การยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยวิธี RNA interference

นางสาวพรพรรณ สุภวรรณวงศ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INHIBITION OF RABIES VIRUS REPLICATION BY RNA INTERFERENCE

Miss Pornpun Supavonwong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยวิธี RNA interference
โดย	นางสาว พรพรรณ สุภวรรณวงศ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. กัญญา ศุภปิติพร)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พรพรรณ สุภวรรณวงศ์: การยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยวิธี RNA interference. (INHIBITION OF RABIES VIRUS REPLICATION BY RNA INTERFERENCE) อ. ที่ปรึกษา: ศ. นพ. ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. นพ. ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา, 96 หน้า.

เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เป็นสาเหตุให้เกิดโรคสมองอักเสบในผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยจะเสียชีวิตทุกราย โรคนี้ยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผล ในขณะนี้ มีการนำเทคโนโลยี RNA interference มาใช้ศึกษาการทำงานของยีน และใช้ยับยั้งการแสดงออกของยีนของเชื้อไวรัสต่างๆ ในงานวิจัยนี้ ได้ทดสอบประสิทธิภาพ miRNA และ siRNA ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N ของเชื้อ RV–CVS เปรียบเทียบกัน ซึ่งพบว่า miRNA สามารถยับยั้งกระบวนการ transcription และ replication ของเชื้อได้ดีกว่า siRNA ในงานวิจัยยังได้ทดสอบประสิทธิภาพ miRNA ต่อ mRNA ของยีน P และต่อ genomic RNA ของเชื้อ พบว่า miRNA ต่อ mRNA ของยีน P แม้ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน P ได้ แต่มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N และ genomic RNA น้อยกว่าและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อยังน้อยกว่า miRNA ต่อ mRNA ของยีน N แสดงว่า P อาจไม่ใช่เป้าหมายที่สำคัญเท่ากับ N สำหรับ miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อ สามารถลด viral transcripts และ genomic RNA ของเชื้อได้ แต่ผลที่ได้ไม่ดีเท่ากับ miRNA ต่อ mRNA ของยีน N นอกจากนั้น ยังพบว่า miRNA แบบ multiple miRNA ใน pre-miRNA transcript เดียวกัน ต่อ single และ multiple target ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่า miRNA แบบ 1 โมเลกุล โดย multiple miRNA ต่อ multiple target สามารถยับยั้งได้ดีกว่า แม้จะไม่มีนัยสำคัญก็ตาม และพบว่า การใส่ scramble miRNA ใน multiple miRNA ไม่ได้ลดประสิทธิภาพโดยรวมต่อการยับยั้งเชื้อของ miRNA อื่นๆ จากผลการทดลองนี้ สนับสนุนการใช้ multiple miRNA ในการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เพราะหากมี 1 หรือ 2 miRNA ใน multiple miRNA ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เนื่องจากเหตุผลด้านลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อ ก็ยังมี miRNA ตัวอื่นใน pre-miRNA transcript เดียวกันที่ให้ผลการยับยั้งเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ ผลจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยคาดหวังว่า โมเลกุล miRNA จะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในอนาคตได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต พรพรรณ สุภวรรณวงศ์

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

487 47598 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: RABIES VIRUS/ RNA INTERFERENCE/ GENE EXPRESSION/ VIRAL REPLICATION

PORNPUN SUPAVONWONG: INHIBITION OF RABIES VIRUS REPLICATION BY RNA INTERFERENCE. THESIS ADVISOR: PROF. THIRAVAT HEMACHUDHA, M.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. NIPAN ISRASENA, M.D., PH.D., 96 pp.

Rabies is an inevitably fatal disease. There is no effective treatment. At present, RNA interference technique has been shown to be a powerful tool in the study of gene function control and one of the promising antiviral therapies. We determined whether miRNAs or siRNAs was more effective in suppressing rabies virus transcription and replication. They were designed against N mRNA of Challenge Virus Standard (CVS) strain of rabies virus. We found that miRNAs were more effective than siRNAs in inhibiting viral transcription and replication. miRNAs against P mRNA (anti-P miRNA) and viral genomic RNA (anti-genome miRNA) were also tested. Anti-P miRNA inhibited P gene expression, however, only partial effect in reducing N mRNA and genomic RNA was observed. This suggested that P may not be an appropriate target. Although anti-genome miRNA could reduce viral transcripts and genomic RNA, it was less effective when compared with anti-N miRNAs. Chaining of multiple miRNAs against single or multiple targets in one pre-miRNA transcript was superior, although not significant, to construct expressing only one anti-N miRNA. We also found that adding scramble miRNA to the chain did not significantly reduce overall inhibitory effect of other miRNAs. Our data may support the use of multiple miRNAs against different targets of rabies virus. It provides a wide safety margin if one or two miRNA in the same chain does not work. Thus, this may be applicable in natural circumstance where sequence of rabies virus has not been known, in particular, such as, in the case of escape mutation of rabies virus. Based on our results, it may suggest that application of miRNAs has future therapeutic potential in symptomatic rabies infected victim.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Medical Science	Student's signature
Academic year 2007	Advisor's signature
	Co-Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความอนุเคราะห์ของท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธีระวัฒน์ เหมะจุฑา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และท่านอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะและความช่วยเหลือในหลายสิ่งหลายอย่างจนกระทั่งงานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. กัญญา ศุภปิติพร และรองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ กรรมการวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. สุภาภรณ์ วัชรพฤษาดี หัวหน้าห้องปฏิบัติการโรคทางสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และ นายนิติพล รัตนเศรษฐ์ยุทธ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคทางสมอง พี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคน ในห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความกรุณาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำและกำลังใจจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ หน่วยงานที่สนับสนุนการวิจัย “ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)”

ขอขอบพระคุณ คุณผกามาศ ขาวปลอด สถานเสาวภา สภากาชาดไทย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในการวิจัย และคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณระพีพร แม้นนนทรัตน์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัยภายในศูนย์วิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ ขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ให้โอกาสและสนับสนุนผู้วิจัยในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท อีกทั้งให้ความรักและกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ...จ
กิตติกรรมประกาศ...ฉ
สารบัญ...ช
สารบัญตาราง..ฌ
สารบัญภาพ..ญ
คำย่อ...ฑ

บทที่

1 บทนำ..1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..1
- คำถามของการวิจัย..4
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย..4
- สมมติฐานของการวิจัย..5
- รูปแบบของการวิจัย..5
- ขอบเขตของการวิจัย..6
- ข้อตกลงเบื้องต้น..9
- ข้อจำกัดของการวิจัย..9
- คำสำคัญ...9
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..9
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..10
- ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย...10

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...11
- เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า...11
- RNA interference (RNAi) 16

หน้า

บทที่

3 วิธีดำเนินการวิจัย......23
- เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย......23
- การเก็บรวบรวมข้อมูล......26
- วิธีดำเนินการวิจัย......27
- การวิเคราะห์ข้อมูล......51

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล......53

5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ......71
- สรุปผลการวิจัย......71
- อภิปรายผล......73

รายการอ้างอิง......76
ภาคผนวก......81
ภาคผนวก ก......82
ภาคผนวก ข......83
ภาคผนวก ค......84
ภาคผนวก ง......85
ภาคผนวก จ......87
ภาคผนวก ฉ......89
ภาคผนวก ช......90
ภาคผนวก ซ......91
ภาคผนวก ฌ......92
ภาคผนวก ญ......93
ภาคผนวก ฎ......94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์......96

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงชื่อ RNA เป้าหมาย และลำดับเบส ของ Oligonucleotide Forward และ Reverse primer ที่ใช้ในการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน N, ยีน G, ยีน P และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า และยีน GADPH ของเซลล์ neuro2A (การทดลองควบคุมเพื่อดูว่าเซลล์มีปริมาณเท่ากัน)………………………..47

2. แสดงชื่อโมเลกุล RNAi เป้าหมาย และลำดับเบส ของ RT primer, Forward primer, Reverse primer และ probe ที่ใช้ในการตรวจวัดระดับโมเลกุล RNAi ที่สนใจ…………………………………………………………...51

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่ หน้า

1. A. วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า
B. โครงสร้าง genome RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า..13

2. miRNA pathway……………………………………………………………………17

3. siRNA pathway..18

4. แสดงลักษณะโครงสร้างของ pre-miRNA (top strand oligo) ที่ออกแบบ.................28

5. แสดงลำดับเบสของเส้น top และ bottom strand oligo ที่สร้างเป็น annealed
miRNA template โดยเป็นตัวอย่างลำดับเบสของ miRNA ต่อยีน lacZ (miR-*lacZ*).. 29

6. แสดงโครงสร้างของ pre-miRNA ของ miR-*lacZ*……………………………………..29

7. แสดงตัวอย่างการออกแบบ siRNA Template Oligonucleotide…………………… 31

8. แสดงขั้นตอนการตรวจสอบปริมาณ (titer) ไวรัสพิษสุนัขบ้า....................................37

9. แสดงจำนวน well ที่เตรียมเซลล์ใน 24-well plate สำหรับการตรวจสอบ
ปริมาณ (titer) ไวรัสพิษสุนัขบ้า..38

10. แสดงขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพโมเลกุล RNAi………………………………...42

11. แสดงขั้นตอนการทดสอบ RNAi quantification……………………………………....48

ภาพประกอบที่ หน้า

12. แสดงระดับ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 10, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม... 57

13. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม................58

14. แสดงระดับ mRNA ของยีน N, G และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า และ mRNA ของยีน GAPDH ของเซลล์ทดลองที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA และ siRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม…59

15. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA และ siRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม……………………………………………………………………..59

16. แสดง cellular N protein ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA และ siRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยการย้อมด้วยวิธี DFA เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม…………………………………………………60

17. แสดงระดับ mRNA ของยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ต่อ genomic RNA เทียบกับ miRNA ต่อยีน N ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม………………....62

ภาพประกอบที่ หน้า

18. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ต่อ genomic RNA (-N1) และ (-N2) เทียบกับ miRNA ต่อยีน N (N1) ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม……..……………63

19. แสดงระดับ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม... 64

20. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม... 64

21. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม…65

22. แสดงระดับ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย multiple miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม....66

23. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย multiple miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม... 66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพประกอบที่ หน้า

24. แสดงระดับ miRNA(N2) ที่แสดงออกในเซลล์ ที่ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ และที่จำนวน copy ของโมเลกุล miRNA ที่แตกต่างกัน หลังจากการ transfection เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Real-time PCR โดยมีระดับการแสดงออกของ miRNA(N2) แบบ single miRNA ที่ความเข้มข้น 1 ug เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ............68

25. แสดงระดับ mRNA ของยีน P, ยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ต่อยีน P ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม…………………………………………………………...…70

26. แสดงขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จาก supernatant…………………….……85

27. แสดงขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จากเซลล์……………………………………...87

คำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
cDNA	complementary DNA
CVS	challenge virus standard
$^{\circ}C$	degree celsius
DFA	direct fluorescence assay
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
dsRNA	double strand RNA
et al.	Et. Alii (latin), and others
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
FFD_{50}	focus forming dose
FITC	fluorescein isothiocyanate
G protein	glycoprotein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
HEP Flury strain	high-egg-passage flury strain
L protein	viral RNA polymerase
M	molar
miRNA	micro RNA
ml	milliliter
mM	millimolar
M protein	matrix protein
mRNA	messenger RNA
NEAA	non-essential amino acids
ng	nanogram
nM	nanomolar
NNR	nonsegmented negative-stranded RNA
N protein	nucleoprotein

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
P protein	phosphoprotein
pre-miRNA	precursor micro RNA
pri-miRNA	primary micro RNA
PTGS	post-transcriptional gene-silencing
RdRP	RNA dependent RNA polymerase
RISC	RNA-inducing silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNP	ribonucleoprotein
RT	reverse transcription
siRNA	small interfering RNA
TBE buffer	tris base EDTA buffer
U	unit
μl	microliter
μg	microgram
μM	micromolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพิษสุนัขบ้า เกิดจากเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยเชื้อไวรัสนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคสมองอักเสบและผู้ป่วยจะเสียชีวิตในที่สุด ในแต่ละปีนั้น ทั่วโลกมีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้อย่างน้อย 55,000 ราย (1, 2, 3) ซึ่งในปัจจุบันนี้ ได้มีความพยายามที่จะค้นหาวิธีการรักษาโรคนี้ แต่ยังไม่ได้ผล ใน ปี ค.ศ. 2005 Rodney E. Willoughby JR และคณะ ได้รายงานผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่ได้รับเชื้อมาจากการถูกค้างคาวกัดและได้รับการรักษาโดยวิธี coma-induction ซึ่งพบว่าวิธีนี้ สามารถรักษาผู้ป่วยได้ประสบผลสำเร็จ (4) แต่จากรายงานของ Hemachudha T. และคณะ พบว่า วิธีการรักษาด้วยวิธี coma-induction ในผู้ป่วยติดเชื้อจากการถูกสุนัขกัดนั้นไม่ได้ผล โดยผู้ป่วยเสียชีวิตใน 15 วัน หลังการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว และพบว่า พยาธิสภาพในไขสันหลังและสมองของผู้ป่วยไทยที่เสียชีวิต ไม่ยืนยันปรากฏการณ์ของ excitotoxicity (1) ดังนั้น การที่ผู้ป่วยรอดชีวิตจากการเป็นโรคนี้ ไม่น่าจะเป็นผลมาจากวิธีการรักษา โดยที่อาจมีเหตุปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้องด้วย ในขณะนี้วิธีการรักษานี้ยังไม่ถือว่าเป็นการรักษามาตรฐานและมีการรายงานความล้มเหลวของการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวอย่างน้อย 5 รายทั่วโลก (5) และโรคนี้ก็ยังนับเป็นโรคที่มีความรุนแรง ผู้ป่วยจะต้องเสียชีวิตทุกราย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีการรักษาแบบใหม่ เพื่อค้นหาวิธีที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีข้างต้นต่อไป

Rabies virus เป็นเชื้อไวรัสใน genus *Lyssavirus* อยู่ใน family Rhabdoviridae โดย genome ของ Rabies virus ประกอบด้วยยีน 5 ชนิด ที่สามารถแปลเป็นโปรตีน 5 ชนิด คือ nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) และ viral RNA polymerase (L) ซึ่งเรียงอยู่บน genome ตามลำดับจากปลาย 3’ ไปยังปลาย 5’ ดังนี้ 3’-N-P-M-G-L-5’ เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามีรูปร่างโครงสร้างเป็นรูป bullet-shaped ซึ่งมีแกนกลางเป็นส่วนของ ribonucleoprotein (RNP) ที่ประกอบด้วย helical RNA และ protein (6) จากการศึกษาพบว่า การร่วมกันทำงานระหว่างกระบวนการ RNA synthesis และ gene expression ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เป็นกระบวนการสำคัญที่สนับสนุนให้ไวรัสสามารถแพร่กระจายอยู่ในเซลล์ที่ติดเชื้อได้ (7) โดยถ้ามีแต่เฉพาะ genomic RNA ของเชื้อไวรัสนี้เพียงอย่างเดียวจะทำให้ไวรัสไม่สามารถแพร่กระจายอยู่ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อได้ (6)

จากความรู้เกี่ยวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ได้กล่าวมานั้น การศึกษาวิจัยนี้ จึงได้พยายามศึกษาหาวิธีการรักษาโรค ด้วยการยับยั้งกระบวนการ RNA synthesis และ gene expression ของเชื้อ ที่คาดหวังว่าจะสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสนี้ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อนี้ได้ โดยในปัจจุบันนี้ มีงานวิจัยมากมายที่นำเทคโนโลยี RNAi มาศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนต่างๆและใช้เทคโนโลยีนี้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน (8) รวมทั้งการใช้ RNAi เป็นตัวยับยั้งการแสดงออกของยีนของเชื้อไวรัสต่างๆ (9) ได้ เช่น HIV-1 (10, 11) , Dengue virus (12) , Hepatitis B virus (13) , Hepatitis C virus (14) , Influenza (15) , WNV (16, 17), JEV (17) และ nonsegmented negative-strand RNA virus (18)

RNA interference (RNAi) คือ กระบวนการป้องกันตัวเองในระดับเซลล์ในการควบคุมการแสดงออกของยีนจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก และรวมถึงกระบวนการปิดกั้นการทำงานของยีนเป้าหมายของสิ่งมีชีวิต โดยทำการสั่งให้มีการหยุดการทำงานของสารโปรตีนที่ผิดปกติ กระบวนการ RNAi สามารถกล่าวได้อีกชื่อหนึ่งว่าเป็นกระบวนการ post-transcriptional gene-silencing (PTGS) โดยกระบวนการนี้มีกลไกการทำงานแยกได้เป็น 2 แบบ คือ แบบ miRNA pathway และแบบ siRNA pathway (8, 19)

ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเทคโนโลยี RNAi มาใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน และควบคุมการสร้าง genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า จากความรู้เกี่ยวกับหน้าที่ของยีนต่างๆของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า จะพบว่าทุกๆยีนนั้นมีความสำคัญสำหรับกระบวนการการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า และยังไม่มีหลักฐานที่สามารถบ่งชี้ได้ว่า ยีนใดที่เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกแล้ว จะมีผลกระทบในระดับใดต่อการแสดงออกของยีนนั้นๆและรวมถึงยีนอื่นๆได้ด้วย และจะยังมีผลกระทบต่อไปถึงการควบคุมกระบวนการสร้าง genome ของเชื้อไวรัสนี้ได้หรือไม่ อย่างไร จากการวิจัยก่อนหน้านี้ (18) พบว่าสามารถใช้เทคโนโลยี RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน M ในเชื้อ vesicular stomatitis virus (VSV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่อยู่ในตระกูลเดียวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า หรือในกรณีของเชื้อ respiratory syncytial virus (RSV) และ human parainfluenza virus (HPIV) ก็สามารถใช้เทคโนโลยี RNAi มายับยั้งการแสดงออกของยีนได้เช่นกัน โดยเชื้อไวรัสเหล่านี้จัดเป็นเชื้อไวรัสประเภท nonsegmented negative-strand RNA virus ซึ่งเป็นประเภทเดียวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคโนโลยี RNAi ในการยับยั้งยีนดังกล่าวนั้น จะสามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เนื่องมาจากเชื้อเหล่านั้น แม้จะเป็นประเภทหรือตระกูลเดียวกัน แต่ก็เป็นเชื้อต่าง genus กัน ซึ่งยีนต่างๆ อาจจะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไปบ้างไม่มากก็น้อย ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัย จึงต้องการศึกษาเพื่อดูว่า โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีนที่ได้เลือกมา ซึ่ง

ก็คือ mRNA ของยีน N จะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและส่งผลต่อกระบวนการติดเชื้อของไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่ และถ้าใช้โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นโดยให้มีการทำงานร่วมกันระหว่างโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล ทั้งต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสนี้ จะสามารถก่อให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการสร้าง genomic RNA ของเชื้อไวรัสนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้ RNAi เฉพาะต่อ mRNA ของยีนเพียงอย่างเดียวหรือไม่

จากการทบทวนวรรณกรรม คณะผู้วิจัยพบว่ายีน N ถือได้ว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ซึ่งมีลำดับเบสที่ conserve มากที่สุดและเป็นองค์ประกอบหลักที่มีมากที่สุดในเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (20) และยังมีหน้าที่ที่สำคัญมากสำหรับกระบวนการ N-specific encapsidation ของ genomic RNA เป็นตัวปกป้อง genomic RNA จาก RNase activity (21, 22) และ N protein ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการ RNA transcription และ RNA replication (6) ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะยับยั้งการทำงานของ mRNA ของยีน N และ genomic RNA ที่บริเวณยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นหลัก โดยใช้กระบวนการ RNAi และคณะผู้วิจัย ยังได้เลือกที่จะยับยั้งการทำงานของ mRNA ของยีน P เป็นอีก 1 ยีนเป้าหมายด้วย โดย P protein จะมีหน้าที่เข้าจับกับ N protein ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และเป็นตัวป้องกันไม่ให้ N protein เกิดการ self-polymerization (self-assembly) และยังป้องกันการจับแบบ nonspecific ของ N protein กับ cellular RNA ด้วย (6, 23) และอีกบทบาทหนึ่ง P protein ยังเป็น cofactor ของ L protein เกิดเป็น RNA polymerase (P-L) complex ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการ transcription และ replication และยังมีงานวิจัยที่พบว่า เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ตัดเอายีน P ออกไปทั้งหมด มีการ replicate และผลิตไวรัสตัวใหม่ได้ช้าลงในเซลล์ทดลองที่มีการแสดงออกของโปรตีน P ร่วมด้วย และไม่สามารถผลิตไวรัสตัวใหม่ได้ในเซลล์ทดลองที่ไม่ได้รับโปรตีน P ร่วม (24)

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยคาดหวังว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในสมองและพัฒนาวิธีการรักษาโรคนี้ต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก

โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน N รวมทั้งยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่?

คำถามรอง

1. เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของโมเลกุล RNAi ระหว่าง single และ multiple RNAi โมเลกุลใดส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่ากัน?

2. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน P สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่?

3. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้น สามารถส่งผลกระทบในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่นๆนอกจากยีนเป้าหมายของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่?

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาว่าโมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน N และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่

2. เพื่อศึกษาว่าโมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้น โดยให้มีการทำงานร่วมกันระหว่างโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล ทั้งต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA จะสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน N และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ได้ดีกว่า การใช้โมเลกุล RNAi 1 โมเลกุล ต่อ mRNA ของยีน N เพียงอย่างเดียวหรือไม่

3. เพื่อศึกษาว่าโมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน P สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน P และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้หรือไม่

4. เพื่อศึกษาว่าโมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้น สามารถส่งผลกระทบในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่นๆได้ด้วยหรือไม่

สมมติฐานของการวิจัย

1. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N ที่เป็นเป้าหมายสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน N เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ และอาจจะส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ด้วย

2. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นโดยให้มีการทำงานร่วมกันระหว่างโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล ทั้งต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน N และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ได้ดีกว่า การใช้โมเลกุล RNAi 1 โมเลกุลต่อ mRNA ของยีน N เพียงอย่างเดียว

3. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน P ที่เป็นเป้าหมายสามารถลดระดับการแสดงออกของยีน P เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ และอาจจะส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ด้วย แต่อาจจะให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ไม่มากเท่ากับโมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N

4. โมเลกุล RNAi ที่สร้างขึ้น สามารถส่งผลกระทบในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่นๆได้ด้วย เช่น mRNA ของยีน G

รูปแบบของการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบ Experimental study

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโมเลกุล RNAi 2 รูปแบบ คือ miRNA และ siRNA (vector-based expression) (preliminary data)

-ออกแบบ miRNA และ siRNA ต่อ mRNA ของยีน N

-ทดสอบการยับยั้งเชื้อโดยการตรวจวัดระดับ mRNA N, mRNA G และ genomic RNA โดยวิธี Real-time PCR

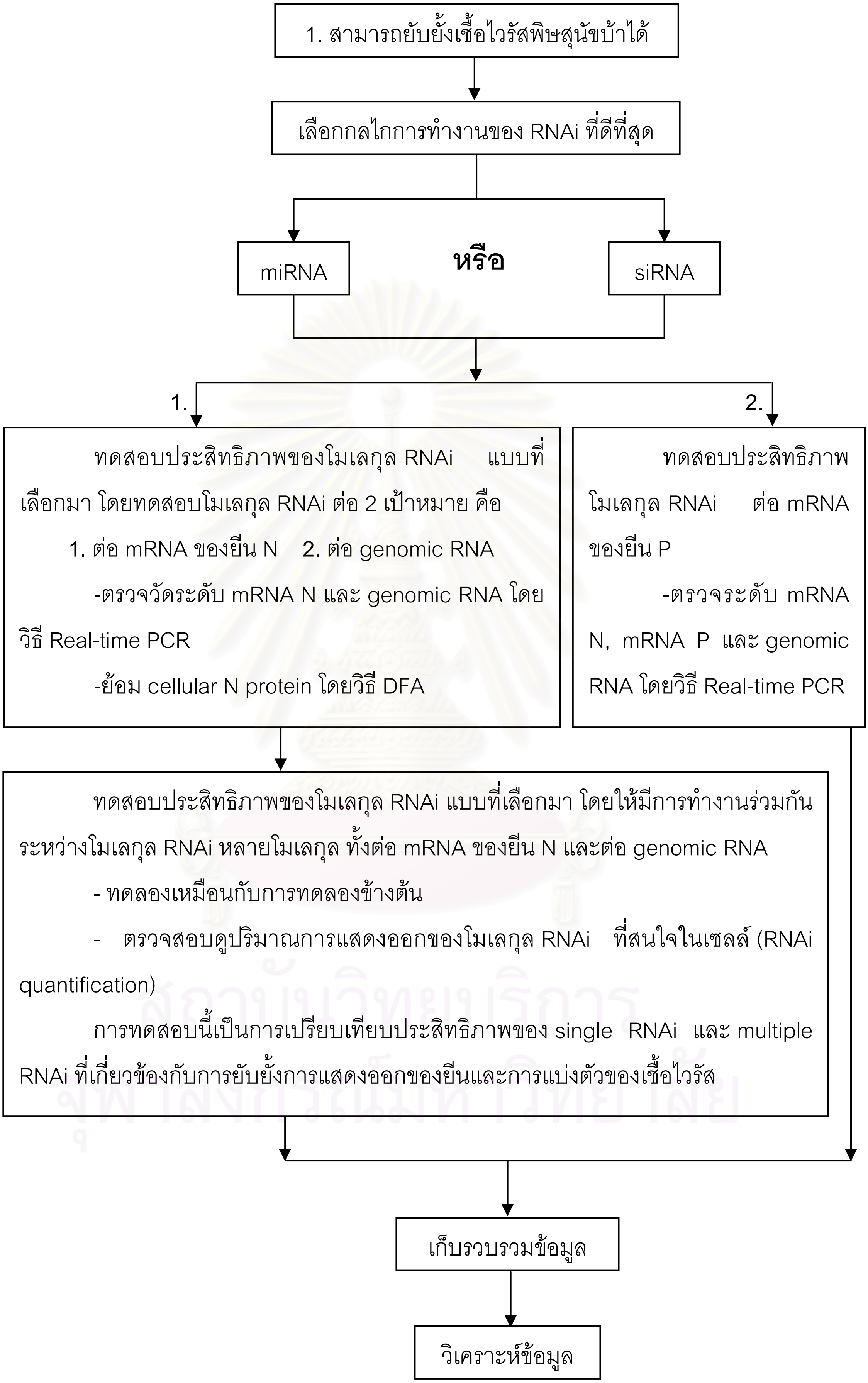
-ย้อม cellular N protein โดยวิธี DFA

-วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากค่า CT และผลการย้อมเซลล์

1. สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้

2. ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้

↓

ความผิดพลาดต่างๆ อาจเนื่องมาจากสาเหตุดังนี้

- การออกแบบโมเลกุล RNAi
- การสร้างโมเลกุล RNAi
- เทคนิคการทำ cell culture
- transfection
- virus infection
- เทคนิคการสกัด RNA
- เทคนิคการทำ PCR

