses จากนั้นจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate immune response ทั้งสองแบบคือ 1) cellular immune response ซึ่งจะอาศัยกลไกต่างๆ ได้แก่ ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เอนแคปซูเลชัน (encapsulation) และการสร้างโนดูล (nodule formation) และ 2) humoral immune response ได้แก่ การสร้างเมลานิน (melanization) สารอนุมูลอิสระจากการทำงานของระบบ prophenoloxidase (ProPO) การแข็งตัวของเลือด (clotting) และการสร้าง antimicrobial peptides (AMP) เพื่อใช้ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและเชื้อจุลชีพ (X. W. Wang & Wang, 2013)

ผังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กลไกต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ที่มา: Jiravanichpaisal, Lee, & Soderhall, 2006

ภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immune response) เป็นการกำจัดเชื้อจุลชีพโดยอาศัยการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลักประกอบด้วย วิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เอนแคปซูเลชัน (encapsulation) และการสร้างโนดูล (nodule formation) วิธีฟาโกไซโทซิสเป็นการ

กำจัดสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ hemocyte ด้วยการยื่นไซโทพลาซึมไปล้อมสิ่งแปลกปลอมเป็น phagosomes จากนั้น phagosomes จะรวมกับ endosomes และ lysosomes ได้เป็น phagolysosomes และจะทำลายเชื้อโดยใช้ความเป็นกรดเนื่องจากภายใน phagolysosomes มีค่า pH ที่ต่ำและใช้สาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^-$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) และไฮดรอกซิลเรดิคัล ( $OH^\cdot$ ) ที่สร้างขึ้น เมื่อสิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมากเกินกว่าจะกำจัดโดยวิธีฟาโกไซโทซิสได้เซลล์จะอาศัยการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดกลายเป็น nodule เพื่อร่วมกันกำจัดสิ่งแปลกปลอม สำหรับในกรณีที่เชื้อจุลินทรีย์มีขนาดใหญ่เซลล์จะให้วิธีเอนแคปซูเลชันซึ่งวิธีนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดชนิดมีแกรนูลทำหน้าที่หลักในการเข้าล้อมสิ่งแปลกปลอมให้รวมอยู่กับเซลล์เม็ดเลือดแล้วกำจัดออกจากร่างกาย (Jiravanichpaisal et al., 2006; Xu, Liu, Alvarez, & Huang, 2014)

ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response) มีกระบวนการสำคัญที่ทำหน้าที่หลัก ได้แก่ ระบบ prophenoloxidase (ProPO) ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นได้จากกลไก PTI หลังจากนั้นจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดกระบวนการสลายแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือด ส่งผลให้มีการหลั่งเอนไซม์ prophenoloxidase-activating enzyme (ppA) และ prophenoloxidase (proPO) ที่อยู่ภายในแกรนูลออกมา ซึ่งเอนไซม์ ppA สามารถเปลี่ยน prophenoloxidase ไปเป็น phenoloxidase (PO) ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างเมลานิน (melanization) โดยทำปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนสารกลุ่ม phenol ไปเป็น quinone และเปลี่ยนไปเป็น melanin ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ และยังเกี่ยวกับสร้าง reactive oxygen species (ROS) ออกมาทำลายเชื้ออีกด้วย (Amparyup, Charoensapsri, & Tassanakajon, 2013)

กระบวนการแข็งตัวของเลือด (clotting) เป็นกระบวนการหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำที่ตอบสนองหลังถูกกระตุ้นแบบ PTI โดยจะเกิดกระบวนการสลายแกรนูล เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินจะปล่อยเอนไซม์ transglutaminase ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยน fibrinogen ในพลาสมาไปเป็น fibrin ทำให้เลือดแข็งตัว จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูลจะหลั่งสารให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูหรือสมานแผลในบริเวณดังกล่าว (Maningas, Kondo, & Hirono, 2013)

Antimicrobial peptides (AMP) เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีขนาดประมาณ 150-200 กรดอะมิโน ถูกสร้างขึ้นและเก็บไว้ภายในแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือด เมื่อมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จะเกิดกระบวนการสลายแกรนูล ทำให้ AMP ที่ถูกเก็บอยู่ด้านในก็จะถูกหลั่งออกมาทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Tassanakajon et al., 2018) ในกึ่งมีการค้นพบ AMP หลายชนิด

เช่น penaeidins และ crustins เป็นต้น แต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันไป penaeidins เป็น AMP ที่มีลักษณะจำเพาะคือที่ด้านปลาย N จะมี unconstrained proline-rich domain (PRD) และปลาย C จะมีกรดอะมิโนซิสเตอีน 6 ตัวที่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 3 พันธะ มีหน้าที่ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น cytokine ที่จะนำไปสู่กระบวนการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (An, Gao, Zhao, & Wang, 2016) crustins เป็น AMP อีกชนิดหนึ่งที่พบได้ในกุ้ง โดยภายในสายเปปไทด์ส่วนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน และมีหน้าที่ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Donpuksa et al., 2014)

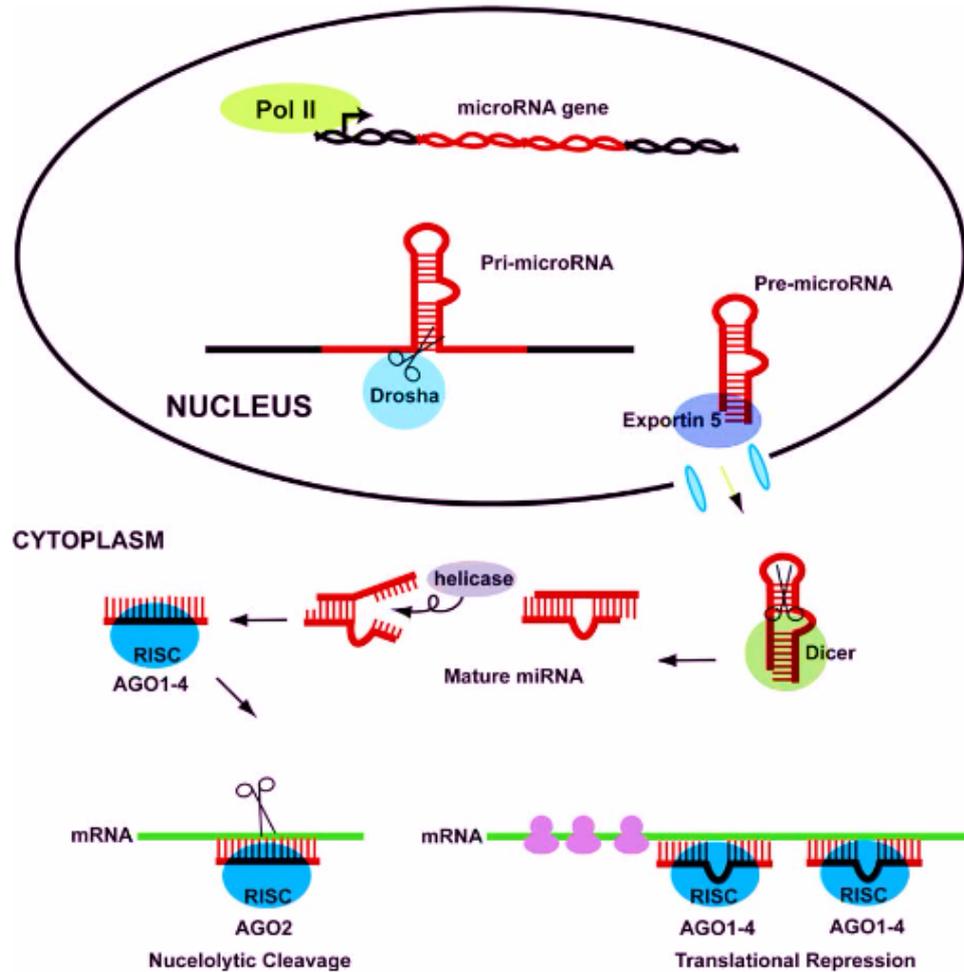
### 2.2.3. ไมโครอาร์เอ็นเอ

miRNAs คือ อาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (non-coding region) มีความยาวประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัส (post-transcription) มีการค้นพบ miRNA เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1993 ซึ่งพบว่า lin-4 และ let-7 ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการพัฒนาตัวอ่อนของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* (Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993; Vella, Choi, Lin, Reinert, & Slack, 2004) หลังจากการค้นพบดังกล่าว ทำให้ miRNA ได้รับความสนใจและมีศึกษาเพิ่มมากขึ้นจนมีการตีพิมพ์เผยแพร่ข้อมูลในฐานข้อมูลเป็นจำนวนมาก

ปัจจุบันมีรายงานของ miRNA ในฐานข้อมูล miRBase ถึง 38589 ชนิด (<http://www.mirbase.org/>) ซึ่งมีรายงานจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย หนอนตัวกลม พืช และไวรัส มีการทำนายด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศพบว่า miRNAs ควบคุมการแสดงออกของยีนถึง 60% ในมนุษย์ (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009; Muljo, Kanellopoulou, & Aravind, 2010) ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากพบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ยูแคริโอต เช่น ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ (Developmental timing) การเปลี่ยนแปลงตัวเองของเซลล์ (Cell differentiation) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Cell proliferation) การตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism)

เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง และกระบวนการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (Immune defense) เป็นต้น (Friedman et al., 2009; Gebert & MacRae, 2018; Muljo et al., 2010)

กระบวนการสังเคราะห์ miRNAs ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตจะเริ่มต้นในนิวเคลียส โดยเอนไซม์ RNA polymerase II จะทำหน้าที่สังเคราะห์ primary miRNA (pri-miRNA) โดยโมเลกุล pri-miRNA สามารถมีขนาดได้หลากหลายและใหญ่ได้ถึง 10 kb ขึ้นไป จากนั้น pri-miRNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็น dsRNA-specific RNase III endonuclease จะได้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) ที่มีความยาว ประมาณ 60-100 นิวคลีโอไทด์ จากนั้น pre-miRNA จะถูกขนส่งออกมาয়ไซโทพลาซึมโดยโปรตีน exportin-5 และจะถูกเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์ nuclease ในไซโทพลาซึม ตัดและจะได้ miRNA ที่นิวคลีโอไทด์ภายในโมเลกุล เข้าคู่กันอย่างไม่สมบูรณ์ ที่มีขนาด ประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า mature miRNA จากนั้นจะถูกแยกสายโดยเอนไซม์ RNA helicase และสาย RNA เส้นที่มีปลายด้าน 5' เสถียรต่ำกว่า (guide strand) จะไปรวมกับ RNA-induce silencing complex (RISC) ซึ่งมีโปรตีน Argonaut (Ago) เป็นส่วนประกอบหลัก ส่วนอีกสายหนึ่งหรือ passenger strand จะถูกสลายทิ้งไป ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน RISC จะถูกพาไปยัง mRNA เป้าหมายและเข้าจับบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) และยับยั้งการแสดงออกของยีนผ่านการกระตุ้นให้มีการตัดและสลาย mRNA เป้าหมาย และ ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (translation) (Bose & Bhattacharyya, 2016; Finnegan & Pasquinelli, 2013)



รูปที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์ miRNA

ที่มา: Hammond, 2006

#### 2.2.4. ความสัมพันธ์ของไมโครอาร์เอ็นเอกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง

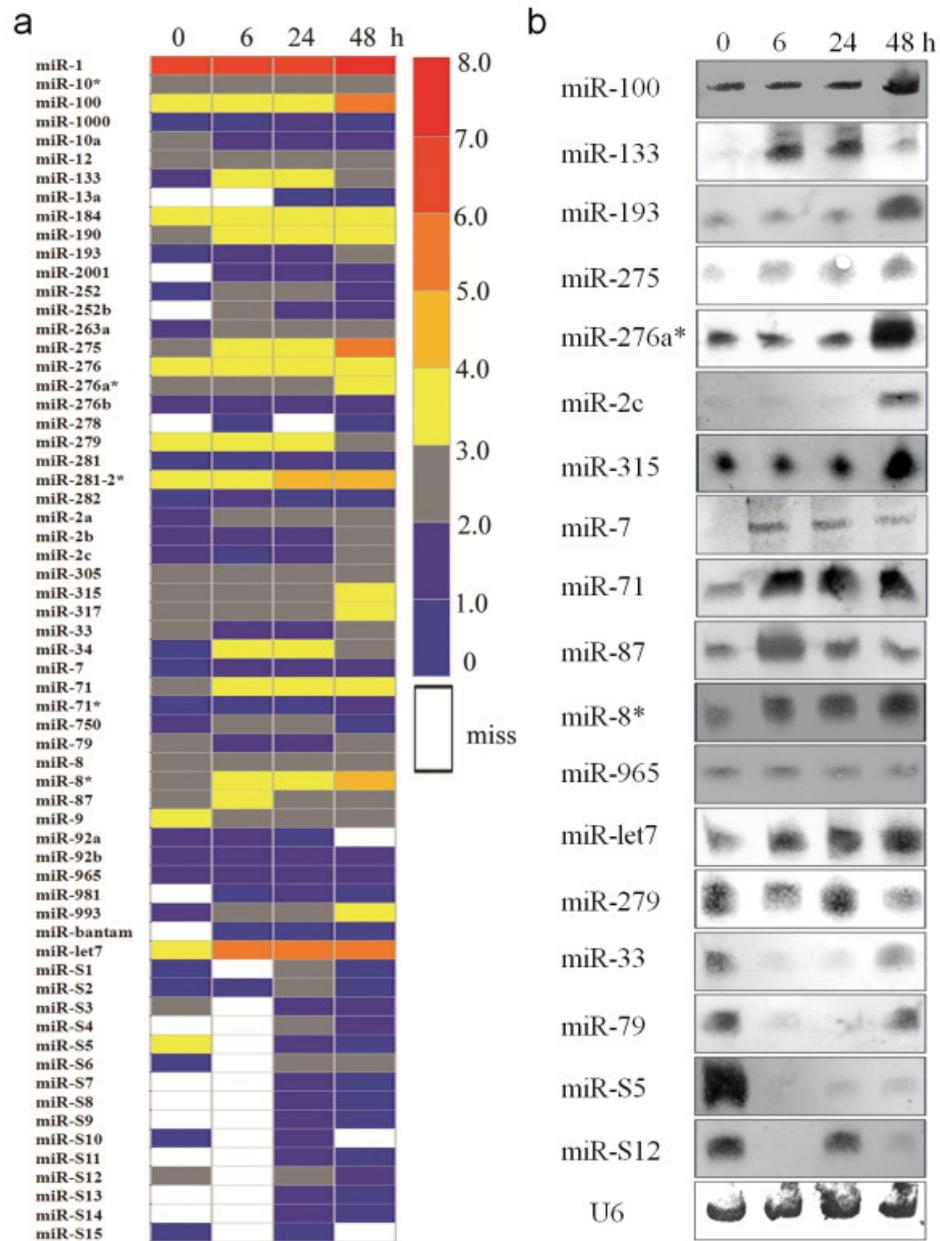
มีการการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่า miRNA มีความสัมพันธ์และทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง โดยได้มีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA และมีการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ miRNA เช่น Dicer Argonaute และ Drosha ในกุ้งหลายชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งแวนนามิ (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งลายเสือญี่ปุ่น

(*Marsupenaeus japonicus*) และกุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) และพบว่ายีนเหล่านี้มีการแสดงออกสูงมากขึ้นมากเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัส (Labreuche & Warr, 2013)

ในปี 2012 Huang และ Zhang ศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ใน *M. japonicus* หลังจากติดเชื้อไวรัส WSSV (Huang, Xu, & Zhang, 2012) พบว่า miRNA 63 ชนิดมีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 5) และยังพบว่า miRNA เหล่านี้ส่วนใหญ่มีเป้าหมายเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ยีนในกลุ่ม small GTPase-mediated signaling transduction pathway ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ autophagy และ apoptosis ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบเซลล์และสารน้ำ เช่น the Toll-like receptor signal pathway การสร้าง antimicrobial humoral response การเกิด endocytosis และ phagocytosis และยีนในกระบวนการ RNA interference (RNAi) ตัวอย่างเช่น let-7 มีเป้าหมายคือ transmembrane protein 14C-like ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ proPO และ miR-12 เป้าหมายคือ signaling (initiator) caspase ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis และ phagocytosis เป็นต้น (Huang et al., 2012)

จากการศึกษาของ Zhang และคณะในปี 2014 ได้ศึกษา miRNA ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) ในกุ้ง *M. japonicus* พบว่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี microarray มี miRNA 199 ชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis และพบว่ามี 8 ชนิดที่มีความอนุรักษ์สูงในสัตว์ คือ miR-1 miR-2 let-7 miR-10 miR-100 miR-184 miR-279 และ miR-305 เมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่า miR-1 สามารถควบคุมเชิงลบต่อ apoptosis โดยมีเป้าหมายเป็นยีน trypsin และยังพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 ยังมีผลทำให้ apoptosis เกิดได้มากขึ้น ลดจำนวน WSSV copies ในกุ้ง และลดอัตราการตายของกุ้งจากการติดเชื้อ WSSV (รูปที่ 6) (L. Yang, Yang, & Zhang, 2014)