ถ้าไม่พบข้อผิดพลาดดังกล่าว อาจทำการแก้ไขโดย

- เปลี่ยนตำแหน่งเป้าหมายที่จำเพาะต่อ RNAi ใน mRNA เดิม
- เปลี่ยน mRNA เป้าหมายใหม่

→ preliminary data

↓

ถ้ายังไม่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ ก็จำเป็นจะต้องหาสมมติฐานข้อสรุปที่เป็นไปได้มากที่สุด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเทคโนโลยี RNAi นี้ไม่เหมาะสมในการใช้กับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อตกลงเบื้องต้น

เครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการทดลอง เป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำตามมาตรฐานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ

ข้อจำกัดของการวิจัย

ไม่มี

คำสำคัญ

Rabies Virus

RNA Interference

Gene Expression

Viral Replication

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- RNAi: เป็นกระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของยีน และใช้ในการศึกษาหน้าที่ต่างๆของยีนได้ โดยผ่านกลไกการทำงาน 2 รูปแบบ คือ การทำลาย mRNA หรืออาจเป็นการยับยั้งการ translation ของ mRNA นั้นๆ

- CVS strain: เป็นเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า strain หนึ่ง ย่อมาจาก Challenge Virus Standard: GenBank No. DQ286762

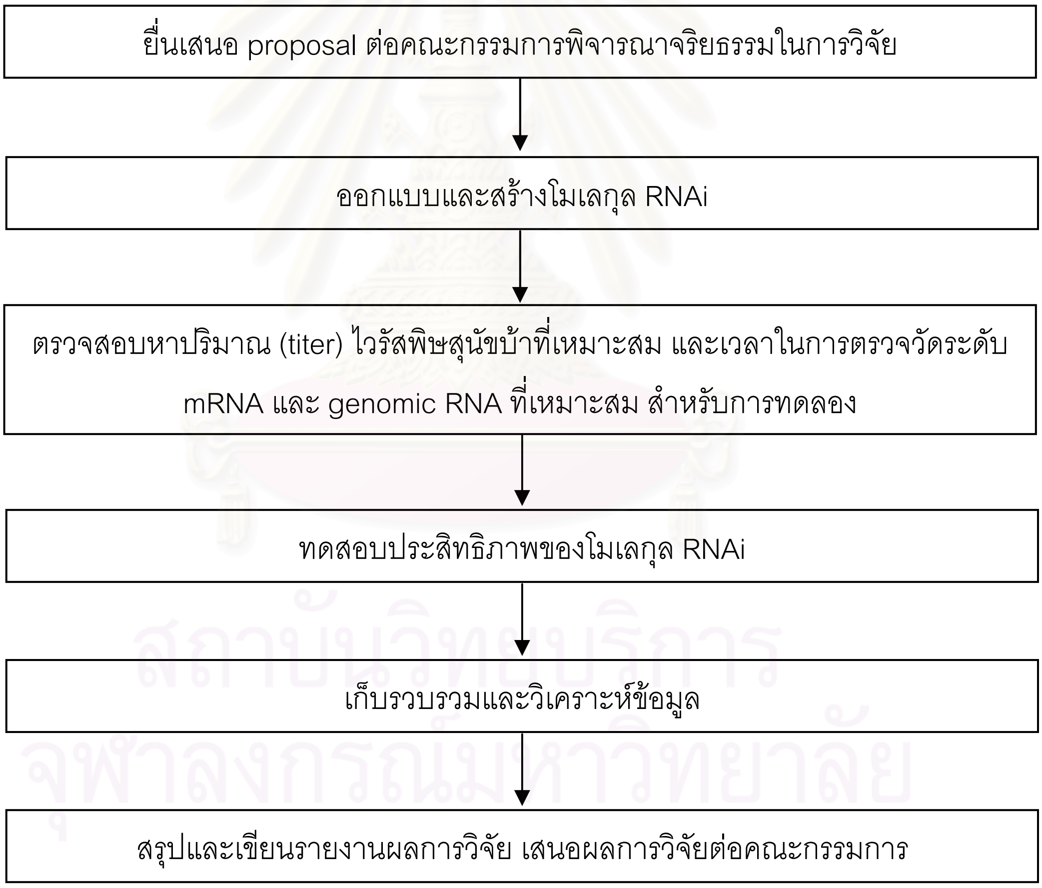
- HEP Flury strain: เป็นเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า strain หนึ่ง ย่อมาจาก High-Egg-Passage Flury: GenBank No. AB085828

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โมเลกุล RNAi ที่ออกแบบและสร้างขึ้นมาจะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ และคาดหวังอย่างสูงสุดว่างานวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าและพัฒนาวิธีการรักษาโรคนี้ต่อไปได้

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เป็นเชื้อไวรัสใน genus *Lyssavirus*, family *Rhabdoviridae*, order *Mononegavirales* (6) เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นเชื้อประเภท neurotropic virus ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคสมองอักเสบในผู้ที่ติดเชื้อ โดยพบว่า มีผู้เสียชีวิตจากเชื้อไวรัสนี้ปีละประมาณ 55,000 ราย (1, 2, 3) และโรคนี้เมื่อมีอาการแสดงของโรคเกิดขึ้น ผู้ติดเชื้อจะเสียชีวิตทุกราย โดยอาการก่อนการเสียชีวิต แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มอาการ คือ อาการแบบดุร้าย (encephalitic หรือ furious rabies) และอาการแบบอัมพาต (paralytic หรือ dump rabies) (1, 2, 25)

<u>1.1 โครงสร้างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า</u>

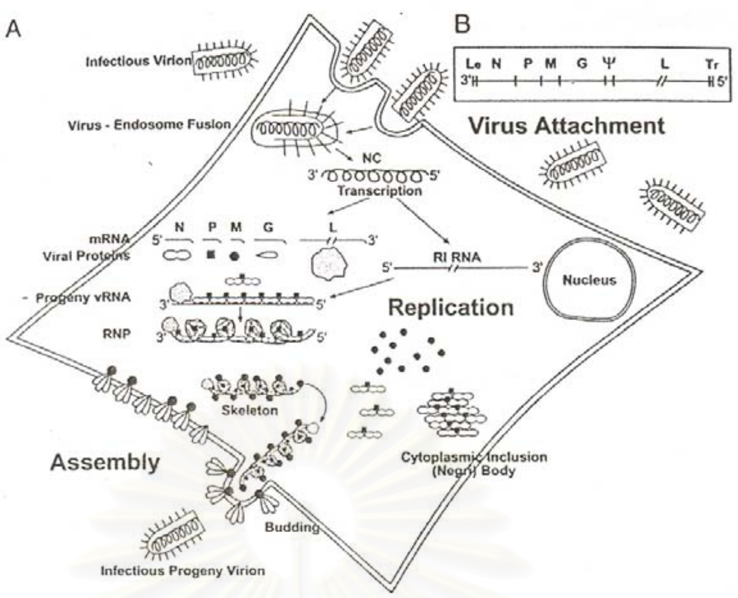
1.1.1 รูปร่างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

รูปร่างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเป็นแบบ bullet-shaped หรือ bacilliform โดยประกอบด้วย helical nucleocapsid (NC) หรือ ribonucleoprotein (RNP) core, genome RNA ประเภท single-strand, nonsegmented, negative-sense genome RNA และโปรตีนต่างๆ โดยโปรตีนเหล่านั้นได้แก่ nucleocapsid protein (N), phosphoprotein (P), matrix protein (M), glycoprotein (G) และ RNA-dependent RNA polymerase หรือ large protein (L) จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า พบว่า ส่วนแกนกลางของอนุภาค คือ แกนของ ribonucleoprotein ที่ประกอบด้วยส่วน genome RNA ที่ถูก encapsidate ด้วยโปรตีน N, L และ P และส่วนแกน ribonucleoprotein นี้ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีน M ทำให้เกิดเป็นอนุภาคที่มีรูปร่างคล้าย bullet-shaped ซึ่งเป็นลักษณะของ rhabdoviruses และโครงสร้างของ RNP-M นี้จะถูกล้อมรอบด้วย trimeric glycoprotein spikes (ยกเว้นด้านที่เป็นปลายตัด) ซึ่งจะกลายเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (6)

1.1.2 วงจรชีวิตและโครงสร้าง genome RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (รูปที่ 1)

วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เริ่มจาก ไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยการเกาะติดของ glycoprotein ของตัวไวรัสกับตัวรับบนเยื่อหุ้มของเซลล์ ซึ่งไวรัสจะเข้าสู่เซลล์โดยวิธีการ endocytosis ได้เป็น coated pit ซึ่งไปหลอมรวมกับ lysosome เอนไซม์ภายใน lysosome จะทำหน้าที่ปลดปล่อย nucleocapsid เข้าไซโทพลาสซึมของเซลล์ จากนั้น ยีนทั้ง 5 ยีนบน genome RNA จะถูกถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA 5 ชนิด และมีการสังเคราะห์ RNA สายบวกเส้นยาว ที่เรียกว่า antigenome หรือ replicative intermediate RNA ขึ้นด้วย (6) mRNA ทั้ง 5 ชนิดจะมีการแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีน 5 ชนิด (ตามที่กล่าวมาข้างต้น) และในส่วนของ antigenome RNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ (replication) genome RNA ของไวรัสรุ่นลูก (negative-strand RNA) โดยมีเอนไซม์ polymerase มาจับกับ antigenome RNA ของไวรัสที่ปลาย 3’ แล้วทำการสังเคราะห์ genome RNA สายใหม่ขึ้นมา (7, 26) โมเลกุลของ N-P complex protein จะทำหน้าที่ encapsidate genome RNA ของไวรัสรุ่นลูก หลังจากนั้น โปรตีน L จะเข้ามารวมตัว ทำให้ได้ progeny RNP structure และต่อมาจะรวมตัวกับโปรตีน M และโปรตีน G ที่อยู่ตรงส่วน plasma membrane ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ตามลำดับ ทำให้ได้เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่และแทรกตัวออกจาก plasma membrane ของเซลล์ที่ติดเชื้อเดิมไปสู่เซลล์ใหม่ใกล้เคียง (6)

genome RNA ของเชื้อไวรัสเป็นแบบ single-strand, nonsegmented, negative-sense genome RNA ซึ่งมีโครงสร้างตรงส่วนปลาย 3’ และ 5’ ของ genome เป็นส่วนของ leader (Le) และ trailer (Tr) ตามลำดับ ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ไม่ถูกถอดรหัส โดยทั้ง 2 ส่วนนี้จะอยู่ขนาบข้างยีนที่สำคัญ 5 ยีน ที่สามารถถอดรหัสและแปลรหัสเป็นโปรตีน 5 ชนิด ได้แก่ ยีน N, P, M, G และ L ตามลำดับบน genome โดยระหว่างยีน G และ L มี pseudogene (Ψ) ซึ่งเป็น long intergenic sequence ที่ไม่มี open reading frame จึงไม่สามารถถอดรหัสและแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ (6)



รูปที่ 1. A. วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า B. โครงสร้าง genome RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

(รูปจาก หนังสือ Rabies แต่งโดย Jackson AC และ Wunner WH. Fig. 3 หน้า 33)

<u>1.2 หน้าที่โปรตีนต่าง ๆของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า</u> (6)

1.2.1 Nucleocapsid Protein (N)

Nucleocapsid (N) protein เป็นส่วนประกอบหลักที่มีมากที่สุดของตัวไวรัส และเป็นโปรตีนตรงส่วน internal helical NC หรือแกน RNP N protein เป็นโปรตีนที่ conserve มากที่สุดภายใน genotype เดียวกันของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (20) N protein มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับกระบวนการ N-specific encapsidation ของ genome RNA และเป็นโปรตีนที่หุ้ม genome RNA มีหน้าที่ในการปกป้อง genome RNA template จากกระบวนการ ribonuclease activity (21, 22) นอกจากนี้ N protein ยังมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการ RNA transcription และ RNA replication โดยกระบวนการ replication นี้ N protein เป็นตัวทำให้การ replication เกิดขึ้นได้ตลอดเส้น genome RNA สามารถสังเคราะห์เส้น antigenome RNA ขึ้นมาและเป็นแม่พิมพ์ทำให้เกิดเส้น full-length progeny genome RNA โดยไม่หยุดชะงักที่ตรงสัญญาณ termination ตรงปลายของแต่ละยีน

1.2.2 Phosphoprotein (P)

Phosphoprotein (P) มีหน้าที่หลากหลาย โดย P protein จะเข้าจับกับ N protein ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และเป็นตัวป้องกันไม่ให้ N protein เกิดการ self-polymerization (self-assembly) และป้องกันการจับแบบ nonspecific ของ N protein กับ cellular RNA (23) โมเลกุล N-P complex ยังมีหน้าที่จำเพาะโดยตรงต่อกระบวนการ N encapsidation ของ genome RNA อีกด้วย และอีกบทบาทหนึ่ง P protein เป็น cofactor ของ L protein เกิดเป็น RNA polymerase (P-L) complex ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการ transcription และ replication

1.2.3 Virion-Associated RNA Polymerase or Large Protein (L)

Large (L) protein คือ ส่วนของ polymerase complex ที่มี P protein เป็น cofactor (23) โดย RNA polymerase (P-L) complex นี้มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ replication

1.2.4 Matrix Protein (M)

Matrix (M) protein คือ โปรตีนที่มีขนาดเล็กที่สุดในตัวไวรัส มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ downregulation ของ RNA transcription, การรวมตัวของแกน helical NC เป็นรูป tight coils การเชื่อมติดกับ membrane bilayers และเกี่ยวข้องในกระบวนการ cytopathogenesis ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสนี้

1.2.5 Glycoprotein (G)

Glycoprotein (G) เป็น fusion protein นำพาไวรัสเข้าเซลล์ เมื่อเข้าเซลล์และเกิดกระบวนการ transcription และ replication ที่สมบูรณ์แล้ว G protein ที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จากกระบวนการดังกล่าว จะฟอร์มตัวเป็น trimeric spike แทรกอยู่บนผิวเซลล์ โดยส่วน domain ของ G protein จะมีส่วนของ cytoplasmic domain ซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นเข้าในไซโทพลาสซึมของเซลล์ และทำการเชื่อมกับ M protein ในโครงสร้าง RNP-M เพื่อให้เกิดการรวมตัวของไวรัสที่สมบูรณ์แบบ และอีกส่วน คือส่วนของ ectodomain ซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกด้านนอกของผิวอนุภาคไวรัส เป็น

ส่วนที่มีความสำคัญในการจับกับ binding site (receptor) ของเชื้อไวรัสบนเซลล์ และสำคัญในกระบวนการเกิด viral pathogenesis

1.3 การรักษาผู้ป่วยที่มีอาการของโรคพิษสุนัขบ้า

โรคพิษสุนัขบ้าเป็นโรคติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตที่เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงมนุษย์ด้วย ผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับเชื้อไวรัส เมื่อมีอาการแสดงของโรคเกิดขึ้นจะเสียชีวิตทุกราย โดยอาการที่แสดงมีทั้งแบบคลุ้มคลั่ง และแบบอัมพาต โดยถ้าไม่ได้รับการรักษาผู้ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 5-11 วัน หลังมีอาการแสดงของโรค (4)

จากรายงานก่อนหน้านี้ (4) พบว่ามีผู้ป่วยหญิงอายุ 15 ปี ได้รับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าจากการโดนค้างคาวกัด สามารถรอดชีวิตจากการติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้านี้ได้ โดยผู้ป่วยรายนี้ได้รับการรักษาด้วยวิธี coma-induction ในขณะที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายร่วมด้วย ซึ่งพบว่าไม่ได้มีการให้วัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าแต่อย่างใด ผู้ป่วยถูกรักษาโดยใช้ยา ketamine, midazolam, ribavirin และ amantadine ร่วมกัน ผู้ป่วยรายนี้มี antibody ต่อไวรัสในน้ำไขสันหลังและเลือดตั้งแต่วันแรกก่อนการรักษา (วันที่ 6 หลังมีอาการ) อาการอัมพาตและระบบประสาทรับความรู้สึกมีอาการดีขึ้น โดยที่ประมาณ 5 เดือนหลังจากรักษา พบว่า ผู้ป่วยสามารถมีความรู้สึกตื่นตัวมากขึ้นและสามารถติดต่อสื่อสารกับผู้อื่นได้ แต่ยังมีอาการแสดงของ choreoathetosis, dysarthria และท่าทางการเดินที่ยังไม่สมดุลมากนัก

แต่ในรายงานจากศูนย์ปฏิบัติการโรคทางสมอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (27) พบว่า มีผู้ป่วยชายอายุ 33 ปี เข้ารับการรักษาโรคพิษสุนัขบ้าในช่วงระยะเริ่มแรกของ furious rabies เขาได้รับการรักษาด้วยวิธี coma-induction เหมือนกับการรักษาข้างต้น ผู้ป่วยรายนี้ไม่มี rabies antibody ในเลือดและน้ำไขสันหลังตั้งแต่ต้นและตลอดการรักษา และเสียชีวิตในวันที่ 12 หลังจากรับการรักษาในโรงพยาบาล และยังพบอีกว่ามีผู้ป่วยโรคนี้อีกอย่างน้อย 5 รายทั่วโลก (5) ที่รับการรักษาด้วยวิธีเดียวกันในต่างประเทศ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จเช่นกัน จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าการรักษาด้วยวิธี coma-induction เป็นที่น่าเชื่อถือได้หรือไม่ และด้วยเหตุผลทางด้านวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นต้องมีการศึกษาวิธีการรักษาใน cell culture system และใน animal model ก่อนนำมาใช้เป็นวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพในผู้ป่วยที่ติดเชื้อได้ และเรื่องค่าใช้จ่ายในการรักษาที่อยู่ในระดับสูงและวิธีการรักษาที่สลับซับซ้อน จึงทำให้วิธีการรักษานี้ยังไม่สามารถใช้เป็นวิธีรักษาโรคติดเชื้อในระบบประสาทและสำหรับโรคพิษสุนัขบ้าได้ ดังนั้น โรคพิษสุนัขบ้าในปัจจุบันจึงถือเป็นโรคที่

ไม่สามารถรักษาให้หายได้ และเป็นโรคที่ยังต้องมีการศึกษาหาวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

2. RNA interference (RNAi)

กระบวนการ RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของยีน และใช้ในการศึกษาหน้าที่ต่างๆของยีน โดยกลไก RNAi จะใช้โมเลกุล small noncoding double-stranded RNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนผ่านกลไกการทำงาน 2 รูปแบบ คือ การทำลาย mRNA หรือยับยั้งการ translation ของ mRNA ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบจะทำให้ mRNA ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ (28)

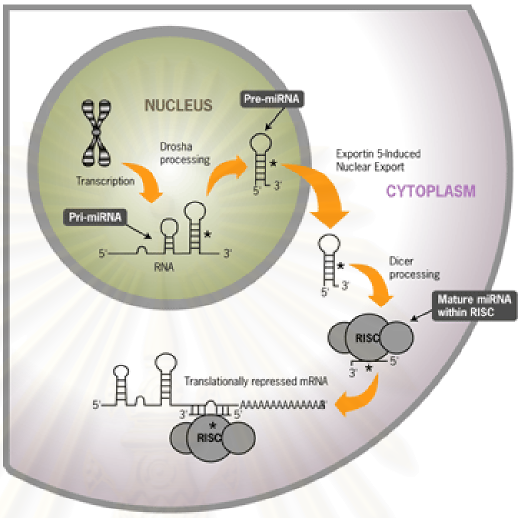
<u>**2.1 กลไกการทำงานของ** RNA interference</u>

กลไกการทำงานของ RNA interference ที่สำคัญที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตมี 2 รูปแบบ คือ small interfering RNAs (siRNAs) และ microRNAs (miRNAs) (28) ซึ่งทั้ง 2 กลไกนั้น มีรูปแบบการทำงานดังนี้

2.1.1. miRNA pathway

miRNA เป็น endogenous single-stranded RNA มีกลไกการทำงานเริ่มต้นในนิวเคลียสของเซลล์ โดยอยู่ในรูปของ primary miRNA (pri-miRNA) ในลักษณะโครงสร้างแบบ hairpin โดย pri-miRNA ถูก transcribe มาจาก genome โดย RNA Polymerase II ต่อมาเอนไซม์ Drosha (dsRNA-specific ribonuclease) จะทำหน้าที่ตัด pri-miRNA ได้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) โดย pre-miRNA มีความยาวประมาณ 70 เบส และมี 1-4 เบส อยู่ตรงด้านปลาย 3’ overhangs และประมาณ 25-30 เบส เป็นส่วนก้าน hairpin ส่วนเบสที่เหลือเป็นส่วน loop เล็กๆ หลังจากนั้น pre-miRNA จะถูกปล่อยออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโทพลาสซึมโดยการทำงานของ exportin-5 ต่อมาเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท RNase III superfamily อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์จะทำหน้าที่ตัด pre-miRNA ทำให้ได้ miRNA (double-stranded RNA) ขนาดสั้นๆประมาณ 19 คู่เบส โดยยังมีเบสประมาณ 1-4 เบส อยู่ตรงด้านปลาย 3’ overhangs ติดอยู่ด้วย ต่อมา miRNA ขนาดสั้นๆนี้จะแยกสาย sense และ antisense ออกจากกัน และส่วน

antisense strand ของ miRNA จะเข้าจับกับ RNA-inducing silencing complex (RISC) ซึ่งเป็น multi-protein complex ได้เป็น RISC-associated miRNA complex ซึ่ง RISC จะพา miRNA ไปจับ mRNA โดยเป็นการจับแบบ imperfect base pairing กับ mRNA เป้าหมาย (29) แล้วยับยั้งการ translation ของ mRNA ทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่อไป

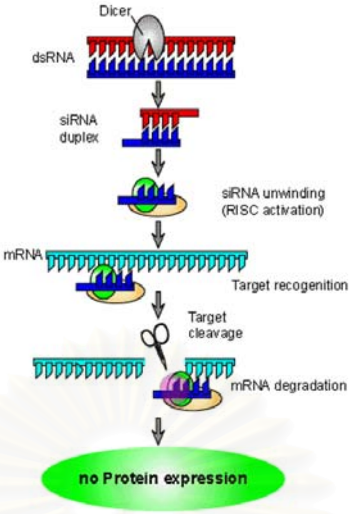


รูปที่ 2. miRNA pathway (30)

(รูปจาก http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA/mirna_pro.html)

2.1.2. siRNA pathway

siRNA เป็น sequence-specific short double-stranded RNA มีกลไกการทำงาน โดยเริ่มจากการนำ double-stranded RNA (dsRNA) เข้าเซลล์ ต่อจากนั้น เอนไซม์ Dicer จะตัด dsRNA ทำให้ได้ dsRNA สายสั้นๆ (siRNA) ประมาณ 21-23 คู่เบสโดยมีเบสประมาณ 2 เบสอยู่ตรงส่วนปลาย 3' overhangs ต่อมา siRNA จะแยกสาย sense และ antisense ออกจากกัน ต่อจากนั้น antisense strand ของ siRNA จะเข้าจับกับ RISC ได้เป็น RISC-associated siRNA complex ซึ่ง RISC จะพา siRNA ไปจับ mRNA แบบ perfect complementary กับ mRNA เป้าหมาย (29) แล้วทำลาย mRNA เป้าหมาย ทำให้ไม่เกิดการ translation เป็นโปรตีนได้ เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆขึ้น



รูปที่ 3. siRNA pathway (31)

(รูปจาก http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/AntisenseRNA)

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ากลไก siRNA เป็นกลไกธรรมชาติในการต่อต้านไวรัส (32, 33) และกลไก miRNA เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมกระบวนการสำคัญของเซลล์ปกติที่จะเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง เช่น กระบวนการ differentiation, proliferation, apoptosis และ metabolism เป็นต้น และมีหลักฐานบ่งชี้ว่า miRNA เกี่ยวข้องกับโรคจากเชื้อไวรัสมากมาย miRNA สามารถควบคุมวงจรชีวิตของไวรัสและปฏิกิริยาที่ไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านทำต่อกัน (34, 35) และอีกทางหนึ่ง miRNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ก็อาจยับยั้งหรือสนับสนุนให้เกิด viral replication ได้เช่นกัน (36, 37) ไวรัสบางชนิดมีกระบวนการในการต่อต้านกลไก RNAi ไม่สามารถใช้กลไกดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญแบ่งตัวของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านได้ (38) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษากระบวนการ RNAi ในการต่อต้านเชื้อไวรัสที่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัสนั้นๆ เพื่อความเข้าใจในกระบวนการเกิดโรคและการรักษาที่มีประสิทธิภาพ

2.2 หลักการออกแบบโมเลกุล siRNA (39)

หลักการออกแบบลักษณะลำดับเบสโมเลกุล siRNA ที่ดี เพื่อสามารถทำงานในกระบวนการ RNA Interference ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีหลักเกณฑ์โดยทั่วไป ดังนี้

1. double-stranded siRNA ควรมีบริเวณ double-stranded complementary 19 ลำดับเบส และที่แต่ละปลาย 3’ ควรมี 2 nucleotide overhang

2. เลือกลำดับเบสในบริเวณ coding region ของ mRNA เป้าหมายที่มี %GC ระหว่าง 30 – 52%

3. ที่ตำแหน่งปลาย 3' ของเส้น sense strand ควรมีลำดับเบส A/U 3-5 ตัว

4. หลีกเลี่ยงลำดับเบสแบบซ้ำๆกันภายในโมเลกุล siRNA (internal repeat)

5. ลักษณะลำดับเบสในเส้น sense strand ที่บางตำแหน่ง ควรมีลักษณะ ดังนี้

ตำแหน่งที่ 3 และ 19 ควรเป็นลำดับเบส A

ตำแหน่งที่ 10 ควรเป็นลำดับเบส U

ตำแหน่งที่ 19 ไม่ควรเป็นลำดับเบส G หรือ C

ตำแหน่งที่ 13 ไม่ควรเป็นลำดับเบส G

6. ลำดับเบสเป้าหมายที่โมเลกุล siRNA ไปจับและทำลาย ต้องไม่เหมือน (non-homologous) กับลำดับเบสของยีนอื่นๆที่ไม่ต้องการ โดยสามารถตรวจสอบได้จากการนำลำดับเบสของยีนที่ต้องการเข้าโปรแกรมการ BLAST

2.3 การสร้างโมเลกุล RNA interference

โมเลกุล RNAi สามารถสร้างได้ 2 รูปแบบ คือ แบบ direct chemical synthesis และแบบการใช้ RNA polymerase promoter เป็นตัวทำให้เกิดการ transcription และเกิดเป็นโมเลกุล RNAi ขึ้น (vector-based expression) วิธีที่นิยมใช้กันคือแบบ vector-based ซึ่งเป็นวิธีที่ high-throughput และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและสามารถถูกสร้างขึ้นมาใหม่ได้ตลอด การใช้โมเลกุล RNAi แบบ direct chemical synthesis ทำให้โมเลกุล RNAi สามารถอยู่ภายในเซลล์เพียงช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น แต่วิธีการสร้างโมเลกุล RNAi แบบ vector-based ทำให้สามารถสร้างโมเลกุล RNAi ในเซลล์ได้ในระยะเวลายาวนานกว่า และสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับโมเลกุล RNAi กับเซลล์ที่ไม่ได้รับโมเลกุล RNAi ออกจากกันได้ โดยใช้คุณสมบัติของ vector ในด้าน antibiotic resistant gene มาช่วยในการคัดแยกเซลล์ ซึ่งทำให้การทดลองเกี่ยวกับกลไก RNAi มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและน่าเชื่อถือมากขึ้น (40)

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้มีการพัฒนาเวกเตอร์แบบ polymerase II promoter-driven plasmid ให้สามารถผลิต artificial miRNA ได้ (41, 42) และการใช้เวกเตอร์นี้ สามารถผลิต miRNA ที่มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกว่า siRNA และสามารถใช้เป็น antiviral therapy ที่ดีได้ (43, 44) และพบว่า การใช้ระบบเวกเตอร์นี้ ยังสามารถผลิต miRNA หลายตัว ที่มาจาก precursor miRNA เพียงโมเลกุลเดียว และ miRNA เหล่านั้นที่สร้างขึ้นมาก็สามารถทำงานอย่างมี

ประสิทธิภาพที่ดี (45) ซึ่งการใช้ miRNA ต่อ mRNA หลายๆเป้าหมายในการยับยั้งเชื้อไวรัสในเวลาเดียวกัน พบว่าเป็นข้อดีในการลดโอกาสที่ไวรัสจะดื้อต่อโมเลกุล RNAi ตัวใดตัวหนึ่ง และเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเรื่องลำดับเบสของไวรัสที่เปลี่ยนแปลงไปในบางตำแหน่ง (genetic variation and mutation)

2.4 การประยุกต์ใช้ RNA interference ในโรคติดเชื้อ

เทคโนโลยี RNA interference ถูกใช้เป็น antiviral therapeutic กับโรคติดเชื้อไวรัสมากมาย เช่น HIV-1 (10, 11), Dengue virus (12), Hepatitis B virus (13), Hepatitis C virus (14), Influenza (15), WNV (16, 17), JEV (17) และ nonsegmented negative-strand RNA virus (18)

จากกลุ่มวิจัยของ Lee NS (10) พบว่า สามารถใช้ double-stranded siRNAs vector ยับยั้งการแสดงออกของ HIV-1 DNA ได้ และจากกลุ่มวิจัยของ Capodici J (11) พวกเขาสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัส HIV-1 ใน permanent cell lines และ primary CD4(+) T cells ได้ และสามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อ HIV ได้โดยใช้ 21 base pair dsRNA siRNA จากข้อมูล บ่งชี้ว่า RNAi สามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อ HIV ได้ ซึ่งในอนาคตอาจนำมาเป็นวิธีการรักษาโรคติดเชื้อ AIDS ต่อไป

จากกลุ่มวิจัยของ Zach N. Adelman (12) พบว่า การใช้ DEN virus-specific RNA ที่สร้างมาจาก plasmid DNA ได้เป็น siRNA 21-25 ลำดับเบส ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส Dengue ในเซลล์ยุง สามารถยับยั้งการสร้างเชื้อ DEN-2 ได้

จากกลุ่มวิจัยของ Tsung-Lin Cheng (13) พบว่า สามารถใช้เทคโนโลยี RNAi มายับยั้งการแสดงออกของ hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) ได้ โดยการใช้ DNA vector-based shRNA expression system ต่อบริเวณ HBsAg coding region มาเป็นเป้าหมายในการยับยั้ง ซึ่งพบว่า สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ใน mouse model ได้

จากกลุ่มวิจัยของ Sharookh B. Kapadia (14) พบว่า การใช้ ds-siRNA สามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อ hepatitis C virus ใน transfected Huh-7 cell ได้ ซึ่งเซลล์นี้ เป็นเซลล์ที่ HCV genome สามารถอาศัยอยู่และ replicate ตัวเองได้ โดย siRNA ที่สร้างต่อยีนบริเวณ NS3 และ NS5B ของเชื้อ สามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อภายใน 2 วัน หลังการ transfection และให้ผลการยับยั้งอยู่อย่างน้อย 6 วันภายในเซลล์ แต่การยับยั้งการแสดงออกของ

โปรตีนของเชื้อ พบว่า ให้ผลที่วันที่ 4 หลังการ transfection นั่นแสดงว่า โปรตีนของเชื้อมี half life ที่ยาวนานกว่า genome RNA

จากกลุ่มวิจัยของ Hongbo Zhou (15) พบว่า การใช้ siRNA ที่สร้างต่อยีนที่มีความ conserve ของเชื้อไวรัส influenza ได้แก่ matrix (M2) gene และ nucleocapsid protein gene (เป็นยีนที่สำคัญต่อกระบวนการ replication ของเชื้อ) ต่อไวรัส influenza A 3 subtype คือ H5N1, H1N1 และ H9N2 โดยทดลองทั้งในเซลล์ทดลอง (เซลล์ MDCK) และหนูทดลอง (BALB/c mice) พบว่า siRNA สามารถยับยั้งกระบวนการ replication ในเซลล์ MDCK ได้ และการแสดงออกของโปรตีนจากยีนดังกล่าวลดลง และพบว่า pS-M48 siRNA และ pS-NP1383 siRNA เป็น siRNA ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งกระบวนการ replication และการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดี โดยการใช้ siRNA ทั้ง 2 ตัวพร้อมกัน เพื่อยับยั้งเชื้อ H5N1, H1N1 หรือ H9N2 ในหนูทดลอง พบว่า ระดับของ titer ไวรัสในปอดของหนู ลดลงถึง 37-50 เท่า และ siRNA ดังกล่าวสามารถทำให้หนูรอดชีวิตจากเชื้อ H1N1 ในอัตราการรอดชีวิต 4/8 และจากเชื้อ H5N1 ในอัตราการรอดชีวิต 2/8 อีกด้วย

จากกลุ่มวิจัยของ Fengwei Bai (16) พบว่า siRNA สามารถยับยั้งการ replication ของ West Nile Virus (WNV) ในหนูทดลองได้ และการฉีด siRNA เข้าหนูก่อนการนำเชื้อไวรัสเข้าไปโดยวิธี intraperitoneal inoculum สามารถลดปริมาณไวรัสในหนู และทำให้หนูรอดชีวิตได้บางส่วน และจากกลุ่มวิจัยของ Priti Kumar (17) พบว่า การทดลองใช้เทคโนโลยี RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในเชื้อไวรัส Japanese encephalitis (JEV) และ WNV ซึ่งเป็นเชื้อใน genus flaviviruses พวกเขาได้เลือกยีนเป้าหมาย คือ บริเวณ cd loop-coding sequence ใน domain II ของ viral envelope protein ซึ่งเป็นบริเวณที่ conserve มากภายใน genus flaviviruses และคลอบคลุมถึง strain ต่างๆของเชื้อ JEV และ WNV ด้วย พวกเขาออกแบบ siRNA ต่อเป้าหมายที่เลือก โดยทดลองใช้ siRNA ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 2 ในหนูทดลอง ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเกิด encephalitis ในหนูได้ ไม่ว่าจะให้ siRNA ก่อนหรือหลังจากที่หนูได้รับเชื้อไวรัส

จากกลุ่มวิจัยของ Sailen Barik (18) ได้มีการใช้ ds-siRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในเชื้อไวรัสกลุ่ม nonsegmented negative-stranded RNA (NNR) เช่น respiratory syncytial virus (RSV), vesicular stomatitis virus (VSV) และ human parainfluenza virus (HPIV) ตัวอย่างเช่น การใช้ siRNA ต่อ mRNA P gene ยับยั้งการทำงานของ RdRP subunits ใน RSV พบว่า siRNA ต่อ mRNA P gene สามารถลดปริมาณโปรตีน P ได้ และการแสดงออกของยีนทั้งหมดของไวรัสลดลงอย่างมาก และยังมีการทดลองใช้ siRNA ยับยั้ง

บทบาทหน้าที่ของ HN protein ในการเกิด syncytium ในเซลล์ที่ติดเชื้อ wild type HPIV-3 ซึ่งพบว่า siRNA สามารถยับยั้งการทำงานของ HN gene ได้ ส่งผลให้เซลล์ไม่เกิดการถูก fuse ซึ่งเป็นการยืนยันหน้าที่ของ HN protein ในการทำให้เกิด syncytium ได้ทางหนึ่ง นอกจากนั้น ยังได้ออกแบบ siRNA ต่อ mRNA M1 gene ของเชื้อไวรัส VSV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสตระกูลเดียวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยพบว่า siRNA ต่อ mRNA M1 gene สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน M1, M2 และ M3 ได้ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตาม การทำงานของยีน M ที่ผลิตโปรตีน M1, M2 และ M3 ใน VSV ก็แตกต่างจากยีน M ในเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคโนโลยี RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน M ใน VSV จะสามารถนำมาใช้ได้ผลกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าหรือไม่

อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยของกลุ่ม Sailen Barik (18) ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับข้อจำกัดของเทคโนโลยี RNAi ในการยับยั้งเชื้อไวรัสในกลุ่ม nonsegmented negative-stranded RNA (NNR) ไว้ โดยจากลักษณะของเชื้อ ยกตัวอย่างเช่น เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่ได้บรรยายมาในข้างต้น พบว่า เชื้อไวรัสในกลุ่มนี้มีการผลิตทั้ง negative-strand genome และ positive-strand antigenome และ viral genome RNA ของเชื้อจะเกิดการ encapsidation โดยโปรตีน N ซึ่งโปรตีน N จะปกป้อง genome RNA template จาก RNase activity และปกป้อง genome RNA template จากการโดนจับกับโมเลกุล RNAi ด้วย นั่นหมายความว่าโมเลกุล RNAi อาจไม่สามารถเข้าไปทำลายได้ถึง genome RNA ของเชื้อไวรัส และอีกข้อจำกัดหนึ่งเกี่ยวกับเทคโนโลยีนี้ คือ การ oversaturation ของปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกลไก RNAi ตามหลักการแล้ว การใส่ multiple RNAi molecules น่าจะสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เป็นเป้าหมายที่ต้องการได้หมด แต่เนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่ช่วยในกระบวนการ RNAi ในเซลล์มีอยู่จำนวนหนึ่ง การใช้โมเลกุล RNAi มากเกินไป ก็จะไม่ส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนแต่อย่างใด นี่จึงเป็นข้อจำกัดในกระบวนการ RNAi อีกข้อหนึ่ง

โดยสรุปแล้ว โมเลกุล RNAi ที่ออกแบบและมีคุณสมบัติที่เหมาะสม จะสามารถใช้เป็น antiviral therapeutic ในการทดลองในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ แต่อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยี RNAi ก็ยังมีข้อจำกัดที่ได้กล่าวมา ดังนั้น ถ้าต้องการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสชนิดใด จึงจำเป็นต้องมีการทดลองที่จำเพาะสำหรับโมเลกุล RNAi ต่อยีนของไวรัสนั้นๆโดยตรง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

1.1 Autoclave

1.2 Centrifuge, refrigerated centrifuge

1.3 Centrifuge, microcentrifuge high speed

1.4 CO_2 Cell Culture Incubator

1.5 Cool Box

1.6 DNA sequencer ABI Prism 310 Genetic Analysis

1.7 Gel Doc 1000

1.8 Gel Electrophoresis chamber set

1.9 GeneAmp PCR System 9700

1.10 Freezer -80°C

1.11 Incubator 37°C

1.12 Laminar Flow Hood Class II

1.13 Light microscope

1.14 Multi-block heater

1.15 Nikon Eclipse TE2000 microscope

1.16 Orbital Incushaker

1.17 pH meter P25 EcoMet

1.18 Pipette Aid

1.19 Precisa XT2200C

1.20 Real-time PCR LightCycler (ROCHE)

1.21 Refrigerator

1.22 RG-6000 Corbett research Real-time PCR (Corbett)

1.23 Spectrophotometer

1.24 Vortex Mixer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.25 Water Bath

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 Aluminum Foil

2.2 Automatic Adjustable Micropipette

2.3 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml

2.4 Bunsen Burner

2.5 Calculator

2.6 Cell Culture Flask: T25, T75

2.7 Corning Sterile Filter for Cell culture

2.8 Cryovial Tube

2.9 Cuvette 80 - 100 μl

2.10 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml

2.11 Digital Timer

2.12 Disposable Gloves

2.13 Flask: 125 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml

2.14 Forceps

2.15 Hemocytometer, cell counter

2.16 Microcentrifuge Tube: 0.2 ml, 0.6 ml, 1.5 ml,

2.17 Microscope Glass Cover Slips

2.18 Parafilm

2.19 Pipette Tip: 10 μl, 20 μl, 200 μl, 1,000 μl

2.20 Permanent Marker

2.21 Petridish

2.22 Polypropylene Conical Tube, sterile: 15 ml, 50 ml

2.23 Reagent Bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml

2.24 Sanitary Tissue Paper

2.25 Spreader

2.26 Syringe Disposable

2.27 Test Tube Racks

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.28 Thermometer

2.29 24-well plate

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 Absolute ethanol

3.2 90% Acetone

3.3 Antibiotic drug: Ampicillin, Spectinomycin

3.4 FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

3.5 BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit

3.6 BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP

3.7 Clorox

3.8 70% Ethanol

3.9 Ethidium bromide

3.10 Fetal Bovine Serum

3.11 Glycerol

3.12 HyQ L-Glutamine 200 mM (100X)

3.13 HyQ MEM/EBSS media

3.14 Ice

3.15 LB agar

3.16 LB broth

3.17 LE agarose

3.18 LightCycler TaqMan Master

3.19 Lipofectamine™ 2000 kit

3.20 6X loading dye

3.21 2-Mercaptoethanol

3.22 Nuclease–free water

3.23 Opti-MEM® I Reduced Serum Medium

3.24 PCR marker

3.25 Pennicillin/Streptomycin

3.26 Phosphate Buffer Saline (PBS)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.27 Primer set

3.28 pSilencer™ 4.1- CMV neo siRNA Expression Vector Kit

3.29 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

3.30 QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)

3.31 QIAquick Gel Extraction Kit

3.32 QuantiTect SYBR Green PCR Kit

3.33 Restriction Enzyme Kit

3.34 RNeasy Mini Kit (Qiagen)

3.35 RT reaction kit (Promega)

3.36 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit

3.37 TBE buffer

3.38 Trypan blue

3.39 0.25% trypsin

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำการสกัด RNA จากเซลล์ neuro2A และ supernatant ที่ผ่านการนำโมเลกุล RNAi และเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเข้าเซลล์แล้ว โดยนำ RNA ดังกล่าวมาทำการตรวจสอบและเก็บรวบรวมข้อมูลจาก 2 วิธี ดังนี้

1. ปริมาณ mRNA, genomic RNA และ โมเลกุล RNAi จะถูกเก็บอยู่ในรูปของค่า CT value จากวิธีการทำ Real-time PCR

2. ข้อมูลการย้อมโปรตีนในเซลล์ จะถูกเก็บรวบรวมโดยวิธี Direct Fluorescence Assay (DFA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ออกแบบโมเลกุล RNAi (โดย ผศ.นพ.ดร. นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

1.1 **การออกแบบโมเลกุล** miRNA

ออกแบบ single-stranded DNA oligonucleotide 2 สาย (RNAi oligonucleotide template) โดยสายแรก เป็นเส้นลำดับเบสของ target pre-miRNA (top strand oligo) ส่วนสายที่สอง เป็นเส้นลำดับเบสที่ complement กับเส้น top strand oligo (bottom strand oligo) ต่อจากนั้น นำ 2 เส้น oligonucleotide นี้ ไปสร้างเป็นโมเลกุล miRNA ต่อไป

การออกแบบ single-stranded DNA oligonucleotide ในงานวิจัย ใช้โปรแกรม BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen) จาก website: www.invitrogen.com/rnai โดยลักษณะ oligonucleotide ทั้ง 2 เส้นมีหลักการออกแบบ ตามลักษณะลำดับเบส ดังนี้

target pre-miRNA หรือ top strand oligo (จากด้าน 5' ⟶ 3')

- 5' nucleotide (TGCTG) โดยเป็นลำดับเบสที่มาจาก endogenous miR-155 (46) ซึ่งเป็น endogenous murine miRNA ที่เป็นพื้นฐานในการพัฒนาระบบ miRNA vector ของห้องปฏิบัติการของ David Turner (41) โดยเมื่อทำ annealing เส้น top และ bottom strand oligo นี้แล้ว ลำดับเบส TGCTG จะเกิดเป็น 4 nucleotide 5' overhang ที่สามารถเข้าคู่ได้กับ 4 nucleotide overhang ของเวกเตอร์ที่ใช้ในการสร้างโมเลกุล miRNA (pcDNA™ 6.2-GW/±EmGFP-miR vectors: Invitrogen)
- Reverse complement (antisense strand) ของลำดับเบส mRNA เป้าหมาย 21 nucleotide (เป็นลำดับเบสของ mature miRNA)
- 19 nucleotide (5'- GTTT**TGGCCA**CTGACTGAC -3') ที่เป็น terminal loop ของ pre-miRNA โดยมีพื้นฐานลำดับเบสมาจาก miR-155 และทำการดัดแปลงลำดับเบสเล็กน้อยให้มีลำดับเบสของ *Msc* I site (ตัวหนาทึบขีดเส้นใต้) เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ลำดับเบสของระบบ

- ลำดับเบส sense strand ของ mRNA เป้าหมาย ในบริเวณที่นำมาทำ reverse complement ตามที่กล่าวมา โดยตัด nucleotide ที่ 9 และ 10 ออก (เพื่อให้เกิดเป็น internal loop ใน mature miRNA)
- 4 nucleotide 5’ overhang (CAGG) โดยเมื่อออกแบบเป็น top strand oligo จะไม่มีส่วน 4 nucleotide นี้ แต่เมื่อเป็น pre-miRNA จะมีส่วน nucleotide นี้ overhang อยู่

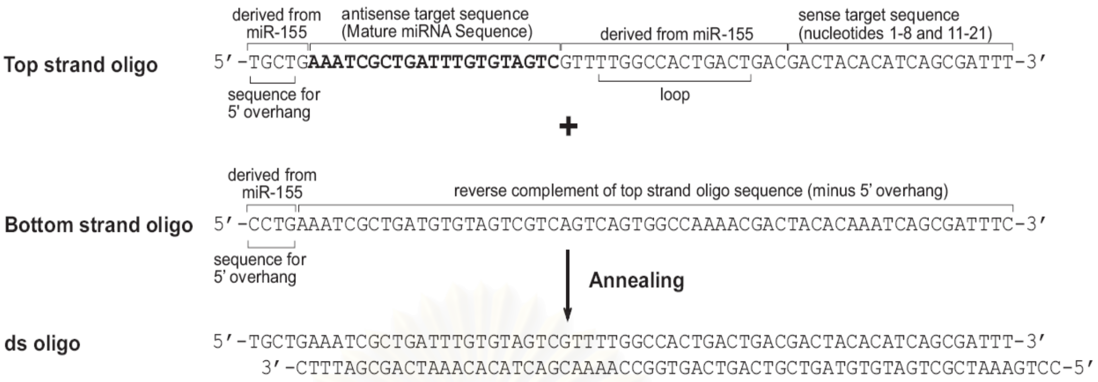
5’ -	TGCT overhang	5’G + antisense target sequence	loop sequence	sense Δ2 nt target sequence	- 3’

รูปที่ 4. แสดงลักษณะโครงสร้างของ pre-miRNA (top strand oligo) ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้

<u>bottom strand oligo</u> (complement เส้น top strand oligo: จากด้าน 5’ $\longrightarrow$ 3’)

- (อ้างอิงจากเส้น top strand oligo) ให้ตัดลำดับเบส 5’ TGCT (5’ overhang) ออก ดังนั้น ลำดับเบสใหม่จะเริ่มที่ 5’ G
- ทำ reverse complement ของเส้น top strand oligo ด้านบน ที่เริ่มต้นด้วย 5’ G ซึ่งจะได้เป็นเส้น bottom strand oligo ที่มีด้าน 3’ เป็น 3’ C
- เติมลำดับเบส CCTG ซึ่งเป็นลำดับเบสของ miR-155 เข้าด้าน 5’ ของเส้น bottom strand oligo ด้านบน ซึ่งจะได้เป็นเส้น bottom strand oligo ที่สมบูรณ์ โดยมีด้าน 5’-CCTG overhang ที่สามารถเข้าคู่ได้กับ 4 nucleotide overhang ของเวกเตอร์ที่ใช้ในการสร้าง double-strand oligo นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5. **แสดงลำดับเบสของเส้น** top **และ** bottom strand oligo **ที่สร้างเป็น** annealed miRNA template **โดยเป็นตัวอย่างลำดับเบสของ** miRNA **ต่อยีน** *lacZ* (miR-*lacZ*)

```
UG|                UU             UUGGCC
   CUGAAAUCGCUGAU   GUGUAGUCGUU        \
   |||||||||||||   ||||||||||:         A
   GACUUUAGCGACUA   CACAUCAGCAG        /
AG^                --             UCAGUC
```

รูปที่ 6. **แสดงโครงสร้างของ** pre-miRNA **ของ** miR-*lacZ*

ในการออกแบบ 2 single-stranded DNA oligonucleotide ในการทดลอง ใช้โปรแกรม BLOCK-iT^{TM} RNAi Designer (Invitrogen) จาก website: www.invitrogen.com/rnai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 **การออกแบบโมเลกุล siRNA**

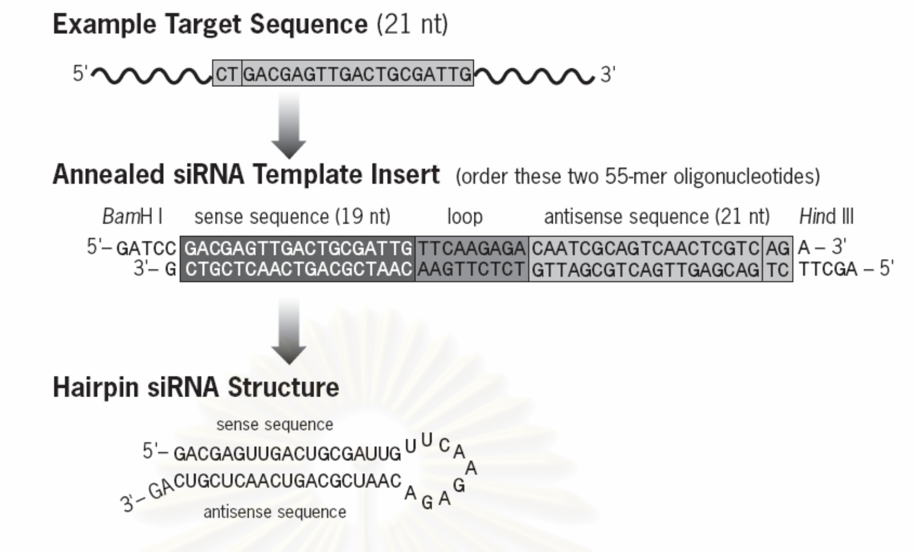
หลักการออกแบบโมเลกุล siRNA คล้ายคลึงกับโมเลกุล miRNA คือ มีเส้น top strand Olido และ bottom strand Oligo โดยในงานวิจัยนี้ ใช้โปรแกรม siRNA target finder จาก www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html ในการออกแบบ โดยลักษณะของ single strand DNA Oligo ทั้ง 2 เส้น มีหลักการออกแบบ ตามลักษณะลำดับเบส ดังนี้

top strand oligo (จากด้าน 5' ⟶ 3')

- 5' nucleotide (GATCC) โดยเป็นลำดับเบสของ restriction enzyme BamHI ที่จะมาจับแล้วตัดเป็น sticky end เพื่อสามารถ ligate เข้ากับ pSilencer 4.1 – CMV neo vector ได้
- 19 nucleotide ของเส้น sense strand mRNA เป้าหมาย
- 9 nucleotide (5' TTCAAGAGA 3') ซึ่งเป็น loop เชื่อม sense และ antisense strand ของ hairpin siRNA
- Reverse Complementary (antisense strand) ของลำดับเบส mRNA เป้าหมาย 21 nucleotide และเติมลำดับเบส A 1 ตัว ต่อท้าย เพื่อให้ complement กับเส้น bottom strand Oligo ช่วงปลาย 5' ที่เป็นส่วน restriction enzyme site

bottom strand oligo (จากด้าน 5' ⟶ 3')

- 5' nucleotide (AGCTT) โดยเป็นลำดับเบสของ restriction enzyme HindIII ที่จะมาจับแล้วตัดเป็น sticky end เพื่อสามารถ ligate เข้ากับ pSilencer 4.1 – CMV neo vector ได้
- ทำ reverse complement เส้น top strand Oligo โดยเริ่มทำตั้งแต่ลำดับเบสตัวสุดท้ายของ antisense strand จนถึงตัวแรก โดยผ่านลำดับเบส loop region จนถึงตัวแรกสุดของลำดับเบส sense sequence แล้วเติมลำดับเบส G 1 ตัว ตรงปลาย 3' เพื่อให้ complement กับเส้น top strand Oligo บริเวณ restriction enzyme site ของ BamHI ได้



รูปที่ 7. แสดงตัวอย่างการออกแบบ siRNA Template Oligonucleotide

ในการออกแบบ siRNA Template Insert เส้น top และ bottom strand Oligo ที่กล่าวมา ใช้โปรแกรม siRNA target finder (Ambion) จาก www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html

2. สร้างเวกเตอร์ที่มีโมเลกุล RNAi (insert) และตรวจสอบชิ้น insert นั้น (โดย นายนิติพล รัตนเศรษฐ์ยุทธ และผู้วิจัย)

สร้าง annealed RNAi template โดยโมเลกุล miRNA ใช้ชุด BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits (Invitrogen) และโมเลกุล siRNA ใช้ชุด pSilencer™ 4.1-CMV neo siRNA Expression Vector Kits (Ambion)

2.1 การสร้าง annealed RNAi template

2.1.1 ขั้นตอนการสร้าง annealed miRNA template

1. ทำ annealing reaction ที่อุณหภูมิห้อง ตามส่วนผสม ดังนี้
(ใน 0.6 ml sterile microcentrifuge tube)

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
Top strand DNA oligo (200 μM)	5.0	50 μM
Bottom strand DNA oligo (200 μM)	5.0	50 μM
10X Oligo Annealing Buffer	2.0	1X
DNase/RNase-Free Water	8.0	-
Total	20.0	

2. incubate ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที (ใน water bath หรือ heat box)
3. นำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 – 10 นาที
4. ปั่น short spin เป็นเวลาประมาณ 5 วินาที แล้วเขย่าเบาๆ
(เสร็จขั้นตอนนี้จะได้เส้น double-strand oligo)
5. เจือจาง dsOligo ที่ได้ (50 μM dsOligo) ให้มีความเข้มข้น 10 nM* เพื่อนำไปทำ ligation

*เนื่องจากการเจือจาง 50 μM dsOligo ให้เป็น 10 nM dsOligo ต้องเจือจางลง 5,000 เท่า ดังนั้น จึงทำการเจือจาง 2 ครั้ง โดยครั้งแรกเจือจางลง 100 เท่า ใน DNase/RNase-Free Water และครั้งที่ 2 เจือจางลง 50 เท่า ใน Oligo Annealing Buffer (ในชุด kit)

วิธีการเจือจาง dsOligo

1. นำ 50 μM dsOligo ที่สร้าง มาเจือจางลง 100 เท่า โดยผสม 50 μM dsOligo 1 μl กับ DNase/RNase-Free Water 99 μl ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex ซึ่งจะได้ dsOligo ที่ความเข้มข้น 500 nM