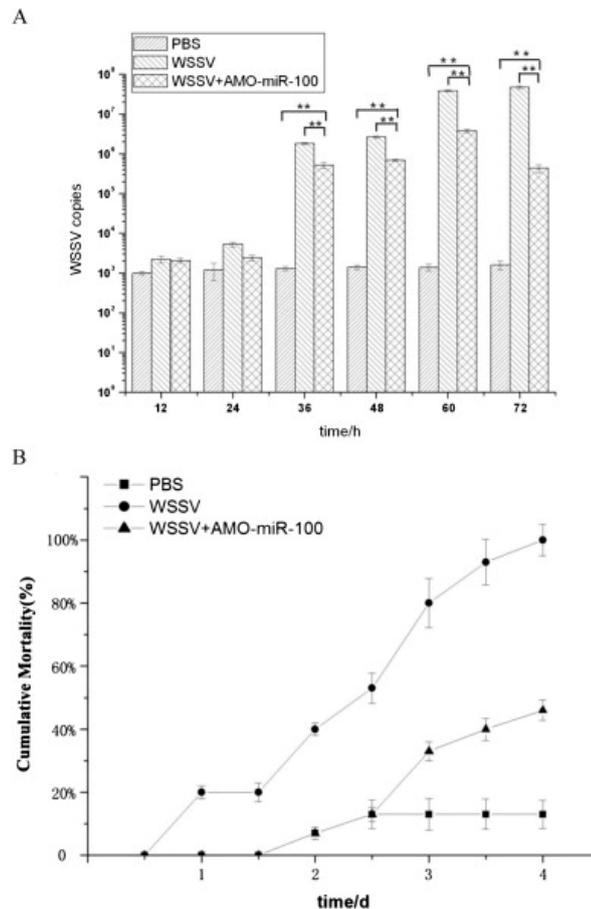
Shu และคณะ รายงานการศึกษา miR-965 ทำหน้าที่สำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง *M. japonicus* โดยพบว่า miR-965 มีเป้าหมายเป็นยีน wsv240 ของไวรัส WSSV



รูปที่ 5 รูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ใน *M.*

*japonicus* (A) Microarray analysis (B) Northern hybridization

ที่มา: Huang et al., 2012



รูปที่ 6 ความสำคัญของ miR-100 ต่อกระบวนการ apoptosis และการยับยั้งการติดเชื้อ

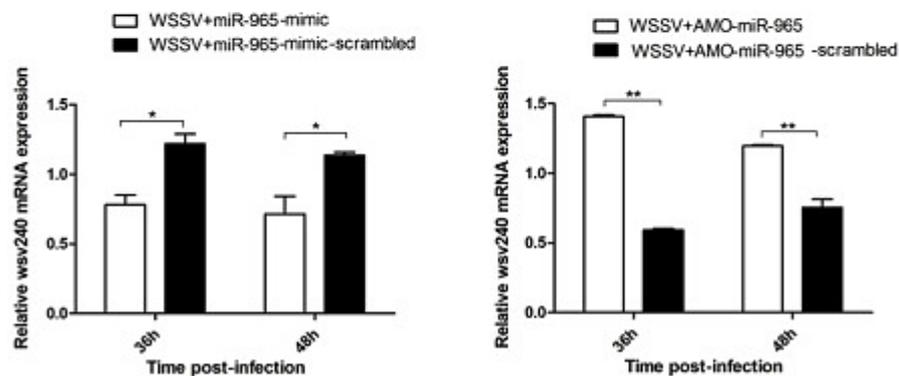
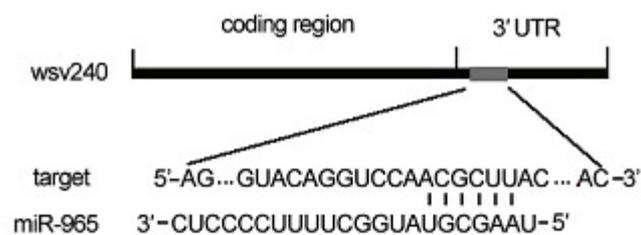
WSSV ใน *M. japonicus* (A) WSSV copies (B) %cumulative mortality

ที่มา: L. Yang et al., 2014

ซึ่งเป็น early gene ที่จำเป็นต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง โดยพบว่า miR-965 สามารถเข้าจับที่ปลาย 3'UTR ของยีน trypsin ได้ และยังพบว่าการฉีดกระตุ้นกุ้งติดเชื้อด้วย miR-965 ยังมีผลให้การแสดงออกของยีน wsv240 ลดต่ำลง และการยับยั้งการแสดงออกของ miR-965 ด้วย anti-miRNA oligonucleotide (AMO) ทำให้การแสดงออกของยีน wsv240 เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 7) (Shu, Li, & Zhang, 2016)

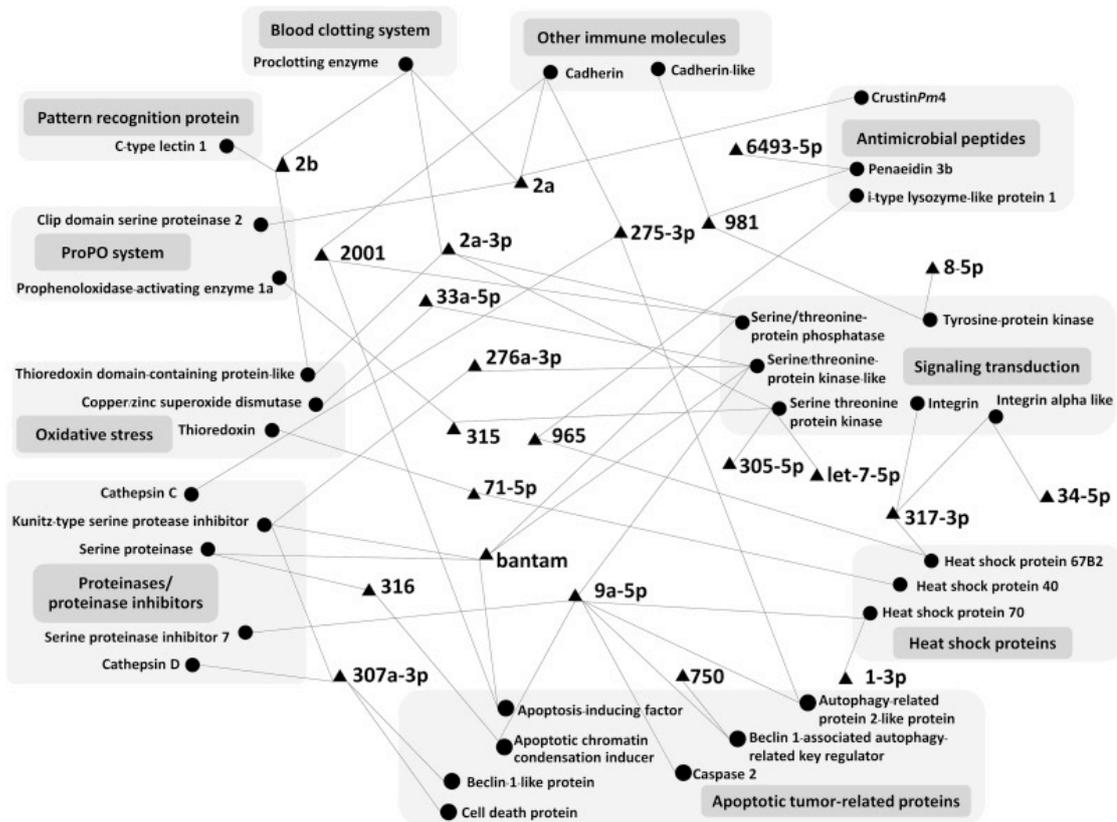
Kaewkascholkul และคณะศึกษา miRNAs ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV ใน hemocyte พบว่ามี miRNAs 11 ชนิด ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไปเมื่อกุ้งติดเชื้อ WSSV ซึ่งเมื่อทำนายยีนเป้าหมายของ miRNAs เหล่านี้

พบว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง antimicrobial peptides ยีนในกลุ่ม signaling transduction proteins ยีนในกลุ่ม heat shock proteins ยีนในกลุ่ม oxidative stress proteins ยีนในกลุ่ม proteinases or proteinase inhibitors ยีนในระบบการแข็งตัวของเลือด ยีนในกลุ่ม apoptosis-related proteins ยีนในระบบ proPO และ pattern recognition proteins (รูปที่ 8) นอกจากนี้ Kaewkascholkul และคณะยังพบว่า pmo-bantam มียีนเป้าหมายคือ Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการต่อต้านไวรัสในกุ้ง (Kaewkascholkul et al., 2016)



รูปที่ 7 บริเวณเป้าหมายของ miR-965 และความสำคัญของ miR-965 ต่อการยับยั้งการติดเชื้อ WSSV ใน *M. japonicas*

ที่มา: Shu et al., 2016



รูปที่ 8 แผนภาพทำนายความสัมพันธ์ของ miRNAs ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและ  
 ยีนเป้าหมายในกุ้งกุลาดำ  
 ที่มา: Kaewkascholkul et al., 2016

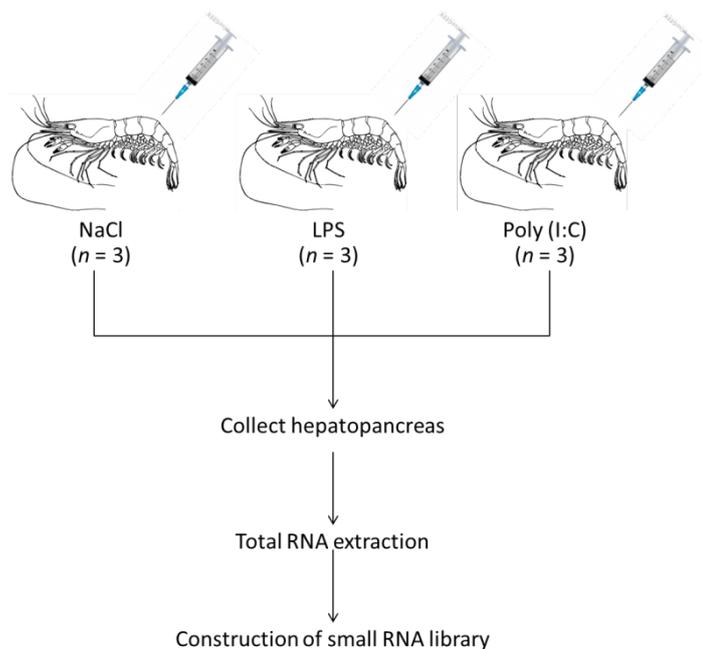
### 2.3. วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อ PAMPs ชนิด lipopolysaccharide (LPS) และ polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC)

### 2.4. วิธีทดลอง

#### 2.4.1. การเตรียมและเก็บตัวอย่าง

ซื้อกุ้งก้ามกรามจากบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดพิษณุโลก นำมาเลี้ยงในภาชนะทรงสี่เหลี่ยม ประมาณ 2 วัน โดยมีการเป่าให้อากาศและให้อาหารอย่างต่อเนื่องเพื่อให้กุ้งปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมใหม่และลดความเครียด จากนั้นแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละสามตัว ( $n=3$ ) กลุ่มแรกฉีดด้วย LPS ความเข้มข้น  $0.125 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ปริมาณ  $100 \mu\text{l}$  กลุ่มที่สองฉีดด้วย Poly IC ความเข้มข้น  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ปริมาณ  $100 \mu\text{l}$  และกลุ่มที่สามฉีดด้วย  $0.85\%$  NaCl ปริมาณ  $100 \mu\text{l}$  ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้น 12 ชม. ทำการเก็บตับและตับอ่อนมาสกัด RNA ด้วย Direct-zol RNA mini kit (Amresco) เพื่อนำไปสร้าง small RNA library โดยจะนำ RNA จากกุ้งแต่ละตัวในกลุ่มการทดลองในปริมาณเท่าๆกันมาผสมกัน เพื่อใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มการทดลองนั้นๆ

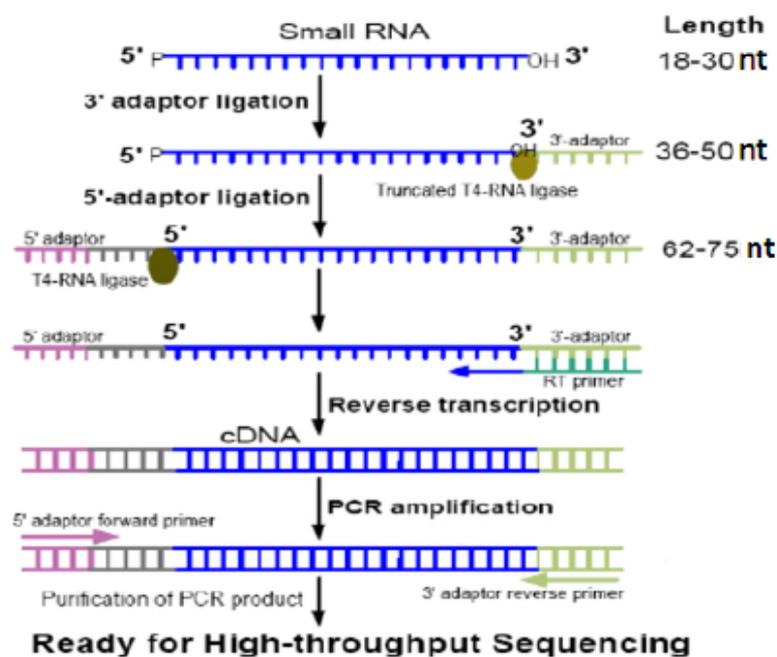


รูปที่ 9 แผนภาพการทดลองเพื่อสร้าง small RNA library

## 2.4.2. การสร้าง small RNA library

นำ RNA ที่สกัดได้ตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นโดยใช้ Agilent 2100 Bioanalyzer และใช้เฉพาะ RNA ที่ได้ Level A (A means the sample is qualified, and the amount of sample satisfies two times library construction or more) เท่านั้นในการทำ library เมื่อตัวอย่างผ่าน Quality Control ลำดับต่อไป RNA จะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้เทคนิค native gel electrophoresis จากนั้นตัด RNA ขนาด 18-30 นิวคลีโอไทด์ออกมาจากเจลแล้วนำมาแยกให้บริสุทธิ์แล้วนำไปสร้าง small RNA library

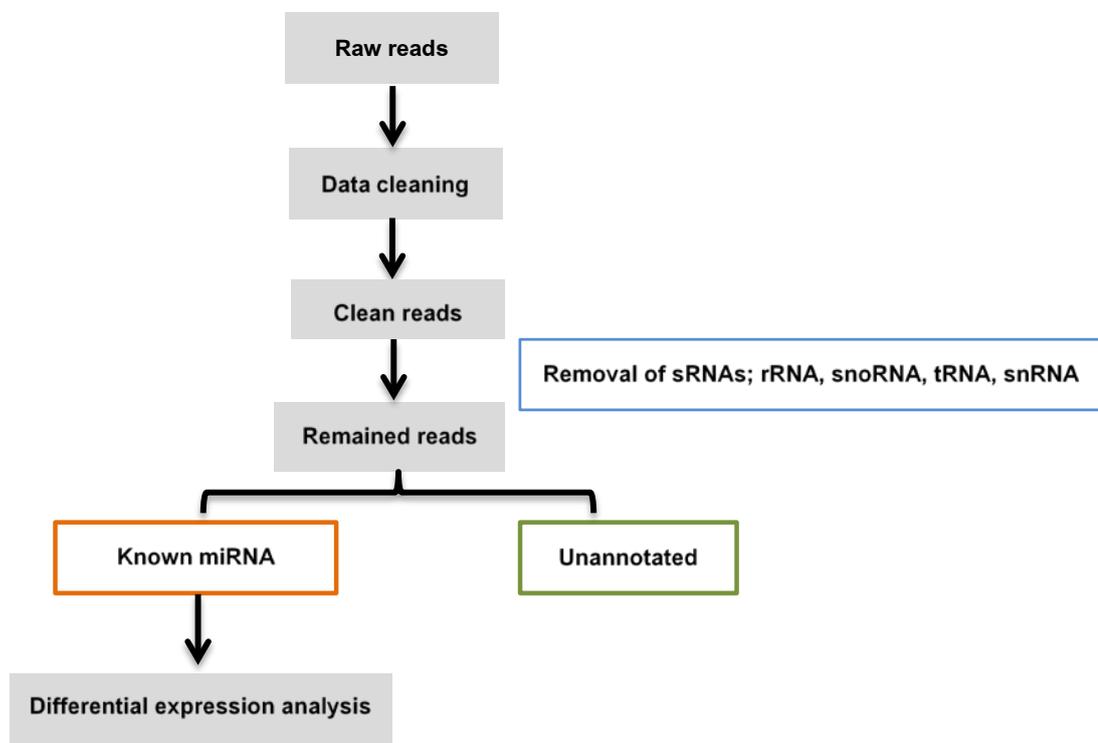
เมื่อได้ Small RNA ที่มีขนาดประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์จะทำ miRNA library โดยจะเติม 3' adaptor และ 5' adaptor โดยใช้ T4 RNA ligase ซึ่งจะได้ Small RNA ที่มีขนาด 62-75 นิวคลีโอไทด์ และนำไปทำปฏิกิริยา Reverse transcription เป็นการเปลี่ยน RNA ให้เป็น complementary DNA (cDNA) จากนั้นเพิ่มจำนวน cDNA โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และนำ PCR product ที่ได้ไปทำ sequencing โดยใช้เทคนิค high throughput sequencing โดยใช้ Illumina 4000 sequencing platform (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ขั้นตอนการสร้าง small RNA library

### 2.4.3. การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศ

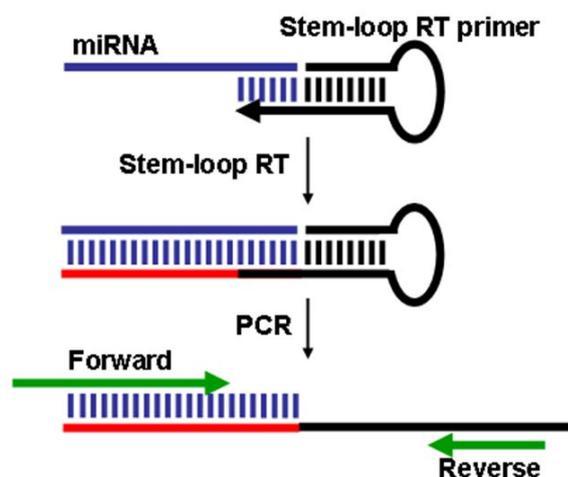
ข้อมูลจากการทำ high throughput sequencing ซึ่งเป็นข้อมูล raw reads จะนำมาทำ data cleaning เพื่อตัดลำดับของ adapter และ poly A ออก ซึ่งจะได้ข้อมูลที่เป็น clean reads จากนั้นจะทำการแยก small RNA ที่ไม่เกี่ยวข้อง เช่น rRNA, snoRNA, tRNA, snRNA ออกจาก library โดยนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) และ NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ข้อมูลส่วนที่เหลือ (remained reads) จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของ miRNA เพื่อทำการระบุชนิดของ miRNA หลังจากที่ได้ชนิดของ miRNA ก็จะทำวิเคราะห์การแสดงออกเปรียบเทียบความแตกต่างแต่ละกลุ่ม (differential expression analysis) เพื่อระบุ miRNA ที่แสดงออกเฉพาะในกึ่งกลุ่มที่ได้รับ LPS หรือ Poly IC โดย miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 2 เท่าของ log จะถูกพิจารณาว่ามีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญ



รูปที่ 11 การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศ

#### 2.4.4. การยืนยันผลการแสดงออกของ miRNA ด้วยเทคนิค stem-loop real-time PCR

คัดเลือก miRNAs 4 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ Poly IC มาทำการยืนยันการแสดงออก มาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ miRNA ด้วย stem-loop qPCR ทำการเตรียมตัวอย่าง RNA โดยแบ่งกึ่งก้ามกรามออกเป็น 3 กลุ่ม (n = 5) กลุ่มแรกฉีดด้วย LPS ความเข้มข้น 0.125 µg/µl ปริมาณ 100 µl กลุ่มที่สองฉีดด้วย Poly IC ความเข้มข้น 1 µg/µl ปริมาณ 100 µl และกลุ่มที่สามฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาณ 100 µl ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเก็บตับและตับอ่อนกึ่ง หลังจากการฉีด LPS และ Poly IC ไป 3 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ต่มาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด Direct-zol RNA mini kit (Amresco) นำ RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้น และใช้เป็นตัวแบบในปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ stem loop RT primer ร่วมกับชุดน้ำยา Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็นตัวแบบในการทำปฏิกิริยา qRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ miRNA แต่ละชนิด ดังตารางที่ 4 ร่วมกับชุดน้ำยา Thunderbird qPCR master mix (Toyobo) ปฏิกิริยา qRT-PCR จะทำขั้นตอน denaturation 15 วินาที และ annealing/extension 30; bokmu และทำทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นจึงตรวจสอบความจำเพาะของ PCR products ด้วยเทคนิค high resolution melting analysis และคำนวณระดับการแสดงออกของ miRNAs ด้วยวิธี comparative Ct method โดยในการทดลองนี้จะใช้  $\beta$ -actin เป็นยีน housekeeping



รูปที่ 12 stem-loop PCR

**ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการทดลอง**

miRNA	Primers	Sequence 5' → 3'
Let-7	Stem	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TGCTAT
	Forward	CCG GCT TGA GGT AGT AGG
miR-100	Stem	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TAA GTT
	Forward	CTATG CCG AAC CCG TAG ATC
Bantam	Stem	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AATCAG
	Forward	CCG GCG TGA GAT CAT TGT
miR-375-3p	Stem	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC CCCAAG
	Forward	GCG CGA GCC TTT GTT CGT TCT
EF1a	Forward	ACT GCG CTG TGT TGA TTG TAG CT
	Reverse	ACA ACA GTA CGT GTT CAC GGG TC
Universal reverse primer		ACA GTG CAG GGT CCG AGG TA

## 2.5. แผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 1 เดือนที่ 1-6

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 1	เดือนที่					
	1	2	3	4	5	6
1. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS และ Poly IC ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งก้ามกราม	←→					
2. การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่งก้ามกราม และการเก็บตัวอย่าง hepatopancreas					←→	
3. รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 1						↔

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 1 เดือนที่ 7-12

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2	เดือนที่					
	7	8	9	10	11	12
1. การวิเคราะห์คุณภาพของ RNA	↔					
2. การสร้าง miRNA library		←→				
3. การวิเคราะห์ miRNA library โดยใช้เทคนิค high-throughput sequencing				←→		
4. รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 2						↔

## แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2 เดือนที่ 1-6

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2	เดือนที่					
	1	2	3	4	5	6
1. การวิเคราะห์ miRNA library โดยใช้วิธีการทางชีวสารสนเทศ	←					→
2. รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 3						↔

## แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2 เดือนที่ 7-12

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2	เดือนที่					
	7	8	9	10	11	12
1. การตรวจยืนยันการแสดงออกของ miRNAs ในกิ้งก่ามกรม	←			→		
2. เตรียม manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ระดับนานาชาติ					↔	
3. รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือน ครั้งที่ 4 และ					↔	

## แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 3 เดือนที่ 1-6

แผนการดำเนินงานวิจัยปีที่ 2	เดือนที่					
	1	2	3	4	5	6
1. เตรียม manuscript สำหรับตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ระดับนานาชาติ	←					→
2. เตรียมเอกสารสำหรับปิดโครงการ	←					→

### บทที่ 3

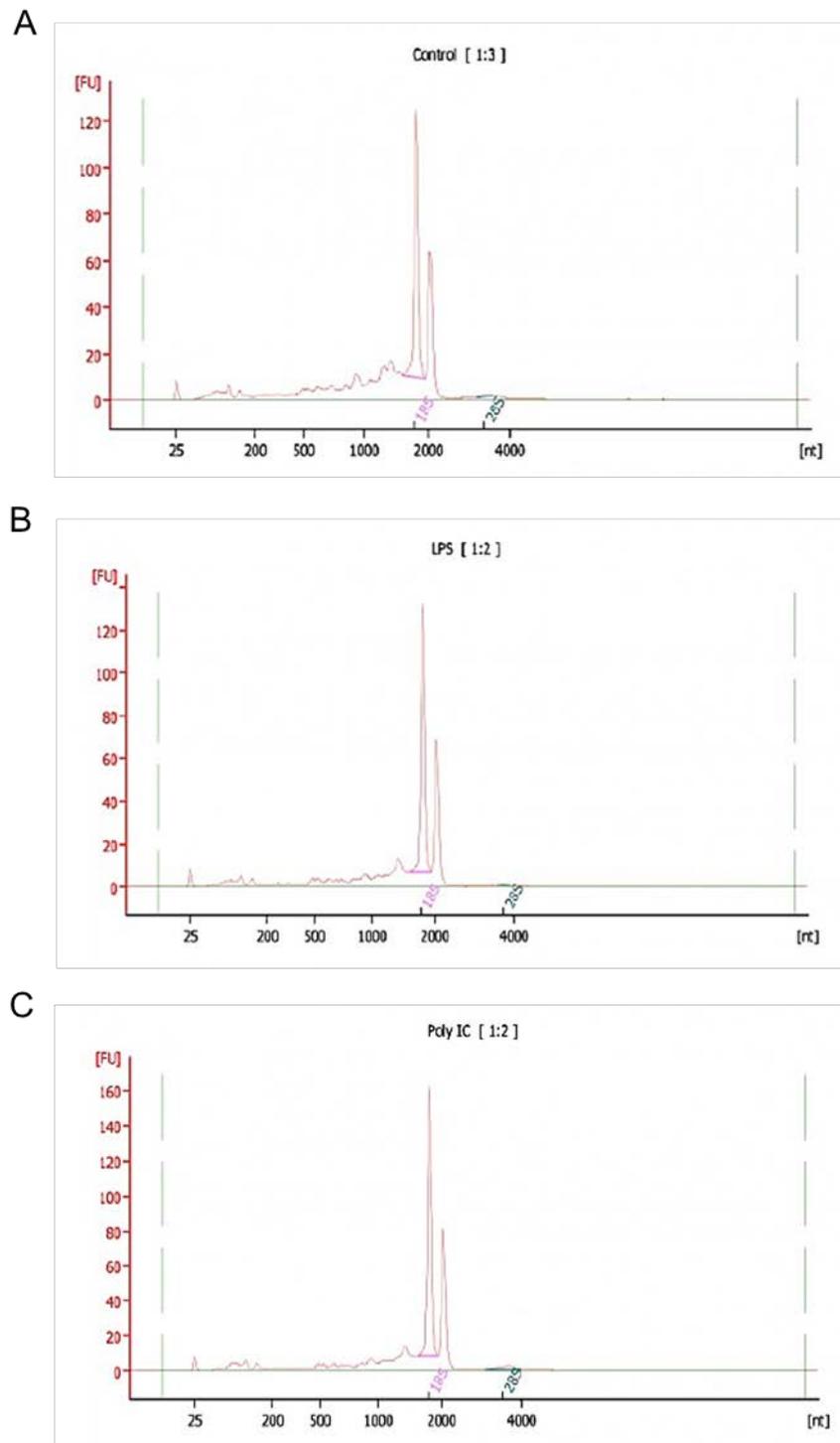
#### ผลการทดลอง

##### 3.1. การสร้าง small RNA library และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผู้วิจัยต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของ miRNA กับ PRRs signaling pathways ในกัญก้ามกราม จึงได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กัญที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS (LPS) กัญที่ฉีดกระตุ้นด้วย Poly IC (IC) และกัญที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl (C) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้น 12 ชม. จึงเก็บอวัยวะส่วนตับและตับอ่อนไปทำการสกัด RNA และนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer พบว่า เมื่อทำการคำนวณค่า RNA integrity number ของตัวอย่าง RNA ของกลุ่ม LPS, IC และ C ได้ค่าเท่ากับ 6.9, 7 และ 6.3 ตามลำดับ และยังพบว่า RNA จากทั้ง 3 กลุ่ม มีคุณภาพในระดับ Level A แปลผลได้ว่า ตัวอย่าง RNA ทั้ง 3 กลุ่มมีคุณภาพสูงและมีปริมาณเพียงพอสำหรับใช้สร้าง small RNA library ได้อย่างน้อย 2 ครั้ง รูปที่ 13

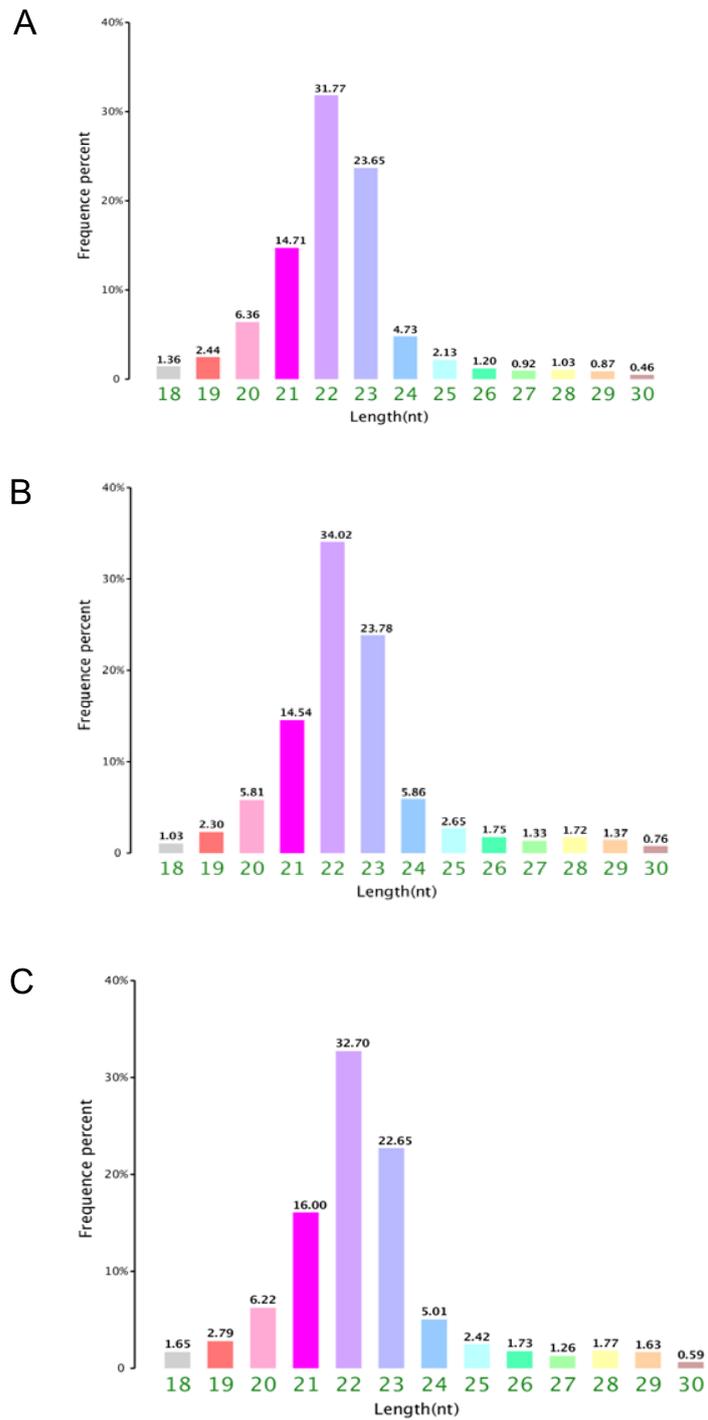
จากนั้นจึงทำการสร้าง small RNA library ของ RNA ทั้ง 3 กลุ่ม คือ LPS, IC และ C ตามวิธีการในรูปที่ 10 และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small RNA ใน library ทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค high throughput sequencing โดยใช้ Illumina 4000 sequencing (Illumina) พบว่า สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ของกลุ่ม LPS, IC และ C ได้เป็นจำนวน 14,949,095, 34,402,299 และ 22,723,132 reads ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทำการตัดลำดับที่ไม่ได้คุณภาพออก เช่น 3'adapter null, Insert null, 5' adapter contaminants, RNA smaller than 18 nt และ polyA จะเหลือลำดับที่มีคุณภาพหรือ clean reads ของกลุ่ม LPS, IC และ C เป็นจำนวน 19,157,854, 32,346,034 และ 13,916,666 reads ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ตามชนิดของลำดับ พบว่ามีจำนวนของ unique reads เท่ากับ 509,371, 888,863 และ 451,521 reads ตามลำดับ จำนวนของ reads จาก library ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังตารางที่ 5

เมื่อวิเคราะห์ length distribution ของลำดับที่พบใน library ทั้ง 3 ชนิด พบว่าลำดับของ small RNA ใน library ส่วนใหญ่มีความยาว 22 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็นสัดส่วนอยู่ที่ 34.02%, 32.70% และ 31.77% ในกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ length distribution ของ small RNA แสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 13 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer

A, B และ C คือ RNA จากกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ



รูปที่ 14 Length distribution ของ small RNA ที่พบใน library

A, B และ C คือ RNA จากกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ

ตารางที่ 5 จำนวน reads ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบใน small RNA library ทั้ง 3 ชนิด

Type	NaCl	Poly IC	LPS
Total reads	22,723,132 (100%)	34,402,299 (100%)	14,949,095 (100%)
3'adapter null	973,169 (4.31%)	530,785 (100%)	427,489
Insert null	579,968 (2.57%)	260,160 (0.76%)	136,636 (0.91%)
5'adapter contaminants	169,349 (0.75%)	177,861 (0.52%)	66,322 (0.44%)
RNA smaller than 18 nt	1,688,816 (7.48%)	1,087,417 (3.16%)	401,970 (2.69%)
polyA	16 (0.00%)	42 (0.00%)	12 (0.00%)
Total clean reads	19,157,854 (84.89%)	32,346,034 (94.02%)	13,916,666 (93.09%)
Unique clean reads	509,371	888,863	451,521

ตารางที่ 6 ชนิดของ small RNA ที่พบใน small RNA library ทั้ง 3 ชนิด

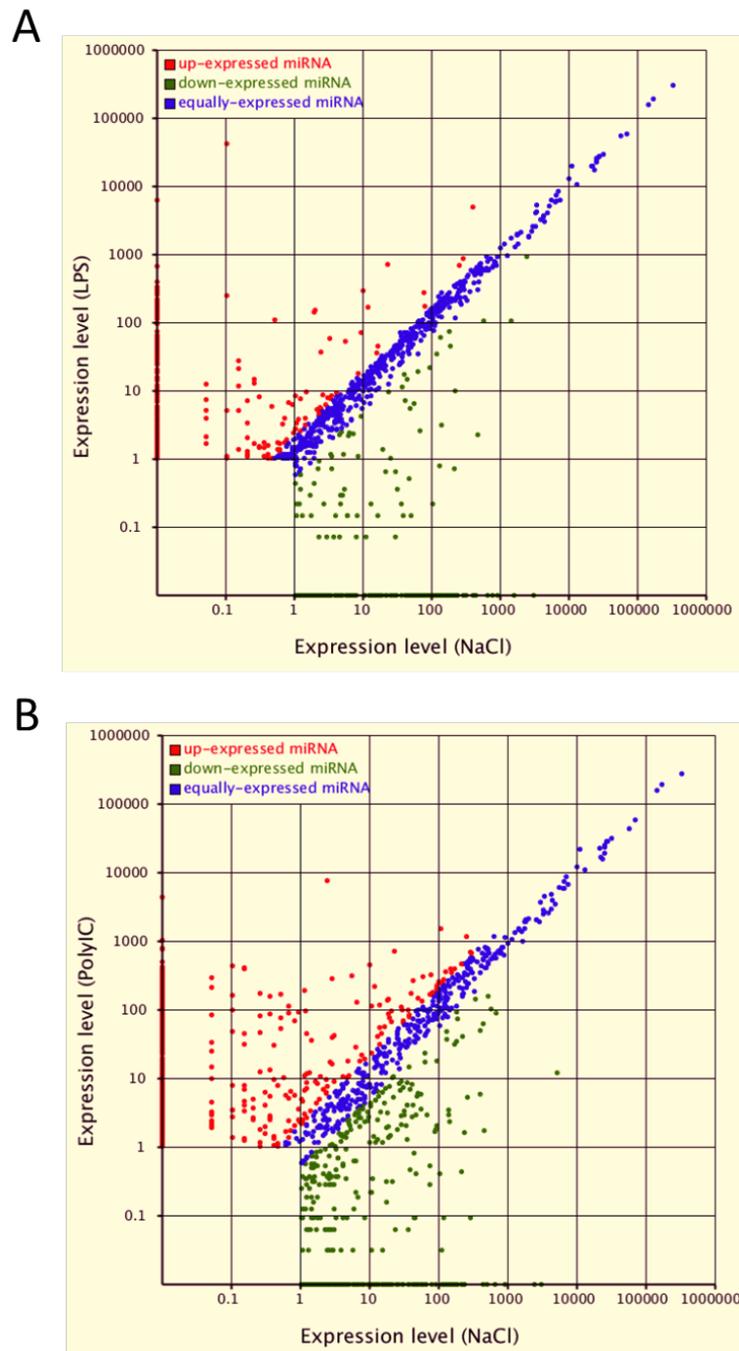
Category	NaCl	Poly IC	LPS
Unique small RNAs	509,371 (100%)	451,521 (100%)	888,863 (100%)
Intron antisense	40 (0.01%)	43 (0.01%)	73 (0.01%)
Intron sense	1,268 (0.25%)	1,145 (0.25%)	1,740 (0.20%)
Exon antisense	391 (0.08%)	391 (0.08%)	539 (0.06%)
Exon sense	558 (0.12%)	520 (0.16%)	766 (0.09%)
rRNA	58,325 (11.45%)	51,253 (11.35%)	103,789 (11.68%)
rRNA etc.	2,769 (0.54%)	2,344 (0.52%)	3,461 (0.39%)
snoRNA	328 (0.06%)	270 (0.06%)	1,324 (0.15%)
snRNA	667 (0.13%)	646 (0.14%)	1,120 (0.13%)
tRNA	11,919 (2.34%)	11,336 (2.51%)	22,065 (2.48%)
miRNA	1,723 (0.33%)	1,580 (0.34%)	1,933 (0.21%)
Unannotated	335,154 (65.0%)	297,352 (65.0%)	542,339 (61.0%)