2. นำ 500 nM dsOligo ในข้อ 1 มาเจือจางลง 50 เท่า โดยผสม 500 nM dsOligo 1 μl, 10X Oligo Annealing Buffer 5 μl และ DNase/RNase-Free Water 44 μl ผสมให้เข้ากัน ซึ่งจะได้ dsOligo ที่ความเข้มข้น 10 nM

หมายเหตุ – aliquot 10 nM dsOligo เก็บเป็น stock ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.2 ขั้นตอนการสร้าง annealed siRNA template

1. ทำ annealing reaction ที่อุณหภูมิห้อง ตามส่วนผสม ดังนี้
(ใน 0.6 ml sterile microcentrifuge tube)

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
Top strand DNA oligo (1 μg/μl)	2.0	40 ng/μl
Bottom strand DNA oligo (1 μg/μl)	2.0	40 ng/μl
1X DNA Annealing Solution	46.0	1X
Total	50.0	

2. incubate ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 นาที

3. นำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 37°C โดยตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เจือจาง annealed siRNA template โดยดูดจาก annealing reaction มา 5 μl ใส่ลงใน DNase/RNase-Free Water 45 μl ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเป็น 8 ng/μl

หมายเหตุ - annealed siRNA template สามารถเก็บได้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

2.2 การทำ ligation

2.2.1 ขั้นตอนการ ligation โมเลกุล miRNA

1. ทำ ligation reaction ที่อุณหภูมิห้อง ตามส่วนผสม ดังนี้
   (ใน 0.6 ml sterile microcentrifuge tube)

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X Ligation Buffer	4.0	1X
pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR, linearized (5 ng/μl)	2.0	0.5 ng/μl
miR-ds oligo (10 nM)	4.0	2 nM
DNase/RNase-Free Water	9.0	-
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	1.0	0.05 U/μl
Total	20.0	

2. incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
3. วาง tube ในน้ำแข็ง เพื่อรอการ transform เข้าสู่ competent cell

2.2.2 ขั้นตอนการ ligation โมเลกุล siRNA

1. ทำ ligation reaction ที่อุณหภูมิห้อง ตามส่วนผสม ดังนี้
   (ใน 0.6 ml sterile microcentrifuge tube)

ส่วนผสม	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
8 ng/μl diluted annealed siRNA insert	1.0	0.8 ng/μl
10X T4 DNA Ligase Buffer	1.0	1X
p*Silencer* 4.1-CMV neo vector	1.0	-
T4 DNA ligase (5 U/μl)	1.0	0.5 U/μl
DNase/RNase-Free Water	6.0	-
Total	10.0	

2. incubate ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 1 วัน (overnight)

3. เก็บ ligation reaction ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการ transform เข้าสู่ competent cell

2.3 การทำ transformation

การทำ transformation เป็นการเพิ่มจำนวนเวกเตอร์ RNAi โดยอาศัยการแบ่งตัวของ competent cell ที่มีเวกเตอร์ RNAi แล้วทำการคัดเลือกโคโลนี โดยวิธี antibiotic selection ซึ่งโมเลกุล miRNA ใช้ชุด One Shot® TOP10 (Invitrogen) (มากับชุด BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits) ส่วนโมเลกุล siRNA ใช้ competent *E.coli* cell ทั่วไป ต่อจากนั้นทำการสกัดเวกเตอร์ RNAi และตรวจสอบลำดับเบสของ RNAi oligonucleotide template ที่แทรกอยู่ (ขั้นตอนการทำ transformation ดูที่ภาคผนวก ก.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สร้างเวกเตอร์ที่มีโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล ใน 1 เวกเตอร์ และตรวจสอบชิ้น insert **นั้น**

การสร้างโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล ใน 1 เวกเตอร์ มีขั้นตอนการสร้างคล้ายกับโมเลกุล RNAi ในข้อ 2 ซึ่งจะใช้เวกเตอร์ RNAi ที่ต้องการ 2 เวกเตอร์ (กรณี 2 เป้าหมาย) มาตัดชิ้นส่วนของเวกเตอร์ออกด้วย enzyme โดยให้เวกเตอร์หนึ่งเมื่อตัดแล้วใช้เป็น backbone (เวกเตอร์หลัก ที่มีโมเลกุล RNAi ที่ 1) ส่วนอีกเวกเตอร์ ตัดเอาเฉพาะส่วนลำดับเบสบริเวณโมเลกุล RNAi มา (โมเลกุล RNAi ที่ 2) แล้วทำการแทรกโมเลกุล RNAi ที่ 2 เข้ากับส่วน backbone (ligation) แล้วทำ transformation ต่อจากนั้น ทำการตรวจสอบลำดับเบสโมเลกุล RNAi 2 โมเลกุล ด้วยการทำ sequencing (กรณีต้องการมากกว่า 2 เป้าหมาย ให้นำเวกเตอร์ RNAi ที่ต้องการมาตัดและต่อเพิ่มขึ้น ในลักษณะเดียวกัน)

<u>ขั้นตอนการสร้างเวกเตอร์ที่มีโมเลกุล RNAi หลายโมเลกุล</u>

1. ส่วน backbone: ตัดเวกเตอร์โมเลกุล RNAi ที่ 1 ด้วย restriction enzyme (ตามแผนที่ลำดับเบสของเวกเตอร์) โดยไม่ตัดคร่อมส่วนโมเลกุล RNAi ที่ 1 ทำให้ส่วนโมเลกุล RNAi ที่ 1 ยังอยู่บนชิ้น backbone หลังจากผสมสารสำหรับการตัดแล้ว นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ส่วน insert: ตัดเวกเตอร์โมเลกุล RNAi ที่ 2 ด้วย restriction enzyme (ตามแผนที่ลำดับเบสของเวกเตอร์) โดยตัดคร่อมโมเลกุล RNAi ที่ 2 ซึ่งทำให้ได้ชิ้นส่วนของโมเลกุล RNAi ที่ 2 ออกมา หลังจากผสมสารสำหรับการตัดแล้ว นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

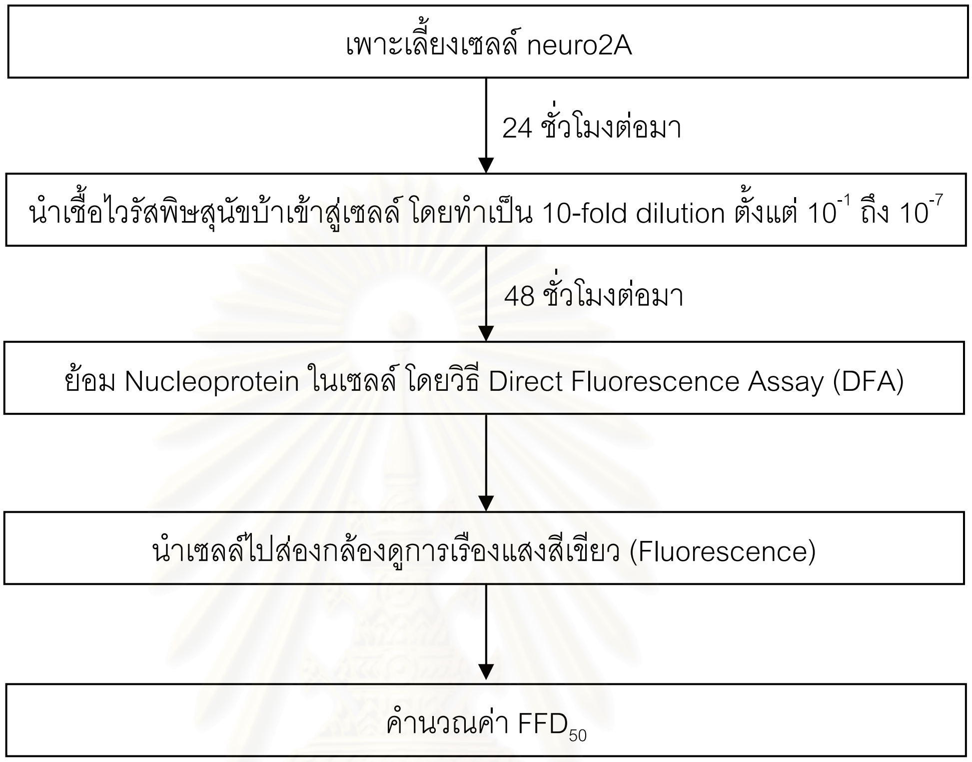
2. นำเวกเตอร์ที่ถูกตัดในข้อ 1 และข้อ 2 ไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนที่ตัด โดยการ run ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์บน agarose gel

3. สกัดส่วน backbone และ insert ออกจาก agarose gel

4. ทำ ligation reaction

5. นำเวกเตอร์ที่มีโมเลกุล RNAi 2 โมเลกุล transform ลงใน competent *E.coli* cell แล้วทำการตรวจสอบเวกเตอร์ว่ามีลำดับเบสของโมเลกุล RNAi ทั้ง 2 ที่ต้องการหรือไม่

4. ตรวจสอบปริมาณ (titer) ไวรัสพิษสุนัขบ้า ในการนำเข้าสู่เซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ



รูปที่ 8. แสดงขั้นตอนการตรวจสอบปริมาณ (titer) ไวรัสพิษสุนัขบ้า

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ neuro2A

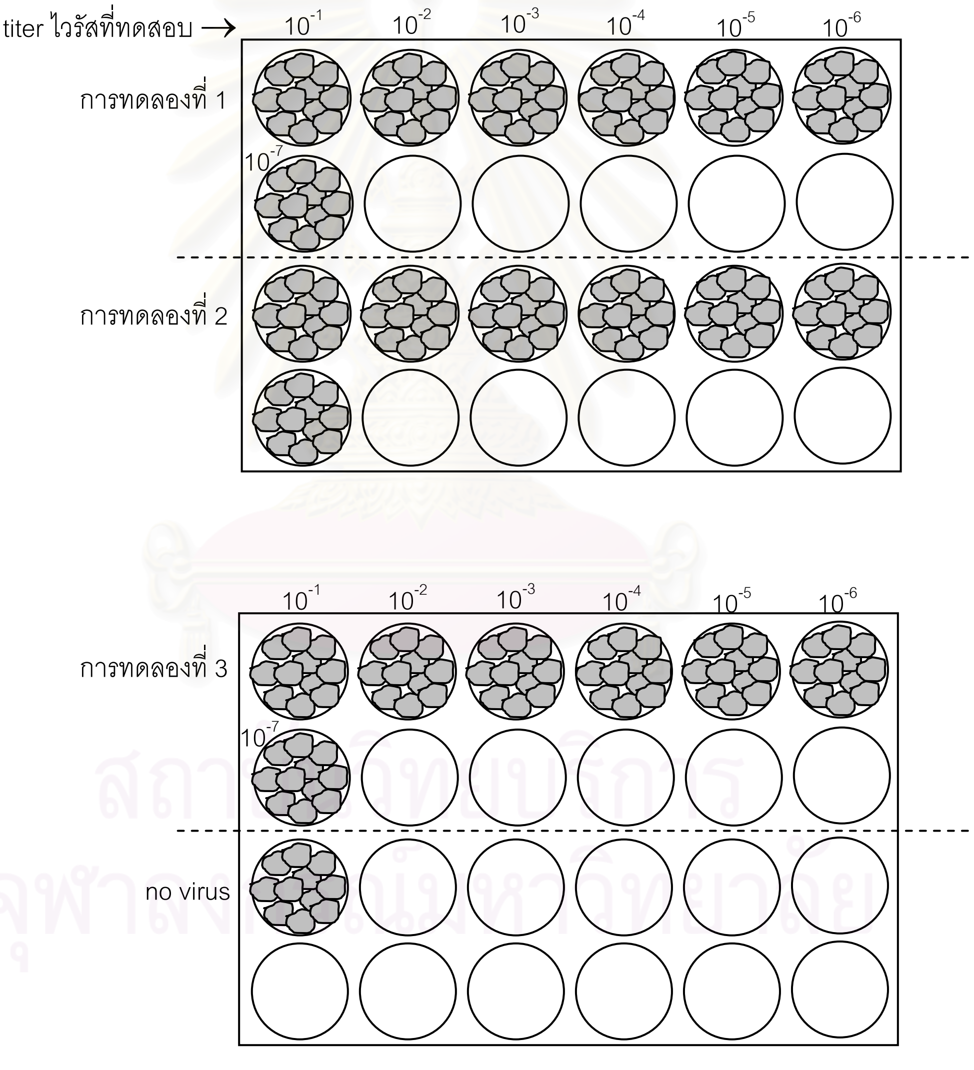
4.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น

นำเซลล์ neuro2A (ATCC cat no.CCL-131) มาเพาะเลี้ยงใน cell culture media MEM/EBSS (ภาคผนวก ข.) โดยเลี้ยงใน cell culture flask ขนาด T75 ในตู้อบสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C ให้เจริญเติบโตได้จำนวนที่เหมาะสม (100% confluence) จึงเก็บรวบรวมเซลล์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย 0.25% trypsin และนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิมอย่างต่อเนื่อง (continually passaged) จนกระทั่งได้เซลล์คุณภาพดี มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ รูปร่างเหมาะสม และความสามารถในการรอดชีวิตอยู่ในเกณฑ์เหมาะสม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการทดลอง

เตรียมเซลล์ใน 24-well plate ให้มีเซลล์ตั้งต้นจำนวน 1 x 10^5 เซลล์/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS+10% FBS ปริมาตร 500 μl โดยนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน (overnight) ก่อนการทดสอบ ให้มีความหนาแน่น 85-90% confluence โดยเตรียมเซลล์ทั้งหมด 22 well แบ่งเป็นการทดลองทั้งหมด 3 การทดลองซ้ำ และเซลล์ควบคุม 1 การทดลอง (ไม่ใส่เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า)



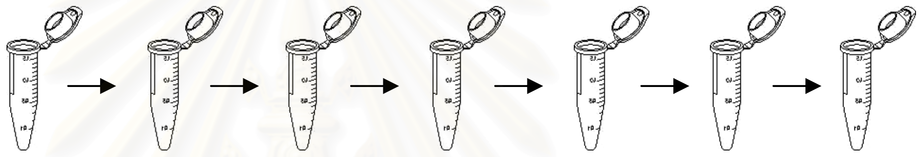
รูปที่ 9. แสดงจำนวน well ที่เตรียมเซลล์ใน 24-well plate สำหรับการตรวจสอบปริมาณ (titer) ไวรัสพิษสุนัขบ้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเตรียมเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

นำเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าค่า FFD_{50} ที่ 10^{-4} (สถานเสาวภา สภากาชาดไทย) มาตรวจสอบค่า FFD_{50} อีกครั้งภายในห้องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามาทำ 10-fold dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7} ใส่ลงในเซลล์ neuro2A ปริมาตร well ละ 300 μl สำหรับเซลล์ควบคุม เป็นเซลล์ neuro2A ปกติ ไม่ใส่เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า หลังจากนั้น นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้อบที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C

<u>การทำ 10-fold dilution</u>



	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
เชื้อไวรัส (μl)	100 (จาก stock virus)	100	100	100	100	100	100
	+	+	+	+	+	+	+
media (μl) MEM/EBSS + 10% FBS	900	900	900	900	900	900	900
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

ดูดทิ้ง 100 μl

4.3 การย้อม nucleoprotein ในเซลล์ด้วยวิธี Direct Fluorescence Assay

การย้อม nucleoprotein ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ใช้ anti-rabies monoclonal globulin antibody ที่ conjugate กับ fluorescein isothiocyanate (FITC) (ขั้นตอนการย้อม nucleoprotein ดูภาคผนวก ค.) ซึ่งเซลล์ที่มี nucleoprotein จะเปล่งสารเรืองแสงสีเขียว เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon Eclipse TE2000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การคำนวณค่า FFD_{50} (Focus Forming Dose) ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

ค่า FFD_{50} เป็นค่า dilution ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เหมาะสมในการทดสอบเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยเป็นระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหรือเท่ากับ 1 เซลล์ในแต่ละ field ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ โดยจำนวน field ที่มีการติดเชื้อในเซลล์ต้องคิดเป็น 50% ของจำนวน field ที่ดูทั้งหมด โดยในแต่ละ well จะถูกแบ่งออกเป็น 8 field ในการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้น ทำการนับดูว่ามีกี่ field ที่มีเซลล์ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 เซลล์ แล้วนำมาคำนวณหาค่า FFD_{50} ต่อไป

<u>ตัวอย่างการคำนวณหาค่า FFD_{50}</u>

1. คำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวน field ที่มีเซลล์ติดเชื้อ

Dilution ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า	จำนวน field ที่มีเซลล์ติดเชื้อ/จำนวน field ทั้งหมด	จำนวน field สะสม		เปอร์เซ็นต์ของ field ที่มีเซลล์ติดเชื้อ
		field ที่มีเซลล์ติดเชื้อ (↑)	field ที่ไม่มีเซลล์ติดเชื้อ (↓)	
10^{-1}	8/8	27	0	(27/27)x100 = 100
10^{-2}	8/8	19	0	(19/19)x100 = 100
10^{-3}	5/8	11	3	(11/14)x100 = 78
10^{-4}	3/8	6	8	(6/14)x100 = 42
10^{-5}	2/8	3	14	(3/17)x100 = 17
10^{-6}	1/8	1	21	(1/22)x100 = 4
10^{-7}	0/8	0	29	(0/29)x100 = 0

2. คำนวณความแตกต่างระหว่าง the logarithm of the starting point dilution และ the logarithm of the 50% end-point dilution (difference of logarithms) จากสูตร

$$\frac{50\% - (\text{infectivity next below } 50\%)}{(\text{infectivity next above } 50\%) - (\text{infectivity next below } 50\%)} \times \text{logarithm of dilution factor}$$

จากตารางการคำนวณเปอร์เซ็นต์จำนวน field ที่มีเซลล์ติดเชื้อ พบว่า the starting point dilution (infectivity next below 50%) คือที่ 10^{-4} และ dilution factor ของการทดลอง คือ 10 (ดังนั้น logarithm of dilution factor = log 10 = 1)

ดังนั้น คำนวณ difference of logarithms ได้ ดังนี้

$$\frac{50-42}{78-42} \times 1 = \frac{8}{36} \times 1 = \underline{0.22}$$

3. คำนวณหา 50% end-point dilution (FFD_{50}) โดยการนำ the starting point dilution มาลบค่า difference of logarithms ออก จากสูตร

log (reciprocal of 50% end-point dilution) = log (reciprocal of starting point dilution) - difference of logarithms

ดังนั้น สามารถคำนวณหาค่า FFD_{50} ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
\log (\text{reciprocal of } 50\% \text{ end-point dilution}) &= \log 10^{4} - 0.22 \\
&= 4 - 0.22 \\
&= 3.78 \\
\therefore \log (50\% \text{ end-point dilution}) &= -3.78 \\
50\% \text{ end-point dilution} &= 10^{-3.78} \\
FFD_{50} &= 10^{-3.78} \approx 10^{-4}
\end{aligned}$$

ดังนั้น จากตัวอย่างการหาค่า FFD_{50} ครั้งนี้ ได้ค่า FFD_{50} ที่ dilution เท่ากับ 10^{-4}

5. ทดสอบประสิทธิภาพโมเลกุล RNAi

รูปที่ 10. แสดงขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพโมเลกุล RNAi

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ neuro2A

เตรียมเซลล์ใน 24-well plate ให้มีเซลล์ตั้งต้นจำนวน 1 x 10^5 เซลล์/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM/EBSS+10% FBS ปริมาตร 500 μl นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน (overnight) ก่อนการทดสอบ ให้มีความหนาแน่น 85-90% confluence

5.2 การ transfection โดยใช้ชุด Lipofectamine™ 2000 kit

ขั้นตอนการ transfection

1. เจือจางโมเลกุล RNAi ปริมาณ 1 μg ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 50 μl เขย่าเบาๆ
2. เจือจางสารละลาย lipofectamine ปริมาตร 1 μl ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 50 μl เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
3. ผสมสารข้อ 1 และข้อ 2 (ปริมาตรรวม 100 μl) เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
4. เติมสารผสม RNAi: Lipofectamine complexs ลงในเซลล์
5. นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C

หมายเหตุ – สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม negative control ไม่ต้องทำการ transfection

5.3 การนำเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเข้าสู่เซลล์ (Infection)

ขั้นตอนการ Infection

1. เตรียมเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า FFD_{50}
2. ใส่เชื้อไวรัสปริมาตร 300 μl ใน transfected cell ข้อ 5.2
3. นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
4. นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 500 μl ลงไป

5. นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งครบเวลาที่กำหนด

หมายเหตุ – สำหรับกลุ่ม negative control ไม่ต้องทำการ infection

5.4 การแยกสกัด total RNA จากเซลล์และ supernatant

1. แยก supernatant เพื่อสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัด QIAamp Viral RNA Mini Kit: Qiagen (ขั้นตอนการสกัดดูภาคผนวก ง.)

2. นำเซลล์ที่อยู่ใน well plate มาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัด RNeasy Mini Kit: Qiagen (ขั้นตอนการสกัดดูภาคผนวก จ.)

3. วัดความเข้มข้นของ total RNA (μg/ml) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยให้มีความบริสุทธิ์ของ RNA ในอัตราส่วน OD 260 nm: OD 280 nm อยู่ระหว่าง 1.8 – 2

4. นำ total RNA มาทำเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากันที่ 20 ng/μl

5.5 การวัดระดับ mRNA และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าโดยการทำ 2 step RT - Real time PCR

นำ total RNA ที่ทำให้เจือจางที่ความเข้มข้น 20 ng/μl มาตรวจวัดระดับ mRNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่สกัดจากเซลล์ และระดับ genomic RNA ของเชื้อที่สกัดจากเซลล์และ supernatant โดยวิธี 2 step RT – Real time PCR (SYBR green)

5.5.1 การทำ Reverse Transcription (RT) จาก total RNA ที่สกัดได้

1. total RNA (template RNA) ความเข้มข้น 20 ng/μl

2. primer สำหรับทำ RT ได้แก่

- Oligo dT primer สำหรับการตรวจระดับ mRNA
- Oligonucleotide Rabies Virus 1F primer (5’- AGAAGGATCGTGGAGC ACCATACTCTCA -3’) สำหรับการตรวจระดับ genomic RNA

3. ผสม primer ความเข้มข้น 0.5 $\mu g/\mu l$ ปริมาตร 1 μl กับ template RNA ปริมาตร 4 μl

4. incubate ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 นาที และ quick cooled ที่ 4°C

5. เตรียมส่วนผสมของ RT reagent ปริมาตร 15 μl ซึ่งประกอบด้วย

ส่วนผสม (reagent)	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย (ใน total 20 μl)
5X buffer	4.0	1X
25 mM $MgCl_2$	2.4	3 mM
10 mM dNTP	1.0	0.5 mM
40 U/μl RNase Inhibitor	0.5	1 U/μl
RT enzyme	1.0	-
RNase-free water	6.1	-
Total	15	

6. นำ master mix ปริมาตร 15 μl เติมลงในสารละลายข้อ 4 และนำไปเข้าเครื่อง GeneAmp PCR System 9700 ตั้ง RT programe ดังนี้

อุณหภูมิ	เวลา
25°C	5 นาที
42°C	60 นาที
95°C	15 นาที
4°C	α

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.5.2 การทำ Real-time PCR (SYBR green)

1. เตรียม SYBR Green master mix ในอัตราส่วน ดังนี้

ส่วนผสม (reagent)	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย (ใน total 20 μl)
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*	10.0	1X
20 μM Forward primer**	0.5	0.5 μM
20 μM Reverse primer**	0.5	0.5 μM
RNase-free water	5.0	-
Total	16	

2. เติม template cDNA ความเข้มข้น 4 ng/μl (จาก RT reaction) ปริมาตร 4 μl ลงใน master mix ที่เตรียมไว้ (ปริมาตรรวม 20 μl) และนำไปเข้าเครื่อง RG-6000 Corbett research Real-time PCR ตั้ง PCR programe ดังนี้

Cycle	Cycle Point
Hold 95°C, 15 นาที	
Cycling (40 รอบ)	Step 1 94°C, hold 15 วินาที Step 2 55°C, hold 20 วินาที Step 3 72°C, hold 10 วินาที
Melt (50-95°C) , hold secs on the 1st step, hold 5 วินาที on next steps	
cooling 40°C, 30 วินาที	

* 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix ประกอบด้วย

- HotStarTaq® DNA Polymerase
- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
- dNTP mix, including dUTP

- SYBR Green I
- ROX passive reference dye
- 5 mM $MgCl_2$

ลำดับ	ชื่อ RNA เป้าหมาย	ลำดับเบส (5' ⟶ 3')
1.	ยีน nucleoprotein (N)	Forward: 5'-CTGGCAGACGACGGAACC-3' Reverse: 5'-CATGATTCGAGTATAGACAGCC-3'
2.	ยีน glycoprotein (G)	Forward: 5'-GGACCCATATGACAGATCCC-3' Reverse: 5'-GCATCCAAATGGTGTAATCG-3'
3.	ยีน phosphoprotein (P)	Forward: 5'-TGTTAATCCGAGTGCAATCAGAGCC-3' Reverse: 5'-TGTCCTCAGGGAGATTGTCCACTTC-3'
4.	genomic RNA	Forward: 5'-AGAAGGATCGTGGAGCACCATACTCTCA-3' Reverse: 5'-TACCAGCCCTGAACAGTCTTCA-3'
5.	ยีน GAPDH	Forward: 5'-TCAACGACCCCTTCATTGAC-3' Reverse: 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'

****ตารางที่ 1. แสดงชื่อ RNA เป้าหมาย และลำดับเบส ของ Oligonucleotide Forward และ Reverse primer ที่ใช้ในการตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน N, ยีน G, ยีน P และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า และยีน GADPH ของเซลล์ neuro2A (การทดลองควบคุมเพื่อดูว่าเซลล์มีปริมาณเท่ากัน)**

ตารางที่ 1. เป็นการแสดง Oligonucleotide Primer ของ RNA ที่สนใจในการทำ Real-time PCR สำหรับตำแหน่งลำดับเบสในยีนหรือ genomic RNA ที่ primer ไปจับ สามารถดูได้ในภาคผนวก ฉ. – ญ.

6. ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล RNAi (RNAi quantification)

การทดลองนี้ เป็นการตรวจสอบและเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล RNAi ในเซลล์ โดยดูความสัมพันธ์ใน 2 ลักษณะ คือ ความสอดคล้องของระดับโมเลกุล RNAi กับปริมาณ RNAi (single RNAi) ที่ใส่เข้าสู่เซลล์ และ ความสอดคล้องของระดับโมเลกุล RNAi กับปริมาณ RNAi (multiple RNAi) ในเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ neuro2A

↓ 24 ชั่วโมงต่อมา

นำโมเลกุล RNAi เข้าสู่เซลล์ (transfection)

↓ 24 ชั่วโมงต่อมา

ตรวจวัดระดับการแสดงออกของโมเลกุล RNAi ด้วยวิธี Real-time PCR (TaqMan probe)

- สกัด RNA จากเซลล์ที่ทดสอบที่เวลาที่เหมาะสม
- วัดความเข้มข้นของ RNA ที่สกัด
- วัดระดับโมเลกุล RNAi โดยวิธี Real-time PCR (TaqMan probe)
- คำนวณและวิเคราะห์ผลการทดสอบ

รูปที่ 11. แสดงขั้นตอนการทดสอบ RNAi quantification

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.1 การทำ RNAi quantification แบ่งการทดสอบเป็น 2 แบบ คือ

1. การทดสอบตรวจวัดระดับโมเลกุล RNAi แบบ single RNAi โดยใส่โมเลกุล RNAi ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 μg ตามลำดับ ลงในเซลล์ โดยใช้ชุด Lipofectamine™ 2000 ในการ transfection สำหรับโมเลกุล RNAi ที่ปริมาณ 0.1 μg ให้ใส่ pcDNA3.1 blank plasmid 0.9 μg เพื่อให้ครบปริมาณ RNA 1 μg สำหรับโมเลกุล RNAi ที่ปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1.0 μg ให้ใส่ pcDNA3.1 blank plasmid 0.8, 0.5 และ 0 μg ลงไป ตามลำดับ

2. การทดสอบตรวจวัดระดับโมเลกุล RNAi แบบ multiple RNAi โดยใส่โมเลกุล RNAi ในระดับปริมาณที่เท่ากัน คือ 1 μg โดยโมเลกุล RNAi จะมีลักษณะแตกต่างกัน คือ โมเลกุล RNAi แบบ 1, 3 และ 6 โมเลกุลใน 1 เวกเตอร์ เป็นต้น

6.2 การวัดระดับการแสดงออกของโมเลกุล RNAi ในเซลล์ โดยการทำ 2 step RT – Real time PCR (TaqMan probe)

6.2.1 การทำ Reverse Transcription (RT) จาก total RNA (ชุด TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit: ABI)

1. เตรียมส่วนผสมของ RT reagent ปริมาตร 7 μl ซึ่งประกอบด้วย

ส่วนผสม (reagent)	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย (ใน total 15 μl)
10X RT buffer	1.50	1X
100 mM dNTP mix	0.15	1 mM
50 U/μl multiscribe RT enzyme	1.00	3.3 U/μl
20 U/μl RNase inhibitor	0.19	0.25 U/μl
nuclease-free water	4.16	-
Total	7.00	

2. เติม total RNA ความเข้มข้น 2 ng/μl ปริมาตร 5 μl ลงใน RT reagent ในข้อ 1

3. เติม RT primer** ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 3 μl ลงในสารละลายข้อ 2

4. นำ RT reaction วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ต่อจากนั้น นำไปเข้าเครื่อง GeneAmp PCR System 9700 ตั้ง RT programe ดังนี้

อุณหภูมิ	เวลา
16°C	30 นาที
42°C	30 นาที
85°C	5 นาที
4°C	α

6.2.2 การทำ Real-time PCR (โดยชุด LightCycler TaqMan Master: Roche)

1. เตรียม TaqMan PCR master mix ในอัตราส่วน ดังนี้

ส่วนผสม (reagent)	ปริมาตร (μl)/1 reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย (ใน total 20 μl)
5X LightCycler TaqMan Master Mix*	4.0	1X
10 μM Oligonucleotide Forward Primer**	0.6	0.3 μM
10 μM Oligonucleotide Reverse Primer**	0.6	0.3 μM
10 μM Oligonucleotide Probe**	0.4	0.2 μM
water PCR-grade	9.4	-
Total	15.0	

2. เติม template cDNA ความเข้มข้น 0.67 ng/μl (จาก RT reaction) ปริมาตร 5 μl ลงใน master mix ที่เตรียมไว้ (ปริมาตรรวม 20 μl) และนำไปเข้าเครื่อง Real-time PCR LightCycler (Roche) ตั้ง PCR programe ดังนี้

อุณหภูมิ	เวลา	
95°C	10 นาที	
95°C	5 วินาที	45 รอบ
55°C	5 วินาที	45 รอบ
60°C	5 วินาที	45 รอบ
40°C	30 วินาที	

* 5X LightCycler TaqMan Master Mix ประกอบด้วย

- FastStart Taq DNA Polymerase
- Reaction Buffer
- dNTP mix (with dUTP instead of dTTP)
- $MgCl_2$

ลำดับ	ชื่อโมเลกุล RNAi เป้าหมาย	ลำดับเบส (5' → 3')
1.	miRNA(N2)	RT primer: 5'- GCGACTCATGCTGACGAATTTT GAGTCGCGTCTCT -3' Forward: 5'- CCCCTAAAGATGCATGTTCAG -3' Reverse: 5'- GCGACTCATGCTGACGAA -3' Probe: 5'- 6FAM-TTTGAG+TCGCG+TC+TCTG— BBQ -3'

****ตารางที่ 2. แสดงชื่อโมเลกุล RNAi เป้าหมาย และลำดับเบส ของ** RT primer, Forward primer, Reverse primer **และ** probe **ที่ใช้ในการตรวจวัดระดับโมเลกุล** RNAi **ที่สนใจ**

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการวิจัยทำให้ได้ข้อมูลออกมาใน 2 รูปแบบ โดยจะนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

1. ค่า CT value จากการตรวจวัดระดับ cDNA ที่แปลงมาจาก mRNA, genomic RNA และโมเลกุล RNAi ด้วยวิธี Reverse Transcription (RT) ซึ่งข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยการตรวจวัดระดับ cDNA ในกลุ่มควบคุม จะให้เป็นตัวแทนระดับปริมาณ RNA นั้นๆ ที่ 100% สำหรับกลุ่มทดลองให้คิดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมว่ามีปริมาณ RNA ลดน้อยลงไปจำนวนกี่เปอร์เซ็นต์ จากการวัดจำนวนรอบของการทำ Real-time PCR ที่ลดน้อยลงไป เมื่อเทียบกับค่า CT ของกลุ่มควบคุม โดยการคำนวณปริมาณผลผลิต cDNA สามารถคำนวณได้จากสูตร

ปริมาณผลผลิต DNA ที่เพิ่มขึ้น = 2^n (n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา)

โดย n ในการทดลอง เป็นค่าผลต่างของค่า CT value ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

2. ภาพถ่ายการย้อมโปรตีนในเซลล์ จากการย้อมด้วย specific antibody ต่อโปรตีนนั้นๆ และถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon Eclipse TE2000 จะนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการเรืองแสงของสารเรืองแสงที่ติดอยู่กับ antibody ซึ่งไปจับกับตำแหน่งที่มีโปรตีนที่สนใจ โดยเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

1. การออกแบบและสร้างโมเลกุล RNAi โดยออกแบบ miRNA และ siRNA ต่อ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ดังนี้

- miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ได้แก่

1) miRNA(N1) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA N ที่ตำแหน่ง 190*

2) miRNA(N2) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA N ที่ตำแหน่ง 400

3) miRNA(N3) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA N ที่ตำแหน่ง 880

- siRNA ต่อ mRNA ของยีน N ได้แก่

1) siRNA(N1) คือ siRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA N ที่ตำแหน่ง 260

2) siRNA(N2) คือ siRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA N ที่ตำแหน่ง 787

*ตัวเลข หมายถึง ตำแหน่งของลำดับเบสในยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (CVS strain: GenBank No. DQ286762) ที่โมเลกุล miRNA หรือ siRNA จะไปจับและทำลาย โดยโมเลกุลเหล่านี้ได้มาจากโปรแกรมการออกแบบโมเลกุล miRNA และ siRNA

<u>ผลการออกแบบ</u>

- ตัวหนังสือสีน้ำเงินแสดงถึงลำดับเบสบน mRNA ของยีน N ที่โมเลกุล miRNA ไปจับ

- ตัวหนังสือสีเขียวแสดงถึงลำดับเบสบน mRNA ของยีน N ที่โมเลกุล siRNA ไปจับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CVS strain: mRNA ของยีน N (GenBank No. DQ286762)

5’-

ATGGATGCCGACAAGATTGTGTTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCT
GAGATTATCGTGGATCAATATGAC miRNA(N1) CTGCCATCAAGGATTTGAAAAAG
CCTTGTATCACCCTAGGGAAAGCC ACAAAGCATACAAATCAGTTTTA
TCAGGCATGAATGCCGCC**AAACTTGATCCGGATGATGTA**TGCTCCTACTTGGCAGCA
GCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACATGTCCGG**AAGACTGGACCAGCTATGGAA**TCCTG
ATTGCA miRNA(N2) ATAGGATCACCCCAAACTCTC siRNA(N1) AAAGCGTACT
GATGTA GGGCTCTGACAGGAGGCATGG GGACCCCACT
GTCTCTGAACATGCATCTTTAGTCGGTCTTCTCCTGAGTCTGTACAGGTTGAGCAAA
ATATCAGGACAGAGCACTGGTAACTATAAGACAAACATTGCAGATAGGATAGAGCAG
ATTTTCGAGACAGCACCTTTTGTTAAGATCGTGGAACACCATACCCTAATGACAACT
CACAAGATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCGAACTTCAGATTTTTGGCCGGAACC
TACGACATGTTTTTCTCACGGATTGAGCATCTGTATTCGGCAATCAC siRNA(N2)
GTCGTCACCGCTTATGAAGACTGCTCAGGACTGGTATCGTTTACAGC
CAGATCAATCTCACCGCAAGGGAAGCAATA miRNA(N3) TCCAC**AAGAACTTTGAG**
GAAGAGATAAGAAGAATGTTCGAGCCAGGC CTGTTCCTCACTCTTAT
TTCATCCACTTCCGTTCACTAGGC**TTGAGTGGGAAGTCTCCTTAT**TCATCGAATGCT
GTCGGTCATGTGTTCAATCTCATTCACTTTGTTGGATGCTACATGGGTCAAGTCAGA
TCTCTAAATGCGACGGTTATTGCTGCATGTGCCCCTCATGAGATGTCTGTTCTAGGG
GGCTATTTGGGAGAGGAATTCTTCGGAAAAGGGACATTTGAAAGAAGGTTCTTCAGA
GACGAGAAAGAACTTCAAGAATATGAGGCGGCTGAACTAACAAAGTCCGACGTGGCA
CTGGCAGATGACGGAACCGTCAACTCTGATGACGAGGACTATTTCTCTGGTGAAACC
AGAAGTCCAGAAGCTGTCTATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACTGAAGAGA
TCTCATATACGGAGATATGTCTCAGTCAGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTCA
TTCGCCGAATTTTTAAACAAGACATATTCGAGTGACTCATAA -3’

2. การทดสอบหา titer ของไวรัสที่จะใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของไวรัสที่เหมาะสม โดยนำ seed virus (CVS strain) ที่มีค่า FFD_{50} (Focus Forming Dose) ที่ 10^{-4} มาทำ 10-fold dilution (10^{-1} – 10^{-7}) แล้วย้อมดู nucleoprotein ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ (neuro2A cell) ซึ่งหลังจากคำนวณค่า FFD_{50} พบว่า titer ที่เหมาะสม คือที่ dilution 10^{-4} ซึ่งเป็นค่าที่ทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 1 เซลล์ในแต่ละ field จากการย้อมดูโปรตีนภายในเซลล์ โดยจำนวน field ที่มีการติดเชื้อนี้ต้องคิดเป็น 50% ของจำนวน field ที่ดูทั้งหมด

<u>ผลการทดสอบ</u>

การทดลองที่	virus titer						
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
1	8/8	7/8	5/8	3/8	1/8	0/8	0/8
2	8/8	8/8	6/8	4/8	1/8	1/8	0/8
3	8/8	7/8	6/8	3/8	2/8	0/8	0/8
เฉลี่ย	8/8	7.3/8	5.7/8	3.3/8	1.3/8	0.3/8	0/8

- คำนวณเปอร์เซ็นต์ของจำนวน field ที่มีเซลล์ที่ติดเชื้อ

Dilution **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า**	**จำนวน** field **ที่มีเซลล์ติดเชื้อ/จำนวน** field **ทั้งหมด**	**จำนวน** field **สะสม**		**เปอร์เซ็นต์ของ** field **ที่มีเซลล์ติดเชื้อ**
		field **ที่มีเซลล์ติดเชื้อ** ↑	field **ที่ไม่มีเซลล์ติดเชื้อ** ↓	
10^{-1}	8/8	25.9	0	(25.9/25.9)x100 = 100
10^{-2}	7.3/8	17.9	0.7	(17.9/18.6)x100 = 96
10^{-3}	5.7/8	10.6	3.0	(10.6/13.6)x100 = 78
10^{-4}	3.3/8	4.9	7.7	(4.9/12.6)x100 = 39
10^{-5}	1.3/8	1.6	14.4	(1.6/16)x100 = 10
10^{-6}	0.3/8	0.3	22.1	(0.3/22.4)x100 = 1
10^{-7}	0/8	0	30.1	(0/30.1)x100 = 0

- คำนวณความแตกต่างระหว่าง the logarithm of the starting point dilution และ the logarithm of the 50% end-point dilution (difference of logarithms) จากสูตร

$$\frac{50\% - (\text{infectivity next below } 50\%)}{(\text{infectivity next above } 50\%) - (\text{infectivity next below } 50\%)} \times \text{logarithm of dilution factor}$$

จากตารางการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของจำนวน field ที่มีเซลล์ที่ติดเชื้อด้านบน จะพบว่า the starting point dilution (infectivity next below 50%) คือที่ 10^{-4} และ dilution factor ของการทดลอง คือ 10 (ดังนั้น logarithm of dilution factor = log 10 = 1)

ดังนั้น คำนวณ difference of logarithms ได้ ดังนี้

$$\frac{50-39}{78-39} \times 1 = \frac{11}{39} \times 1 = \underline{0.282}$$

- คำนวณหา 50% end-point dilution (FFD_{50}) โดยการนำ the starting point dilution มาลบค่า difference of logarithms ออก จากสูตร

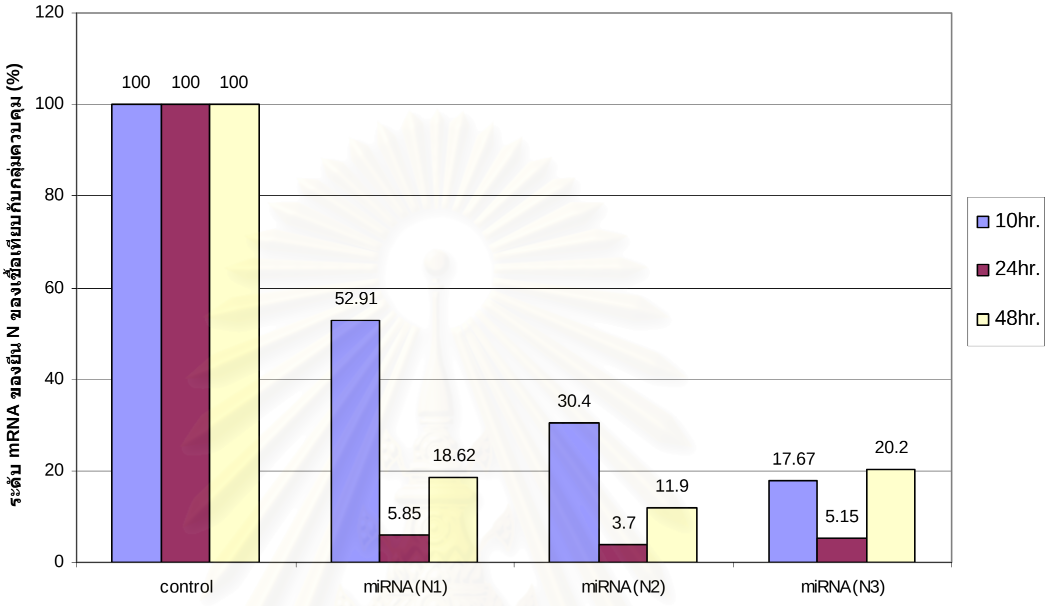
log (reciprocal of 50% end-point dilution) = log (reciprocal of starting point dilution) - difference of logarithms

ดังนั้น จะสามารถคำนวณหาค่า FFD_{50} ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \log(\text{reciprocal of 50\% end-point dilution}) &= \log 10^{4} - 0.282 \\ &= 4 - 0.282 \\ &= 3.71 \\ \therefore \log(\text{50\% end-point dilution}) &= -3.71 \\ \text{50\% end-point dilution} &= 10^{-3.71} \\ FFD_{50} &= 10^{-3.71} \approx 10^{-4} \end{aligned}$$

ดังนั้น จากผลการทดสอบและคำนวณหาค่า FFD_{50} พบว่าค่า $FFD_{50} = 10^{-3.71}$ แต่เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน จะใช้ค่าประมาณที่ 10^{-4}

3. การทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสม (optimal time) ที่จะใช้ตรวจวัดระดับ mRNA และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยทำการทดลองกับโมเลกุล miRNA ได้ผลการทดลองดังนี้

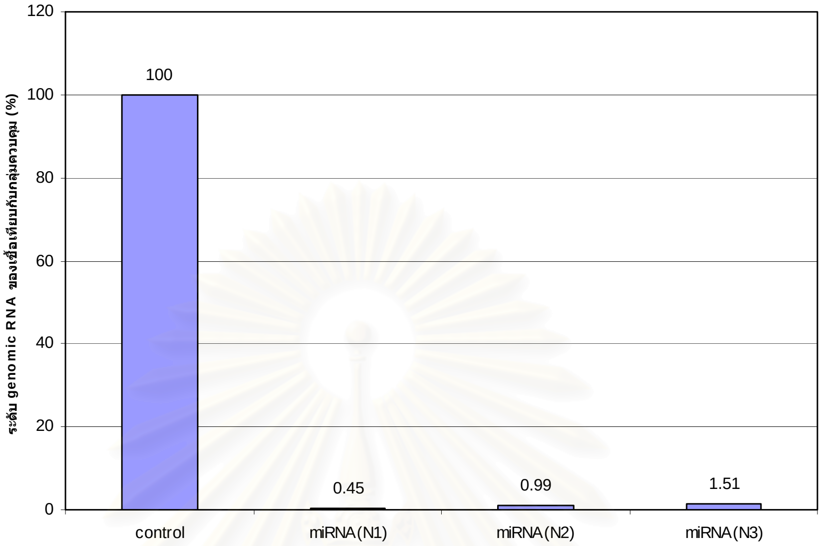


รูปที่ 12. **แสดงระดับ** mRNA **ของยีน** N **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่** dilution 10^{-4} **ในเซลล์** neuro2A **ที่ถูกยับยั้งด้วย** miRNA **ที่** incubate **เป็นเวลา** 10, 24 **และ** 48 **ชั่วโมง หลังจาก** infect **เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี** Real-time PCR **เทียบกับกลุ่มควบคุม**

จากรูปที่ 12 สามารถสรุปได้ว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน N ในเซลล์ คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า เนื่องจากสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 10 และ 48 ชั่วโมง โดยสามารถให้ผลการยับยั้งได้ถึงประมาณ 95%

จากความรู้เกี่ยวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่มีการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า หลังจากเชื้อไวรัสเข้าเซลล์ไปแล้ว จะเกิดกระบวนการ transcription และ replication โดยหลังจากเกิดกระบวนการ transcription จะเกิดกระบวนการ translation ตามมา ซึ่งจะมีการผลิตโปรตีนจากยีนต่างๆและเกิดการรวมตัวกับ genomic RNA ที่เกิดจากการ replication เกิดเป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่ขึ้น โดยไวรัสใหม่นี้จะออกจากเซลล์ มาสู่ supernatant ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่า ใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง ระดับอนุภาคไวรัสควรจะมีระดับเป็นอย่างไรเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (หลังจากพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ระดับ mRNA ของยีนในเซลล์ลดลงอย่างมีประสิทธิภาพ) ซึ่งจากการทดลอง พบว่า ระดับของ genomic RNA (ตัวแทนของอนุภาคไวรัส) ใน

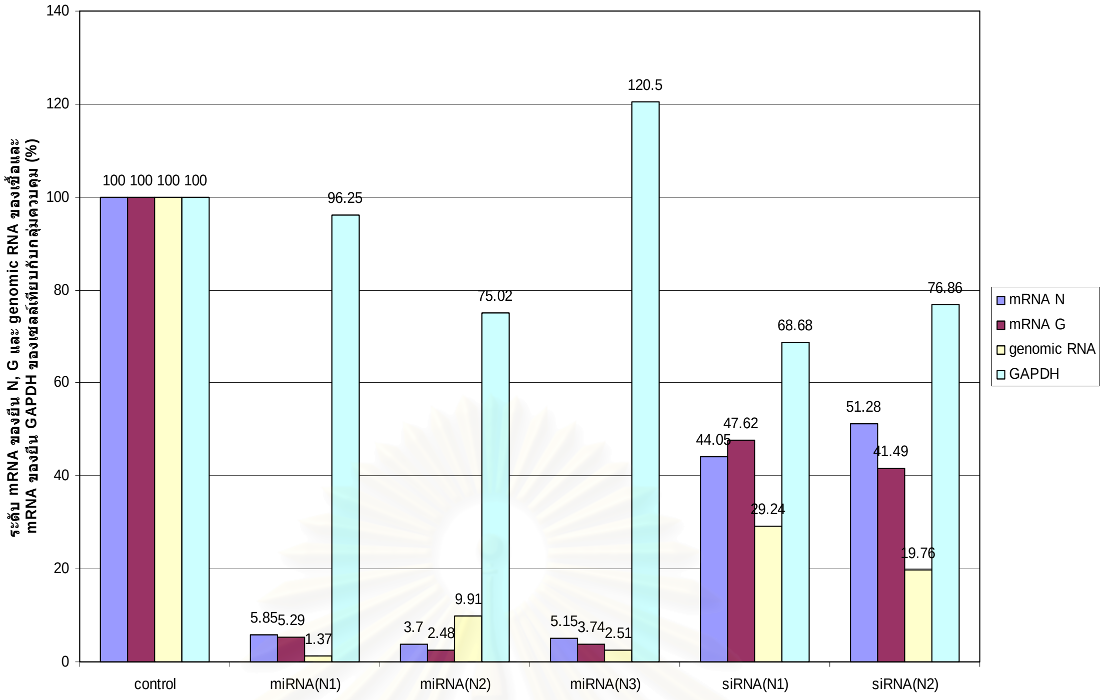
supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง ลดลงได้ถึงประมาณ 98% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นผลการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพดีมาก ดังผลการทดลองรูปที่ 13



รูปที่ 13. **แสดงระดับ** genomic RNA **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่** dilution 10^{-4} **ใน** supernatant **ที่ถูกยับยั้งด้วย** miRNA **ที่** incubate **เป็นเวลา** 48 **ชั่วโมง หลังจาก** infect **เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี** Real-time PCR **เทียบกับกลุ่มควบคุม**

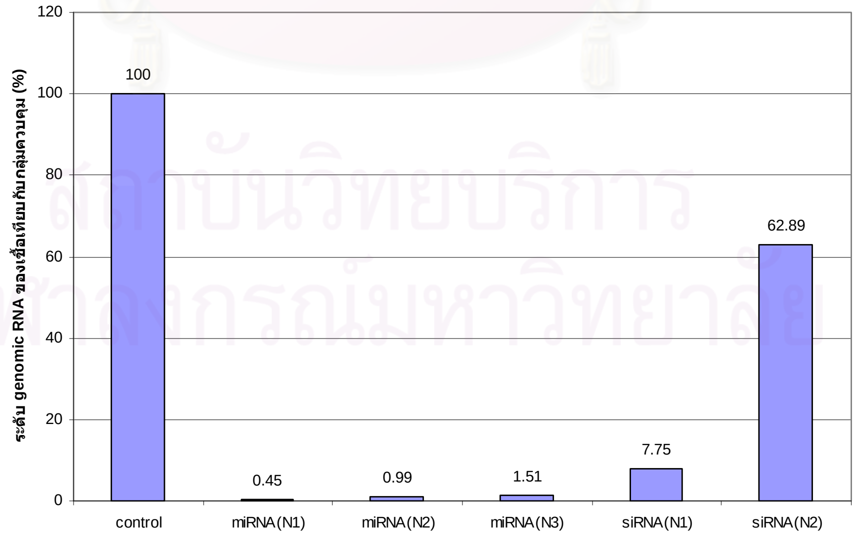
ดังนั้น จากรูปที่ 12 และ 13 จึงสรุปได้ว่า เวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจวัดระดับ mRNA ของยีน และตรวจ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และจะตรวจวัดระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยทั้ง 2 ช่วงเวลานี้ จะใช้เป็นมาตรฐานในการทดลองต่อๆไป

4. การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ระหว่างโมเลกุล miRNA และ siRNA ต่อ mRNA ของยีน N พบว่า โมเลกุล miRNA ให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าโมเลกุล siRNA โดยโมเลกุล miRNA ทั้ง 3 ตัวที่สร้างไว้ ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N, G และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ neuro2A ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ถึงประมาณ 95% ในขณะที่ siRNA ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N และ G ประมาณ 50% และยับยั้งการแสดงออกของ genomic RNA ประมาณ 75% และผลการทดลองแสดงว่าเวกเตอร์โมเลกุล miRNA และ siRNA ไม่ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ในเซลล์ทดลอง โดยทดลองวัดระดับ mRNA ของยีน GAPDH ในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14. แสดงระดับ mRNA ของยีน N, G และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าและ mRNA ของยีน GAPDH ของเซลล์ทดลองที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA และ siRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

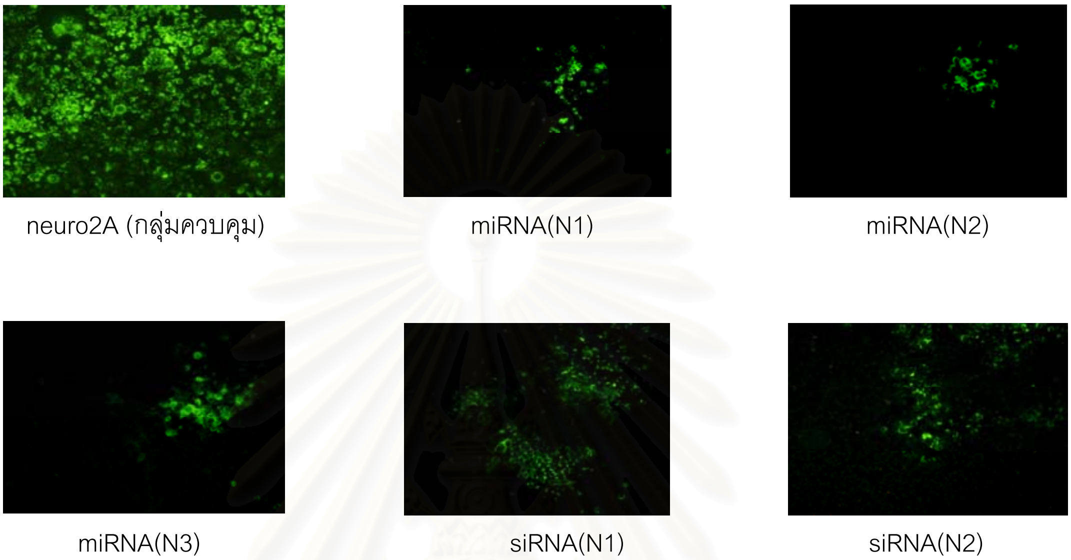
การตรวจระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า โมเลกุล miRNA ทั้ง 3 นั้นให้ผลการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ได้ถึงประมาณ 98% ในขณะที่ โมเลกุล siRNA ให้ผลการยับยั้งที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA และ siRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการย้อม cellular N protein โดยวิธี Direct Fluorescence Assay (DFA) ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ที่ได้รับโมเลกุล miRNA มีการแสดงออกของ N protein น้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับโมเลกุล siRNA และน้อยกว่าเซลล์ที่เป็นกลุ่มควบคุม (เซลล์ neuro2A ที่ไม่ได้รับ miRNA หรือ siRNA) ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16. **แสดง** cellular N protein **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่** dilution 10^{-4} **ในเซลล์** neuro2A **ที่ถูกยับยั้งด้วย** miRNA **และ** siRNA **ที่** incubate **เป็นเวลา** 48 **ชั่วโมง หลังจาก** infect **เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยการย้อมด้วยวิธี** DFA **เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม**