### 3.2. การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของ small RNA ด้วยการนำลำดับของนิวคลีโอไทด์แบบ clean reads ที่พบใน library ทั้ง 3 ชนิดไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆ เช่น Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) และ NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เพื่อทำการแยก small RNA อื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้อง เช่น rRNA, snoRNA, tRNA, snRNA ออกจาก library จากนั้นนำข้อมูลส่วนที่เหลือ (remained reads) จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของ miRNA เพื่อทำการระบุชนิดของ miRNA พบว่า สามารถระบุ miRNA ได้ทั้งหมด 1580, 1933 และ 1723 ชนิดจากกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ และพบว่ามี unannotated reads อยู่ 297,352, 542,339 และ 335,154 ชนิดตามลำดับ ตารางที่ 6 แสดงชนิดของ small RNA ที่พบใน small RNA library ทั้ง 3 ชนิด

หลังจากที่ได้ชนิดของ miRNA ก็จะมาวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ (differential expression) เพื่อระบุชนิดของ miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งได้รับการฉีด LPS หรือ Poly IC โดยเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ LPS library กับ C พบว่ามี miRNA จำนวน 407 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 2 เท่า ( $\text{Log}_2$  LPS/C) เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยพบว่ามี miRNA 173 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี miRNA 234 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง รูปที่ 15A แสดง scattered plot ของ miRNA expression ในกลุ่ม LPS เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม C ตารางที่ 7 แสดง miRNA ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงสุด 10 อันดับแรกเมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS รายชื่อ miRNA ทั้งหมดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งได้รับการฉีด LPS แสดงในภาคผนวก

เมื่อเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ IC library กับ C พบว่ามี miRNA จำนวน 764 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 2 เท่า ( $\text{Log}_2$  IC/C) เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย IC โดยพบว่ามี miRNA 450 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี miRNA 314 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง รูปที่ 15B แสดง scattered plot ของ miRNA expression ในกลุ่ม LPS เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม C ตารางที่ 8 แสดง miRNA ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงสุด 10 อันดับแรกเมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย IC รายชื่อ miRNA ทั้งหมดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งได้รับการฉีด Poly IC แสดงในภาคผนวก



รูปที่ 15 Scattered plot แสดงการแสดงออกของ miRNA ที่เปลี่ยนไปเมื่อกึ่งได้รับการฉีด  
กระตุ้นด้วย (A) LPS และ (B) Poly IC

ตารางที่ 7 miRNA ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงที่สุด 10 อันดับแรกเมื่อถูก  
ฉีดกระตุ้นด้วย LPS

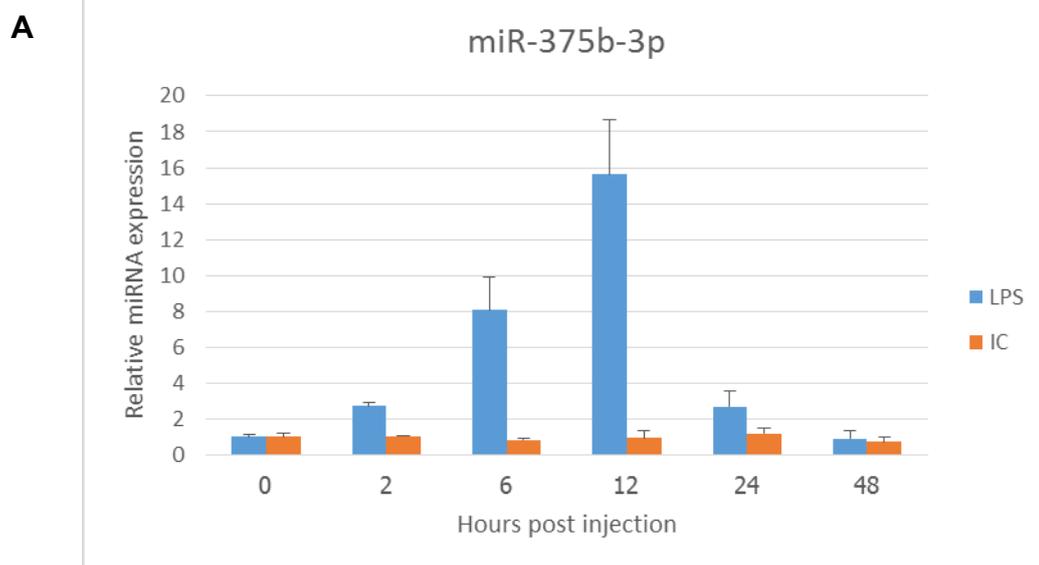
miRNAs	Sequence (5'→3')	Fold change (LPS vs NaCl)
Top 10 up-regulated		
miR-3689f	TTTGTTTCGTTCTTCCTGGGA	19.229
miR-375b-3p	TTTGTTTCGTTCTACTCGGTATG	18.595
miR-2970-5p	GAAGTCAAGCAACGTTGGGTCTGG	16.031
miR-9856-3p	GTTCCGGATTGGGGTGGG	15.260
miR-1842	ATTGGCTCTGAGGGTCGGGTCAG	15.013
miR-7911c-5p	GTCTCCCGGCCGATGCACCA	14.893
miR-1420e-5p	GTTTCGACACAGACTGTACTCATCT	14.761
miR-4970-5p	CTGGGAGCACCGATGCTGTTGGCG	14.626
miR-4634	CGGGCGACCGGACCGGGA	14.408
miR-7965-3p	TTTTGGTAAGCAGAACAGGCGCT	14.395
Top 10 down-regulated		
miR-1273c	GGCGACGAACGAGACTCTGG	-14.550
miR-309a-5p	ATGATGGATCGCTCGGCT	-14.847
miR-4984-3p	AAGTGTTTGACGATTCCTGG	-14.977
miR-609	CGGGAAGCGGGTGCGGGGC	-15.307
miR-4266	CTTAGTGAGGCCTTCGGACC	-15.429
miR-1502d-3p	ACTTACTCCCGGACGAGTGTCTGC	-16.015
miR-3277	TGGGCCAGTGTCTCTGAAATTCT	-16.257
miR-6078	CCGTTAAGCTAGCTGTGGT	-16.510
miR-1647	GCTCTCCTGTAAGGGTACTCT	-17.287
miR-7358-3p	AGTGTTGTCGCCACTTCCGGAC	-18.237

**ตารางที่ 8 miRNA ที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงที่สุด 10 อันดับแรกเมื่อถูก  
ฉีดกระตุ้นด้วย IC**

miRNAs	Sequence (5'→3')	Fold change (LPS vs NaCl)
Top 10 up-regulated		
miR-733	TGGGGTGTAGCTCAGTGGTT	18.740
miR-8932	TGTGCGGAGCGCTGAGAC	16.635
miR-242	TTTTTTTTGTTTGTGTTGT	16.618
miR-6416-5p	CTCCGATGTCGGCTCTTCT	16.254
miR-8192-3p	CGAACGAGACTCTGGCCTGC	16.219
miR-4260	GCTTGGGGATGTAGCCCA	15.603
miR-9312	AGACCATGTTGAGCTTGAC	15.344
miR-646	AAGGGTTGGCTCTGAGGGC	15.275
miR-3575	AATGCTGAGGTACGAGACGAG	15.211
miR-6327	ACAGACTGTAACCATCTC	15.177
Top 10 down-regulated		
miR-6512-5p	AACCATTAGAAGCTGGAACA	-14.195
miR-1586	AACCATTAGAAGCTGGAACA	-14.195
miR-9-2-5p	TGGTGATCTAGCTGTATGAA	-14.485
miR-1273c	GGCGACGAACGAGACTCTGG	-14.550
miR-4266	CTTAGTGAGGCCTTCGGACC	-15.430
miR-318-3p	TCACTGGGCTTTGTTTATCTC	-15.620
miR-1502d-3p	ACTTACTCCCGGACGAGTGTCTGC	-16.016
miR-6078	CCGTTAAGCTAGCTGTGGT	-16.511
miR-2786	AGGGATGCAGTGGCGAAAGGAATA	-17.905
miR-7358-3p	AGTGTGTGCGCCACTTCCGGAC	-18.237

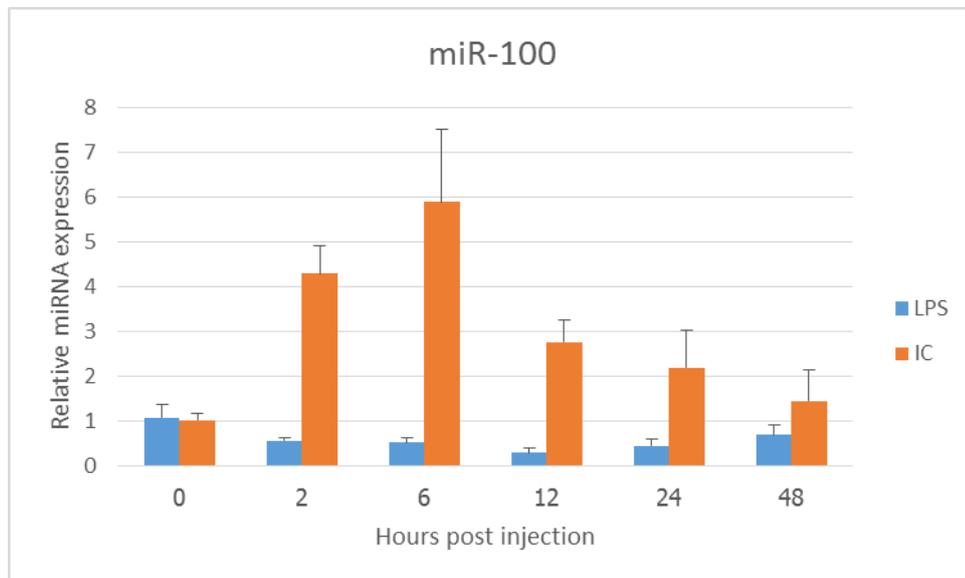
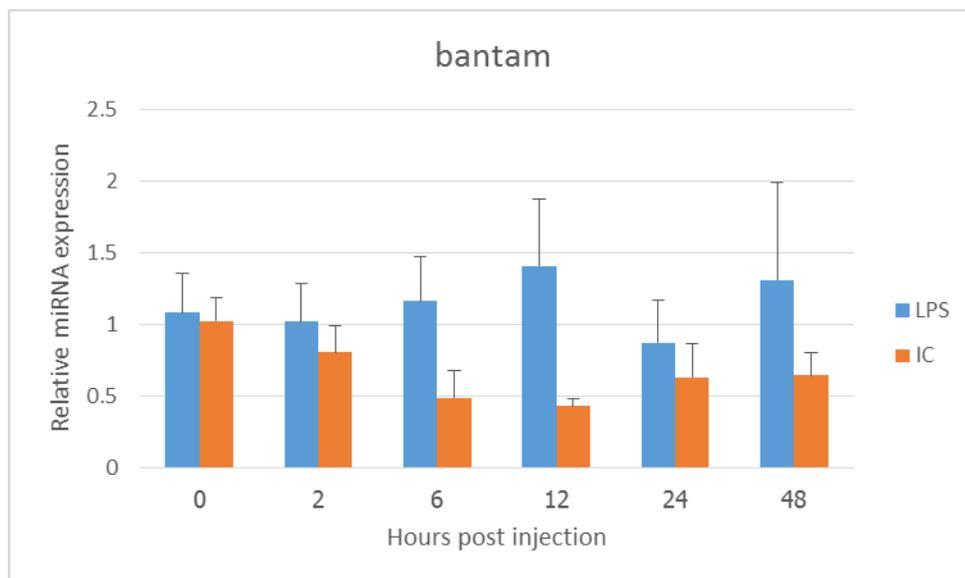
### 3.3. การตรวจยืนยันการแสดงออกของ miRNA ด้วย stem-loop qPCR

คัดเลือก miRNAs ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ Poly IC คือ miR-375b-3p, miR-100, let-7 และ bantam ด้วยเทคนิค stem-loop qPCR โดยดูการแสดงออกหลังจากกึ่งที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ Poly IC ไป 2 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ผลการแสดงออกของ miRNA ที่ตรวจสอบได้จาก stem-loop qPCR มีความสอดคล้องกับผลจาก sequencing โดยพบว่า miR-375b-3p มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกึ่งที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ let-7 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกึ่งที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Poly IC miR-100 มีการแสดงออกลดลงเมื่อกึ่งได้รับ LPS แต่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อกึ่งได้รับ Poly IC และ bantam มีการแสดงออกลดลงในกึ่งที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Poly IC แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในกึ่งที่ได้รับ LPS ดังรูปที่ 16

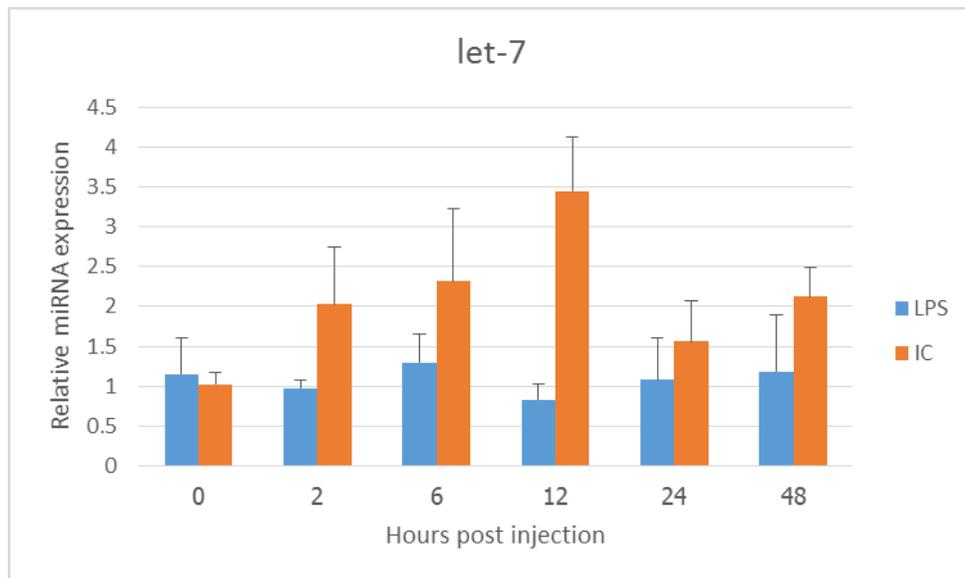


รูปที่ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของ miRNA ด้วยเทคนิค stem-loop qPCR

(A) miR3-75b-3p (B) miR-100 (C) bantam (D) let-7

**B****C**

รูปที่ 16 (ต่อ)

**D**

รูปที่ 16 (ต่อ)

## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

#### 4.1. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อ PAMPs ชนิด lipopolysaccharide (LPS) และ polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) จึงมีการสร้าง small RNA library จากกึ่งที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ poly IC และนำมาเปรียบเทียบกับ small RNA library ของกึ่งปกติที่ฉีดด้วย NaCl เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และ length distribution ของ small RNA ใน library ทั้ง 3 ชนิด คือ LPS, IC และ C ผลที่ได้พบว่า small RNA ใน library ส่วนใหญ่มีความยาว 22 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็นสัดส่วนอยู่ที่ 34.02%, 32.70% และ 31.77% ในกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษา miRNA ในกึ่งที่เหนี่ยวนำชนิดต่าง ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า miRNA ที่พบในกึ่ง มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นลักษณะของ miRNA ที่พบในสัตว์ (Huang et al., 2012; Kaewkascholkul et al., 2016; Li et al., 2017; Sun et al., 2016) ผลจากการวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศพบว่า สามารถระบุ miRNA ที่ตรงกับฐานข้อมูล miRBase ได้ทั้งหมด 1580, 1933 และ 1723 ชนิดจากกลุ่ม LPS, IC และ C ตามลำดับ และพบว่ามี unannotated reads อยู่ 297,352, 542,339 และ 335,154 ชนิด ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่าจะมี miRNA ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานอยู่ในส่วนของ unannotated reads ซึ่งต้องการการวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศขั้นสูงในการระบุ miRNA ดังกล่าว

เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs (differential expression analysis) จะเห็นได้ว่า miRNA มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อกึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS หรือ poly IC ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ระหว่างกลุ่ม LPS และ C พบว่ามี miRNA จำนวน 407 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 2 เท่า ( $\text{Log}_2 \text{LPS/C}$ ) พบว่า miRNA 173 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี miRNA 234 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง และเมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ระหว่างกลุ่ม IC และ C พบว่ามี miRNA จำนวน 764 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 2 เท่า ( $\text{Log}_2 \text{LPS/C}$ ) พบว่า miRNA 450 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี miRNA 314 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง แสดงให้เห็นว่า PAMPs

มีผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในกึ่งอย่างมีนัยยะสำคัญทั้งในแง่ของชนิดและระดับการแสดงออก และยังแสดงให้เห็นว่าชนิดของ PAMPs ที่ต่างกัน จะส่งผลให้รูปแบบการแสดงออกของ miRNA แตกต่างกันไปด้วย ดังที่แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของ miRNA ในกึ่งที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ poly IC มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน

เพื่อตรวจยืนยันผลของ high throughput sequencing ผู้วิจัยคัดเลือก miRNA มา 4 ชนิดได้แก่ คือ miR-375b-3p, miR-100, let-7 และ bantam มาตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค stem-loop qPCR ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ miRNA ที่ตรวจสอบได้จาก stem-loop qPCR มีความสอดคล้องกับผลจาก high throughput sequencing แสดงให้เห็นว่า library ที่สร้างขึ้นนั้นมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

miRNA ใน family ของ miR-375 ถูกค้นพบและมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆมากมาย โดยการศึกษาของ Poy และคณะ พบว่า miR-375 มีการแสดงออกมากในตับอ่อน และมีเป้าหมายเป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น caveolin1 (Cav1), inhibitor of DNA binding 3 (Id3), Smarca2, Ras-dexamethasone-induced-1 (Rasd1), regulator of G protein signaling 16 (Rgs16), eukaryotic elongation factor 1 epsilon 1 (Eef1e1), apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1 (Aifm1) และ cell adhesion molecule 1 (Cadm1) ดังนั้น miR-375 จึงทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเพิ่มจำนวนและการรักษาระดับของแอลฟาและเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออินสุลินของเบต้าเซลล์ รวมไปถึงการรักษาระดับของกลูโคส (Poy et al., 2009) มีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ miR-375 ในระบบภูมิคุ้มกัน Shafiee และคณะ รายงานว่า miR-375 เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเยื่อบุผิว โดยพบว่า miR-375 มีเป้าหมายเป็น lncRNA SOX2OT การยับยั้งการแสดงออกของเป้าหมายดังกล่าวส่งผลให้เกิดการลดการอักเสบที่เกิดจาก *Helicobacter pylori* (Shafiee, Aleyasin, Mowla, Vasei, & Yazdanparast, 2016) บทบาทของ miR-375 ที่เกี่ยวข้องกับ gut mucosal immunity มีการรายงานด้วยเช่นกัน (Biton et al., 2011) ในงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า miR-375b-3p มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อกึ่งก้ามกรามได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยจากผลของ high throughput sequencing พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นถึง 18.59 เท่า ( $\log_2$  LPS/C) อย่างไรก็ตามบทบาทของ miR-375 ในระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจ เนื่องจากยังไม่มีการระบุเป้าหมายของ miR-375

มีรายงานวิจัยชี้ให้เห็นว่า miR-100 ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง Yang และคณะพบว่า miR-100 ทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการ apoptosis ในกุ้งโดยยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย คือ trypsin (L. Yang et al., 2014) Wang และคณะ รายงานว่า พบว่า miR-100 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้ง *M. japonicus* ติดเชื้อ WSSV และ *Vibrio alginolyticus* การยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 ด้วย anti-miRNA oligonucleotide (AMO) พบว่ากุ้งมี phenoloxidase (PO) activity, superoxide dismutase (SOD) activity และ total hemocyte count (THC) ลดลง การยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 ยังส่งผลให้ลดการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อ WSSV แต่กลับเพิ่มอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* แสดงให้เห็นว่า miR-100 เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในบทบาทที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของ pathogen ที่มาก่อโรคในกุ้ง (Z. Wang & Zhu, 2017) ในงานวิจัยนี้พบว่า miR-100 มีการแสดงออกลดลงเมื่อกุ้งได้รับ LPS แต่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อกุ้งได้รับ Poly IC แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ miR-100 ที่แตกต่างกันไปเมื่อกุ้งได้รับการกระตุ้นด้วย PAMPs ที่ต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตามการระบุเป้าหมายของ miR-100 ในกุ้งก้ามกราม จะช่วยให้เข้าใจหน้าที่ของ miR-100 ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากขึ้น

Bantam เป็น miRNA ที่มีความอนุรักษ์ในสัตว์กลุ่ม arthropods และยังพบว่าทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่างๆมากมาย ความเกี่ยวข้องของ bantam กับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีรายงานพบว่า การติดเชื้อปรสิตทำให้การแสดงออกของ bantam ลดลงมากใน *Plutella xylostella* (Etebari, Hussain, & Asgari, 2013) จากการศึกษาของ Kaewkascholkul และคณะพบว่า การแสดงออกของ bantam ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อ WSSV แต่อย่างไรก็ตามพบว่า bantam มีเป้าหมายเป็นยีน Serine protease inhibitor *KuSPI* ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ coagulation, fibrinolysis และ immune response ในกุ้ง (Kaewkascholkul et al., 2016) ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยพบว่า bantam มีการแสดงออกลดลงในกุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Poly IC แต่อย่างไรก็ตามการระบุเป้าหมายของ bantam ในกุ้งก้ามกราม จะช่วยให้เข้าใจหน้าที่ของ bantam ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากขึ้น

Let-7 เป็น miRNA ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ innate immune response (Jiang, 2018) มีรายงานวิจัยใน mammalian พบว่า let-7 ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบผ่านทางกระบวนการแสดงออกของยีน TLR-4 ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ส่งผลให้ let-7 มีการแสดงออกลดลง ส่งผลให้ TLR-4 มีการ

แสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Chen, Splinter, O'Hara, & LaRusso, 2007) มีรายงานวิจัยว่า การติดเชื้อ *H. pylori* ยังมีผลให้ let-7 มีการแสดงออกลดลง ส่งผลให้ TLR-4 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และยังทำให้เกิดการกระตุ้น NF-KB อีกด้วย (Teng et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า let-7 ควบคุม bactericidal และ phagocytic activities ของ macrophages อีกด้วย (Banerjee et al., 2013) จากการศึกษาของ Yang และคณะพบว่า let-7 ยังมีส่วนในการควบคุมระบบ prophenoloxidase system ในกุ้ง (G. Yang, Yang, Zhao, Wang, & Zhang, 2012) และ Kaewkascholkul พบว่า let-7 มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อกุ้งก้ามกรามติดเชื้อ WSSV (Kaewkascholkul et al., 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่า let-7 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกุ้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Poly IC แต่อย่างไรก็ตามการระบุเป้าหมายของ Poly IC ในกุ้งก้ามกราม จะช่วยให้เข้าใจหน้าที่ของ let-7 ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากขึ้น

โดยสรุป ในงานวิจัยนี้สร้าง small RNA library และวิเคราะห์ด้วย high-throughput sequencing เพื่อระบุ miRNA ที่ตอบสนองต่อ LPS และ poly IC ซึ่งเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ poly IC กับ NaCl พบว่ามี miRNAs หลายชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญ การระบุเป้าหมายของ miRNAs เหล่านี้ในกุ้งก้ามกราม จะช่วยให้เข้าใจหน้าที่ของ miRNA ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากขึ้น

#### 4.2. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ในงานวิจัยนี้ พบว่ามี miRNAs หลายชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อกุ้งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ poly IC การระบุเป้าหมายของ miRNAs เหล่านี้ในกุ้งก้ามกราม จะช่วยให้เข้าใจหน้าที่ของ miRNA ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามมากขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol*, *34*(4), 990-1001. doi: 10.1016/j.fsi.2012.08.019
- An, M. Y., Gao, J., Zhao, X. F., & Wang, J. X. (2016). A new subfamily of penaeidin with an additional serine-rich region from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) contributes to antimicrobial and phagocytic activities. *Dev Comp Immunol*, *59*, 186-198. doi: 10.1016/j.dci.2016.02.001
- Banerjee, S., Xie, N., Cui, H. C., Tan, Z., Yang, S. Z., Icyuz, M., . . . Liu, G. (2013). MicroRNA let-7c Regulates Macrophage Polarization. *Journal of Immunology*, *190*(12), 6542-6549. doi: 10.4049/jimmunol.1202496
- Biton, M., Levin, A., Slyper, M., Alkalay, I., Horwitz, E., Mor, H., . . . Ben-Neriah, Y. (2011). Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nat Immunol*, *12*(3), 239-246. doi: 10.1038/ni.1994
- Bose, M., & Bhattacharyya, S. N. (2016). Target-dependent biogenesis of cognate microRNAs in human cells. *Nat Commun*, *7*, 12200. doi: 10.1038/ncomms12200
- Chen, X. M., Splinter, P. L., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2007). A cellular Micro-RNA, let-7i, regulates toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(39), 28929-28938. doi: 10.1074/jbc.M702633200
- Donpuksa, S., Visetnan, S., Supungul, P., Tang, S., Tassanakajon, A., & Rimphanitchayakit, V. (2014). Type I and type II crustins from *Penaeus monodon*, genetic variation and antimicrobial activity of the most abundant crustinPm4. *Dev Comp Immunol*, *47*(1), 95-103. doi: 10.1016/j.dci.2014.06.015
- Etebari, K., Hussain, M., & Asgari, S. (2013). Identification of microRNAs from *Plutella xylostella* larvae associated with parasitization by *Diadegma semiclausum*. *Insect Biochem Mol Biol*, *43*(4), 309-318. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.01.004
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(1), 51-68. doi: 10.3109/10409238.2012.738643
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, *19*(1), 92-105. doi: 10.1101/gr.082701.108
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7
- Hammond, S. M. (2006). MicroRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *16*(1), 4-9. doi: 10.1016/j.gde.2005.12.005
- Huang, T. Z., Xu, D. D., & Zhang, X. B. (2012). Characterization of host microRNAs that respond to DNA virus infection in a crustacean. *Bmc Genomics*, *13*. doi: Artn 15910.1186/1471-2164-13-159
- Jiang, S. (2018). Recent findings regarding let-7 in immunity. *Cancer Letters*, *434*, 130-131. doi: 10.1016/j.canlet.2018.07.027

- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Soderhall, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, *211*(4), 213-236. doi: 10.1016/j.imbio.2005.10.015
- Kaewkascholkul, N., Somboonviwat, K., Asakawa, S., Hirono, I., Tassanakajon, A., & Somboonwiwat, K. (2016). Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol*, *60*, 191-201. doi: 10.1016/j.dci.2016.03.002
- Labreuche, Y., & Warr, G. W. (2013). Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, *34*(4), 1002-1010. doi: 10.1016/j.fsi.2012.06.008
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Li, X., Meng, X., Luo, K., Luan, S., Shi, X., Cao, B., & Kong, J. (2017). The identification of microRNAs involved in the response of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to white spot syndrome virus infection. *Fish Shellfish Immunol*, *68*, 220-231. doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.060
- Maningas, M. B., Kondo, H., & Hirono, I. (2013). Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish Shellfish Immunol*, *34*(4), 968-972. doi: 10.1016/j.fsi.2012.09.018
- Muljo, S. A., Kanellopoulou, C., & Aravind, L. (2010). MicroRNA targeting in mammalian genomes: genes and mechanisms. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, *2*(2), 148-161. doi: 10.1002/wsbm.53
- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., . . . Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(14), 5813-5818. doi: 10.1073/pnas.0810550106
- Shafiee, M., Aleyasin, S. A., Mowla, S. J., Vasei, M., & Yazdanparast, S. A. (2016). The Effect of MicroRNA-375 Overexpression, an Inhibitor of Helicobacter pylori-Induced Carcinogenesis, on lncRNA SOX2OT. *Jundishapur J Microbiol*, *9*(9), e23464. doi: 10.5812/jjm.23464
- Shu, L., Li, C., & Zhang, X. (2016). The role of shrimp miR-965 in virus infection. *Fish Shellfish Immunol*, *54*, 427-434. doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.129
- Sun, X., Liu, Q. H., Yang, B., & Huang, J. (2016). Differential expression of microRNAs of *Litopenaeus vannamei* in response to different virulence WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol*, *58*, 18-23. doi: 10.1016/j.fsi.2016.08.062
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev Comp Immunol*, *80*, 81-93. doi: 10.1016/j.dci.2017.05.009
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol*, *34*(4), 954-967. doi: 10.1016/j.fsi.2012.09.021
- Teng, G. G., Wang, W. H., Dai, Y., Wang, S. J., Chu, Y. X., & Li, J. (2013). Let-7b Is Involved in the Inflammation and Immune Responses Associated with Helicobacter pylori

- Infection by Targeting Toll-Like Receptor 4. *PLoS One*, 8(2). doi: ARTN e5670910.1371/journal.pone.0056709
- Vella, M. C., Choi, E. Y., Lin, S. Y., Reinert, K., & Slack, F. J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev*, 18(2), 132-137. doi: 10.1101/gad.1165404
- Wang, X. W., & Wang, J. X. (2013). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol*, 34(4), 981-989. doi: 10.1016/j.fsi.2012.08.008
- Wang, Z., & Zhu, F. (2017). MicroRNA-100 is involved in shrimp immune response to white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection. *Scientific Reports*, 7. doi: Artn 4233410.1038/Srep42334
- Xu, D., Liu, W., Alvarez, A., & Huang, T. (2014). Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. *Dev Comp Immunol*, 47(2), 287-297. doi: 10.1016/j.dci.2014.08.004
- Yang, G., Yang, L., Zhao, Z., Wang, J., & Zhang, X. (2012). Signature miRNAs involved in the innate immunity of invertebrates. *PLoS One*, 7(6), e39015. doi: 10.1371/journal.pone.0039015
- Yang, L., Yang, G., & Zhang, X. (2014). The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 40(1), 146-153. doi: 10.1016/j.fsi.2014.06.019
- Zhan, W. B., Wei, X. M., Xing, J., & Zhang, Z. D. (2008). Characterization of monoclonal antibodies to haemocyte types of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Crustaceana*, 81(8), 931-942. doi: 10.1163/156854008X354993

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 1. ผลงานวิจัยในรูปแบบ proceeding

รัตติกรณ์ ธรรมสอน, รัตน์สุตา ยะป้อม และ อำนาจ เพชรรุ่งนภา. การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอของกุ้งก้ามกรามเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS. งานประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 4 วันที่ 23 มีนาคม พ.ศ. 2561 ณ ศูนย์วัฒนธรรมภาคเหนือตอนล่าง จังหวัดพิษณุโลก. หน้า 365-372

### 2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสาร Fish and Shellfish Immunology (quartile 1, impact factor 3.185)

## ภาคผนวก 1

**miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS**

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-3689f	0	85546	0.01	6147.0183	19.22952725	0
miR-375b-3p	2	575674	0.1044	41365.7984	18.59595719	0
miR-2970-5p	0	9321	0.01	669.7725	16.03138352	0
miR-9856-3p	0	5464	0.01	392.6228	15.26085633	0
miR-1842	0	4603	0.01	330.7545	15.01347316	0
miR-7911c-5p	0	4235	0.01	304.3114	14.89326076	0
miR-1420e-5p	0	3866	0.01	277.7964	14.76174028	0
miR-4970-5p	0	3521	0.01	253.006	14.62688398	0
miR-4634	0	3026	0.01	217.4371	14.4083105	0
miR-7965-3p	0	2999	0.01	215.497	14.39538016	0
miR-2117	0	2868	0.01	206.0838	14.33094348	0
miR-7149-5p	0	2677	0.01	192.3593	14.23151596	0
miR-3187-3p	0	2563	0.01	184.1677	14.16873244	0
miR-460b-3p	0	2421	0.01	173.9641	14.086502	0
miR-511-5p	0	2329	0.01	167.3533	14.03060938	0
miR-8491	0	2266	0.01	162.8264	13.99104701	0
miR-4666a-5p	0	2165	0.01	155.5689	13.92526606	0
miR-2852	0	2011	0.01	144.503	13.81881182	0
miR-9380-5p	0	2006	0.01	144.1437	13.81522016	0
miR-6789-3p	0	1924	0.01	138.2515	13.75500751	0
miR-6989-3p	0	1858	0.01	133.509	13.70464938	0
miR-6596-5p	0	1749	0.01	125.6767	13.61742958	0
miR-8052	0	1616	0.01	116.1198	13.50332637	0
miR-4008a-5p	0	1604	0.01	115.2575	13.49257301	0
miR-750-5p	0	1566	0.01	112.527	13.45798359	0
miR-9312	0	1349	0.01	96.9341	13.24278856	0
miR-2817	0	1337	0.01	96.0719	13.2298988	0
miR-1644	0	1029	0.01	73.9401	12.85214128	0
miR-80-5p	0	900	0.01	64.6707	12.65889651	0
miR-33	0	881	0.01	63.3054	12.62811285	0
miR-82-3p	0	868	0.01	62.3713	12.60666661	0
miR-8411-5p	0	831	0.01	59.7126	12.54381967	3.18E-313
miR-4510	0	782	0.01	56.1916	12.45613876	8.43E-295
miR-5334	0	757	0.01	54.3952	12.40926363	2.11E-285
miR-4133-3p	0	753	0.01	54.1078	12.40162087	6.74E-284
miR-2131-3p	0	730	0.01	52.4551	12.35686733	2.99E-275
miR-4169-3p	0	728	0.01	52.3114	12.35290967	1.69E-274
miR-222b-5p	0	720	0.01	51.7365	12.33696674	1.72E-271
miR-6851-5p	0	671	0.01	48.2156	12.23528429	4.54E-253
miR-3830-5p	0	630	0.01	45.2695	12.14432366	1.18E-237
miR-4156-3p	0	616	0.01	44.2635	12.11190182	2.16E-232
miR-8476-5p	0	615	0.01	44.1916	12.10955645	5.14E-232
miR-514a-5p	0	580	0.01	41.6766	12.02502187	7.40E-219
miR-5358a-5p	0	558	0.01	40.0958	11.96923541	1.38E-210
miR-5883	0	529	0.01	38.012	11.89223922	1.10E-199
miR-10d-5p	0	491	0.01	35.2814	11.78469209	2.14E-185
miR-7340-3p	0	491	0.01	35.2814	11.78469209	2.14E-185
miR-3473d	0	470	0.01	33.7725	11.72163326	1.68E-177
miR-688	0	450	0.01	32.3353	11.65889428	5.54E-170
miR-6820-3p	0	424	0.01	30.4671	11.57303647	3.30E-160
miR-6121-3p	0	390	0.01	28.024	11.45244718	2.00E-147
miR-309b-3p	0	359	0.01	25.7964	11.33295403	9.04E-136
miR-1402	0	338	0.01	24.2874	11.24599234	7.10E-128
miR-342	2	3407	0.1044	244.8144	11.19535099	0
miR-222a-5p	0	284	0.01	20.4072	10.99486253	1.42E-107
miR-5974	0	271	0.01	19.4731	10.92726686	1.10E-102
miR-204-2-3p	0	261	0.01	18.7545	10.87302109	6.31E-99
miR-3612	0	253	0.01	18.1796	10.82810474	6.42E-96
miR-755-3p	0	219	0.01	15.7365	10.61989899	3.89E-83
miR-922	0	215	0.01	15.4491	10.59330708	1.24E-81
miR-6762-5p	0	210	0.01	15.0898	10.55935797	9.41E-80
miR-8364f-3p	0	194	0.01	13.9401	10.4450252	9.75E-74
miR-6239	0	167	0.01	12	10.22881869	1.38E-63
miR-13b	0	152	0.01	10.9222	10.09304776	6.02E-58
miR-7964a-3p	0	141	0.01	10.1317	9.98466055	8.22E-54
miR-8837	0	134	0.01	9.6287	9.91119722	3.52E-51

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-190b-3p	0	129	0.01	9.2695	9.85634771	2.67E-49
miR-8541	0	128	0.01	9.1976	9.84511365	6.34E-49
miR-9107	0	121	0.01	8.6946	9.76397585	2.72E-46
miR-36e-5p	0	107	0.01	7.6886	9.58657711	4.98E-41
miR-3896-5p	0	100	0.01	7.1856	9.48896482	2.13E-38
miR-365-1-5p	0	99	0.01	7.1138	9.4744766	5.07E-38
miR-644a	0	94	0.01	6.7545	9.39970517	3.85E-36
miR-9306	0	82	0.01	5.8922	9.20266259	1.25E-31
miR-323a	0	78	0.01	5.6048	9.13051908	3.98E-30
miR-281a	0	73	0.01	5.2455	9.03493649	3.02E-28
miR-4458	0	72	0.01	5.1737	9.01505259	7.18E-28
miR-4110-5p	0	65	0.01	4.6707	8.86749497	3.07E-25
miR-4488	0	64	0.01	4.5988	8.84511365	7.31E-25
miR-1269	0	59	0.01	4.2395	8.72775032	5.54E-23
miR-2353	0	53	0.01	3.8084	8.5730412	9.98E-21
miR-3592	0	53	0.01	3.8084	8.5730412	9.98E-21
miR-2170	0	51	0.01	3.6647	8.51755129	5.64E-20
miR-6728-3p	0	51	0.01	3.6647	8.51755129	5.64E-20
miR-4451	0	49	0.01	3.521	8.45984142	3.19E-19
miR-2461-5p	0	48	0.01	3.4491	8.43007615	7.57E-19
miR-1384	0	43	0.01	3.0898	8.27136965	5.74E-17
miR-7428-3p	0	43	0.01	3.0898	8.27136965	5.74E-17
miR-6750-3p	0	39	0.01	2.8024	8.13051908	1.83E-15
miR-205-3p	0	38	0.01	2.7305	8.09302135	4.35E-15
miR-2374	0	38	0.01	2.7305	8.09302135	4.35E-15
miR-6717-5p	0	38	0.01	2.7305	8.09302135	4.35E-15
miR-18b-5p	0	35	0.01	2.515	7.97441459	5.84E-14
miR-1903	0	34	0.01	2.4431	7.93256911	1.39E-13
miR-7307-5p	0	33	0.01	2.3713	7.88953438	3.30E-13
miR-1268a	1	172	0.0522	12.3593	7.88733151	1.84E-63
miR-5738-3p	0	32	0.01	2.2994	7.84511365	7.84E-13
miR-1755	0	30	0.01	2.1557	7.75201261	4.43E-12
miR-1786	0	30	0.01	2.1557	7.75201261	4.43E-12
miR-3656	10	1520	0.522	109.2216	7.70899267	0
miR-1827	0	29	0.01	2.0838	7.70307301	1.05E-11
miR-101c	0	28	0.01	2.012	7.65248649	2.50E-11
miR-450-3p	0	28	0.01	2.012	7.65248649	2.50E-11
miR-6390	0	27	0.01	1.9401	7.59998721	5.95E-11
miR-7549	0	27	0.01	1.9401	7.59998721	5.95E-11
miR-9212	0	27	0.01	1.9401	7.59998721	5.95E-11
miR-3761	0	26	0.01	1.8683	7.54558232	1.41E-10
miR-6509-5p	0	26	0.01	1.8683	7.54558232	1.41E-10
miR-8842	0	25	0.01	1.7964	7.48896482	3.36E-10
miR-8859b	0	25	0.01	1.7964	7.48896482	3.36E-10
miR-107b	3	380	0.1566	27.3054	7.44595827	2.11E-137
miR-3850-3p	0	24	0.01	1.7246	7.43011797	7.98E-10
miR-8498	0	24	0.01	1.7246	7.43011797	7.98E-10
miR-350-5p	0	23	0.01	1.6527	7.36868106	1.90E-09
miR-3422	0	21	0.01	1.509	7.237449	1.07E-08
miR-4737	0	21	0.01	1.509	7.237449	1.07E-08
miR-8301-3p	0	20	0.01	1.4371	7.16701664	2.55E-08
miR-3115	1	103	0.0522	7.4012	7.14756559	9.74E-38
miR-6652-5p	0	19	0.01	1.3653	7.09307418	6.05E-08
miR-2944	3	289	0.1566	20.7665	7.05103006	1.52E-103
miR-1843b-5p	0	18	0.01	1.2934	7.01502471	1.44E-07
miR-4871-3p	0	18	0.01	1.2934	7.01502471	1.44E-07
miR-7442-5p	0	18	0.01	1.2934	7.01502471	1.44E-07
miR-182-3p	0	17	0.01	1.2216	6.93262816	3.42E-07
miR-4187-5p	0	17	0.01	1.2216	6.93262816	3.42E-07
miR-5434	0	17	0.01	1.2216	6.93262816	3.42E-07
miR-4018b-5p	0	16	0.01	1.1497	6.84511365	8.12E-07
miR-8896	0	15	0.01	1.0778	6.75194568	1.93E-06
miR-1287-5p	0	14	0.01	1.006	6.65248649	4.59E-06
miR-5407-3p	0	14	0.01	1.006	6.65248649	4.59E-06
miR-7933-5p	0	14	0.01	1.006	6.65248649	4.59E-06
miR-3126-5p	1	72	0.0522	5.1737	6.63100278	3.11E-26

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-19b	3	164	0.1566	11.7844	6.23365028	2.83E-57
miR-10b-3p	1	54	0.0522	3.8802	6.2159374	1.38E-19
miR-7063-5p	39	2075	2.0357	149.1018	6.1946289	0
miR-9852-3p	38	1947	1.9835	139.9042	6.14024707	0
miR-9825-5p	5	204	0.261	14.6587	5.81156355	3.65E-69
miR-937-5p	5	179	0.261	12.8623	5.62295503	4.84E-60
miR-130a-3p	2	70	0.1044	5.0299	5.5903361	3.65E-24
miR-2765	1	29	0.0522	2.0838	5.3190232	1.93E-10
miR-30b	4	98	0.2088	7.0419	5.07577112	6.18E-32
miR-1371	3	70	0.1566	5.0299	5.0053736	5.27E-23
miR-129a-5p	1	23	0.0522	1.6527	4.98463125	2.83E-08
miR-2287	445	9815	23.2281	705.2695	4.9242316	0
miR-7174-5p	197	4072	10.283	292.5988	4.83059072	0
miR-92	6	112	0.3132	8.0479	4.68345626	8.95E-35
miR-27a	64	797	3.3407	57.2695	4.09954467	7.28E-218
miR-124b-3p	4	47	0.2088	3.3772	4.015634	5.82E-14
miR-4755-3p	47	502	2.4533	36.0719	3.87807985	3.84E-132
miR-57-5p	230	2319	12.0055	166.6347	3.79492146	0
miR-6653-3p	9	82	0.4698	5.8922	3.64868778	8.63E-22
miR-1c-3p	7668	67612	400.2536	4858.3475	3.6014794	0
miR-203b-3p	2	15	0.1044	1.0778	3.36789587	0.00010792
miR-263b	2	14	0.1044	1.006	3.26843669	0.00022919
miR-29c	4	28	0.2088	2.012	3.26843669	1.27E-07
miR-569	106	729	5.533	52.3832	3.24297037	2.73E-163
miR-263b-5p	3	19	0.1566	1.3653	3.12406187	2.31E-05
miR-6873-3p	16	93	0.8352	6.6826	3.0002159	1.17E-20
miR-409a-3p	20	115	1.044	8.2635	2.98463125	4.47E-25
miR-928	184	982	9.6044	70.5629	2.87714246	3.41E-194
miR-305	18	86	0.9396	6.1796	2.71739484	1.98E-17
miR-381	5	23	0.261	1.6527	2.66270316	1.71E-05
miR-8528a	29	132	1.5137	9.485	2.64756847	2.92E-25
miR-2f-3p	4	18	0.2088	1.2934	2.6309749	0.00016649
miR-6505-3p	24	104	1.2527	7.4731	2.57666587	1.21E-19
miR-236-3p	4	16	0.2088	1.1497	2.46106384	0.00064653
miR-1587	14	55	0.7308	3.9521	2.43507091	1.98E-10
miR-139	4	15	0.2088	1.0778	2.36789587	0.00125643
miR-2682-5p	4	15	0.2088	1.0778	2.36789587	0.00125643
miR-146c-5p	6	21	0.3132	1.509	2.26843669	0.00018626
miR-4736	13	45	0.6786	3.2335	2.25246328	4.23E-08
miR-146b	7	24	0.3654	1.7246	2.23871325	7.24E-05
miR-200-3p	6	20	0.3132	1.4371	2.19800434	0.00035114
miR-8071	3648	629	190.418	45.1976	-2.07485179	0
miR-2569-5p	1816	299	94.7914	21.485	-2.1414264	6.59E-171
miR-5463	101	16	5.272	1.1497	-2.19709291	3.68E-11
miR-8336-3p	38	6	1.9835	0.4311	-2.20195393	6.35E-05
miR-142-5p	68	10	3.5495	0.7186	-2.30435497	2.69E-08
miR-152	21	3	1.0962	0.2156	-2.34608196	0.00249634
miR-449b	23	3	1.2006	0.2156	-2.47732649	0.00104944
miR-965	11132	1451	581.0672	104.2635	-2.47847082	0
miR-27a-3p	796	100	41.5495	7.1856	-2.53165058	3.98E-92
miR-4104-5p	33	4	1.7225	0.2874	-2.58337202	4.71E-05
miR-4164-3p	21	2	1.0962	0.1437	-2.93137907	0.00066766
miR-46-3p	163	15	8.5083	1.0778	-2.98078141	1.74E-23
miR-6960-5p	1081	90	56.4259	6.4671	-3.1251667	2.71E-154
miR-4121-3p	940	76	49.066	5.4611	-3.16746018	4.54E-136
miR-574-3p	25	2	1.3049	0.1437	-3.18280728	0.00010114
miR-219a	34	2	1.7747	0.1437	-3.6264432	1.28E-06
miR-81	52	3	2.7143	0.2156	-3.6541511	1.20E-09
miR-200b-5p	27857	1461	1454.0773	104.982	-3.79189007	0
miR-222a-3p	378	19	19.7308	1.3653	-3.85315956	2.71E-65
miR-694	103	5	5.3764	0.3593	-3.90337964	7.15E-19
miR-3802-5p	91	4	4.75	0.2874	-4.04679555	3.37E-17
miR-323a-5p	99	4	5.1676	0.2874	-4.16836244	5.88E-19
miR-1777a	91	3	4.75	0.2156	-4.46149843	3.28E-18
miR-202-3p	4223	138	220.4318	9.9162	-4.47440119	0
miR-1268	491	14	25.6292	1.006	-4.67108624	1.65E-95

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-996-3p	1321	36	68.9534	2.5868	-4.73638127	1.93E-256
miR-3787	77	2	4.0192	0.1437	-4.8057764	3.69E-16
miR-574	44	1	2.2967	0.0719	-4.99742684	8.49E-10
miR-43e-3p	412	9	21.5055	0.6467	-5.05546525	1.05E-83
miR-7016-5p	57	1	2.9753	0.0719	-5.37089956	8.94E-13
miR-223	114	2	5.9506	0.1437	-5.37190318	1.32E-24
miR-92c	115	2	6.0028	0.1437	-5.38450364	7.75E-25
miR-10c	2691	43	140.4646	3.0898	-5.50654932	0
miR-133b	586	9	30.588	0.6467	-5.56372536	1.30E-123
miR-451	73	1	3.8104	0.0719	-5.72780688	1.82E-16
miR-4127-3p	159	2	8.2995	0.1437	-5.85189246	5.35E-35
miR-2137	254	3	13.2583	0.2156	-5.94239481	1.44E-55
miR-34a	88	1	4.5934	0.0719	-5.99742684	6.02E-20
miR-6763-5p	607	5	31.6841	0.3593	-6.46242629	1.24E-134
miR-129b-5p	908	7	47.3957	0.503	-6.55805397	1.34E-201
miR-1649-5p	20	0	1.044	0.01	-6.7059779	2.09E-05
miR-8516	20	0	1.044	0.01	-6.7059779	2.09E-05
miR-1016-5p	21	0	1.0962	0.01	-6.77636723	1.21E-05
miR-2462	21	0	1.0962	0.01	-6.77636723	1.21E-05
miR-7186-5p	21	0	1.0962	0.01	-6.77636723	1.21E-05
miR-276	156	1	8.1429	0.0719	-6.8234071	7.86E-36
miR-1199-5p	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-1685-3p	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-2733i-5p	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-2772b	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-2856-5p	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-3091-5p	22	0	1.1484	0.01	-6.84348143	7.03E-06
miR-2861	319	2	16.6511	0.1437	-6.85641361	2.39E-72
miR-2982	23	0	1.2006	0.01	-6.90761177	4.07E-06
miR-3741	23	0	1.2006	0.01	-6.90761177	4.07E-06
miR-650	23	0	1.2006	0.01	-6.90761177	4.07E-06
miR-8226-5p	23	0	1.2006	0.01	-6.90761177	4.07E-06
miR-9277	23	0	1.2006	0.01	-6.90761177	4.07E-06
miR-4506	24	0	1.2527	0.01	-6.96889715	2.36E-06
miR-6127	24	0	1.2527	0.01	-6.96889715	2.36E-06
miR-7405-3p	24	0	1.2527	0.01	-6.96889715	2.36E-06
miR-8528b	24	0	1.2527	0.01	-6.96889715	2.36E-06
miR-511-3p	26	0	1.3571	0.01	-7.08438323	7.91E-07
miR-3888-5p	28	0	1.4615	0.01	-7.19130602	2.65E-07
miR-6010-5p	28	0	1.4615	0.01	-7.19130602	2.65E-07
miR-7021-3p	28	0	1.4615	0.01	-7.19130602	2.65E-07
miR-745a	28	0	1.4615	0.01	-7.19130602	2.65E-07
miR-1719	29	0	1.5137	0.01	-7.24193549	1.54E-07
miR-8503	29	0	1.5137	0.01	-7.24193549	1.54E-07
miR-5624-5p	214	1	11.1704	0.0719	-7.27947337	1.89E-49
miR-4943-5p	30	0	1.5659	0.01	-7.29084828	8.90E-08
miR-3028	31	0	1.6181	0.01	-7.33815695	5.16E-08
miR-9275	31	0	1.6181	0.01	-7.33815695	5.16E-08
miR-100d	32	0	1.6703	0.01	-7.38396342	2.99E-08
miR-3473f	32	0	1.6703	0.01	-7.38396342	2.99E-08
miR-4117-5p	32	0	1.6703	0.01	-7.38396342	2.99E-08
miR-5136	32	0	1.6703	0.01	-7.38396342	2.99E-08
miR-44-3p	2549	11	133.0525	0.7904	-7.39519696	0
miR-3202	708	3	36.9561	0.2156	-7.42131154	6.55E-162
miR-9826-5p	34	0	1.7747	0.01	-7.47143135	1.00E-08
miR-5701	35	0	1.8269	0.01	-7.51325384	5.80E-09
miR-8338-5p	35	0	1.8269	0.01	-7.51325384	5.80E-09
miR-2371	36	0	1.8791	0.01	-7.55389802	3.36E-09
miR-6557-5p	36	0	1.8791	0.01	-7.55389802	3.36E-09
miR-1976	37	0	1.9313	0.01	-7.59342847	1.95E-09
miR-8308-3p	40	0	2.0879	0.01	-7.70590881	3.78E-10
miR-6092	9072	31	473.5395	2.2275	-7.73191552	0
miR-6060	41	0	2.1401	0.01	-7.74153441	2.19E-10
miR-7108-5p	41	0	2.1401	0.01	-7.74153441	2.19E-10
miR-7b-5p	41	0	2.1401	0.01	-7.74153441	2.19E-10
miR-299b-3p	42	0	2.1923	0.01	-7.77630143	1.27E-10