จากผลการวัดระดับ mRNA ของยีน N, G และ genomic RNA ทั้งในเซลล์และใน supernatant โดยวิธี Real-time PCR ดังรูปที่ 14 และ 15 และผลการย้อมดู N protein ในเซลล์โดยวิธี DFA ดังรูปที่ 16 พบว่า โมเลกุล miRNA ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและยังยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าโมเลกุล siRNA ประมาณ 20-45% ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกทำการทดสอบดูการยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยใช้โมเลกุล miRNA ต่อไป

5. การออกแบบและสร้างโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่บริเวณยีน N ได้ดังนี้

- miRNA ต่อ genomic RNA (-N) ได้แก่

1) miRNA(-N1) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน genomic RNA ที่ตำแหน่ง 365*

2) miRNA(-N2) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน genomic RNA ที่ตำแหน่ง 1005

*ตัวเลข หมายถึง ตำแหน่งของลำดับเบสใน genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (CVS strain: GenBank No. DQ286762) ที่โมเลกุล miRNA จะไปจับและทำลาย โดยโมเลกุลเหล่านี้ได้มาจากโปรแกรมการออกแบบโมเลกุล miRNA

<u>ผลการออกแบบ</u>

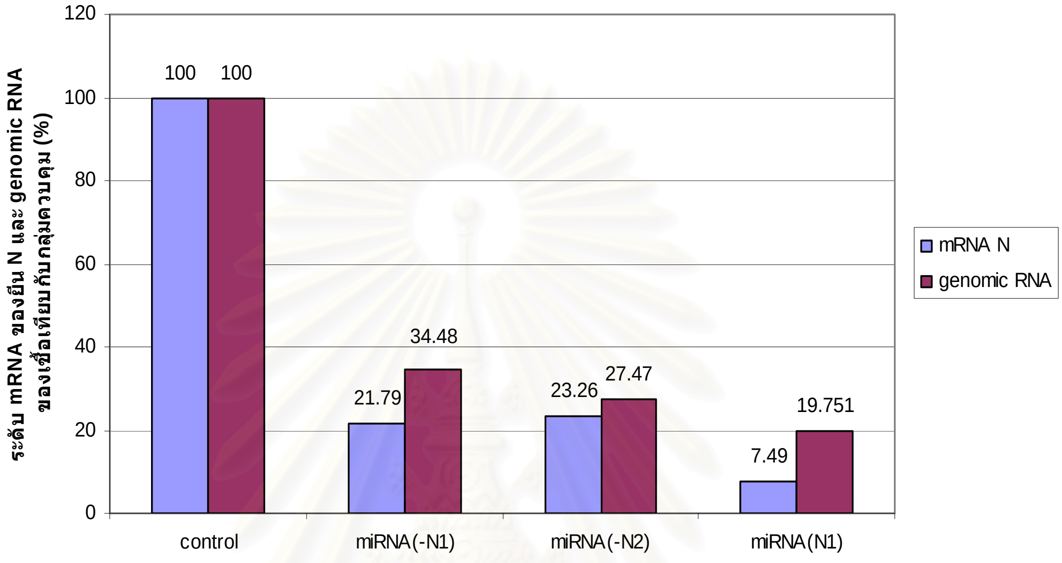
- ตัวหนังสือสีน้ำเงินแสดงถึงลำดับเบสบน genomic RNA ของเชื้อที่โมเลกุล miRNA ไปจับ

CVS strain: genomic RNA (GenBank No. DQ286762)

5’-

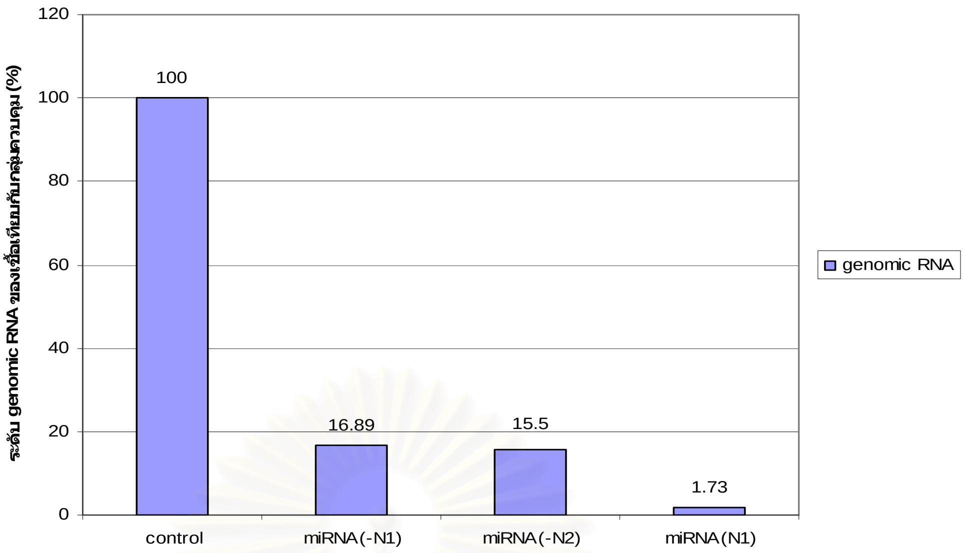
TTATGAGTCACTCGAATATGTCTTGTTTAAAAATTCGGCGAATGAGTTTGGACGG
GCTTGATGATTGGAACTGACTGAGACATATCTCCGTATATGAGATCTCTTCAGTC
GACCTCCATTCATCATGATTCGAGTATAGACAGCTTCTGGACTTCTGGTTTCACC
AGAGAAATAGTCCTCGTCATCAGAGTTGACGGTTCCGTCATCTGCCAGTGCCACG
TCGGACTTTGTTAGTTCAGCCGCCTCATATTCTTGAAGTT miRNA(-N1) CTGA
AGAACCTTCTTTCAAATGTCCCTTTTCCGAAGAATTCCTC CCCC
TAGAACAGACATCTCATGAGGGGCACATGCAGCA**<u>ATAACCGTCGCATTTAGAGAT</u>**
CTGACTTGACCCATGTAGCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGA
CAGCATTCGATGAATAAGGAGACTTCCCACTCAAGCCTAGTGAACGGAAGTGGAT
GAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTCTTGCCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATC
TCTTCCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAGTATTGCTTCCCTTGCGGTGAGAT
TGATCTGCTTTATGAACCCTGTAAACGATACCAGTCCTGAGCAGTCTTCATAAGC
GGTGACGACTGTGCCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCTCAATCCGTGAGAAA
AACATGTCGTAGGTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACTCCAATTAG
CACACATCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTTCCACGATCTTAACAAAAGG
TGCTGTCTCGAAAATCTGCTCTATCCTATCTGCAATGTTTGTCTTATAGTTACCA
GTGCTCTGTCCTGATATTTT miRNA(-N2) ACAGACTCAGGAGAAGACCGACTA
AAGATGCATGTTCAGAGACA TGTCAATTCCATGCCTCCTGTCAG
AGCCCAATTCCCTT**<u>CTACATCAGTACGCTTTATCT</u>**CCACTAGAGAGTTTGGGGTG
ATCCTATCTCCTTTTCGTGCAATCAGGATTCCATAGCTGGTCCAGTCTTCCGGAC
ATGTCCCCTCAAAGAACTGCATTGCTGCTGCCAAGTAGGAGCATACATCATCCGG
ATCAAGTTTGGCGGCATTCATGCCTGATAAAACTGATTTGTATGCTTTGTTCAAG
TCGGGGGCTTTCCCTAGGGTGATACAAGGCTTTTTCAAATCCTTGATGGCAGGGT
ACTTGTACTCATATTGATCCACGATAATCTCAGGCTTCAAAGAGACCACCTGATT
ATTGACTTTGAACACAATCTTGTCGGCATCCAT -3′

6. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยใช้โมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่บริเวณยีน N พบว่า โมเลกุล miRNA ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ neuro2A ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ประมาณ 75% เทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17. แสดงระดับ mRNA ของยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ต่อ genomic RNA เทียบกับ miRNA ต่อยีน N ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

การตรวจระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า โมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อทั้ง 2 ให้ผลการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ได้ประมาณ 85% ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ต่อ genomic RNA (-N1) และ (-N2) เทียบกับ miRNA ต่อยีน N (N1) ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

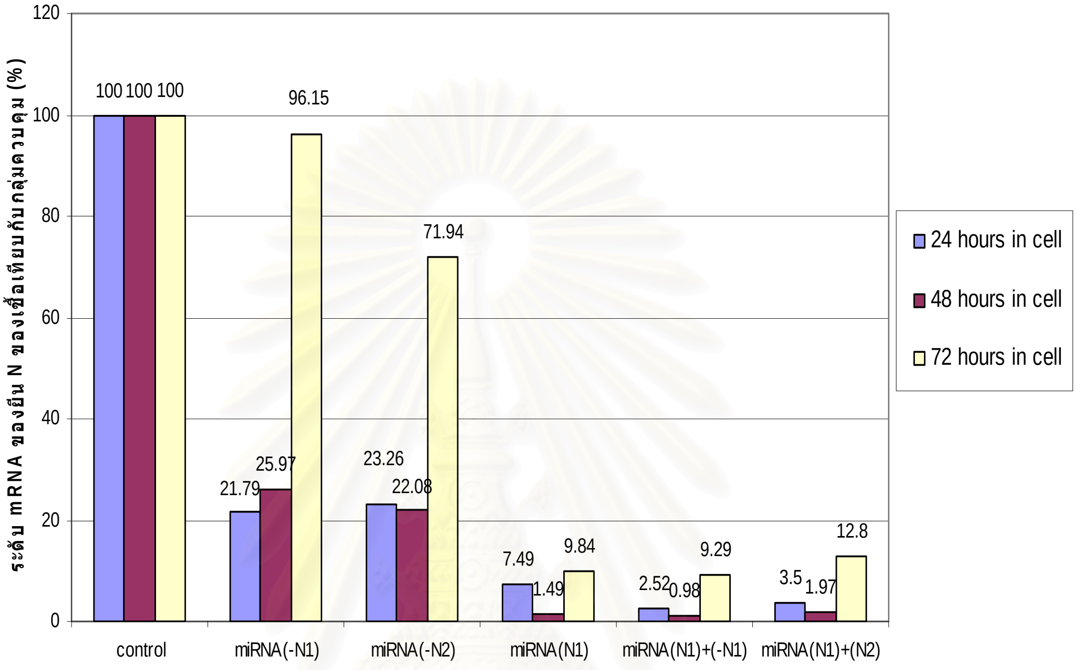
จากผลการทดลอง รูปที่ 17 และ 18 พบว่า โมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและ genomic RNA ในเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และยับยั้งการแสดงออกของ genomic RNA ใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง ได้ประมาณ 75% และ 85% ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าของโมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ทั้ง 3 โมเลกุล (รูปที่ 14 และ 15) พบว่า โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ทั้ง 3 โมเลกุล ให้ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่าโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ทั้ง 2 โมเลกุล ประมาณ 13 - 20%

7. การสร้างโมเลกุล miRNA หลายโมเลกุลใน 1 เวกเตอร์ ทั้งต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่บริเวณยีน N ดังนี้

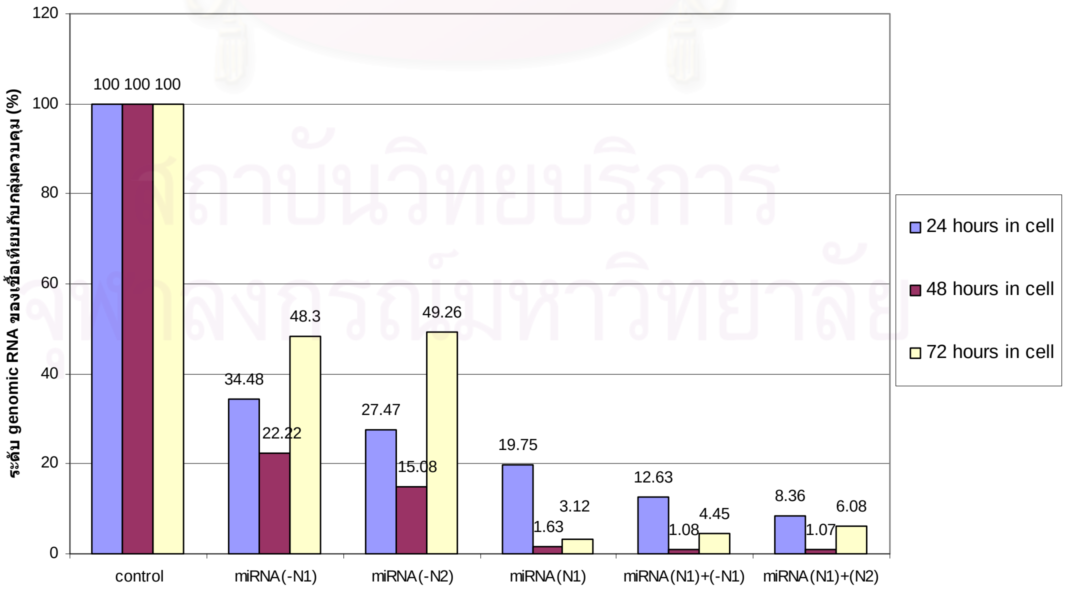
- miRNA 2 โมเลกุล ได้แก่ miRNA(N1)+(N2) และ miRNA(N1)+(-N1)
- miRNA 3 โมเลกุล ได้แก่ miRNA(N1)+(N1)+(N1), miRNA(N1)+(N2)+(N3), และ miRNA(N1)+(N3)+(Neg control)

8. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยใช้โมเลกุล miRNA หลายโมเลกุล ใน 1 เวกเตอร์ ตามที่สร้างในข้อ 7 พบว่า โมเลกุล miRNA 2 โมเลกุล ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ neuro2A ได้

ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับโมเลกุล miRNA(N1) และดีกว่าโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA (miRNA(-N1) และ miRNA(-N2)) อย่างชัดเจน และพบว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมง ผลการยับยั้งการแสดงออกของเชื้อยังมีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อเทียบกับที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 19 และ 20

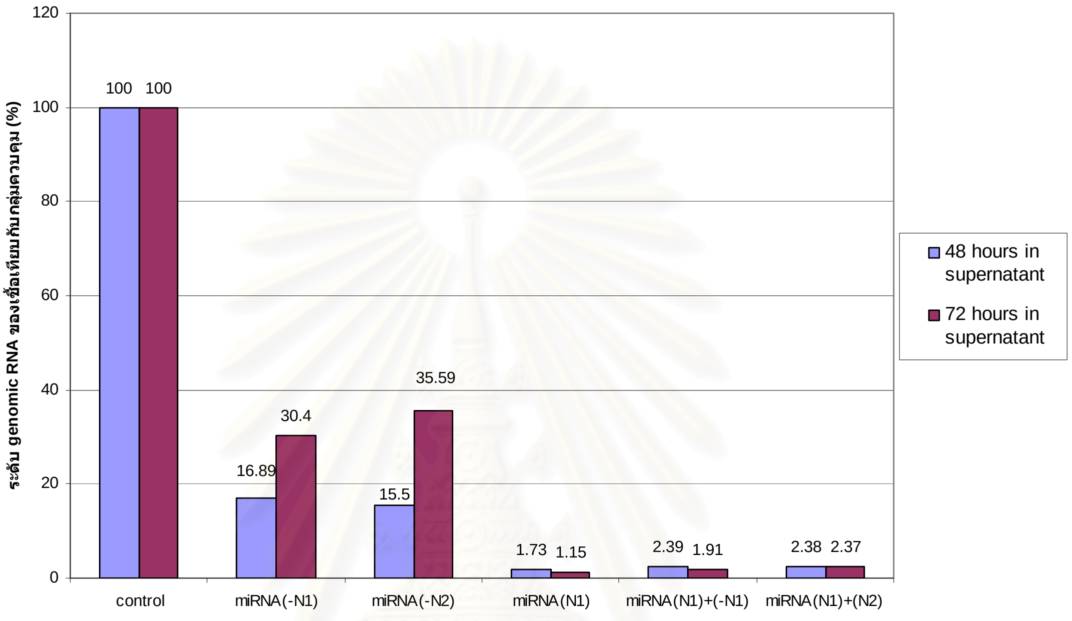


รูปที่ 19. แสดงระดับ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม



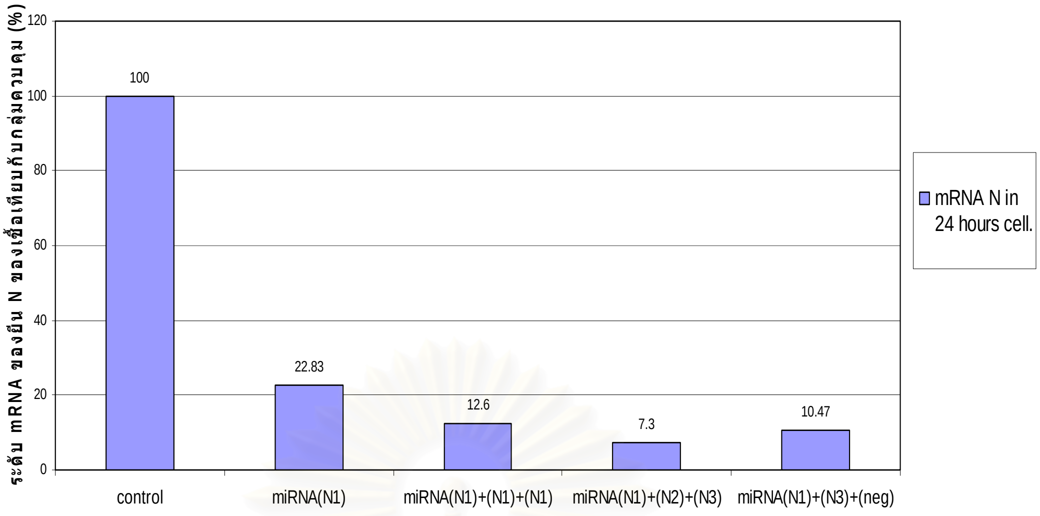
รูปที่ 20. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

การตรวจระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ใน supernatant ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า โมเลกุล miRNA 2 โมเลกุล ให้ผลการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีเท่ากับโมเลกุล miRNA(N1) และดีกว่าโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA (miRNA(-N1) และ miRNA(-N2)) อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 21

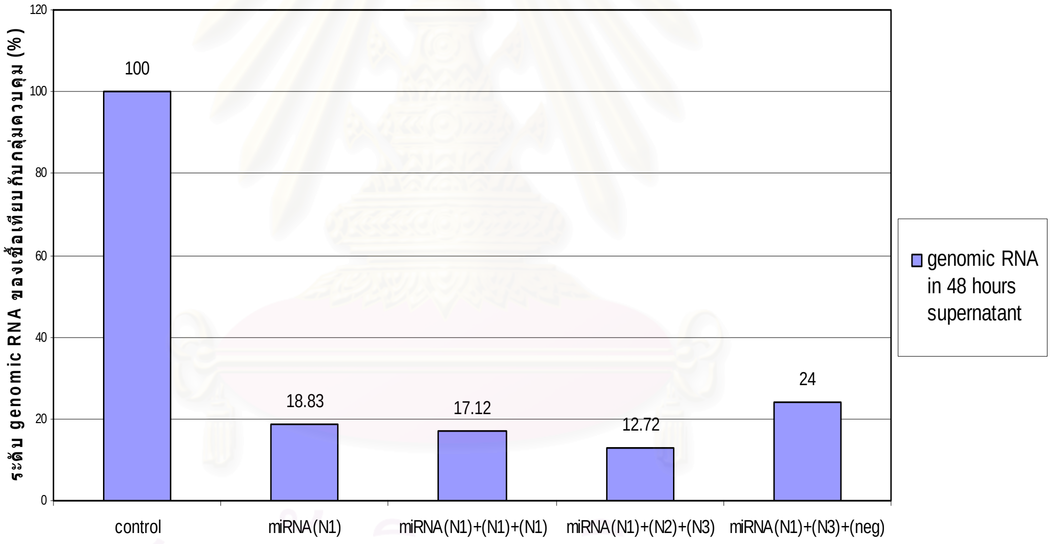


รูปที่ 21. **แสดงระดับ** genomic RNA **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่** dilution 10^{-4} **ใน** supernatant **ที่ถูกยับยั้งด้วย** miRNA **ที่** incubate **เป็นเวลา** 48 **และ** 72 **ชั่วโมง หลังจาก** infect **เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี** Real-time PCR **เทียบกับกลุ่มควบคุม**

การตรวจระดับ mRNA ของยีน N ในเซลล์ทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมงและระดับ genomic RNA ใน supernatant ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า โมเลกุล miRNA 3 โมเลกุล ทั้งต่อ single target (N1+N1+N1) และต่อ multiple target (N1+N2+N3) ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าโมเลกุล miRNA(N1) โดยต่อ multiple target ให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่า และพบว่า โมเลกุล miRNA 3 โมเลกุล ที่มี scramble miRNA (N1+N3+neg) สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้เช่นกันเมื่อเทียบกับโมเลกุล miRNA แบบ 1 โมเลกุล และ 3 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 22 และ 23



รูปที่ 22. แสดงระดับ mRNA ของยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ในเซลล์ neuro2A ที่ถูกยับยั้งด้วย multiple miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 23. แสดงระดับ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ dilution 10^{-4} ใน supernatant ที่ถูกยับยั้งด้วย multiple miRNA ที่ incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจาก infect เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี Real-time PCR เทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองรูปที่ 19, 20, 21, 22 และ 23 พบว่า โมเลกุล multiple miRNA ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ โดยการยับยั้งการแสดงออกของ mRNA ของยีน N สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสได้ โดยการใช้โมเลกุล miRNA ที่มีการรวมกันของโมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA (miRNA(N1)+(-N1)) แต่ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสก็ไม่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N เพียงอย่างเดียว

สำหรับโมเลกุล multiple miRNA ทั้งต่อ single target และต่อ multiple target สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่าการใช้โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N แบบ 1 โมเลกุล โดยจะเห็นว่า multiple miRNA ต่อ multiple target มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีกว่า แม้จะไม่มีนัยสำคัญก็ตาม และพบว่า การใส่ scramble miRNA ลงในโมเลกุล miRNA ไม่ได้ลดประสิทธิภาพโดยรวมต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า

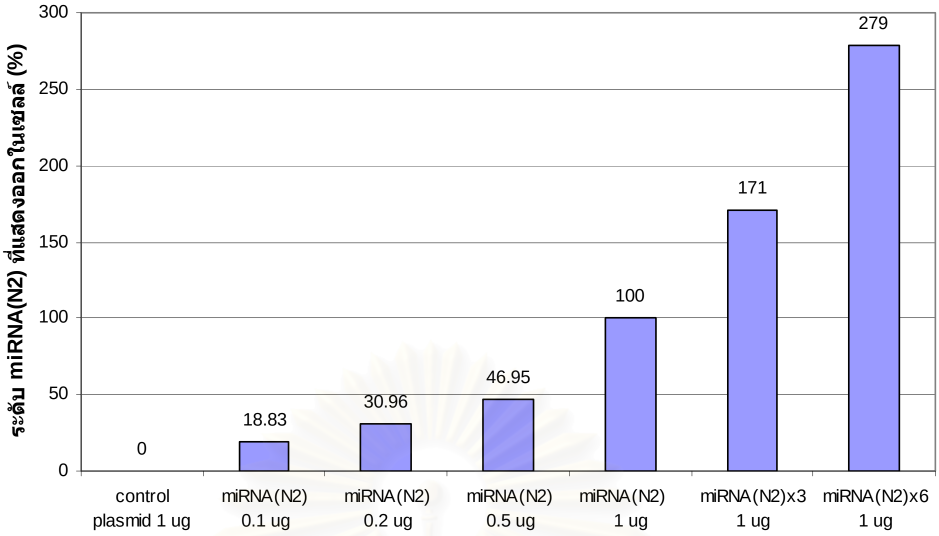
จากผลการทดลอง ยังพบอีกว่า ที่เวลา 72 ชั่วโมงในเซลล์และ supernatant โมเลกุล miRNA ยังทำงานได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับช่วงเวลาเริ่มต้นที่ใส่โมเลกุล miRNA เข้าไปในเซลล์

9. การสร้างโมเลกุล miRNA เพื่อใช้ในการทดลองตรวจวัดระดับการแสดงออกของโมเลกุล miRNA (RNAi quantification) โดยใช้โมเลกุล miRNA(N2) ในการตรวจวัดระดับเปรียบเทียบกัน ดังนี้

- miRNA(N2)+(N2)+(N2) หรือ miRNA(N2)x3
- miRNA(N2)+(N2)+(N2)+(N2)+(N2)+(N2) หรือ miRNA(N2)x6

ผลการตรวจสอบดูปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล miRNA(N2) ในเซลล์ พบว่า เซลล์ที่ได้รับ miRNA(N2) แบบ single miRNA ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 μg ให้ผลการแสดงออกของระดับ miRNA(N2) ที่ 18.83, 30.96, 46.95 และ 100% ตามลำดับ และสำหรับเซลล์ที่ได้รับ miRNA(N2) แบบ multiple miRNA คือ miRNA(N2)x6 และ miRNA(N2)x3 ที่ปริมาณ 1.0 μg ที่เท่ากับแบบ single miRNA 1.0 μg ให้ผลการแสดงออกของระดับ miRNA(N2) ที่ 279, 171 และ 100% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24. แสดงระดับ miRNA(N2) ที่แสดงออกในเซลล์ ที่ปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆและที่จำนวน copy ของโมเลกุล miRNA ที่แตกต่างกัน หลังจากการ transfection เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Real-time PCR โดยมีระดับการแสดงออกของ miRNA(N2) แบบ single miRNA ที่ความเข้มข้น 1 ug เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

จากผลการทดลองรูปที่ 24 พบว่า การเปรียบเทียบระดับของโมเลกุล miRNA(N2) ว่ามีความมากน้อยสอดคล้องกับปริมาณ miRNA(N2) ที่ใส่ลงไปหรือไม่ เซลล์ที่ได้รับปริมาณ miRNA(N2) แบบ single miRNA ที่ลดหลั่นกันไป ให้ผลการแสดงออกของระดับ miRNA(N2) ลดลงอย่างสอดคล้องกัน และสำหรับเซลล์ที่ได้รับปริมาณ miRNA(N2) แบบ multiple miRNA ให้ผลการแสดงออกของระดับ miRNA(N2) ที่มากขึ้นเมื่อมีจำนวนโมเลกุล miRNA มากขึ้น

10. การออกแบบและสร้างโมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน P ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ดังนี้

- miRNA ต่อ mRNA ของยีน P ได้แก่

1) miRNA(P1) คือ miRNA ที่ไปจับกับลำดับเบสใน mRNA P ที่ตำแหน่ง 66*

*ตัวเลข หมายถึง ตำแหน่งของลำดับเบสในยีน P ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (HEP Flury strain: GenBank No. AB085828) ที่โมเลกุล miRNA จะไปจับและทำลาย โดยโมเลกุลเหล่านี้ได้มาจากโปรแกรมการออกแบบโมเลกุล miRNA

<u>ผลการออกแบบ</u>

- ตัวหนังสือสีน้ำเงินแสดงถึงลำดับเบสบน mRNA ของยีน P ที่โมเลกุล miRNA ไปจับ

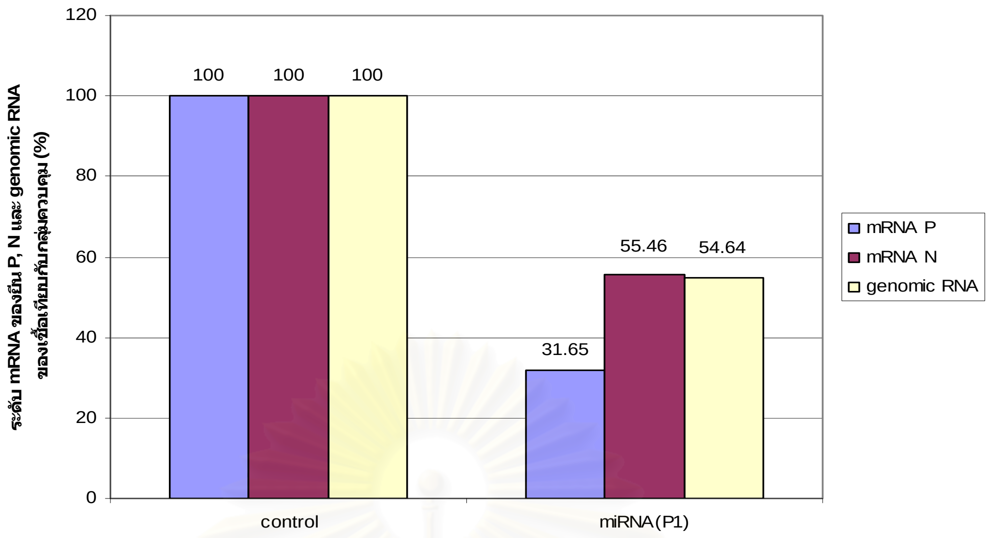
HEP Flury strain: mRNA ของยีน P (GenBank No. AB085828)

5'-

miRNA(P1)

ATGAGCAAGATCTT AGTGCAATCAGAGCCGGTCTGGCCGATCTTGAG
ATGGCCGA**<u>AGAGACTGTTGATCTGATCAA</u>**CAGAAACATAGAAGACAATCAGGCTCAT
CTCCAGGGAGAACCCATAGAAGTGGACAATCTCCCTGAGGACATGAGGCAATTTCAC
CTGGACGATGAAAAATTGTCCAACCTTGGTGAGATGGTTAGGGTGGGCGAAGGCAAG
TATCGAGAGGACTTTCAGATGAATGAGGGAGAGGACCCCAACCTCCTGTTCCAATCG
TACCTGGACAATGTTGGAGTCCAAATAGTCAGACAAATGAGGTCAGGAGAGAGATTC
CTCAAGATATGGTCACAGACCGTAGAGGAAATTATATCCTATGTCTCGGTCAACTTT
CCTAACCCTCCAGGAAGGTCTTCGGAGGATAAATCAACCCAAACTACTGGCCGGGAG
CTCAAGAAGGAGACAACATCCATTCTTTCTCAAAGAGAAAGCCAACCTTCAAAAGCC
GGAATGGTGGCTCAAGTTGCCTCTGGCCCTCCATCCCTTGAATGGTCTGCCACCAAT
GGAGAGGATGATCTATCAGTAGAGGCTGAGATCGCTCATCAGATTGCTGAAAGCTTT
TCCAAGAAGTACAAGTTTCCTTCTCGATCTTCAGGAATATTCTTGTATAATTTTGAG
CAACTGGAGATGAACCTTGATGACATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCGGGCGTG
ACCCGTCTGGCCCATGATGGATCCAAAATCCCCCTAAGATGTGTACTGGGATGGGTC
GCTTTGGCCAACTCCAAGAAATTCCAATTGCTAGTCGAGGCCGACAAGCTAAGCAAA
ATCATGCAAGATGACTTGGATCGCTACACATCATGCTAA – 3'

11. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยใช้โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน P ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า พบว่า โมเลกุล miRNA ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน P, ยีน N และ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ neuro2A ที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้ประมาณ 70% (ยีน P) และ 45% (ยีน N และ genomic RNA) เทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25. **แสดงระดับ** mRNA **ของยีน** P, **ยีน** N **และ** genomic RNA **ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่** dilution 10^{-4} **ในเซลล์** neuro2A **ที่ถูกยับยั้งด้วย** miRNA **ต่อยีน** P **ที่** incubate **เป็นเวลา** 24 **ชั่วโมง หลังจาก** infect **เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า โดยวิธี** Real-time PCR **เทียบกับกลุ่มควบคุม**

จากผลการทดลองรูปที่ 25 พบว่า miRNA ต่อ mRNA ของยีน P แม้ให้ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน P ได้ แต่มีผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน N และ genomic RNA น้อยกว่าและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อยังน้อยกว่า miRNA ต่อ mRNA ของยีน N (ดังแสดงในรูปที่ 14)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

โมเลกุล miRNA ในรูปแบบ vector-based expression สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่าโมเลกุล siRNA โดยโมเลกุล miRNA ที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน N และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ถึงประมาณ 95 - 98% และยับยั้งการแสดงออกของ nucleoprotein ในเซลล์ได้ด้วยเช่นกัน เมื่อกระบวนการแสดงออกของยีน N ถูกยับยั้ง จึงส่งผลต่อกระบวนการ replication และการ transcription ของยีนอื่นๆของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าด้วย เช่น การแสดงออกของยีน G ที่ลดลง จากการทดลองวัดระดับ mRNA ของยีน GAPDH แสดงให้เห็นว่าโมเลกุล miRNA ที่สร้างขึ้นไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน GAPDH ในเซลล์ นั่นแสดงว่าระดับการแสดงออกที่ลดลงของยีน N และยีน G เป็นผลมาจากโมเลกุล miRNA ที่จำเพาะ ไม่ได้มีสาเหตุจากการลดลงของโปรตีนโดยรวมภายในเซลล์แต่อย่างใด

หลังจากทดสอบประสิทธิภาพของโมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N แล้ว จึงทำการทดสอบโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในบริเวณที่ถอดรหัสเป็นยีน N ซึ่งพบว่า โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ของเชื้อ โดยโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA ให้ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าเพียง 75 - 85% นั่นแสดงได้ว่า mRNA ของยีน N น่าจะเป็นเป้าหมายในการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ดีกว่า genomic RNA ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ (18) ที่กล่าวถึงไวรัสในกลุ่ม negative-sense genome RNA เช่น respiratory syncytial virus (RSV) และ vesicular stomatitis virus (VSV) เกี่ยวกับการที่ genomic RNA ของเชื้อถูกโปรตีน N ปกป้องจาก RNase activity และจากการโดนโมเลกุล RNAi จับและทำลาย ซึ่งผลการทดสอบในเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าครั้งนี้ และเป็นเชื้อในกลุ่ม negative-sense genome RNA เช่นกัน ให้ผลที่มีข้อสันนิษฐานไปในทางเดียวกัน จึงได้มีการทดสอบต่อไป โดยใช้โมเลกุล miRNA 2 โมเลกุล ใน pre-miRNA transcript เดียวกันที่สร้างขึ้นต่อ mRNA ของยีน N และต่อ genomic RNA ซึ่งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่าโมเลกุล miRNA ต่อ genomic RNA อย่างชัดเจน แต่ผลการยับยั้งเชื้อก็ไม่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N เพียงอย่างเดียว

จากการทดสอบวัดระดับการแสดงออกของโมเลกุล miRNA (RNAi quantification) ในเซลล์ที่ได้รับปริมาณ miRNA แบบ single miRNA ที่ลดหลั่นไป สามารถแสดงระดับ miRNA ลดลงอย่างสอดคล้องกัน และสำหรับเซลล์ที่ได้รับปริมาณ miRNA แบบ multiple miRNA ที่เหมือนกัน ให้ผลการแสดงออกของระดับ miRNA ที่มากขึ้นเมื่อมีจำนวนโมเลกุล miRNA มากขึ้น แต่ระดับการแสดงออกไม่ได้เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าตามจำนวนโมเลกุล miRNA แต่อย่างใด จากการทดสอบประสิทธิภาพโมเลกุล multiple miRNA ต่อ single target และต่อ multiple target พบว่า สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีกว่าการใช้โมเลกุล single miRNA โดยโมเลกุล multiple miRNA ต่อ multiple target มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีกว่า แม้จะไม่มีนัยสำคัญก็ตาม และการใส่ scramble miRNA ในโมเลกุล multiple miRNA ไม่ได้ลดประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าแต่อย่างใด ซึ่งจากผลการทดสอบนี้ เป็นการสนับสนุนการใช้ miRNA แบบ multiple miRNA เพราะให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ และหากมีโมเลกุล miRNA ตัวใดตัวหนึ่งใน multiple miRNA ที่ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจด้วยเพราะเหตุผลด้านลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อ เนื่องจากมี mutant escape หรือลำดับเบสไม่ตรงตั้งแต่ต้น ก็ยังมี miRNA ตัวอื่นใน pre-miRNA transcript เดียวกัน ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อที่ดีอยู่

จากการทดสอบดูการยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่เวลายาวนานขึ้นในเซลล์และ supernatant คือที่ 72 ชั่วโมง พบว่า โมเลกุล miRNA ดังกล่าว ยังสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ทดลอง เมื่อเทียบกับเวลาที่ 24 และ 48 ชั่วโมงที่ใส่โมเลกุล miRNA เข้าในเซลล์

การทดสอบประสิทธิภาพโมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน P แสดงให้เห็นว่า miRNA สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน P, ยีน N และยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อยังน้อยกว่า miRNA ต่อ mRNA ของยีน N นั่นแสดงว่า P mRNA อาจไม่ใช่เป้าหมายที่สำคัญเท่ากับ N mRNA

อภิปรายผลการวิจัย

ตามลักษณะวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า จะเห็นว่า ไวรัสเข้าสู่เซลล์โดยวิธีการ endocytosis และเมื่อเข้าเซลล์แล้ว ยีนทั้ง 5 ยีนบน genome RNA จะ transcript เป็น mRNA 5 ชนิด และมีการสร้าง RNA สายบวกเส้นยาว ที่เรียกว่า antigenome หรือ replicative intermediate RNA ขึ้น mRNA ทั้ง 5 ชนิดจะ translate เป็นโปรตีน 5 ชนิด และในส่วนของ antigenome RNA จะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ genome RNA ของไวรัสรุ่นลูกต่อไป โดยโมเลกุล N-P complex protein จะทำหน้าที่ encapsidate genome RNA ของไวรัสรุ่นลูก หลังจากนั้น โปรตีน L จะเข้ามารวมตัว และต่อมาจะรวมกับโปรตีน M และโปรตีน G ที่อยู่ตรงส่วน plasma membrane ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ตามลำดับ ทำให้ได้เป็นอนุภาคไวรัสตัวใหม่ขึ้นมา (6) การยับยั้งกระบวนการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคโนโลยี RNAi ไปจับและทำลาย mRNA หรือยับยั้งการ translate ของ mRNA ก็ตาม ต่างส่งผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีนของไวรัสที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการยับยั้งนั้นไม่ได้ทำให้ mRNA ของเชื้อไวรัสหมดไปทั้งหมดได้ จึงทำให้ยังคงมีโปรตีนของไวรัสถูกสร้างขึ้นมาได้บ้าง และในเซลล์เจ้าบ้านที่ไวรัสอาศัยอยู่ ยังคงมี genomic RNA ที่ไม่ได้ถูกทำลาย เมื่อระยะเวลาการฟักตัวของไวรัสผ่านไปนานขึ้น จึงอาจทำให้ไวรัสมีโอกาสเกิดการเจริญแบ่งตัวได้มากขึ้นเพราะมีองค์ประกอบที่ใช้ในการสร้างไวรัสตัวใหม่ครบสมบูรณ์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงตั้งข้อสันนิษฐานว่า ถ้ามีการทำลาย genomic RNA ของเชื้อไวรัส อาจส่งผลต่อกระบวนการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสได้มากขึ้น แต่จากลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า พบว่า genomic RNA ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า ถูกห่อหุ้มด้วย N protein (N-specific encapsidation) (6) ซึ่ง N protein จะทำหน้าที่เป็นตัวปกป้อง genomic RNA จาก RNase activity และปกป้อง genomic RNA จากโมเลกุลต่างๆที่จะมาจับ (18) ซึ่งในงานวิจัย พบว่า miRNA ต่อ genomic RNA ให้ผลการยับยั้งที่ไม่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับ miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่ามาก ซึ่งผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างของเชื้อ ทำให้ miRNA ต่อ genomic RNA ไม่สามารถเข้าไปจับกับ specific target site ที่ออกแบบไว้ได้ ดังนั้น จึงได้สร้างโมเลกุล miRNA ที่มีการรวมกันของ miRNA ต่อ mRNA และ genomic RNA ของเชื้อขึ้น แต่ก็พบว่าผลการยับยั้งเชื้อไม่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N เพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเนื่องมาจากปัญหาเกี่ยวกับระบบการ transient transfection ที่เซลล์ทดลองอาจมีข้อจำกัดในความสามารถของการรับ plasmid เข้าเซลล์ ดังนั้น อาจมีการพัฒนาระบบ

transfection ให้มั่นใจได้ว่า เซลล์ทดลองสามารถรับเวกเตอร์ miRNA ดังกล่าวได้หมด โดยอาจทำเซลล์ทดลองเป็น stable cell line ที่มี miRNA เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (47) แสดงให้เห็นว่า short nucleotide fragment จาก nucleoprotein gene ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า สามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อในเซลล์ทดลองได้ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ทางหนึ่งว่าโปรตีน N มีความสำคัญต่อ viral RNP activity และเป็นยีนเป้าหมายที่ดีสำหรับควบคุมการแสดงออกของไวรัส จากงานวิจัย เกี่ยวกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าที่ตัดเอายีน P ออกไป (24) พบว่า เชื้อไวรัสมีการ replicate และผลิตไวรัสตัวใหม่ในเซลล์ทดลองช้าลง และเมื่อทดลองนำเชื้อไวรัสดังกล่าวฉีดเข้าหนูทดลอง พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด virus-neutralizing antibody ในระดับ titer ที่สูงและทำให้หนูทดลองรอดชีวิตจากการติดเชื้อไวรัส CVS ได้ และมีงานวิจัยที่ใช้ siRNA ต่อ mRNA ของยีน P ของเชื้อ respiratory syncytial virus (RSV) (18) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสแบบ nonsegmented negative-stranded RNA (NNR) เหมือนกับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า พบว่า siRNA สามารถยับยั้งการทำงานของ RdRP subunit และทำให้ปริมาณโปรตีน P ของเชื้อไวรัสลดลง ซึ่งโยงให้เห็นว่า anti-P miRNA อาจเป็นโมเลกุลที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้เช่นกัน แต่จากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า anti-P miRNA ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ แต่ประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับ anti-N miRNA ที่ถูกออกแบบและสร้างโดยวิธีเดียวกัน จึงสันนิษฐานได้ว่าการใช้ miRNA ต่อ mRNA ของยีน P อาจควบคุมกระบวนการแสดงออกของไวรัสได้ไม่เท่ากับ N mRNA

การศึกษา miRNA แบบ multiple miRNA ใน single pre-miRNA transcript unit พบว่า การสร้าง multiple miRNA จากพื้นฐานลำดับเบส miR-30 ให้ประสิทธิภาพการทำงานในกระบวนการ RNAi ได้น้อยกว่า miRNA แบบ single miRNA (42) ในทางกลับกัน เมื่อสร้าง miRNA จากพื้นฐาน miR-155 พบว่า miRNA แบบ multiple miRNA ให้ผลยับยั้งยีนเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อมีจำนวนโมเลกุล miRNA แสดงออกมากขึ้น (41) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ ที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ multiple miRNA ที่สร้างจากพื้นฐานลำดับเบสของ miR-155 สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้ดีขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ miRNA แบบ single miRNA และจากการวัดระดับการแสดงออกของ miRNA (miRNA quantification) พบว่า เมื่อจำนวนโมเลกุล miRNA มีปริมาณมากขึ้น ระดับการแสดงออกของ miRNA เพิ่มขึ้นด้วย แต่ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามจำนวนเท่าของโมเลกุล miRNA ซึ่งจะเห็นว่า จากผลการทดลองที่ 9 พบว่า ระดับการแสดงออกของโมเลกุล miRNA เฉลี่ย 1 โมเลกุล ใน 1 pre-miRNA transcript คือ ที่ระดับประมาณ 45 – 50% นั่นแสดงว่าถ้าต้องการสร้าง multiple miRNA และสร้างต่อ multiple target ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยให้มีการแสดงออกของโมเลกุล miRNA ต่อ target หนึ่งๆที่ระดับประมาณ 100% อาจต้องสร้าง pre-miRNA transcript ให้มีโมเลกุล miRNA ต่อ

target แบบเดียวกัน 2 โมเลกุล และสร้างต่อ multiple target ตามต้องการ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการทดสอบโมเลกุล miRNA ต่อยีนเป้าหมายใดก็ตามในลักษณะงานวิจัยดังข้างต้น ควรทดลองวัดระดับการแสดงออกของโมเลกุล miRNA ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง เพื่อเป็นการคาดคะเนผลการยับยั้งยีนเป้าหมายในการทดลองนั้นๆ เพราะระบบการสร้างโมเลกุล miRNA จากพื้นฐานลำดับเบส miR ใดๆเป็นลักษณะเฉพาะสำหรับโมเลกุล miRNA นั้นๆที่ออกแบบและสร้างขึ้นในการทดลอง

กระบวนการ RNA interference ในรูปแบบการทำงานของ miRNA จะเห็นว่า miRNA ไปจับ mRNA เป้าหมายแบบ imperfect base pairing (29) แล้วจึงยับยั้งการ translation ของ mRNA ทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่อไป ซึ่งจากงานวิจัยครั้งนี้ ได้ออกแบบ miRNA ต่อบริเวณ coding region ของยีน และเป็นการออกแบบจากลำดับเบสของยีนที่สนใจจะยับยั้ง ทำให้ miRNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมีลำดับเบสที่สามารถจับเข้าคู่ได้กับ mRNA เป้าหมายอย่างสมบูรณ์ทั้ง 21 เบส แต่จากความรู้เกี่ยวกับกลไก miRNA ที่จับกับเป้าหมายแบบ imperfect base pairing จึงมีข้อสันนิษฐานต่อไปว่า ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าในงานวิจัยครั้งนี้ มาจากกลไกการจับระหว่าง miRNA กับยีนเป้าหมายในลักษณะใด เป็นไปได้หรือไม่ที่ flanking region จาก pre-miRNA จะส่งผลต่อลำดับเบสที่อาจเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของ miRNA ทำให้เกิด mismatch ขึ้นในบางตำแหน่งระหว่างการจับกันของ miRNA กับ mRNA เป้าหมาย ซึ่งก็ยังไม่สามารถหาคำตอบที่ชัดเจนในกรณีนี้ แต่จากงานวิจัยของ Nipan Israsena และคณะ (48) พบว่า ได้นำ miRNA ที่ออกแบบและสร้างขึ้นโดยมีลำดับเบสที่สามารถจับเข้าคู่ได้อย่างสมบูรณ์ทั้ง 21 เบส กับยีน N ของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า CVS strain มาทดสอบดูการยับยั้งการแสดงออกของยีนและการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสกับไวรัสพิษสุนัขบ้าอีก 2 strain คือ HEP Flury strain และ street rabies virus ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณยีน N ที่โมเลกุล miRNA ต่อ mRNA ของยีน N ที่ออกแบบมาจาก CVS จะไปจับ พบว่าในบริเวณดังกล่าวมีลำดับเบสที่ไม่เข้าคู่กันอยู่ 1-3 ตำแหน่ง และจากผลการทดลองพบว่า miRNA ที่ออกแบบจาก CVS สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HEP Flury strain และ street rabies virus ได้ จึงอาจวิเคราะห์ได้ว่า กลไกการจับระหว่าง miRNA กับ mRNA เป้าหมายในงานวิจัยครั้งนี้ อาจเป็นแบบ perfect หรือ imperfect base pairing ก็ตาม แต่ miRNA ก็ยังสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลจากงานวิจัย (48) ทำให้เกิดประโยชน์ในแง่ของการนำโมเลกุล miRNA ไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าทั่วไป (street rabies virus) ซึ่งเชื้อไวรัส street rabies virus อาจมี mutant escape หรือลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปบ้าง ดังนั้นถ้าใช้ miRNA ที่ออกแบบมาต่อเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าแบบหนึ่ง แต่เมื่อนำไปใช้กับเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้าอื่นที่มีลำดับเบสไม่เข้าคู่กัน 1-3 ตำแหน่ง ก็อาจส่งผลยับยั้งการแสดงออกของเชื้อนั้นๆได้ด้วย

รายการอ้างอิง

[1.] Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Laothamatas J, and Wilde H. Rabies. Curr Neurol Neurosci Rep 2006 Nov; 6(6): 460-8.

[2.] WHO Expert Consultation on rabies. World Health Organ Tech Rep Ser 2005 931: 1-88, back cover.

[3.] Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fèvre EM, Meltzer MI, Miranda ME, Shaw A, Zinsstag J, and Meslin FX. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. Bull World Health Organ 2005 May; 83(5): 360-8.

[4.] Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, and Rupprecht CE. Survival after treatment of rabies with induction of coma. N Engl J Med 2005 Jun; 352(24): 2508-14.

[5.] Robert C. McDermid, Lynora Saxinger, Bonita Lee, Jennie Johnstone, R.T. Noel Gibney, Marcia Johnson, and Sean M. Bagshaw. Human rabies encephalitis following bat exposure: failure of therapeutic coma. CMAJ 2008 Feb 26; 178(5): 557-561.

[6.] Jackson AC and Wunner WH. Rabies. United states of America. 2002; 1-493 p.

[7.] Finke S, Conzelmann KK. Replication strategies of rabies virus. Virus Res 2005 Aug; 111(2): 120-31.

[8.] Shen WG. RNA interference and its current application in mammals. Chin Med J (Engl) 2004 Jul; 117(7): 1084-91.

[9.] Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, and Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. Science 2005 Apr 22; 308(5721): 557-60.

[10.] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, and Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nat Biotechnol 2002 May; 20(5): 500-5.

[11.] Capodici J, Kariko K, and Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. J Immunol 2002 Nov; 169(9): 5196-201.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[12.] Zach N. Adelman, Irma Sanchez-Vargas, Emily A. Travanty, Jon O. Carlson, Barry J. Beaty, Carol D. Blair, and Ken E. Olson. RNA Silencing of Dengue Virus Type 2 Replication in Transformed C6/36 Mosquito Cells Transcribing an Inverted-Repeat RNA Derived from the Virus Genome. Journal of Virology 2002 Dec; 76(24): 12925-33.

[13.] Tsung-Lin Cheng, Wen-Wei Chang, Ih-Jen Su, Ming-Derg Lai, Wenya Huang, Huan-Yao Lei, and Wen-Tsan Chang. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005 Oct; 336(3): 820-30.

[14.] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, and Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Feb 18; 100(4): 2014-8.

[15.] Zhou H, Jin M, Yu Z, Xu X, Peng Y, Wu H, Liu J, Liu H, Cao S, and Chen H. Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. Antiviral Res 2007 Nov; 76(2): 186-93.

[16.] Bai F, Wang T, Pal U, Bao F, Gould LH, and Fikrig E. Use of RNA interference to prevent lethal murine west nile virus infection. J Infect Dis 2005 Apr 1; 191(7): 1148-54.

[17.] Priti Kumar, Sang Kyung Lee, Premlata Shankar, and N Manjunath. A Single siRNA Suppresses Fatal Encephalitis Induced by Two Different Flaviviruses. PLoS Med 2006 April; 3(4): 505-14.

[18.] Barik S. Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. Virus Res 2004 Jun; 102(1): 27-35.

[19.] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, and Pillai RS. Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr Opin Struct Biol 2005 Jun; 15(3): 331-41.

[20.] Kissi B, Tordo N, and Bourhy H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. Virology 1995 Jun 1; 209(2): 526-37.

[21.] Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE, and Clark K. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. N Engl J Med 1991 Jan 24; 324(4): 205-11.

[22.] Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, and Fu ZF. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. J Virol 1999 Feb; 73(2): 1661-4.

[23.] Fu ZF, Zheng Y, Wunner WH, Koprowski H, and Dietzschold B. Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. Virology 1994 May; 200: 590-7.

[24.] Morimoto K, Shoji Y, and Inoue S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. Virus Res 2005 Jul; 111(1): 61-7.

[25.] Hemachudha T, Laothamatas J, and Rupprecht CE. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. Journal of Lancet Neurology 2002 Jun; 1: 101-9.

[26.] Finke S, Mueller-Waldeck R, and Conzelmann KK. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. J Gen Virol 2003 Jun; 84(Pt 6): 1613-21.

[27.] Hemachudha T, Sunsaneewitayakul B, Desudchit T, Suankratay C, Sittipunt C, Wacharapluesadee S, Khawplod P, Wilde H, and Jackson AC. Failure of therapeutic coma and ketamine for therapy of human rabies. J Neurovirol 2006 Oct; 12(5): 407-9.

[28.] Barik S. Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med 2005 Oct; 83(10): 764-73.

[29.] Zeng Y, Yi R, and Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A 2003 Aug 19; 100(17): 9779-84.

[30.] http://www.ambion.com/techlib/resources/miRNA/mirna_pro.html

[31.] http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/AntisenseRNA/

[32.] Schütz S, and Sarnow P. Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. Virology 2006 Jan 5; 344(1): 151-7.

[33.] Van Rij RP, and Andino R. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. Trends Biotechnol 2006 24:186-93.

[34.] Cullen BR. Viruses and microRNAs. Nat Genet 2006 Jun; 38 Suppl: S25-30.

[35.] Dykxhoorn DM. MicroRNAs in viral replication and pathogenesis. DNA Cell Biol

2007 Apr; 26(4): 239-49.

[36.] John M, Constien R, Akinc A, Goldberg M, Moon YA, Spranger M, Hadwiger P, Soutschek J, Vornlocher HP, Manoharan M, Stoffel M, Langer R, Anderson DG, Horton JD, Koteliansky V, and Bumcrot D. Effective RNA imediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. Nature 2007 Oct 11; 449(7163): 745-7.

[37.] Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, and Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature 2007 Jul 5; 448(7149): 39-43.

[38.] Leonard JN, and Schaffer DV. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. Gene Ther 2006 Mar; 13(6): 532-40.

[39.] Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, and Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. Nat Biotechnol 2004 Mar; 22(3): 326-30.

[40.] Meihong Chen, Quan Du, Hong-Yan Zhang, Claes Wahlestedt, and Zicai Liang. Vector-based siRNA delivery strategies for high-throughput screening of novel target genes. Journal of RNAi and Gene Silencing 2005 Aug; 1(1): 5-11.