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-1648-5p	44	0	2.2967	0.01	-7.84341862	4.26E-11
miR-2375	44	0	2.2967	0.01	-7.84341862	4.26E-11
miR-3879-5p	45	0	2.3489	0.01	-7.8758415	2.47E-11
miR-7169-3p	45	0	2.3489	0.01	-7.8758415	2.47E-11
miR-8282a-3p	45	0	2.3489	0.01	-7.8758415	2.47E-11
miR-8117	46	0	2.4011	0.01	-7.90755169	1.43E-11
miR-4507	47	0	2.4533	0.01	-7.93857987	8.28E-12
miR-9026	48	0	2.5055	0.01	-7.96895473	4.80E-12
miR-875-3p	50	0	2.6099	0.01	-8.02785073	1.61E-12
miR-100a	745	2	38.8874	0.1437	-8.08009892	1.22E-172
miR-8334-3p	53	0	2.7665	0.01	-8.11191811	3.13E-13
miR-7155-5p	55	0	2.8709	0.01	-8.16535925	1.05E-13
miR-2944a-3p	56	0	2.9231	0.01	-8.19135538	6.08E-14
miR-191-3p	57	0	2.9753	0.01	-8.21689134	3.52E-14
miR-43a-3p	4180	10	218.1873	0.7186	-8.24616247	0
miR-752-5p	59	0	3.0797	0.01	-8.26664602	1.18E-14
miR-100c	60	0	3.1319	0.01	-8.29089432	6.84E-15
miR-4265	60	0	3.1319	0.01	-8.29089432	6.84E-15
miR-3660	62	0	3.2363	0.01	-8.33820154	2.30E-15
miR-6412	62	0	3.2363	0.01	-8.33820154	2.30E-15
miR-4463	63	0	3.2885	0.01	-8.36128586	1.33E-15
miR-760-3p	64	0	3.3407	0.01	-8.38400663	7.70E-16
miR-3526	65	0	3.3929	0.01	-8.4063751	4.46E-16
miR-27c-5p	66	0	3.4451	0.01	-8.42840203	2.58E-16
miR-143-5p	971	2	50.6842	0.1437	-8.4623322	5.24E-226
bantam-c-3p	76	0	3.967	0.01	-8.63190457	1.10E-18
miR-2565-3p	79	0	4.1236	0.01	-8.68776057	2.13E-19
miR-2463	573	1	29.9094	0.0719	-8.7003915	3.66E-134
miR-130b-3p	80	0	4.1758	0.01	-8.70590881	1.24E-19
miR-344a-5p	80	0	4.1758	0.01	-8.70590881	1.24E-19
miR-3661	80	0	4.1758	0.01	-8.70590881	1.24E-19
miR-451-5p	80	0	4.1758	0.01	-8.70590881	1.24E-19
miR-2342	82	0	4.2802	0.01	-8.74153441	4.15E-20
miR-3675-5p	83	0	4.3324	0.01	-8.75902261	2.40E-20
miR-4446	88	0	4.5934	0.01	-8.84341862	1.57E-21
miR-1955-3p	89	0	4.6456	0.01	-8.85972111	9.07E-22
miR-3840-5p	89	0	4.6456	0.01	-8.85972111	9.07E-22
miR-71b-5p	89	0	4.6456	0.01	-8.85972111	9.07E-22
miR-1328	91	0	4.75	0.01	-8.89178367	3.04E-22
miR-285-3p	91	0	4.75	0.01	-8.89178367	3.04E-22
miR-6845-5p	92	0	4.8022	0.01	-8.90755169	1.76E-22
miR-200b	2032	3	106.0662	0.2156	-8.94239209	0
miR-967-5p	97	0	5.0632	0.01	-8.98390563	1.15E-23
miR-8478-3p	110	0	5.7418	0.01	-9.16535929	9.50E-27
miR-135a-1-3p	111	0	5.794	0.01	-9.17841585	5.50E-27
miR-7117-3p	120	0	6.2637	0.01	-9.29087128	4.04E-29
miR-7255-3p	126	0	6.5769	0.01	-9.3612639	1.53E-30
miR-9163	126	0	6.5769	0.01	-9.3612639	1.53E-30
miR-5439	128	0	6.6813	0.01	-9.38398504	5.12E-31
miR-7309-5p	131	0	6.8379	0.01	-9.41740951	9.95E-32
miR-378b	133	0	6.9423	0.01	-9.43926991	3.34E-32
miR-466f	133	0	6.9423	0.01	-9.43926991	3.34E-32
miR-241-5p	134	0	6.9945	0.01	-9.45007708	1.93E-32
miR-4327	136	0	7.0989	0.01	-9.47145173	6.49E-33
miR-2775a	138	0	7.2033	0.01	-9.49251419	2.18E-33
miR-4618	147	0	7.6731	0.01	-9.58366578	1.60E-35
miR-7865-3p	150	0	7.8297	0.01	-9.61281327	3.10E-36
miR-2734	156	0	8.1429	0.01	-9.66939889	1.17E-37
miR-4257	203	0	10.5962	0.01	-10.04933134	8.38E-49
miR-7346-3p	207	0	10.805	0.01	-10.07748329	9.43E-50
miR-6786-5p	241	0	12.5797	0.01	-10.29688183	8.16E-58
miR-9859-3p	242	0	12.6319	0.01	-10.30285602	4.72E-58
miR-7377-3p	260	0	13.5715	0.01	-10.40636452	2.55E-62
miR-5124b	266	0	13.8846	0.01	-10.43926991	9.61E-64
miR-4103-3p	274	0	14.3022	0.01	-10.48202143	1.22E-65
miR-105b-3p	275	0	14.3544	0.01	-10.48727732	7.06E-66

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-1799	283	0	14.772	0.01	-10.52864946	8.94E-68
miR-454-5p	285	0	14.8764	0.01	-10.53880982	3.00E-68
miR-1548-3p	286	0	14.9286	0.01	-10.54386311	1.74E-68
miR-2696	286	0	14.9286	0.01	-10.54386311	1.74E-68
miR-4217-3p	295	0	15.3984	0.01	-10.58856478	1.28E-70
miR-265	296	0	15.4506	0.01	-10.59344705	7.39E-71
miR-507b	310	0	16.1814	0.01	-10.66012072	3.54E-74
miR-1185	311	0	16.2336	0.01	-10.66476727	2.05E-74
miR-5952	326	0	17.0165	0.01	-10.73271865	5.68E-78
miR-2354	328	0	17.1209	0.01	-10.74154294	1.90E-78
miR-6090	343	0	17.9039	0.01	-10.80605823	5.28E-82
miR-329a-5p	348	0	18.1649	0.01	-10.82693758	3.44E-83
miR-1956-3p	366	0	19.1044	0.01	-10.89968931	1.85E-87
miR-1015-3p	410	0	21.4011	0.01	-11.06346924	6.82E-98
miR-6367	429	0	22.3929	0.01	-11.12882572	2.13E-102
miR-84a	485	0	25.316	0.01	-11.30583379	1.12E-115
miR-4611	512	0	26.7253	0.01	-11.38399034	4.41E-122
miR-1813	561	0	29.283	0.01	-11.5158475	1.06E-133
miR-4532	600	0	31.3187	0.01	-11.61280841	5.97E-143
miR-3064-5p	713	0	37.2171	0.01	-11.86174988	9.51E-170
miR-9c	803	0	41.9149	0.01	-12.03324774	4.32E-191
miR-2032a-3p	825	0	43.0633	0.01	-12.07224314	2.62E-196
miR-7325-5p	835	0	43.5853	0.01	-12.08962563	1.11E-198
miR-8877	866	0	45.2034	0.01	-12.14221556	4.95E-206
miR-1368	891	0	46.5083	0.01	-12.18327239	5.84E-212
miR-7068-3p	895	0	46.7171	0.01	-12.18973489	6.57E-213
miR-7340-5p	942	0	49.1704	0.01	-12.26357429	4.70E-224
miR-5428	978	0	51.0496	0.01	-12.31768409	1.36E-232
miR-3490	997	0	52.0413	0.01	-12.34544111	4.25E-237
miR-21a-3p	1063	0	55.4864	0.01	-12.43791883	9.48E-253
miR-8434-5p	1135	0	59.2446	0.01	-12.53246756	7.99E-270
miR-7160-5p	1162	0	60.654	0.01	-12.56638697	3.16E-276
miR-7150	1181	0	61.6457	0.01	-12.58978469	9.85E-281
miR-286b	1214	0	63.3683	0.01	-12.62954569	1.47E-288
miR-1669	1252	0	65.3518	0.01	-12.67401101	1.43E-297
miR-3084c-3p	1278	0	66.7089	0.01	-12.70366388	9.78E-304
miR-5547-5p	1354	0	70.676	0.01	-12.78700515	43414181544e-322
miR-2368-5p	1429	0	74.5908	0.01	-12.86478189	0
miR-4492	1441	0	75.2172	0.01	-12.87684705	0
miR-3086-5p	1582	0	82.5771	0.01	-13.01152662	0
miR-6534	1621	0	84.6128	0.01	-13.04666056	0
miR-2816	1765	0	92.1293	0.01	-13.16944436	0
miR-6744-5p	1839	0	95.992	0.01	-13.22869912	0
miR-1412	1989	0	103.8216	0.01	-13.34181856	0
miR-1673	1989	0	103.8216	0.01	-13.34181856	0
miR-1292-3p	1991	0	103.926	0.01	-13.34326919	0
miR-1258	2127	0	111.025	0.01	-13.43859702	0
miR-6392-3p	2239	0	116.8711	0.01	-13.5126298	0
miR-4090-3p	2287	0	119.3766	0.01	-13.54323263	0
miR-9337	2306	0	120.3684	0.01	-13.55516878	0
miR-924	2394	0	124.9618	0.01	-13.60919872	0
miR-7357-5p	2465	0	128.6679	0.01	-13.65136385	0
miR-510-3p	2506	0	130.808	0.01	-13.6751636	0
miR-8875	2511	0	131.069	0.01	-13.67803872	0
miR-1618-5p	2618	0	136.6541	0.01	-13.73824035	0
miR-4514	2753	0	143.7009	0.01	-13.8107812	0
miR-1715-3p	2960	0	154.5058	0.01	-13.91537314	0
miR-35c-3p	3144	0	164.1102	0.01	-14.00237645	0
miR-9771e	3275	0	170.9482	0.01	-14.06127044	0
miR-2046-5p	3491	0	182.2229	0.01	-14.15341783	0
miR-4099-3p	3514	0	183.4235	0.01	-14.16289196	0
miR-8101	3565	0	186.0856	0.01	-14.18367905	0
miR-6512-5p	3594	0	187.5993	0.01	-14.1953669	0
miR-4466	3847	0	200.8054	0.01	-14.29350922	0
miR-1586	4106	0	214.3246	0.01	-14.38750982	0
miR-9-2-5p	4392	0	229.2532	0.01	-14.48465401	0

miR_name	NaCl-expressed reads	LPS-expressed reads	NaCl-std (TPM)	LPS-std (TPM)	fold-change (log2 LPS/NaCl)	p-value
miR-6569-3p	4590	0	239.5884	0.01	-14.54827209	0
miR-1273c	4597	0	239.9538	0.01	-14.55046866	0
miR-309a-5p	5647	0	294.7616	0.01	-14.84726189	0
miR-4984-3p	6179	0	322.5309	0.01	-14.97714889	0
miR-609	7770	0	405.5778	0.01	-15.30769	0
miR-4266	8456	0	441.3856	0.01	-15.42975367	0
miR-1502d-3p	12694	0	662.6003	0.01	-16.01584691	0
miR-3277	15011	0	783.5429	0.01	-16.25772951	0
miR-6078	17887	0	933.6641	0.01	-16.51061464	0
miR-1647	30655	0	1600.127	0.01	-17.2878278	0
miR-7358-3p	59208	0	3090.534	0.01	-18.23749072	0

## การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอของกุ้งก้ามกรามเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS COMPARATIVE ANALYSIS OF MIRNA EXPRESSION IN THE GIANT FRESHWATER PRAWN STIMULATED BY LPS

รัตติกรม์ ธรรมสอน รัตน์สุตา ยะป้อม และ อำนวย เพชรรุ่งนภา\*  
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พิษณุโลก  
\*corresponding author e-mail : amnatp@nu.ac.th

### บทคัดย่อ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง อย่างไรก็ตามปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่เป็นให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในกระบวนการผลิตกุ้ง ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกลไกระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามจึงมีความจำเป็นต่อการพัฒนาแนวทางยับยั้งโรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุและจัดจำแนกไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNAs) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกราม โดยทำการฉีดกระตุ้นกุ้งก้ามกรามด้วย lipopolysaccharide (LPS) และมีกลุ่มควบคุม คือ กุ้งที่ฉีด 0.85% NaCl จากนั้นจึงเก็บตับและตับอ่อนของกุ้งมาสกัด total RNA และนำไปสร้างและหาลำดับของ small RNA library โดยใช้เทคนิค high-throughput sequencing ผลการทดลองพบว่า สามารถระบุ miRNA ได้ 1,723 และ 1,580 ชนิดจาก NaCl และ LPS library ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ miRNA ทั้ง 2 library พบว่า มี miRNA 466 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดย miRNA 213 ชนิดมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และ miRNA 253 ชนิดมีการแสดงออกลดลง ซึ่ง miRNA เหล่านี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม

**คำสำคัญ :** ไมโครอาร์เอ็นเอ กุ้งก้ามกราม ระบบภูมิคุ้มกัน LPS

### Abstract

The giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) is an economically important aquaculture species. However, the outbreak of bacterial and viral diseases causes an economic loss in prawn production. Therefore, study of the mechanism of prawn immune response is essential for developing the approaches to lessen the effects of prawn pathogens. In this study aimed to identify the immune-responsive miRNA in prawn. Some prawns were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and the others were used as control group which injected with NaCl. Hepatopancreas was subsequently collected for small RNA library construction and high-throughput sequencing. It was found that 1,723 and 1,580 miRNAs could be identified from NaCl and LPS library, respectively. The differential expression analysis showed that 466 miRNAs were expressed differentially upon LPS injection. Of these, 213 miRNAs were significantly up regulated and 253 miRNAs were significantly down-regulated upon LPS, indicating that miRNAs might be involved in the immune response in prawn.

**keywords :** miRNAs LPS *Macrobrachium rosenbergii* immune response high-throughput sequencing

### บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้มหาศาลให้กับเกษตรกรทั่วโลก รวมไปถึงประเทศไทย จากการสำรวจของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กรมประมงในปี 2549-2559 พบว่ามูลค่าการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยมีมูลค่าเฉลี่ยมากกว่า 3,000 ล้านบาทต่อปี (Department of Fisheries, 2017) แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาโรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม เช่น โรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และโรคหางขาว (White

tail disease) ที่เกิดจากไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus และ extra small virus ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ทำให้เกิดการสูญเสียรายได้ อีกทั้งยังส่งผลถึงอัตราการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยให้ลดลงอีกด้วย ดังนั้นเพื่อรองรับปัญหาที่จึงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการยับยั้งโรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามต่อไปในอนาคต

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) คือโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ lipoteichoic acid (LTA) ของแบคทีเรียแกรมบวก และ -1,3- glucan (bG) ของเชื้อราและยีสต์ รวมไปถึงกรดนิวคลีอิกประเภทอาร์เอ็นเอสายคู่ และ CpG DNA ของไวรัส (Wang and Wang, 2013; Janeway and Medzhitov, 2002) เป็นต้น โมเลกุลดังกล่าวจะถูกจดจำอย่างจำเพาะโดย โปรตีน pattern recognition receptors (PRRs) ที่เป็นตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ ทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์นำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ทั้งภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immunity) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งกลไกที่ PAMPs ทำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะดังกล่าวเรียกว่า PAMPs-triggered immunity (PTI) (Li et al., 2010)

MicroRNA (miRNA) เป็น Non-coding RNA ขนาดประมาณ 20-24 นิวคลีโอไทด์ ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ post-transcription ในยูคาริโอต โดยจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายอย่างจำเพาะโดยเข้าจับที่บริเวณ 3'untranslated regions (3'UTR) ของ Messenger RNA (mRNA) และส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือกระบวนการสลาย mRNA เป้าหมาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆของเซลล์หลากหลายกระบวนการ เช่น cell differentiation, cell proliferation, Metabolism รวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ (Huang and Zhang, 2012)

การศึกษา miRNA ในกุ้งพื้นเมืองหลายชนิด พบว่า miRNA มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ โดย miRNAs หลายชนิดมีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อกุ้งติดเชื้อจุลชีพ แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของ miRNAs กับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง อย่างไรก็ตามหน้าที่ของ miRNAs ในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งหรือสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก และในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาชนิดของ miRNAs ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ PTI ในกุ้ง ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของ miRNA ในกุ้งก้ามกรามที่ตอบสนองต่อ LPS และศึกษาการแสดงออกของ miRNA ดังกล่าว

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามและการเก็บตัวอย่างตับและตับอ่อน

ผู้วิจัยซื้อกุ้งก้ามกรามขนาด 30 กรัมโดยเฉลี่ยจากบ่อเลี้ยงกุ้งในจังหวัดพิษณุโลก นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 3 วันเพื่อให้กุ้งปรับตัว จากนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มกลุ่มละ 3 ตัว ( $n=3$ ) กลุ่มทดลองจะถูกฉีดด้วย LPS ปริมาณ 12.5 (g ในกลุ่มควบคุมจะถูกฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาณ 100  $\mu$ l จากนั้น 12 ชม. จึงเก็บตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ไปสกัด total RNA โดยใช้ Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research) และนำไปวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer โดย total RNA ที่สกัดได้จะถูกเก็บที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

### 2. Small RNA library และ Sequencing

Total RNA ปริมาณ 10  $\mu$ g จากตัวอย่างแต่ละกลุ่ม จะถูกนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่อง Agilent Bioanalyzer 2100 และรายงานผลในรูปแบบ RNA integrity number (RIN) จากนั้นนำ total RNA ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพไปสร้าง small RNA library ทั้งหมด 2 libraries ได้แก่ control และ LPS โดยเริ่มจากแยก small RNA ขนาด 18-30 nucleotides (nt) ออกจาก total RNA ด้วย Native gel electrophoresis จากนั้นจึงนำ small RNA ที่แยกได้ไปต่อกับ 3' และ 5' adaptor ตามลำดับ นำ small RNA ที่ต่อ adaptor เรียบร้อยแล้วไปทำ reverse transcription และ PCR

จากนั้นจึงนำ small RNA library ที่ได้ไปทำ high-throughput sequencing โดยใช้ Illumina Hiseq 4000 sequencing system

### 3. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

ข้อมูลที่ได้จากการทำ high-throughput sequencing จะอยู่ในรูปแบบ raw reads จะนำมาทำ data cleaning โดยทำการตัดลำดับของ adaptor และลำดับที่ไม่มีคุณภาพออก จะได้เป็น clean reads จากนั้นจึงนำ clean reads ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆเพื่อระบุชนิดของ small RNA โดยจะนำไปเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Rfam เพื่อตัด RNA ชนิดอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องออก จากนั้นนำ reads ที่เหลือไปเทียบกับฐานข้อมูล miRBase v.21 เพื่อระบุชนิดของ miRNA จากนั้นจึงวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่ม control และกลุ่ม LPS เพื่อระบุหาและจัดจำแนก miRNA ชนิดต่างๆที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่ามกราคมเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS

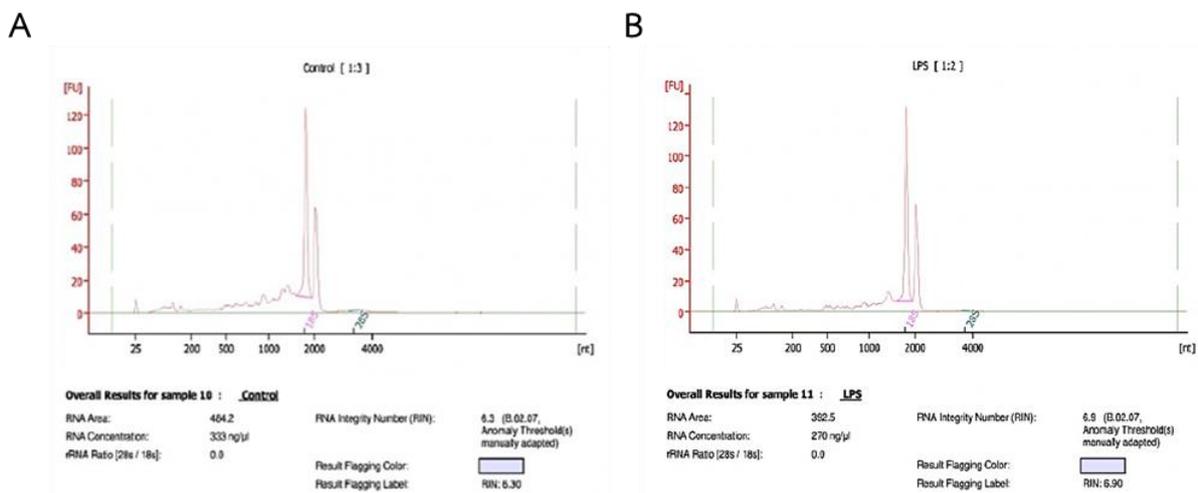
## ผลการวิจัย

### 1. การตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA ที่สกัดได้

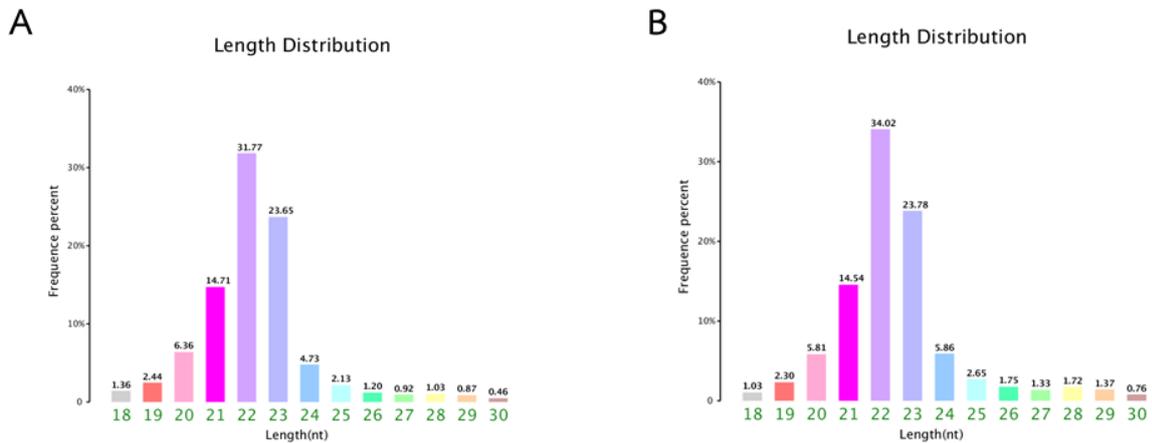
ผลการตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้จากตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า total RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพสูง ซึ่งแสดงให้เห็นจากค่า RNA integrity number (RIN) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความสมบูรณ์ของ RNA (รูปที่ 1) โดยในกลุ่ม control และกลุ่ม LPS มีค่า RIN เท่ากับ 6.3 และ 6.9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า total RNA ทั้ง 2 กลุ่มเหมาะสมสำหรับนำไปสร้าง small RNA library และหาลำดับด้วย high-throughput sequencing

### 2. Small RNA library และ Sequencing

ผลการวิเคราะห์ small RNA library จากกิ้งก่าทั้ง 2 กลุ่ม ด้วย Hiseq 4000 sequencing system พบว่า control library มีลำดับ clean reads ทั้งหมด 19,157,451 reads และ LPS library มีลำดับ clean reads ทั้งหมด 13,916,339 reads เมื่อวิเคราะห์ length distribution พบว่า control และ LPS มีลำดับที่มีความยาว 22 nt เป็นสัดส่วนอยู่ที่ 31.77% และ 34.02% ของ clean reads ตามลำดับ ซึ่งขนาดดังกล่าวเป็นขนาดของ miRNA ในสัตว์ (รูปที่ 2) จากนั้นใช้วิธี bioinformatics เพื่อวิเคราะห์ผลการทำ sequencing เพื่อระบุ miRNA ที่มีการตอบสนองต่อ LPS



ภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของ total RNA ของกลุ่ม control (A) และกลุ่ม LPS (B) ด้วย Agilent Bioanalyzer 2100



ภาพที่ 2 Length distribution ของ small RNA library ของกลุ่ม control (A) และกลุ่ม LPS (B)

### 3. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยชีวสารสนเทศ (bioinformatics)

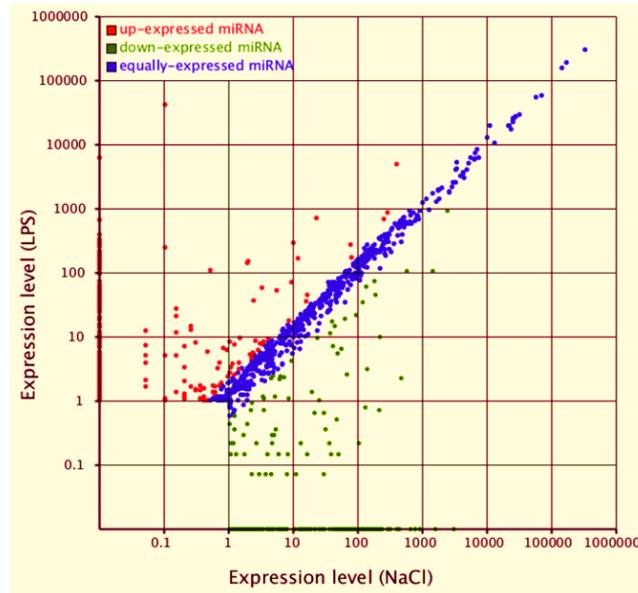
Raw reads ที่ได้จากการทำ high-throughput sequencing จะถูกนำมาทำ data cleaning โดยทำการตัดลำดับของ adaptor และลำดับที่ไม่มีคุณภาพออก จะได้เป็น clean reads จากนั้นจึงนำ clean reads ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆเพื่อระบุชนิดของ small RNA โดยจะนำไปเทียบกับฐานข้อมูล NCBI และ Rfam เพื่อตัด RNA ชนิดอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องออก เช่น rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, intron และ exon จากนั้นนำ reads ที่เหลือไปเทียบกับฐานข้อมูล miRBase v.21 เพื่อระบุชนิดของ miRNA พบว่าในกลุ่ม control สามารถระบุ miRNA ได้ 1723 (0.34%) ชนิด และในกลุ่ม LPS สามารถระบุ miRNA ได้ 1580 (0.35%) ชนิด แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดต่างๆของ RNA ที่ระบุได้จากฐานข้อมูล

RNA species	Control (NaCl)				LPS			
	Total		Unique		Total		Unique	
	Reads	Percentage	Reads	Percentage	Reads	Percentage	Reads	Percentage
Clean reads	19157854	100	509371	100	13916666	100	451521	100
Intron	5440	0.03	1308	0.26	4500	0.03	1188	0.26
Exon	4809	0.03	949	0.19	3159	0.02	911	0.20
rRNA	1154824	6.03	61094	11.99	861855	6.19	53597	11.87
tRNA	265772	1.39	11919	2.34	238802	1.72	11336	2.51
snRNA	1236	0.01	667	0.13	1183	0.01	646	0.14
snoRNA	816	0.00	328	0.06	612	0.00	270	0.06
miRNA	15279555	79.76	1723	0.34	11301115	81.21	1580	0.35
unannotated	2444999	12.76	335154	65.80	1505113	10.82	297352	65.86

### 4. การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA

ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNA โดยเปรียบเทียบชนิดและระดับการแสดงออกของ miRNA ในกลุ่ม LPS เทียบกับในกลุ่ม control ผลการทดลองพบว่า มี miRNA 466 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยมี miRNA 213 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี miRNA 253 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง ดังรูปที่ 3 และตัวอย่างของ miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกกัมมกรามถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย LPS แสดงดังตารางที่ 2



ภาพที่ 3 Scattered plot แสดงจำนวน miRNAs ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกำกวมถูกกระตุ้นด้วย LPS

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ miRNA ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกำกวมถูกกระตุ้นด้วย LPS

miRNAs	Sequence (5'→3')	Length (nt)	Fold change (LPS vs NaCl)
<b>Up-regulated miRNA upon LPS</b>			
miR-3689f	TTTGTTTCGTTCTTCCTGGGA	20	19.229
miR-375b-3p	TTTGTTTCGTTCTACTCGGTATG	22	18.595
miR-2970-5p	GAAGTCAAGCAACGTTGGGTCTGG	24	16.031
miR-9856-3p	GTTCCGGATTGGGGTGGG	18	15.260
miR-9856-3p	ATTGGCTCTGAGGGTCGGGTCAG	22	15.013
miR-1842	GTCTCCCGCCGATGCACCA	20	14.893
miR-7911c-5p	GTTTCGACACAGACTGTACTCATCT	25	14.761
miR-1420e-5p	TTTTGGTAAGCAGAACAGGCGCT	23	14.395
miR-7965-3p			
<b>Down-regulated miRNA upon LPS</b>			
miR-1273c	GGCGACGAACGAGACTCTGG	20	-14.550
miR-4984-3p	AAGTGTTTGACGATTCCTGG	20	-14.977
miR-609	CGGGAAGCGGGTGCGGGGC	19	-15.307
miR-4266	CTTAGTGAGGCCTTCGGACC	20	-15.429
miR-1502d-3p	ACTTACTCCCGACGAGTGTCTGCG	24	-16.015
miR-3277	TGGGCCAGTGTCTCTGAAATTCT	23	-16.257
miR-6078	CCGTTAAGCTAGCTGTGGT	19	-16.510
miR-1647	GCTCTCCTGTAAGGGTACTCT	21	-17.287
miR-7358-3p	AGTGTGTGCGCCACTTCCGGAC	22	-18.237

## อภิปรายผล

miRNA ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนระดับ post-transcription ในยูคาริโอต ทำให้ miRNA มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น cell cycle, cell differentiation, cell proliferation, metabolism, apoptosis และยังรวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน (Huang and Zhang, 2012) สำหรับสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน มีรายงานว่า miRNA ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่นในกิ้งก่าลายเสื้อญี่ปุ่น (*Marsupenaeus japonicus*) พบว่าหลังจากที่กิ้งก่าติดเชื้อไวรัส WSSV มี miRNA หลายชนิดแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปและพบว่าส่วนใหญ่มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและกระบวนการตายของเซลล์ เช่น miR-12 มีการแสดงออกลดลงเมื่อกิ้งก่าติดเชื้อ WSSV โดยพบว่า miR-12 มีเป้าหมายคือ signaling caspase ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis และ phagocytosis (Yang et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า miR-100 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อกิ้งก่าติดเชื้อ WSSV โดย miR-100 มีเป้าหมายเป็น trypsin gene ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต้านไวรัสในกิ้ง (Yang et al., 2014) นอกจากนี้กิ้งก่าลายเสื้อญี่ปุ่นยังมีรายงานว่า miRNA เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในครัสเตเชียนชนิดอื่นๆ เช่น กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*), กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*), ปูขน (*Eriocheir sinensis*) และ ปลาจวดเหลือง (*Larimichthys crocea*) (Sun et al., 2016; Kaewkascholkul et al., 2016; Li et al., 2014; Qiao et al., 2016)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการกระตุ้นกิ้งก่ามแกรมด้วย LPS ซึ่งเป็น PAMPs ที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นจึงสกัด RNA จากตับและตับอ่อนของกิ้งก่าเพื่อนำไปสร้าง small RNA library ผู้วิจัยพบว่าขนาดของ small RNA ที่พบทั้งในกลุ่มที่ฉีด LPS และกลุ่มควบคุม (NaCl) มีสัดส่วนของ small RNA ขนาด 22 nt สูงที่สุด ซึ่งขนาดดังกล่าวตรงกับขนาดของ miRNA ที่พบในกิ้งก่าแวนนาไม กุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวจีน (Sun et al., 2016; Kaewkascholkul et al., 2016; Li et al., 2017) เมื่อทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของ small RNA ใน LPS library และ NaCl library พบว่ามี miRNA 466 ชนิดที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดย 213 ชนิดที่มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และ 253 ชนิดที่มีการแสดงออกลดลง โดยพบว่า miRNA ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อ LPS บางชนิดมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น miR-3689f มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากถึง 19.229 เท่า โดยพบว่า miR-3689f มีเป้าหมายเป็นยีน PHD finger protein 20-like 1 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ ในมนุษย์ (Estève et al., 2014) miR-1647 มีการแสดงออกลดลง 17.287 เท่า จากการศึกษานี้ของ JL Irizarry และคณะ พบว่า miR-1647 มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวในไก่ (Irizarry et al., 2017) แสดงให้เห็นว่า miRNA มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งก่ามแกรม

## สรุปผลการวิจัย

miRNA 466 ชนิดมีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อกิ้งก่ามแกรมถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ miRNA ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกิ้งก่ามแกรม

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

## เอกสารอ้างอิง

- Barozai, M. Y. K. (2012). Identification and characterization of the microRNAs and their targets in *Salmosalar*. *Gene*, 499(1), 163-168.
- Cristino, A. S., Tanaka, E. D., Rubio, M., Piulachs, M. D., & Belles, X. (2011). Deep sequencing of organ- and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS One*, 6(4), e19350.

Department of Fisheries 2017

- Estève, P. O., Terragni, J., Deepti, K., Chin, H. G., Dai, N., Espejo, A., ... & Pradhan, S. (2014). Methyllysine reader plant homeodomain (PHD) finger protein 20-like 1 (PHF20L1) antagonizes DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 (DNMT1) proteasomal degradation. **Journal of Biological Chemistry**, 289(12), 8277-8287.
- Huang, T., Xu, D., & Zhang, X. (2012). Characterization of host microRNAs that respond to DNA virus infection in a crustacean. **Bmc Genomics**, 13(1), 159.
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, 20(1), 197-216.
- JL Irizarry, K., Chan, A., Kettle, D., Kezian, S., Ma, D., Palacios, L., ... & Drechsler, Y. (2017). Bioinformatics Analysis of Chicken miRNAs Associated with Monocyte to Macrophage Differentiation and Subsequent IFN $\gamma$  Stimulated Activation. **MicroRNA**, 6(1), 53-70.
- Kaewkascholkul, N., Somboonviwat, K., Asakawa, S., Hirono, I., Tassanakajon, A., & Somboonwiwat, K. (2016). Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. **Developmental & Comparative Immunology**, 60, 191-201.
- Li, S., Jia, Z., Li, X., Geng, X., & Sun, J. (2014). Identification and expression analysis of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor gene in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Fish & shellfish immunology**, 38(1), 190-195.
- Li, X., Meng, X., Luo, K., Luan, S., Shi, X., Cao, B., & Kong, J. (2017). The identification of microRNAs involved in the response of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to white spot syndrome virus infection. **Fish & Shellfish Immunology**.
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M. (2010). Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. **Plant physiology**, 152(4), 2222-2231.
- Qiao, Y., Mao, Y., Wang, J., Chen, R., Libing, Z., Su, Y. Q., ... & Zheng, W. Q. (2016). Analysis of liver and gill miRNAs of *Larimichthys crocea* against *Cryptocaryon irritans* challenge. **Fish & shellfish immunology**, 59, 484-491.
- Sun, X., Liu, Q. H., Yang, B., & Huang, J. (2016). Differential expression of microRNAs of *Litopenaeus vannamei* in response to different virulence WSSV infection. **Fish & shellfish immunology**, 58, 18-23.
- Wang, X. W., & Wang, J. X. (2013). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish & shellfish immunology**, 34(4), 981-989.
- Wong, N., & Wang, X. (2014). **miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations**. *Nucleic acids research*, 43(D1), D146-D152.
- Yang, G., Yang, L., Zhao, Z., Wang, J., & Zhang, X. (2012). Signature miRNAs involved in the innate immunity of invertebrates. **PloS one**, 7(6), e39015.
- Yang, L., Yang, G., & Zhang, X. (2014). The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. **Fish & shellfish immunology**, 40(1), 146-153.

- Zeng, D., Chen, X., Xie, D., Zhao, Y., Yang, Q., Wang, H., ... & Chen, X. (2015). Identification of highly expressed host microRNAs that respond to white spot syndrome virus infection in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). **Genet Mol Res**, 14(2), 4818-28.
- Zhu, F., Wang, Z., & Sun, B. Z. (2016). Differential expression of microRNAs in shrimp *Marsupenaeus japonicus* in response to *Vibrio alginolyticus* infection. **Developmental & Comparative Immunology**, 55, 76-79.