[41.] Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, and Turner DL. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. Nucleic Acids Res 2006 Apr 13; 34(7): e53.

[42.] Zhou H, Xia XG, and Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. Nucleic Acids Res 2005 Apr 1; 33(6): e62.

[43.] Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, and Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. Nucleic Acids Res 2004 Feb 13; 32(3): 1154-8.

[44.] Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, and David M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. Nature 2007 Oct 18; 449(7164): 919-22.

[45.] Xia XG, Zhou H, and Xu Z. Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes.

Biotechniques 2006 Jul; 41(1): 64-8.

[46.] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, and Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol 2002 Apr 30; 12(9): 735-9.

[47.] Wunner WH, Pallatroni C, and Curtis PJ. Selection of genetic inhibitors of rabies virus. Arch Virol 2004 Aug; 149(8): 1653-62.

[48.] Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, and Hemachudha T. Inhibition of Rabies Virus Replication by Designed microRNAs. (manuscript in prep).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
ขั้นตอนการทำ transformation

1. miRNA : ดูด ligation reaction ปริมาตร 2 μl ใส่ลงใน One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* (จากชุด kit) เขย่าเบาๆ ห้ามผสมโดยวิธี pipet ขึ้น-ลง เด็ดขาด

siRNA : ดูด ligation reaction ปริมาตร 10 μl ใส่ลงใน competent *E. coli* cell ปริมาตร 100 μl เขย่าเบาๆ ห้ามผสมโดยวิธี pipet ขึ้น-ลง เด็ดขาด

2. incubate บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที

3. heat shock เซลล์ โดยการ incubate ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ใน water bath) หลังจากนั้น วางในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2-3 นาที

4. เติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 μl

5. shake incubate ที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. ดูด transformed cell 50-200 μl มา spread บน pre-warmed LB agar plate ที่มียาปฏิชีวนะ (miRNA: spectinomycin 50 μg/ml, siRNA: ampicillin 50-200 μg/ml)

7. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน (overnight)

8. คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบน LB agar plate (อย่างสุ่ม) ใส่ใน LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ (ความเข้มข้นเหมือนใน LB agar plate) นำไป shake incubate ที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน (overnight)

9. สกัดเวกเตอร์ RNAi ออกจาก *E.coli* cell

10. ทำ sequencing เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของโมเลกุล RNAi ในเวกเตอร์นั้นๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.
สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์

ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ HyQ MEM/EBSS media (Hyclone) ที่มีส่วนผสมของ

- 2mM L-glutamine
- 1.5 g/L $NaHCO_3$
- 1mM Sodium Pyruvate
- 1X Non-Essential Amino Acids (NEAA)
- 10% Fetal bovial serum
- 100U of penicillin/ml
- 100μg of streptomycin/ml

ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

ขั้นตอนการย้อม nucleoprotein ในเซลล์ด้วยวิธี Direct Fluorescence Assay (DFA)

1. ล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วย phosphate buffer saline (PBS)

2. fix เซลล์ด้วย 90% acetone (ที่เย็นจัด) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3. ดูด 90% acetone ออก

4. นำ anti-rabies monoclonal globulin antibody มาทำให้เจือจาง (จาก stock เริ่มต้น) ในอัตราส่วน 1: 50

5. ใส่ anti-rabies monoclonal globulin antibody ที่เจือจางแล้วลงในเซลล์ข้อ 3 ปริมาตร 300 μl)

6. นำกระดาษฟอยด์ทึบแสงมาห่อ plate เพื่อกันแสง หลังจากนั้น นำไป incubate ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7. ดูด anti-rabies monoclonal globulin antibody ออก แล้วล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย PBS

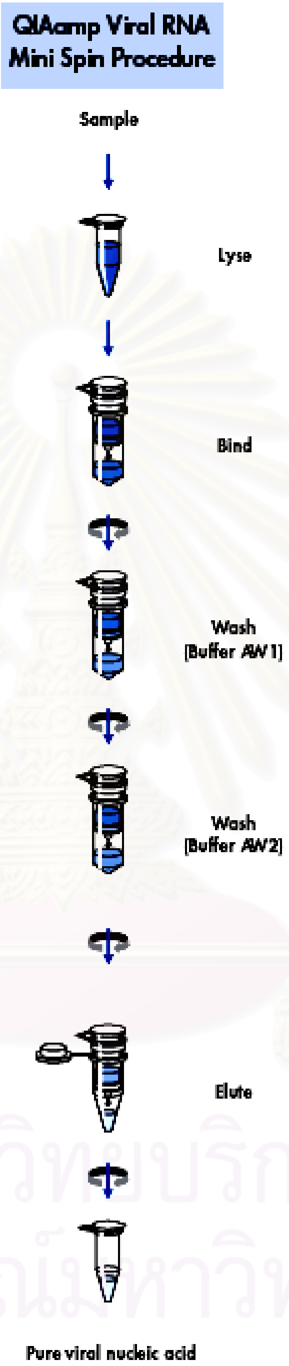
8. นำไปส่องกล้องดูการเรืองแสงสีเขียวของสาร fluorescein ในกล้องจุลทรรศน์ Nikon Eclipse TE2000

<u>หมายเหตุ</u> – ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 4 – 8 ให้ทำในที่มืด หรือ ที่มีแสงน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

ขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จาก supernatant



รูปที่ 26. แสดงขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จาก supernatant

1. ดูด buffer AVL (ใส่ carrier RNA แล้ว) ปริมาตร 560 μl ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

2. เติม supernatant ปริมาตร 140 μl ลงใน buffer AVL ทำการผสม โดยการ vortex ประมาณ 15 วินาที ให้เป็น homogenous solution

3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

4. ปั่น short spin เพื่อให้สารที่ติดฝาปิดตกลงมา

5. เติม 96 – 100% ethanol ปริมาตร 560 μl ทำการผสม โดยการ vortex ประมาณ 15 วินาที หลังจากผสมแล้ว ให้ปั่น short spin เพื่อให้สารที่ติดฝาปิดตกลงมา

6. ดูดสารละลายในข้อ 5 มา 630 μl (จาก 1,260 μl) ใส่ลงใน QIAamp spin column ที่วางอยู่ใน 2 ml collection tube ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g (8,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและ collection tube ไป

7. วาง QIAamp spin column ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ ดูดสารละลายที่เหลือในข้อ 5 ใส่ลงใน column แล้วทำซ้ำข้อ 6

8. วาง QIAamp spin column ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer RW1 ปริมาตร 500 μl ใน column ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g (8,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและ collection tube ไป

9. วาง QIAamp spin column ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ แล้วเติม buffer RW2 ปริมาตร 500 μl ใน column ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 3 นาที ที่ความเร็วรอบสูงสุด 20,000 x g (14,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและ collection tube ไป

10. วาง QIAamp spin column ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที

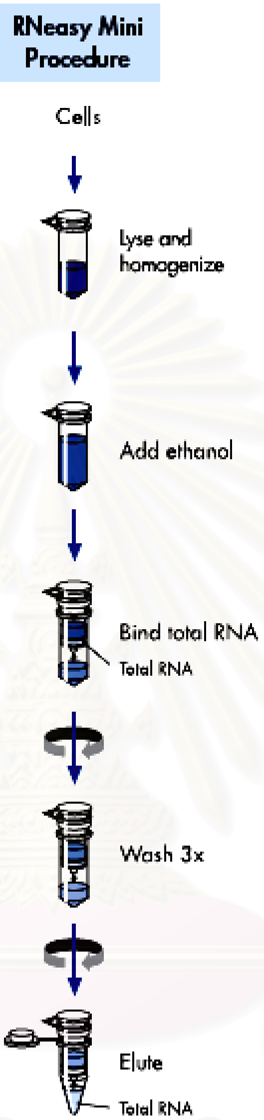
11. วาง QIAamp spin column ลงใน 1.5 ml collection tube อันใหม่ เติม buffer AVE (Elution buffer) ปริมาตร 60 μl ใน QIAamp spin column โดยตรง ปิดฝาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น นำไปปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ 6,000 x g (8,000 rpm) เพื่อ elute เอา total RNA ออกมา

12. นำ total RNA ที่ได้ (eluate) ไปวัดและคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ RNA

<u>หมายเหตุ</u> – total RNA สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20°C หรือ -70°C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.
ขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จากเซลล์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27. แสดงขั้นตอนการแยกสกัด total RNA จากเซลล์

1. Harvest Cells: เก็บเซลล์ โดยการล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วยสารละลาย PBS ต่อมา เติม 0.25% trypsin ลงในเซลล์เพื่อย่อยเซลล์ แล้วเติม media ที่มี serum ลงไป เพื่อหยุดการทำงานของ trypsin ต่อจากนั้น ดูดเซลล์มาใส่ใน RNase-free microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเป็นเวลา 5 นาที ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนเป็น pellet cells แล้วดูด supernatant ที่ปั่นได้ทิ้งให้หมด เพื่อไม่ให้รบกวน total RNA yield ที่แยกสกัดได้

2. Disrupt Cells: เติม buffer RLT ปริมาตร 350 µl ใน pellet cells เขย่า lysate โดยการ vortex หรือ pipet เพื่อให้เซลล์เป็น homogenize

3. เติม 70% ethanol ปริมาตร 350 µl (1 เท่าของ lysate) ใน homogenized lysate แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ pipet ขึ้นลง เท่านั้น

4. ดูด lysate ทั้งหมดลงใน RNeasy spin column ที่วางอยู่ใน 2 ml collection tube ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและวาง column ลงใน collection tube เดิม

5. เติม buffer RW1 ปริมาตร 700 µl ใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและวาง column ลงใน collection tube เดิม

6. เติม buffer RPE ปริมาตร 500 µl ใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและวาง column ลงใน collection tube เดิม

7. เติม buffer RPE ปริมาตร 500 µl ใน RNeasy spin column ปิดฝาเบาๆและนำไปปั่นเป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) หลังจากนั้น ทิ้งสารด้านล่างและ collection tube ไป

8. วาง RNeasy spin column ลงใน 2 ml collection tube อันใหม่ และนำไปปั่นที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที

9. วาง RNeasy spin column ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ เติม RNase-free water ปริมาตร 30 – 50 µl ใน spin column membrane โดยตรง ปิดฝาเบาๆ และนำไปปั่นเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็วรอบ ≥ 8,000 x g (≥ 10,000 rpm) เพื่อ elute เอา total RNA ออกมา

<u>หมายเหตุ</u> – ถ้าคาดว่า total RNA yield > 30 µg ให้ทำซ้ำข้อ 9 โดยใส่ RNase-free water อีก 30 – 50 µl หรือใช้ eluate ในข้อ 9 ที่ได้ ใส่ลงใน spin column membrane เดิม แล้วนำไปปั่น โดยใช้ collection tube เดิม

10. นำ total RNA ที่ได้ (eluate) ไปวัดและคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ RNA

ภาคผนวก ฉ.

แสดง Oligonucleotide Forward และ Reverse Primer ของยีน nucleoprotein ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR และแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ Primer ไปจับในยีน

Forward primer: 5′- CTGGCAGACGACGGAACC – 3′

Reverse primer: 5′- CATGATTCGAGTATAGACAGCC – 3′

Rabies Nucleoprotein Gene Sequence (CVS strain)

5′-

TTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGTGGATCAATATGAG
TACAAGTACCCTGCCATCAAGGATTTGAAAAAGCCTTGTATCACCCTAGGGAAAGCCCCC
GACTTGAACAAAGCATACAAATCAGTTTTATCAGGCATGAATGCCGCCAAACTTGATCCG
GATGATGTATGCTCCTACTTGGCAGCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACATGTCCGGAA
GACTGGACCAGCTATGGAATCCTGATTGCACGAAAAGGAGATAGGATCACCCCAAACTCT
CTAGTGGAGATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAA
TTGACAAGGGACCCCACTGTCTCTGAACATGCATCTTTAGTCGGTCTTCTCCTGAGTCTG
TACAGGTTGAGCAAAATATCAGGACAGAACACTGGTAACTATAAGACAAACATTGCAGAT
AGGATAGAGCAGATTTTCGAGACAGCACCTTTTGTTAAGATCGTGGAACACCATACCCTA
ATGACAACTCACAAGATGTGTGCTAATTGGAGTACTATACCGAACTTCAGATTTTTGGCC
GGAACCTACGACATGTTTTTCTCACGGATTGAGCATCTGTATTCGGCAATCAGAGTGGGC
ACAGTCGTCACCGCTTATGAAGACTGCTCAGGACTGGTATCGTTTACAGGGTTCATAAAG
CAGATCAATCTCACCGCAAGGGAAGCAATACTATATTTCTTCCACAAGAACTTTGAGGAA
GAGATAAGAAGAATGTTCGAGCCAGGGCAAGAGACAGCTGTTCCTCACTCTTATTTCATC
CACTTCCGTTCACTAGGCTTGAGTGGGAAGTCTCCTTATTCATCGAATGCTGTCGGTCAT
GTGTTCAATCTCATTCACTTTGTTGGATGCTACATGGGTCAAGTCAGATCTCTAAATGCG
ACGGTTATTGCTGCATGTGCCCCTCATGAGATGTCTGTTCT Forward Primer GAGAG
GAATTCTTCGGAAAAGGGACATTTGAAAGAAGGTTCTTCAG TTCAA
GAATATGAGGCGGCTGAACTAACAAAGTCCGACGTGGCA**CTGGCAGATGACGGAACC**GTC
AACTCTGATGACGAGGACTATTTCTCTGGTGAAACCAGAAGTCCAGA**AGCTGTCTATACT**
CGAATCATGATGAATGGAGGTCGACTGAAGAGATCTCATATACGGA
AGTTCCAATCATCAAGCCCGTCCAAACTCATTCGCCGAATTTTTAA Reverse Primer
AATGACTCATAAGGAGTTGATTGATAGGGTGCCAGAAATCTATAGA
CATGAAAAAAACTAACACTCCTCCTTTCAAACCATCCCAAAT – 3′

ภาคผนวก ซ.

แสดง Oligonucleotide Forward และ Reverse Primer ของยีน glycoprotein ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR และแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ Primer ไปจับในยีน

Forward primer: 5′- GGACCCATATGACAGATCCC – 3′

Reverse primer: 5′- GCATCCAAATGGTGTAATCG – 3′

Rabies Glycoprotein Gene Sequence (CVS strain)

5′-

GGATCCGCCACCATGGTTCCTCAGGTTCTTTTGTTTGTACTCCTTCTGGGTTTTTCGTTGTG
TTTCGGGAAGTTCCCCATTTACACGATACCAGACAAACTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGACA
TACACCATCTCCGCTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCC
GGGTTCTCCTACATGGAACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAACGGGTTCAC
TTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGTCACAACCA
CA[illegible]TTTCCGCCCCACCCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAG
AT [Forward Primer] GATATGAAGAGTCCCTACAAAATCCATACCCCGACTACCACTGGCT
TC[illegible]ACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCAAGTGTGACAGATTT**GG**
ACCCATATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACG
GTGTCCTCTACCTACTGCTCAACTAACCA**TGATTACACCATTTGGATGC**CCGAGAATCCGAG
ACCAGGGACACCTTGTGACATTTTTACCAATA[illegible]CATCCAACGGGAACA
AGACTTGCGGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTG [Reverse Primer] GGAGCATGCAGGCTC
AAGTTATGTGGAGTTCTTGGACTTAGACTTAT[illegible]CGCGATGCAAACATC
AGATGAGACCAAATGGTGCTCTCCAGATCAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACG
AGATTGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATACATTA
GAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACTTGT
CCCAGGGTTTGGAAAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTGATGCTCACT
ACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATCCCCTCAAAAGGGTGTTTGAAAGTTGGAGGA
AGGTGCCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTATAATATTAGGGCCTGACGACCG
TGTCCTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCGGCAACATATGGAGTTGTTGGAATCTT
CAGTTATCCCCCTGATGCACCCCCTGGCTGACCCTTCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGAG
GCTGAGGATTTTGTTGAAGTTCACCTCCCCGATGTGTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCT
GGGTCTCCCGAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGGCCATGATTGGCCTGGTGT
TGATATTTTCCCTAATGACATGGTGCAGAAGAGCCAATCGACCAGAATCGAAACAACGCAGT
TTTGGAGGGACAGGGGGGAATGTGTCAGTCACTTCCCAAAGCGGAAAAGTCATACCTTCATG
GGAATCATATAAGAGTGGAGGTGAGATCAGACTGTGAAGGCCGGTCATCCTTTTGACGATTC
CAGTCCCGAGGATAACCTCCTCTCGGGATTGGGGGGAATCTTTGGATCCAGTAGT – 3′

ภาคผนวก ซ.

แสดง Oligonucleotide Forward และ Reverse Primer ของยีน phosphoprotein ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR และแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ Primer ไปจับในยีน

Forward primer: 5′- TGTTAATCCGAGTGCAATCAGAGCC – 3′

Reverse primer: 5′- TGTCCTCAGGGAGATTGTCCACTTC – 3′

Rabies Phosphoprotein Gene Sequence (HEP Flury strain)

5′-

Forward Primer

ATGAGCAAGATCTT**TGTTAATCCGAGTGCAATCAGAGCC**GGTCTGGCCGATCTTGAGATGGC
CGAAGAGACTGTTGATCTGATCAACAGAAACATAGAAGACAATCAGGCTCATCTCCAGGGAG
AACCCATA**GAAGTGGACAATCTCCCTGAGGACA**TGAGGCAATTTCACCTGGACGATGAAAAA
TTGTCCAACCTTGCTCACATCCTTACCCTGGGCGAAGGCAAGTATCGAGAGGACTTTCAGAT
GAATGAGGGAGAG Reverse Primer TTCCAATCGTACCTGGACAATGTTGGAGTCCAAA
TAGTCAGACAAAT[illegible]ATTCCTCAAGATATGGTCACAGACCGTAGGAA
ATTATATCCTATGTCTCGGTCAACTTTCCTAACCCTCCAGGAAGGTCTTCGGAGGATAAATC
AACCCAAACTACTGGCCGGGAGCTCAAGAAGGAGACAACATCCATTCTTTCTCAAAGAGAAA
GCCAACCTTCAAAAGCCGGAATGGTGGCTCAAGTTGCCTCTGGCCCTCCATCCCTTGAATGG
TCTGCCACCAATGGAGAGGATGATCTATCAGTAGAGGCTGAGATCGCTCATCAGATTGCTGA
AAGCTTTTCCAAGAAGTACAAGTTTCCTTCTCGATCTTCAGGAATATTCTTGTATAATTTTG
AGCAACTGGAGATGAACCTTGATGACATAGTTAAAGAGGCAAAAAATGTACCGGGCGTGACC
CGTCTGGCCCATGATGGATCCAAAATCCCCCTAAGATGTGTACTGGGATGGGTCGCTTTGGC
CAACTCCAAGAAATTCCAATTGCTAGTCGAGGCCGACAAGCTAAGCAAAATCATGCAAGATG
ACTTGGATCGCTACACATCATGCTAA – 3′

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฌ.

แสดง Oligonucleotide Forward และ Reverse Primer ของ genomic RNA ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR และแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ Primer ไปจับในยีน

Forward primer: 5′- AGAAGGATCGTGGAGCACCATACTCTCA - 3′

Reverse primer: 5′- TACCAGCCCTGAACAGTCTTCA - 3′

Rabies genomic RNA Sequence (CVS strain)

3′-

AAGTTTCAGTTATTAGTCCACCAGAGAAACTTCGGACTCTAATAGCACCTAGTTATAC
TCATGTTCATGGGACGGTAGTTCCTAAACTTTTTCGGAACATAGTGGGATCCCTTTCG
GGGGCTGAACTTGTTTCGTATGTTTAGTCAAAATAGTCCGTACTTACGGCGGTTTGAA
CTAGGCCTACTACATACGAGGATGAACCGTCGTCGTTACGTCAAGAAACTCCCCTGTA
CAGGCCTTCTGACCTGGTCGATACCTTAGGACTAACGTGCTTTTCCTCTATCCTAGTG
GGGTTTGAGAGATCACCTCTATTTCGCATGACTACATCTTCCCTTAACCCGAGACTGT
CCTCCGTACCTTAACTGTTCCCTGGGGTGACAGAGACTTGTACGTAGAAATCAGCCAG
AAC Forward Primer GTCCAACTCGTTTTATAGTCCTGTCTCGTGACCATTGATATT
CTC TCCTATCTCGTCTAAAAGCTCTGTCGTGGAAAA**CAATTCTAG**
CACCTTGTGGTATGGGATTACTGTTGAGTGTTCTACACACGATTAACCTCATGATATG
GCTTGAAGTCTAAAAACCGGCCTTGGATGCTGTACAAAAAGAGTGCCTAACTCGTAGA
CATAAGCCGTTAGTCTCACCCGTGTCAGCAGTGGCGAAT**ACTTCTGACGAGTCCTGAC**
CATAGCAAATGTCCCAAGTATTTCGTCTAGTTAGAGTGGCGTTCCCTTCGTTATCATA
TAAAGAAGGTGTTCTTGAAACTCCTTCTCTATTCTTCTTACA Reverse Primer CT
CTGTCGACAAGGAGTGAGAATAAAGTAGGTGAAGGCAAGTGA TC
AGAGGAATAAGTAGCTTACGACAGCCAGTACACAAGTTAGAGTAAGTGAAACAACCTA
CGATGTACCCAGTTCAGTCTAGAGATTTACGCTGCCAATAACGACGTACACGGGGAGT
ACTCTACAGACAAGATCCCCCGATAAACCCTCTCCTTAAGAAGCCTTTTCCCTGTAAA
CTTTCTTCCAAGAAGTCTCTGCTCTTTCTTGAAGTTCTTATACTCCGCCGACTTGATT
GTTTCAGGCTGCACCGTGACCGTCTACTGCCTTGGCAGTTGAGACTACTGCTCCTGAT
AAAGAGACCACTTTGGTCTTCAGGTCTTCGACAGATATGAGCTTAGTACTACTTACCT
CCAGCTGACTTCTCTAGAGTATATGCCTCTATACAGAGTCAGTCAAGGTTAGTAGTTC
GGGCAGGTTTGAGTAAGCGGCTTAAAAATTTGTTCTGTATAAGCTCACTGAGTATTCC
TCAACTAACTGTCCCACGGTCTTTAGATATCTAACATATATAGGTAGTACTTTTTTTG
ATTGTGAGGAGGAAAGTTTGGTAGGGTTTA – 5′

ภาคผนวก ญ.

แสดง Oligonucleotide Forward และ Reverse Primer ของยีน GAPDH ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR และแสดงตำแหน่งลำดับเบสที่ Primer ไปจับในยีน

Forward primer: 5′- TCAACGACCCCTTCATTGAC - 3′

Reverse primer: 5′- ATGCAGGGATGATGTTCTGG - 3′

GAPDH Gene Sequence (Mus musculus: mouse)

5′-

TCGGCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCCAGAGACAGCCGCATCTTCTT [illegible] TCG **Forward Primer**
TCCCGTAGACAAAATGGTGAAGGTCGGTGTGAACGAATTTGGCCG [illegible] TCA
CCAGGGCTGCCATCTGCAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTGCCA**TCAACGACCCCTTCATTGAC**
CTCAACTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGACTCCACCCACGGCAAATTCAACGGCACAGT
CAAGGCCGAGAATGGGAAGCTCGTCATCAACGGGAAGCCCATCACGATCTTCCAGGAGCGAG
ACCCCGCTAACATCAAATGGGGTAAGGCCGGTGCTGAGTATGTTGTGGAGTCTACTGGTGTC
TTCACCACCATGGAGAAAGCCAGGGCCCACTTGAAGGGGTGGAGCCAAAAGGTCATCATCTC
CGCCCCTTCTGCCGATGCCCCCATGTTTGTGATGGTGAACCACGAGAAATATGACAACTCAC
TCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCCCTGGCCAAGGTCATC
CATGACAACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACGGTCCATGCCATCACTGCCACCCA
GAAGACTGTGGATGGCCCCTCTGGAAAGCTGTGGCGTGATGGTCGTGGGGCTGC**CCAGAACA**
TCATCCCTGCATCCACTGGTGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCAGAGCTGAACGGG
AACCTCACTCCCATGGCCTTCCGTGTTCCTACCCCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGACGTG
[illegible] CTGCCAAGTATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATCTGAGG **Reverse Primer**
[illegible] ATCTTGGGCTACACTGAGGACCAGGTTGTCTCCTGCAACTTCAACAGC
AACTCCCACTCTTCCACCTTCGATGCCGGGGCTGGCATTGCTCTCAATGACAACTTTGTCAA
GCTCATTTCCTGGTATGACAATGAATACGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCT
ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGAAACCCTGGACCACCCACCCCAGCAAGGACACTGAGCAAGA
GAGAGGCCCTATCCCAACTCGGCCCCCAACACTGAGCATCTCCCTCACAATTTCCATCCCAG
ACCCCCATAATAACAGGAGGGGCCTAGGGAGCCCTCCCTACTCTCTTGAATACCATCAATAA
AGTTTGCTGCACCCACAAAAAAAAAAAAAAGAAAATTATCTATT - 3′

ภาคผนวก ฎ.
การเตรียมสารละลาย

สูตรการคำนวณความเข้มข้นสารละลายจากสารละลายเข้มข้น ใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นเดิม V_1 = ปริมาตรสารละลายเดิมที่ตักหรือแบ่งมา

N_2 = ความเข้มข้นที่เจือจางแล้ว V_2 = ปริมาตรทั้งหมดรวมน้ำและสาร

1. การเตรียมสารละลาย 1 M HCl ปริมาตร 100 ml (จาก conc. HCl ความเข้มข้น 37.1 M)

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(37.1\ M) * (V_1) = (1\ M) * (100\ ml)$

ดังนั้น $V_1 = 2.69\ ml$

หมายถึง ตวง conc. HCl ความเข้มข้น 37.1 M มา 2.69 ml แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรครบ 100 ml

2. การเตรียมสารละลาย 70% Ethanol (EtOH) ปริมาตร 1 ลิตร จาก absolute Ethanol (100%)

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(100\%) * (V_1) = (70\%) * (1000\ ml)$

ดังนั้น $V_1 = 700\ ml$

หมายถึง ตวง absolute Ethanol (100%) มา 700 ml แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 ml

3. การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร, pH 7.4 (10X PBS)

ชั่ง	NaCl	80 g
ชั่ง	KCl	2 g
ชั่ง	Na_2HPO_4	14.4 g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชั่ง KH_2PO_4 2.4 g

เติมน้ำไป 500 ml, ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 M HCl แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตรครบ 1000 ml แล้วนำไป autoclave

4. การเตรียมสารละลาย Tris Base EDTA buffer (10X TBE) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tris Base 60.5 g

ชั่ง Boric acid 30.86 g

ชั่ง $Na_2EDTA*2H_2O$ 3.72 g

เติมน้ำให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรพรรณ สุภวรรณวงศ์ เกิดวันที่ 8 เมษายน พ.ศ. 2525 โรงพยาบาลสมิติเวช จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) เทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2547 (เกียรตินิยมอันดับ 2)

ระดับปริญญาโท ศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต แขนงอณูชีววิทยาและพันธุ-ศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2548

การนำเสนอผลงาน

นำเสนอผลงานในหัวข้อ “การใช้เทคโนโลยี RNA interference เพื่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนและยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า” ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 7-8 กันยายน 2550

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย