โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2

Investigation of the expressed miRNA in Dengue serotype-2-infected HEK293T cell

ชื่อนิสิต นางสาวกนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์ **เลขประจำตัว** 5832301323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงงาน	Investigation of the expressed miRNA in Dengue serotype-2-infected HEK293T cell
โดย	นางสาวกนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์ รหัสนิสิต 5832301323
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี-สิริศรัทธา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สริสา ณ ป้อมเพ็ชร์)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2

Investigation of the expressed miRNA in Dengue serotype-2-infected HEK293T cell

นิสิตในโครงการ

น.ส.กนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์

รหัสประจำตัวนิสิต 5832301323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของ

หลักสูตรการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิทยาศาสตร์ระดับปริญญาตรีนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่คอยให้คำแนะนำ สอนเทคนิคการทำการทดลอง แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาทั้งในด้านการใช้ชีวิตประจำวันและแนวคิดอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์มาโดยตลอด จนโครงการนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงค่ะ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ ที่ให้กำลังใจ คอยรับ-ส่งระหว่างบ้านกับมหาวิทยาลัย แม้ว่าจะต้องไปเช้าหรือกลับดึกก็ตาม และทำกับข้าวให้ทานในทุก ๆ วัน

ขอขอบพระคุณพี่รพี สินเนืองนอง และพี่จารุวรรณ วรวิทยธาดา ที่สละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ อย่าง ทั้งการทำการทดลอง ให้ความรู้ ให้กำลังใจ คอยสร้างเสียงหัวเราะ และเป็นที่ปรึกษาที่ดีมากในทุกเรื่อง

ขอขอบคุณณัฐนรี แตงเอี่ยม เพื่อนรักและเพื่อนที่ทำการทดลองร่วมห้องเดียวกัน ที่คอยให้กำลังใจเสมอ สามารถพูดคุยแลกเปลี่ยนความเห็นได้ในทุก ๆ เรื่อง และช่วยเหลือทั้งการเรียน และการทำการทดลอง

ขอขอบคุณชลัญญา ภูมิภาค เพื่อนรักห้อง 2016 ที่คอยให้กำลังใจ และสร้างสีสันเสมอ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ไมโครฯ จุฬาฯ รุ่นที่ 42 ทุก ๆ คน ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ราชินี ที่รับฟังปัญหา ให้คำแนะนำและกำลังใจ ทั้งยังสามารถพูดคุยด้วยความสนิทสนมเช่นเดิม ทำให้มีกำลังใจในการปฏิบัติงานจนสำเร็จลุล่วง

กนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทที่ 1 บทนำ	
— โรคไข้เลือดออก	3
— ไวรัสเดงกี	4
— วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก	5
— ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA)	6
— เซลล์ Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T)	7
— วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
บทที่ 2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	
— อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	9
— สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	
— การเลี้ยงเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36, LLC-MK2 และ HEK293T	13
— การเพิ่มจำนวนไวรัส DENV2 ในเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36	15
— การตรวจหาปริมาณไวรัส DENV2 ด้วยวิธี Plaque assay	15
— การทำให้เซลล์ HEK293T ติดไวรัส DENV2	16
— การสกัด RNA	17
— การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA ที่สกัดได้ ด้วยวิธี gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสง	17
— การสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ miRNA ที่สนใจ ด้วยวิธี Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	18
— การเพิ่มจำนวน cDNA ที่สร้างขึ้น โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ miRNA ที่สนใจ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)	19
— การตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis	22

หน้า

บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

- ผลการติดไวรัส DENV2 ในเซลล์ HEK293T ที่เวลาต่าง ๆ 23
- ผลการสกัด RNA 24
- ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-let-7c 26
- ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-744 28
- ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-U6 30

เอกสารอ้างอิง 31

ภาคผนวก ก 33

ภาคผนวก ข 38

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สถานการณ์โรคไข้เลือดออกประจำสัปดาห์ที่ 22 ปี 2562	3
2	โครงสร้างของไวรัสเดงกี	4
3	กระบวนการเพิ่มจำนวนของ Positive single stranded RNA virus	5
4	กระบวนการสร้าง miRNA	7
5	เซลล์ HEK293T	7
6	ตารางบนอุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer)	15
7	แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis ของการสกัด RNA ด้วยวิธีการใช้ Trizol ของเซลล์ HEK293T ที่ติดด้วยไวรัส DENV2 ที่เวลาต่าง ๆ	24
8	แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-let-7c	26
9	แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-744	28
10	แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-U6	30

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	9
2	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	10
3	แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด	13
4	แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดได้	18
5	แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม บริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-let-7c	19
6	แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม บริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-744	20
7	แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม บริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-U6	21
8	แสดงลักษณะของเซลล์ HEK293T ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า	23
9	แสดงความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ในหน่วย ng/µl	25

ชื่อโครงการ	การศึกษาการแสดงออกของ microRNA ในเซลล์ HEK293T ที่ติดด้วยไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2
ชื่อนิสิตเสนอโครงการ	นางสาว กนิษฐ์ ขุมเพ็ชร์
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัศวลาภสกุล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ไวรัสเดงกีเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก มียุงลายเป็นพาหะ และยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก ไวรัสเดงกีมี 4 ซีโรไทป์ ได้แก่ DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4 โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง microRNA (miRNA) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ กับการติดไวรัสเดงกี อาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้เลือดออกในอนาคตได้ ในการศึกษานี้ ได้ศึกษาการแสดงออกของ miRNA จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ miRNA-let-7c และ miRNA-744 ของเซลล์ Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T) ที่ติดไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 (DENV2) โดยมี multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 5 เมื่อทำการเก็บเซลล์หลังการติดไวรัส DENV2 ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง มาศึกษาการแสดงออกของยีน miRNA-let-7c และ miRNA-744 พบว่า เซลล์ HEK293T มีการแสดงออกของยีน miRNA-let-7c ในทุกช่วงเวลาการติดไวรัส DENV2 แต่มีปริมาณการแสดงออกในแต่ละช่วงเวลาต่างกัน และมีการแสดงออกของยีน miRNA-744 ในปริมาณน้อยกว่า miRNA-let-7c เมื่อเทียบกับยีนควบคุม miRNA-U6

TITLE Investigation of the expressed miRNA in Dengue serotype-2-infected HEK293T cell

INVESTIGATION Ms. Kanid Khumpet

ADVISOR Associate Professor Ph.D. Wanchai Assavalapsakul

DEPARTMENT Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Dengue fever, a mosquito-borne tropical disease caused by the dengue virus, remains a worldwide public health problem. There are 4 serotypes of dengue virus; DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4. The study between microRNA (miRNA), is a small single-stranded RNA with 22 nucleotides, and dengue viral infection is promoting for vaccine development to prevent the dengue viral infection. In this study, we investigated the expression of two miRNAs, miRNA-let-7c and miRNA-744, in human embryonic kidney cells 293T (HEK293T) infected with DENV2 at an MOI of 5. After 0, 24 and 48 hours post of infection, the cells were harvested to determine the expression of miRNA-let-7c and miRNA-744. The results showed the different expression levels of miRNA-let-7c at every time point in HEK293T infected DENV2 but miRNA-744 was expressed at lower level than miRNA-let-7c compared to the internal control, miRNA-U6.

บทที่ 1

บทนำ

1. โรคไข้เลือดออก

ไข้เลือดออก (Dengue Fever) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อไวรัสเดงกี (Dengue) ที่แพร่สู่ร่างกายมนุษย์โดยมียุงลายเป็นพาหะนำโรค ผู้ป่วยที่ได้รับไวรัสเดงกีเข้าสู่ร่างกายจะมีไข้สูง มีอาการป่วยรุนแรงกว่าไข้หวัดธรรมดา จากการแพร่ระบาดในวงกว้างอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน (สำนักระบาดวิทยา, 2017) ไข้เลือดออกจึงเป็นหนึ่งในโรคที่องค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ความสนใจ และประกาศให้เป็นโรคที่ควรเฝ้าระวัง (WHO, 2009)

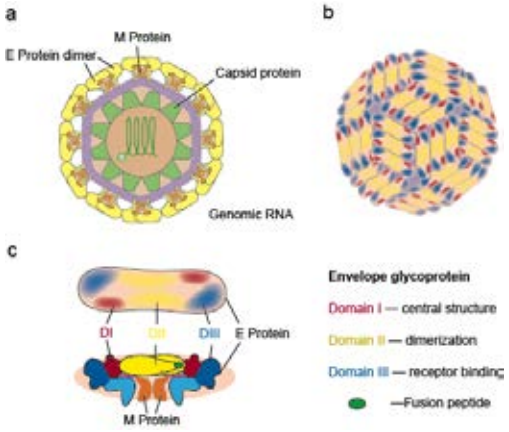
เมื่อมีการติดเชื้อครั้งแรกจะมีอาการเป็นไข้ คลื่นไส้ อาเจียน มีจุดแดงตามผิวหนัง โดยอาการจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อเกิดการติดเชื้อครั้งที่ 2 ซึ่งมีซีโรไทป์ที่ต่างไปจากการติดเชื้อครั้งแรก ส่งผลให้เกิดภาวะ antibody dependent enhancement ผู้ป่วยจะมีอาการเลือดออกที่อวัยวะภายใน (Dengue hemorrhagic fever) อาจเกิดภาวะช็อค (Dengue shock syndrome) และทำให้เสียชีวิตได้ (Bäck, A., et al. 2013) โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสุขภาพระดับโลก รวมถึงประเทศไทย ซึ่งมีสภาพอากาศอยู่ในเขตร้อน มีความชุกชุมของยุงลายมาก และโรคไข้เลือดออกจัดเป็นโรคประจำถิ่น (endemic disease) ของประเทศไทย โดยมีรายงานสถานการณ์โรคไข้เลือดออก กรมควบคุมโรค สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง ประจำสัปดาห์ที่ 22 ปี 2562 ข้อมูล ณ วันที่ 11 มิถุนายน 2562 พบว่ามีผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกมากถึง 28,785 ราย และเสียชีวิตจากโรคไข้เลือดออก 43 ราย (สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง, กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2019) ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 สถานการณ์โรคไข้เลือดออกประจำสัปดาห์ที่ 22 ปี 2562
(อ้างอิงจาก : https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor/6f4922f45568161a8cdf4ad2299f6d23/files/Dangue/Situation/2562/DHF%2022.pdf)

2. ไวรัสเดงกี

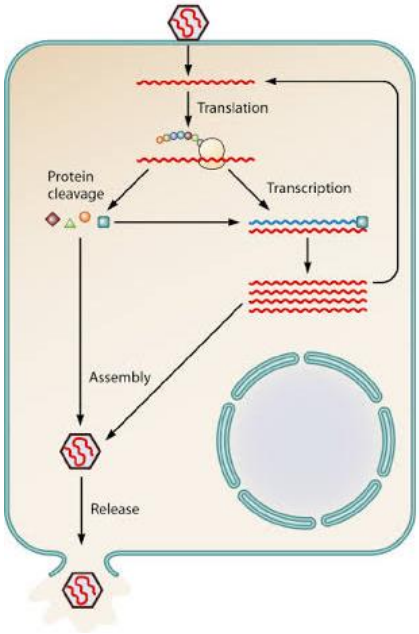
ไวรัสเดงกี (Dengue virus, DENV) เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelop virus) ซึ่งมีสารประเภทไขมัน (lipid) ห่อหุ้มโปรตีนโครงสร้าง หรือแคปซิด (capsid) อยู่ ภายในมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวกเดี่ยว (positive-sense single-stranded RNA) ดังแสดงโครงสร้างของไวรัสเดงกีในรูปที่ 2 ความแตกต่างระหว่างไวรัสเดงกีแต่ละสายพันธุ์ เกิดจากการจัดเรียงโปรตีนบริเวณด้านนอกของอนุภาคแตกต่างกัน ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับชนิดของแอนติบอดีภายในร่างกายต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถแบ่งประเภทของไวรัสเดงกีได้เป็น 4 ซีโรไทป์ (DENV1, DENV2, DENV3 และ DENV4) นอกจากนี้ในแต่ละภูมิประเทศ มีการแพร่ระบาดของสายพันธุ์ไวรัสเดงกีแตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ซีโรไทป์ 2 พบการแพร่ระบาดมากในทุกภูมิประเทศ (Messina, J. P., et al. 2013) ไวรัสเดงกีมีพาหะที่สำคัญ คือ ยุงลายสปีชีส์ *Ades aegypti* และ *Ades albopictus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไข้เลือดออก โดยมีอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญคือตับ (Thepparit, C., et al. 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดไวรัสเดงกีที่อวัยวะอื่น ๆ เช่น ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ไต ปอด หัวใจ และระบบประสาทส่วนกลาง (Povoa, T. F., et al., 2014)

ไวรัสเดงกีถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* เมื่ออนุภาคไวรัสเดงกีเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านจะปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมาเพื่อเข้าสู่กระบวนการจำลองตัวเอง (replication) (Bäck, A., et al. 2013) โดยสารพันธุกรรมนี้จะถูกแปลรหัสโดยอาศัยไรโบโซมของเซลล์เจ้าบ้าน (Hulo, C., et al. 2010) เป็นโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส และเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase เพื่อสร้างอาร์เอ็นเอสายลบ ในการนำมาเป็นต้นแบบการสร้างอาร์เอ็นเอสายบวก เมื่อนำสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ได้มาประกอบกับโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ และปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกมานอกเซลล์ต่อไป (Li, D., et al. 2013) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 โครงสร้างของไวรัสเดงกี

(อ้างอิงจาก https://www.creative-diagnostics.com/Dengue-Virus.htm)



รูปที่ 3 กระบวนการเพิ่มจำนวนของ Positive sense single-stranded RNA virus (อ้างอิงจาก https://mmbr.asm.org/content/77/2/253)

3. วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้เลือดออก โดย Chimeric yellow fever-dengue virus-Tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) หรือ DENGVAXIA เป็นวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกชนิดแรกที่ได้รับการรับรอง วัคซีน DENGVAXIA มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคต่อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ เนื่องจากเป็นวัคซีนประเภทเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลง โดยรวมทั้ง 4 ซีโรไทป์เข้าด้วยกัน (ศูนย์การแพทย์กาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยมหิดล, 2017) มีประสิทธิภาพดังนี้

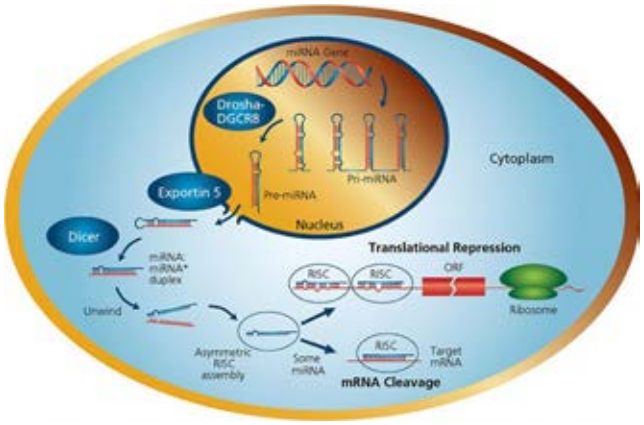
- สามารถป้องกันโรคไข้เลือดออกได้ 65.6 %
- ลดความรุนแรงของโรค 93.2 %
- ลดอัตราการนอนโรงพยาบาล 80.8 %

แต่อย่างไรก็ดียังมีรายงานว่าผู้ป่วยเกิดอาการรุนแรงของโรคไข้เลือดออกภายหลังจากรับวัคซีน DENGVAXIA โดยผู้ป่วยนั้นไม่เคยติดไวรัสเดงกีมาก่อน (Fatima, K., 2018) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานข่าวจากบริษัท ซาโนฟี ปาสเตอร์ บริษัทผู้ผลิตยาของฝรั่งเศส ได้ออกประกาศเตือนว่า วัคซีน DENVAXIA อาจมีผลข้างเคียง โดยอาจทำให้ผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อนมีอาการป่วยรุนแรงขึ้นกว่าเดิมหากได้รับเชื้อในอนาคต จากเหตุผลของการเกิดภาวะ antibody dependent enhancement ส่งผลให้สำนักงานอาหารและยาของประเทศฟิลิปปินส์สั่งระงับการฉีดวัคซีน DENVAXIA ให้กับเด็กนักเรียนทั่วประเทศทันที พร้อมทั้งให้บริษัทดังกล่าวหยุดจำหน่าย และเรียกคืนวัคซีน DENGVAXIA (กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2017)

4. ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA, miRNA)

ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA, miR) เป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอขนาดเล็กประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์ ถูกสร้างขึ้นจากยีนที่ถอดรหัส (encode) ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการสร้าง miRNA เมื่อเข้าสู่กระบวนการถอดรหัสโดยการทำงานของ RNA polymerase II จะได้ pri-miRNA ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแบบ hairpin loop จากนั้นเอนไซม์ Drosha ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภท class 2 Rnase III จะเปลี่ยนจาก pri-miRNA เป็น pre-miRNA ภายในนิวเคลียส แล้วจะลำเลียงออกจากนิวเคลียสสู่ไซโตพลาสซึม ผ่านทางช่อง exportin-5 จากนั้นเอนไซม์ Dicer จะตัดบริเวณ loop และเติม Argonaute (ago) protein เพื่อกระตุ้นการทำงาน จึงเกิดเป็น mature miRNA เมื่อเกิดการแยกสายของ mature miRNA จะรวมกับโปรตีน RNA-induced silencing complex (RISC) (Wahid, F., et al., 2010) ดังแสดงกระบวนการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอในรูปที่ 4 ดังนั้นหากสารพันธุกรรมของไวรัสถูกปลดปล่อยเข้าสู่เซลล์ แล้วมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ miRNA ที่มีอยู่ในเซลล์ ทำให้ miRNA เข้าจับกับสารพันธุกรรมของไวรัส หรือ messenger RNA (mRNA) ได้ จากนั้นจะเกิดกระบวนการ RNA interference โดย mRNA ของไวรัสจะถูกตัดหรือถูกยับยั้งไม่ให้เกิดกระบวนการแปลรหัสเป็นโปรตีน ทำให้ไวรัสไม่สามารถประกอบรวมกันเป็นอนุภาคไวรัสได้ จึงไม่เกิดการเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายของอนุภาคไวรัส (Roberts, T.C. 2015)

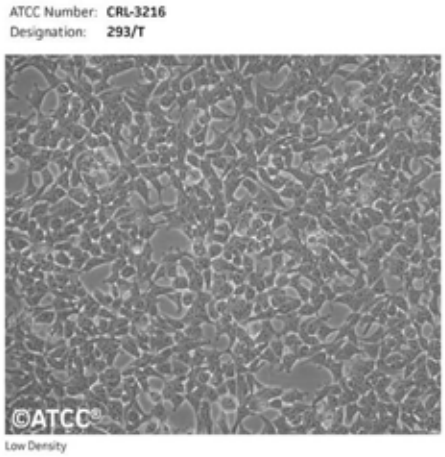
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA กับการติดไวรัสพบว่า miRNA มีความสัมพันธ์กับการติดไวรัสอย่างจำเพาะต่อชนิดกัน เช่น miRNA-373 จะเพิ่มการติดไวรัส Hepatitis C ในเนื้อเยื่อตับ (Shahen, M., et al. 2018), miRNA-21 จะเพิ่มการติดไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 2 ในเซลล์ HepG2 (Kanokudom, S., et al. 2017) , การเพิ่มขึ้นของ miRNA-let-7c สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกีได้ในเซลล์ตับ (Cueto, M. E., et al., 2014) และการเพิ่มขึ้นของ miRNA-484 และ miRNA-744 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดไวรัสเดงกีใน vero cell (Betancur, J. C. C., et al., 2017) เป็นต้น โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง miRNA และ การติดไวรัสเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นสำหรับการพัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับโรคติดต่อที่ไม่สามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีนเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย เช่น ไวรัสเดงกี ซึ่งวัคซีนที่ผลิตจากอนุภาคไวรัส อาจทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงจากภาวะ antibody dependent enhancement ได้ หรือ ไวรัส Influenza ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูงมากจากการเกิด genetic drift หรือ genetic shift (Center for Disease Control and Prevention, 2017) จึงไม่สามารถใช้องค์ประกอบภายนอกของไวรัสมาผลิตเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ในระยะยาวได้



รูปที่ 4 กระบวนการสร้างไมโครอาร์เอ็นเอ
(อ้างอิงจาก https://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.html)

5. เซลล์ Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T)

เซลล์ HEK293T เป็นเซลล์ที่คัดแยกมาจากไตของมนุษย์ โดยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ SV40 large T antigen (Dubridge, R. B., et al. 1987) มีการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว มักถูกใช้ในการทดลองในการแสดงออกของโปรตีน และการทดลองอื่น ๆ อย่างแพร่หลาย



รูปที่ 5 เซลล์ HEK293T
(อ้างอิงจาก https://www.atcc.org/~/media/Attachments/3/1/D/7/CRL-3216%20Low.ashx)

เนื่องจากผู้ทดลองได้เห็นความสำคัญของปัญหาการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก อันเกิดจากการติดไวรัส DENV2 และจากงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า miRNA-let-7c และ miRNA-744 มีความเกี่ยวข้องกับการติดไวรัสเดงกีในเซลล์ตับและใน vero cell ตามลำดับ นอกจากนี้ไตยังเป็นอีกหนึ่งอวัยวะเป้าหมายของไวรัสเดงกี ทำให้ผู้ทดลองได้เลือกเซลล์ HEK293T มาทดสอบ จึงเกิดเป็นโครงการการศึกษาการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miRNA-let-7c และ miRNA-744 ในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV 2

บทที่ 2

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
1. ฟลาสก์สำหรับเลี้ยงเซลล์ ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร	Corming (USA)
2. ฟลาสก์สำหรับเลี้ยงเซลล์ ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร	Thermo Scientific (Jiangsu, China)
3. จานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 6 หลุม	Corming (China)
4. ขวด Duran ขนาด 50, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร	Schott (Germany)
5. ทิป ขนาด 2.5, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร	Bioscience (Salt lake, USA)
6. ปิเปตต์แก้ว ปริมาตร 5 และ 10 มิลลิลิตร	Precicolor HBG (Germany)
7. ออโต้ปิเปตต์ ขนาด 2.5, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร	Eppendorf
8. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย	Thermo Scientific (China)
9. บีกเกอร์พลาสติก ขนาด 2 ลิตร	Kartell (Italy)
10. กระบอกตวง ปริมาตร 250 และ 1,000 มิลลิลิตร	Simax (Czech Republic)
11. อุปกรณ์กรองสารขนาด 0.22 ไมครอน	Corning (USA)
12. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.5 และ 1.7 มิลลิลิตร	Bioscience (Salt lake, USA)
13. หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร	Bioscience (Salt lake, USA)
14. หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร	Corning (USA)
15. หลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร	Greiner
16. หลอดสำหรับเก็บเซลล์แบบเยือกแข็ง (cryotube)	Corning (USA)
17. ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์	Thermo Scientific (USA)
18. ตู้บ่มอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	Toshiba
19. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	Labcaire (UK)
20. เครื่องชั่งสาร	Adam equipment (Connecticut, USA)
21. เครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating block)	Labnet
22. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ	Julabo
23. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (เครื่อง PCR)	Biorad
24. เครื่องปั่นเหวี่ยง (เครื่อง centrifuge)	Eppendorf (Hamburg, Germany)

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
25. เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ปรับอุณหภูมิได้	Eppendorf (Hamburg, Germany)
26. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	Scientific industry
27. เครื่องปั่นตกสารละลาย (เครื่อง spin down microcentrifuge)	Harmony
28. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Eppendorf
29. เครื่องถ่ายภาพเจล (เครื่อง gel documentation)	Biorad
30. เครื่องทำน้ำบริสุทธ์ MilliQ	Thermo Scientific
31. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้าแนวนอน	Biorad
32. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้าแนวตั้ง	Biorad
33. อุปกรณ์เตรียมเจลอะกาโรส	Biorad
34. อุปกรณ์เตรียมเจลอะคริลาไมด์	Biorad
35. เครื่องไมโครเวฟ	Sharp (Japan)
36. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (เครื่อง autoclave)	Tomy (Japan)
37. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ	Olympus (Japan)
38. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic stirrer)	-
39. อุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer)	Precicolor HBG (Germany)
40. คิวเวตต์ ควอตซ์	Eppendorf

ตารางที่ 2 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
1. MEM powder	Caisson (USA)
2. DMEM powder	Hyclone (South logan, USA)
3. $NaHCO_3$	Ajax Finechem
4. HEPES	Research organics (Cleveland, USA)
5. HCl	VWR Chemical
6. Fetal Bovine Serum	Hyclone (South lake, USA)
7. Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml)	Hyclone (South lake, USA)
8. NaCl	Emsure (Denmark)
9. KCl	VWR international Ltd. (England)

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
10. Na_2HPO_4	VWR international Ltd. (England)
11. Trypsin	Sigma
12. EDTA	USB corporation (Cleaveland, USA)
13. Trypan blue	Gibco
14. $CaCl_2.2H_2O$	Merck (USA)
15. $MgSO_4.7H_2O$	Ajax Finechem
16. $NaH_2PO_4.2H_2O$	Ajax Finechem
17. Glucose	Scribd
18. Yeast extract	Conda (Madrid, Spain)
19. Lactalbuminhydrolysate	Fluka analytical
20. Neutral red	Ajax Finechem
21. Seakem LE agarose	Axygen biosciences (Spain)
22. Diethylpyrocarbonate (DEPC)	USB corporation (Cleaveland, USA)
23. Tris base	Bio Basic Canada Inc. (Canada)
24. Acetic acid	RCI Labscan
25. Acrylamide	Bio Basic Canada Inc. (Canada)
26. N, N'-methylene-bis acrylamide	Bio Basic Canada Inc. (Canada)
27. Ammonium persulfate (APS)	Vivantis Inc. (USA)
28. TEMED	USB corporation (Cleaveland, USA)
29. Trizol	Amresco
30. Chloroform	Lab-Scan analytical science
31. Isopropanol	Merck (USA)
32. 95% ethanol	Lab-Scan
33. 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific
34. Ultra low range DNA ladder	Thermo Scientific
35. Primers	Bio Basic Canada Inc. (Canada)
36. RevertAid reverse transcriptase (200 U/L)	Thermo Scientific (Vilnius, Lithuania)
37. Taq polymerase	Apsalagen
38. 10 mM dNTP	Thermo Scientific (Vilnius, Lithuania)
39. 5X RT buffer	Thermo Scientific (Vilnius, Lithuania)

รายการ	บริษัทผู้ผลิต
40. 10X reaction buffer	Apsalagen
41. 50 mM $MgCl_2$	Apsalagen
42. Ethidium bromide	VWR Chemical

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเลี้ยงเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36, LLC-MK2 และ HEK293T

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
ภาคผนวก ก

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM)
ภาคผนวก ก

1.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์จากการจัดเก็บแบบเยือกแข็ง

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด

ชนิดของเซลล์	อาหารเลี้ยงเซลล์	สภาวะการบ่ม
Aedes albopictus clone C6/36	MEM + 10% FBS + 1% P/S	28 °C
LLC-MK2	DMEM + 5% FBS + 1% P/S	37 °C + 5% CO_2
HEK293T	DMEM + 10% FBS + 1% P/S	37 °C + 5% CO_2

หมายเหตุ 1. เซลล์ *Aedes albopictus* clone C6/36 เป็นเซลล์สำหรับเพิ่มจำนวนไวรัส DENV2
2. เซลล์ LLC-MK2 เป็นเซลล์สำหรับตรวจวัดปริมาณไวรัส DENV2 ด้วยวิธี Plaque assay
3. P/S คือ ยาปฏิชีวนะชนิด Penicillin และ Streptomycin
4. FBS คือ Fetal Bovine Serum ที่ inactivated ด้วยความร้อนแล้ว

นำเซลล์ที่จัดเก็บแบบเยือกแข็ง หรือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายบางส่วน โดยการแช่น้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ใช้ออโต้ปิเปตต์ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดเซลล์ออกจากหลอดจัดเก็บทั้งหมด เพื่อย้ายมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 x g เป็นเวลา 8 นาที เพื่อทำให้เซลล์ตกตะกอน ใช้ปิเปตต์แก้วขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เพื่อละลายตะกอนเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดทั้งหมดใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปบ่มตามสภาวะที่เหมาะสม

1.4 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากฟลาสก์ แล้วเติม 1X Phosphate Buffered Saline (1X PBS) (ภาคผนวก ก) ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูด 1X PBS ทิ้ง แล้วเติม 0.05% Trypsin ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับฟลาสก์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร หรือ 2 มิลลิลิตร สำหรับฟลาสก์

ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร นำไปบ่มเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยสำหรับเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเซลล์ LLC-MK2 และ HEK293T บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร หรือ 8 มิลลิลิตร สำหรับฟลาสก์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เพื่อหยุดการทำงานของ 0.05% Trypsin ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายขึ้น-ลงหลายครั้ง เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากฟลาสก์ทั้งหมด จากนั้นดูดย้ายสารละลายทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 x g เป็นเวลา 8 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลงหลายครั้งเพื่อละลายตะกอนและทำให้เซลล์ไม่เกาะกลุ่มกัน ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วยอุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer) คำนวณจำนวนเซลล์ให้เป็นหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วดูดลงในฟลากส์ใหม่ด้วยปริมาตรของจำนวนเซลล์ที่ต้องการ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยฟลาสก์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อปรับปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ส่วนฟลาสก์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ปิเปตต์ดูดขึ้น-ลงหลายครั้งเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม

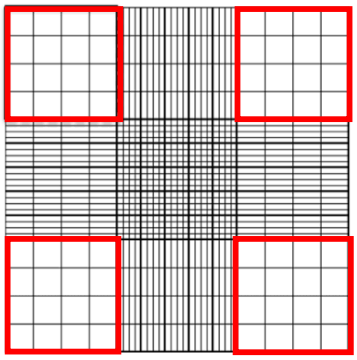
1.5 ขั้นตอนการนับจำนวนเซลล์ด้วยอุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer)

ปิเปตต์สารละลายเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสี 0.4% trypan blue (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ดูดขึ้น-ลงให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายผสม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ด้านใต้กระจกปิดสไลด์ให้ท่วมทั้งตารางนับเซลล์ด้านบนและด้านล่าง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ กำลังขยาย 200 เท่า นับเซลล์ที่ไม่ติดสีภายในบริเวณช่องใหญ่ 4 ช่อง ดังรูปที่ 6 บริเวณที่มีกรอบสีแดง ทั้งตารางด้านบนและด้านล่าง นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณดังนี้

จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่นับได้ x 10^4 x dilution factor

<u>หมายเหตุ</u>

1. 10^4 เป็นค่าที่มาจาก ความกว้าง ความยาว และความลึกของอุปกรณ์นับเซลล์ โดยคำนวณได้ดังนี้
   1 มม. X 1 มม. X 0.1 มม. = 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
   1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร = 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
   ดังนั้น 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จึงเท่ากับ 10^{-4} ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือมิลลิลิตร
   เมื่อต้องการหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงต้องนำ 10^{-4} ไปเป็นตัวหาร และจากกฎการหาร จึงสามารถใช้การคูณด้วย 10^4 แทนได้ และจะได้ผลลัพธ์เท่ากัน
2. Dilution factor คำนวณตามการเจือจางสารละลายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และสี 0.4% Trypan blue ซึ่งจากการอธิบายข้างต้น ผู้ทดลองได้ใช้ dilution factor เท่ากับ 2 เนื่องจากมีการเจือจางสารละลายเซลล์ลง 2 เท่า



รูปที่ 6 ตารางบนอุปกรณ์นับเซลล์ (Hemocytometer)
(อ้างอิงจาก https://www.hemocytometer.org/wp-content/uploads/2013/06/hemocytometer-first-square.png)

2. การเพิ่มจำนวนไวรัส DENV2 ในเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36

เลี้ยงเซลล์ *Ades albopictus* clone C6/36 จำนวน 5 ล้านเซลล์ ในฟลาสก์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างด้วย 1X PBS ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมแล้วนำออกจากฟลาสก์ ปิเปตต์ DENV 2 ที่มีจำนวน 5 ล้าน Plaque Forming Unit (PFU) เพื่อทำให้มีค่า Multiples of infection (MOI) เท่ากับ 1 บ่มที่สภาวะ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าฟลาสก์ทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติม MEM ที่ผสม 10% FBS และ 1% P/S ให้มีปริมาตรเป็น 9 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 6 วัน เก็บส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตต์ส่วนใสลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม FBS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% จากนั้นแบ่งใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.7 มิลลิลิตร หลอดละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บที่ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การตรวจหาปริมาณไวรัส DENV2 ด้วยวิธี Plaque assay

เลี้ยงเซลล์ LLC-MK2 ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 1 ล้านเซลล์ ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากหลุม แล้วปิเปตต์ไวรัสที่ความเข้มข้นค่าต่าง ๆ โดยเจือจางด้วยอาหาร DMEM ที่ไม่ผสม FBS และ P/S ปริมาตรหลุมละ 400 ไมโครลิตร บ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าจานเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 10 นาที ผสม 1st overlay 2X nutrient solution (ภาคผนวก ก) กับ 1.6% agarose gel ในอัตราส่วน 1:1 และปิเปตต์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 4 มิลลิลิตร หมุนวนจานเลี้ยงเซลล์ให้สารละลายเข้ากัน และพักจานเลี้ยงเซลล์ไว้จนกว่าเจลจะเป็นของแข็ง แล้วนำไปบ่มคว่ำที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น ผสม 2nd overlay 2X nutrient solution (ภาคผนวก ก) กับ 1.6% agarose gel

ในอัตราส่วน 1:1 และปิเปตต์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 2 มิลลิลิตร หมุนวนจานเลี้ยงเซลล์ให้สารละลายเข้ากัน และพักจานเลี้ยงเซลล์ไว้จนกว่าเจลจะเป็นของแข็ง แล้วนำไปบ่มคว่ำที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นับจำนวนบริเวณใส (plaque) ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยตามสูตร ดังนี้

Titer (PFU/ml) = จำนวน plaque x serial dilution factor x infection volume dilution factor

หมายเหตุ Infection volume dilution factor คิดจากการที่ผู้ทดลองปิเปตต์ไวรัสปริมาตร 400 ไมโครลิตร หรือ 0.4 มิลลิลิตร ดังนั้น 1 มิลลิลิตร คิดเป็น 2.5 เท่าของ 0.4 มิลลิลิตร ค่า infection volume dilution factor จึงมีค่าเท่ากับ 2.5

4. การทำให้เซลล์ HEK293T ติดไวรัส DENV2

เลี้ยงเซลล์ HEK293T ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละ 1 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 1X PBS ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมเป็นจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นปิเปตต์ไวรัส DENV2 ที่มีจำนวน 5 ล้าน PFU ลงในแต่ละหลุมเพื่อทำให้มีค่า MOI เท่ากับ 5 โดยชุดควบคุมจะปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ผสมกับ 10% FBS และ 1% P/S แทนไวรัส DENV2 จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าจานเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 10 นาที จากนั้นปิเปตต์อาหาร DMEM ที่ผสม 10% FBS และ 1% P/S ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุม แล้วเก็บเซลล์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

4.1 การเก็บเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2 ภายใน 24 ชั่วโมง

นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 1X PBS ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมเป็นจำนวน 1 ครั้ง เติม Trizol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ปิเปตต์ย้ายสารละลายทั้งหมดลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.7 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปเก็บที่ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.2 การเก็บเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2 มาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเซลล์เก่าเพื่อชะเซลล์ให้หลุดออกจากจานเลี้ยงเซลล์ แล้วย้ายลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.7 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วย 1X PBS ปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม เป็นจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นนำ 1X PBS

ออกจากหลอด แล้วเติม Trizol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปเก็บที่ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5. การสกัด RNA

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่เก็บเซลล์จากข้อ 4 ออกจากตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย จากนั้นนำไปปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เติม chloroform ปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปิเปตต์ส่วนใสเพื่อย้ายลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.7 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่ปิเปตต์มา นำไปปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสออกจากหลอด จากนั้นล้างตะกอนด้วย 75% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสออกจากหลอด แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 12,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อนำส่วนใสออกจากหลอดทั้งหมด ทำให้ตะกอนแห้งโดยการใส่หลอดในเครื่องอุ่นหลอดทดลอง (heating block) ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase หรือน้ำ DEPC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเก็บรักษา RNA ที่สกัดได้ในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

6. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA ที่สกัดได้ ด้วยวิธี gel electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสง

6.1 การเตรียม 1% agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งผง agarose 1 กรัม ผสมใน 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (ภาคผนวก ก) ให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้ผง agarose ละลายจนหมด จากนั้นเทลงในถาดเตรียมเจล แล้วใส่หวี (comb) จำนวน 20 ซี่ พักไว้จนกว่าเจลจะเป็นของแข็ง จากนั้นนำ comb ออกและแช่เจลพร้อมถาดเตรียมเจลลงในเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอน แล้วเติม 1X TAE จนท่วมเจล

6.2 Gel electrophoresis

ปิเปตต์ 0.5 µg/µl 1 kb DNA ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในช่องแรกของเจล นำตัวอย่าง RNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปิเปตต์ขึ้น-ลงเพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปิเปตต์ลงในแต่ละช่องของเจล จากนั้นต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ปรับให้มีความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

แล้วกดปุ่ม Run เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำเจลไปย้อมด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเจลไปถ่ายรูปด้วยเครื่อง gel documentation

6.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิเคราะห์ความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) โดยปิเปตต์น้ำ DEPC ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงในคิวเวตต์ควอตซ์ เพื่อตั้งค่าให้เป็น blank จากนั้นเช็ดให้สะอาดแล้วปิเปตต์ RNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงในคิวเวตต์ควอตซ์ แล้ววิเคราะห์ผลความเข้มข้นในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl)

7. การสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ miRNA ที่สนใจ ด้วยวิธี Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ขั้นตอนทั้งหมดต่อไปนี้จะต้องปฏิบัติบนน้ำแข็งทุกขั้นตอน โดยเริ่มจากการปรับความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ให้เป็น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยการเจือจางด้วยน้ำ DEPC แล้วปิเปตต์ 1 ไมโครลิตร มาผสมกับ 1 µM RT primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดพีซีอาร์ โดยชุดควบคุมจะใช้น้ำ DEPC แทน RNA ที่สกัดได้ ทำการปิเปตต์ขึ้น-ลงเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ไปใส่ลงในเครื่องอุ่นหลอดทดลอง (heating block) ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำออกมาวางบนน้ำแข็ง 2 นาที แล้วเติม master mix ดังแสดงในตารางที่ 4 หลอดละ 8 ไมโครลิตร

ตารางที่ 4 แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดได้

องค์ประกอบ	**1 ปฏิกิริยา**	**40 ปฏิกิริยา**
น้ำ DEPC	5	200
5X RT buffer	2	80
10 mM dNTP	0.5	20
200 U/µl RevertAid reverse transcriptase	0.5	20
RNA template และ RT primer	2	-
ปริมาตรสุทธิ	10	320

หมายเหตุ 1. ผู้ทดลองผสม master mix เป็นจำนวน 40 ปฏิกิริยาเนื่องจากมีตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 primer ที่จำเพาะต่อยีนจำนวน 3 ยีนที่สนใจ และมีชุดควบคุมเพื่อทดสอบสภาวะของขั้นตอน RT PCR อีก 3 ชุด รวมเป็น 39 ปฏิกิริยา

2. ผู้ทดลองดัดแปลงวิธีปฏิบัติ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Varkonyi-Gasic, E., et al. 2007

เมื่อผสม RNA template และ RT primer เข้ากับ master mix แล้ว ให้ปิเปตต์ขึ้น-ลงเพื่อผสมให้เข้ากัน และนำเข้าเครื่องปั่นตกสารละลาย (spin down microcentrifuge) เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (เครื่อง PCR) โดยปรับสภาวะของเครื่องดังนี้

ขั้นที่ 1 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
ขั้นที่ 2 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 3 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นที่ 4 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที
(วนซ้ำในขั้นที่ 2 ถึง 4 เป็นจำนวน 60 รอบ)
ขั้นที่ 5 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เก็บรักษา cDNA ที่สร้างขึ้นได้ในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. การเพิ่มจำนวน cDNA ที่สร้างขึ้น โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ miRNA ที่สนใจ ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

8.1 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-let-7c

ขั้นตอนทั้งหมดต่อไปนี้จะต้องปฏิบัติบนน้ำแข็งทุกขั้นตอน โดยเริ่มจากทำการผสม master mix โดยมีองค์ประกอบดังนี้

ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-let-7c

องค์ประกอบ	1 ปฏิกิริยา	15 ปฏิกิริยา
น้ำ DEPC	6.7	100.5
10X reaction buffer	1	15
10 mM dNTP	0.2	3
50 mM $MgCl_2$	0.4	6
1 µM miRNA-let-7c Forward primer	0.5	7.5
1 µM Universal reverse primer	0.5	7.5
5 U/µl Taq polymerase	0.2	3
cDNA	0.5	-
ปริมาตรสุทธิ	10	142.5

ปิเปตต์ master mix ที่เตรียมได้ลงในหลอดพีซีอาร์หลอดละ 9.5 ไมโครลิตร และปิเปตต์ตัวอย่าง cDNA ที่สร้างขึ้นหลอดละ 0.5 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยปิเปตต์ขึ้น-ลงหลายครั้ง โดยชุดควบคุมจะประกอบด้วย 2 ชุดคือ ชุดที่ใส่น้ำ DEPC และชุดควบคุมจากขั้นตอน RT-PCR แทน cDNA จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นตกสารละลาย (spin down microcentrifuge) เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (เครื่อง PCR) โดยปรับสภาวะของเครื่องดังนี้

ขั้นที่ 1 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
ขั้นที่ 2 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นที่ 3 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
(วนซ้ำในขั้นที่ 2 ถึง 3 เป็นจำนวน 25 รอบ)
ขั้นที่ 4 คงอุณหภูมิไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เก็บรักษา PCR product ที่ได้ในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ผู้ทดลองดัดแปลงวิธีปฏิบัติ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Varkonyi-Gasic, E., et al. 2007)

8.2 การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-744 และ miRNA-U6

ขั้นตอนทั้งหมดต่อไปนี้จะต้องปฏิบัติบนน้ำแข็งทุกขั้นตอน โดยเริ่มจากทำการผสม master mix โดยมีองค์ประกอบดังนี้

ตารางที่ 6 แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-744

องค์ประกอบ	**1 ปฏิกิริยา**	**15 ปฏิกิริยา**
น้ำ DEPC	5.7	85.5
10X reaction buffer	1	15
10 mM dNTP	0.2	3
50 mM $MgCl_2$	0.4	6
1 µM miRNA-744 Forward primer	1	15
1 µM Universal reverse primer	1	15
5 U/µl Taq polymerase	0.2	3
cDNA	0.5	-
ปริมาตรสุทธิ	10	142.5

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบและสัดส่วนของสารเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณที่จำเพาะต่อยีน miRNA-U6

องค์ประกอบ	1 ปฏิกิริยา	15 ปฏิกิริยา
น้ำ DEPC	5.7	85.5
10X reaction buffer	1	15
10 mM dNTP	0.2	3
50 mM $MgCl_2$	0.4	6
1 µM miRNA-U6 Forward primer	1	15
1 µM miRNA-U6 Reverse primer	1	15
5 U/µl Taq polymerase	0.2	3
cDNA	0.5	-
ปริมาตรสุทธิ	10	142.5

ปิเปตต์ master mix ที่เตรียมได้ลงในหลอดพีซีอาร์หลอดละ 9.5 ไมโครลิตร และปิเปตต์ตัวอย่าง cDNA ที่สร้างขึ้นหลอดละ 0.5 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกันโดยปิเปตต์ขึ้น-ลงหลายครั้ง โดยชุดควบคุมจะประกอบด้วย 2 ชุดคือ ชุดที่ใส่น้ำ DEPC และชุดควบคุมจากขั้นตอน RT-PCR แทน cDNA จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นตกสารละลาย (spin down microcentrifuge) เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (เครื่อง PCR) โดยปรับสภาวะของเครื่องดังนี้

ขั้นที่ 1 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
ขั้นที่ 2 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
ขั้นที่ 3 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
(วนซ้ำในขั้นที่ 2 ถึง 3 เป็นจำนวน 25 รอบ)
ขั้นที่ 4 คงอุณหภูมิไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส

เมื่อครบกำหนดเวลา ให้เก็บรักษา PCR product ที่ได้ในตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ผู้ทดลองดัดแปลงวิธีปฏิบัติ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Varkonyi-Gasic, E., et al. 2007)

9. การตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis

9.1 การเตรียม 8% acrylamide gel ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ทำการผสมสารเคมีสำหรับเตรียม 8% acrylamide gel ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นประกอบอุปกรณ์เตรียมเจล เป็นจำนวน 3 ชุด ปิเปตต์สารละลายที่ผสมได้ลงในกระจกเตรียมเจล ชุดละประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่หวี (comb) จำนวน 15 ซี่ ลงในอุปกรณ์เตรียมเจลแต่ละชุด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีเพื่อให้เจลเป็นของแข็ง

9.2 Gel electrophoresis

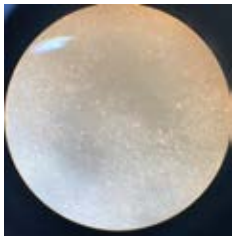
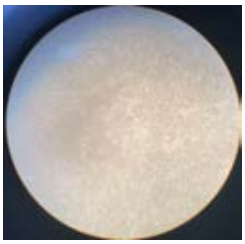
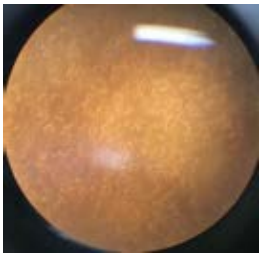
นำเจลที่ถูกประกบด้วยกระจกเตรียมเจลออกจากอุปกรณ์เตรียมเจล นำ comb ออก และประกอบลงในเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้าแนวตั้ง โดยใช้ buffer ชนิด 1X TAE buffer ปิเปตต์ 0.5 µg/µl Ultra low range DNA ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในช่องแรกของเจล นำตัวอย่าง PCR product ที่ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ DEPC ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปิเปตต์ขึ้น-ลงเพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปิเปตต์ลงในแต่ละช่องของเจล จากนั้นต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ปรับให้มีความต่างศักย์ 88 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที แล้วกดปุ่ม Run เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำเจลไปย้อมด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำเจลไปถ่ายรูปด้วยเครื่อง gel documentation

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. ผลการติดไวรัส DENV2 ในเซลล์ HEK293T ที่เวลาต่าง ๆ

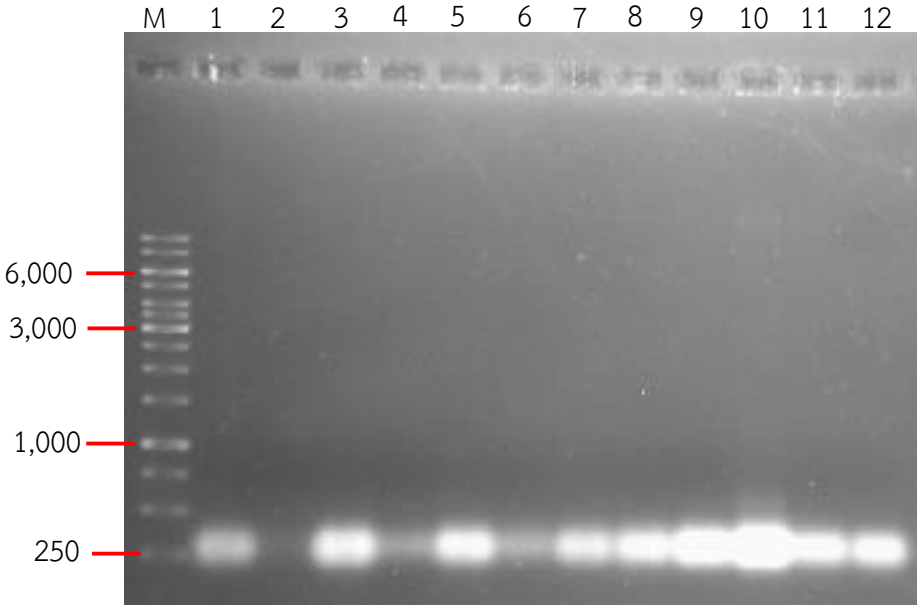
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์ HEK293T ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า

	0 ชั่วโมง	**24 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**
ชุดควบคุม			
ชุดทดสอบ (HEK293T ที่ติดด้วยไวรัส DENV2)			

จากผลการทดลองพบว่า ระหว่างชุดควบคุมที่เซลล์ HEK293T ไม่ได้ติดไวรัส DENV2 กับชุดทดสอบที่เซลล์ HEK293T ที่ติดด้วยไวรัส DENV2 มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย คือ ปริมาณเซลล์ที่หลุดลอกออกจากจานเลี้ยงเซลล์ของชุดทดสอบจะมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะที่สามารถบ่งบอกถึงการติดไวรัสในเซลล์ได้ โดยในการทดลองนี้ ได้ทำให้เซลล์ HEK293T ติดด้วยไวรัส DENV2 โดยมี MOI เท่ากับ 5 (Jitoboam, K., et al., 2016) แต่เนื่องจากไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพของเซลล์ HEK293T ของทั้งสองชุดการทดลอง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่สามารถบ่งบอกถึงการติดไวรัสในเซลล์ ดังนั้นการทดสอบในครั้งต่อไป ควรทดสอบการติดไวรัสด้วยวิธี RT-PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสเดงกีก่อนทำการทดลองต่อไป

2. ผลการสกัด RNA

2.1 ผล 1% agarose gel electrophoresis



M : 0.5 µg/µl 1 kb DNA ladder
1 : ชุดควบคุม 1 ที่ 0 ชั่วโมง
2 : ชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง
3 : ชุดควบคุม 1 ที่ 24 ชั่วโมง
4 : ชุดควบคุม 2 ที่ 24 ชั่วโมง
5 : ชุดควบคุม 1 ที่ 48 ชั่วโมง
6 : ชุดควบคุม 2 ที่ 48 ชั่วโมง
7 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 0 ชั่วโมง
8 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 0 ชั่วโมง
9 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง
10 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 24 ชั่วโมง
11 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 48 ชั่วโมง
12 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 48 ชั่วโมง

รูปที่ 7 แสดงผล 1% agarose gel electrophoresis ของการสกัด RNA ด้วยวิธีการใช้ Trizol ของเซลล์ HEK293T ที่ติดด้วยไวรัส DENV2 ที่เวลาต่าง ๆ

ผลการสกัด RNA ด้วยการใช้ Trizol ของเซลล์ HEK293T (รูปที่ 7) จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบขึ้นที่ขนาด 250 ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงแถบเดียว ซึ่งในการสกัดสารพันธุกรรมประเภท RNA ทั้งหมด (total RNA) ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จะปรากฏลักษณะแถบขึ้นประมาณ 3 ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ แถบของ 28S RNA จะอยู่ด้านบนสุด จากนั้นจะปรากฏแถบของ 18S RNA และแถบของ small RNA จะปรากฏที่ด้านล่างสุด (Ishikawa, H., et al, 1977) ซึ่งจากการทดลองที่ได้ ปรากฏแถบที่ขนาด 250 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็นแถบของ small RNA เพียงแถบเดียว จากการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมพบว่า การที่มีแถบของ small RNA ขึ้นเพียงแถบเดียวนี้ อาจเกิดได้จากการปนเปื้อนเอนไซม์ RNase ระหว่างขั้นตอนการสกัด RNA หรืออาจเกิดขึ้นจากเทคนิคการสกัด RNA ของผู้ทดลองที่ไม่ดีเท่าที่ควร จึงควรแก้ไขด้วยการพัฒนาวิธีสกัด RNA ของผู้ทดลอง

จากความเข้มของแถบที่ปรากฏบนเจล มีความเข้ม-จางต่างกัน ซึ่งสามารถระบุปริมาณ RNA ที่สกัดได้อย่างคร่าว ๆ โดยในช่องที่ 10 มีความเข้มของแถบสูงที่สุด จึงน่าจะปริมาณ RNA ที่สกัดได้มากที่สุด และในช่องที่ 2 มีความเข้มของแถบน้อยที่สุด จึงน่าจะมีปริมาณ RNA ที่สกัดได้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบเพื่อหาปริมาณ RNA ที่สกัดได้ โดยวิธีการวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง

วัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ และนำผลของทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบให้สอดคล้องกัน

2.2 ผลการวัดปริมาณของ RNA ที่สกัดได้

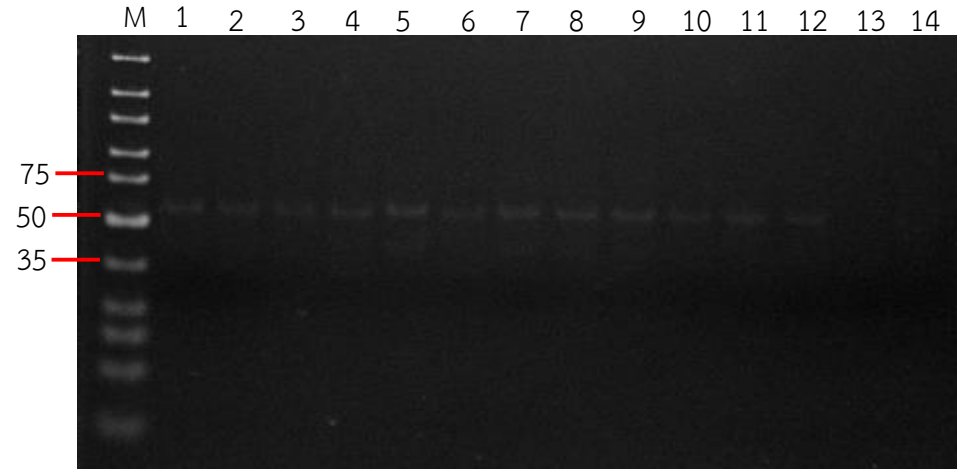
ตารางที่ 9 แสดงความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ในหน่วย ng/µl

หมายเลขช่องบนเจลเมื่อเทียบกับผล gel electrophoresis	**RNA ที่สกัดได้**	**ความเข้มข้น (ng/µl)**
1	ชุดควบคุม 1 ที่ 0 ชั่วโมง	276.3
2	ชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง	140.4
3	ชุดควบคุม 1 ที่ 24 ชั่วโมง	335.4
4	ชุดควบคุม 2 ที่ 24 ชั่วโมง	243.4
5	ชุดควบคุม 1 ที่ 48 ชั่วโมง	456.2
6	ชุดควบคุม 2 ที่ 48 ชั่วโมง	26.3
7	ชุดทดสอบ 1 ที่ 0 ชั่วโมง	225.7
8	ชุดทดสอบ 2 ที่ 0 ชั่วโมง	37.7
9	ชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง	380.0
10	ชุดทดสอบ 2 ที่ 24 ชั่วโมง	858.9
11	ชุดทดสอบ 1 ที่ 48 ชั่วโมง	356.2
12	ชุดทดสอบ 2 ที่ 48 ชั่วโมง	417.7

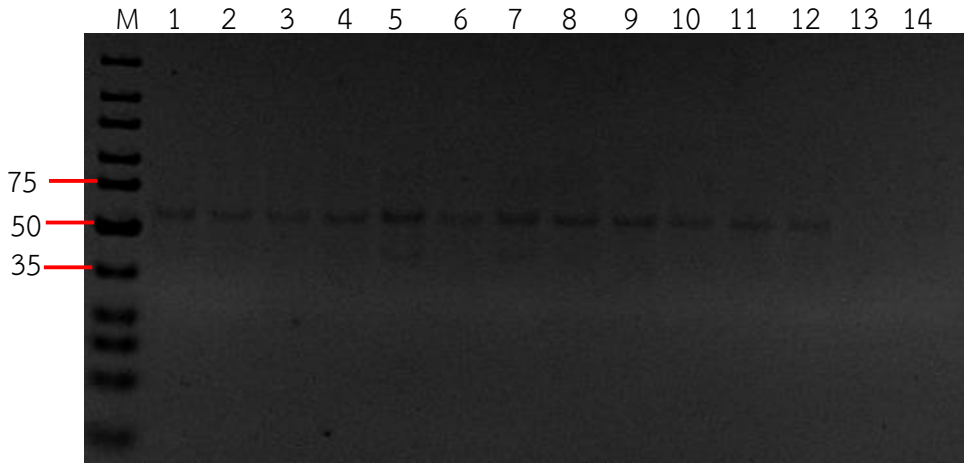
จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่สกัดได้ เพื่อหาค่าความเข้มข้นในหน่วย ng/µl และนำมาเปรียบเทียบกับผล gel electrophoresis พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ได้แก่ หากมีความเข้มของแถบปรากฏบนเจลมาก ค่าความเข้มข้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงก็จะมากด้วย นั่นคือในช่องที่ 10 บนเจล ซึ่งมีความเข้มของแถบปรากฏมากที่สุด มีความเข้มข้นของ RNA สูงถึง 858.9 ng/µl ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง และหากมีความเข้มของแถบปรากฏบนเจลน้อย ค่าความเข้มข้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงก็จะน้อยด้วย แต่ค่าที่น้อยที่สุดของการวัดค่าการดูดกลืนแสงคือ 26.3 และ 37.7 ng/µl ซึ่งเมื่อนำมาเทียบกับผล gel electrophoresis ในช่องที่ 6 และ 8 ตามลำดับ ให้ผลไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากแถบปรากฏที่มีความเข้มน้อยที่สุดบนเจลคือช่องที่ 2 หรือชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง ดังนั้นผู้ทดลองจึงใช้การคาดคะเนจากผล gel electrophoresis เป็นหลัก โดยความเข้มของแถบในช่องที่ 6 น่าจะมีความเข้มเท่ากับแถบในช่องที่ 4 จึงน่าจะมีปริมาณ RNA

ที่สกัดได้ประมาณเท่ากัน และความเข้มของแถบในช่องที่ 8 น่าจะมีความเข้มเท่ากับแถบในช่องที่ 7 จึงน่าจะมีปริมาณ RNA ที่สกัดได้ประมาณเท่ากัน ทำให้สามารถคำนวณปริมาณ RNA เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-let-7c



(a)



(b)

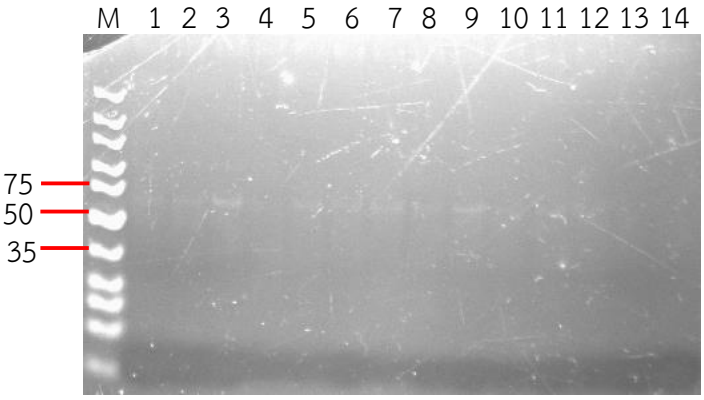
M : 0.5 µg/µl Ultra low range DNA ladder
1 : ชุดควบคุม 1 ที่ 0 ชั่วโมง
2 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 0 ชั่วโมง
3 : ชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง
4 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 0 ชั่วโมง
5 : ชุดควบคุม 1 ที่ 24 ชั่วโมง
6 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง
7 : ชุดควบคุม 2 ที่ 24 ชั่วโมง
8 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 24 ชั่วโมง
9 : ชุดควบคุม 1 ที่ 48 ชั่วโมง
10 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 48 ชั่วโมง
11 : ชุดควบคุม 2 ที่ 48 ชั่วโมง
12 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 48 ชั่วโมง
14 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ cDNA
15 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ RNA

รูปที่ 8 แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-let-7c โดยถ่ายภาพด้วยแสงธรรมดา (a) และแสงแบบ invert (b)

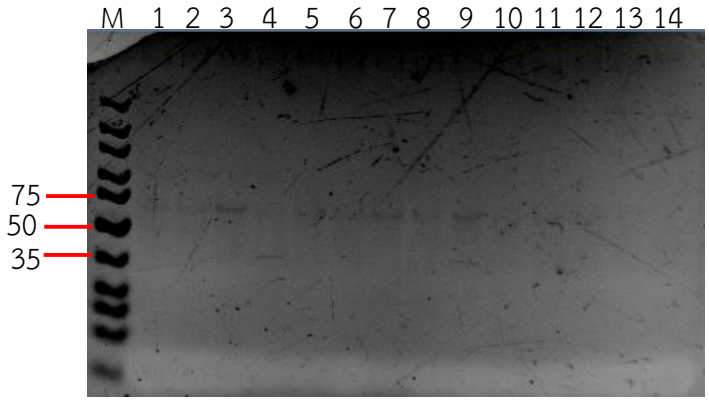
จากรูปแสดงผลการทดสอบยีน miRNA-let-7c ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยมี annealing temperature เท่ากับ 65 องศาเซลเซียส พบว่ามีแถบขึ้นที่ขนาดประมาณ 70 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงสามารถระบุได้ว่า ยีน miR-let-7c สามารถแสดงออกได้ในเซลล์ HEK293T (Cueto, M. E., et al., 2014) และจากแถบที่ปรากฏพบว่า ความเข้มของแถบในแต่ละช่องแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าในแต่ละช่วงเวลาที่เซลล์ HEK293T ติดไวรัส DENV2 มีการแสดงออกของ miRNA-let-7c แตกต่างกัน โดยควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อตรวจหาปริมาณการแสดงออกของยีน miRNA-let-7c ด้วยวิธี Real time PCR

ผู้ทดลองได้ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน miRNA-let-7c โดยใช้ cDNA template ของชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี temperature gradient PCR และพบว่า ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดแถบปรากฏบนเจลเพียงแถบเดียว (ภาคผนวก ข) แสดงว่าไม่มีการจับกันของไพรเมอร์จนเกิดเป็น primer-dimer หรือแถบปรากฏที่ไม่จำเพาะ แต่จากผลการทดลองพบว่า ในช่องที่ 5 และ 7 ปรากฏแถบที่ไม่จำเพาะต่อยีน miRNA-let-7c ขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการเข้าจับกันของไพรเมอร์กับ cDNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ หรือปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใส่ลงไปใน master mix เช่น $MgCl_2$ หรือ dNTP เป็นต้น ในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไพรเมอร์ ด้วยการใช้ cDNA template ของทุก ๆ ตัวอย่างมาทดสอบและลองปรับปริมาตรของสารต่าง ๆ ที่ใส่ลงไปใน master mix

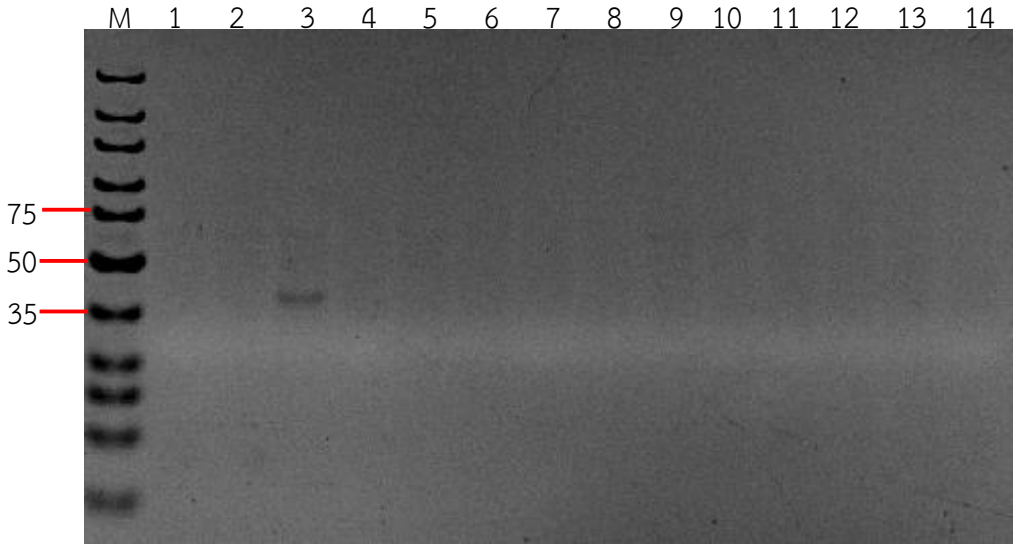
4. ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-744



(a)



(b)



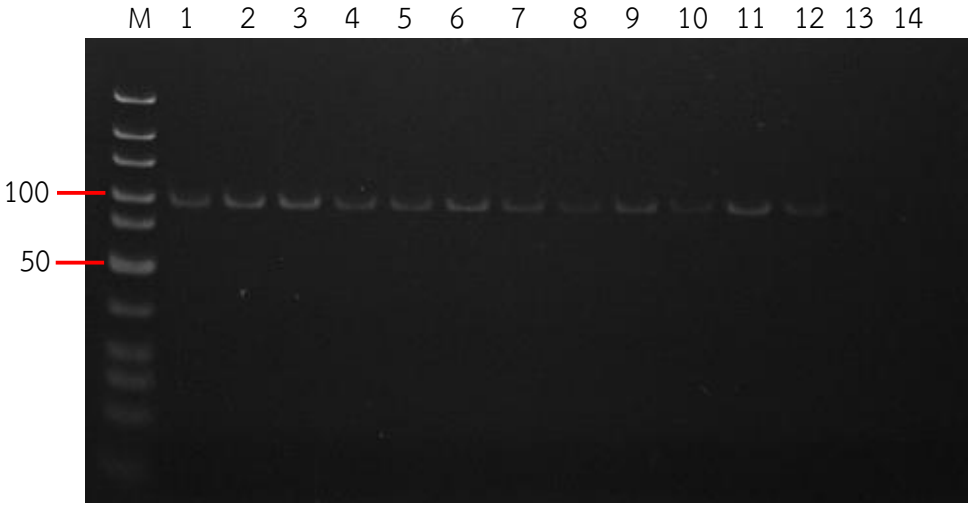
(c)

M : 0.5 µg/µl Ultra low range DNA ladder
1 : ชุดควบคุม 1 ที่ 0 ชั่วโมง
2 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 0 ชั่วโมง
3 : ชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง
4 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 0 ชั่วโมง
5 : ชุดควบคุม 1 ที่ 24 ชั่วโมง
6 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง
7 : ชุดควบคุม 2 ที่ 24 ชั่วโมง
8 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 24 ชั่วโมง
9 : ชุดควบคุม 1 ที่ 48 ชั่วโมง
10 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 48 ชั่วโมง
11 : ชุดควบคุม 2 ที่ 48 ชั่วโมง
12 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 48 ชั่วโมง
14 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ cDNA
15 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ RNA

รูปที่ 9 แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-744 ครั้งที่ 1 โดยถ่ายภาพด้วยแสงธรรมดา (a) และแสงแบบ invert (b) และการทำ PCR จากยีน miRNA-744 ครั้งที่ 2 โดยถ่ายภาพด้วยแสงแบบ invert (c)

จากรูปแสดงผลการทดสอบยีน miRNA-744 ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยมี annealing temperature เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส โดยได้ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ซึ่งผลการทดสอบในครั้งที่ 1 แสดงในรูปที่ 9 (a), (b) พบว่ามีแถบขึ้นที่ขนาดประมาณ 70 ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยแถบที่ปรากฏมีความเข้มน้อยมาก และในแต่ละแถบมีความเข้มแตกต่างกัน จึงอาจสรุปได้ว่าในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2 มีการแสดงออกของยีน miRNA-744 น้อย และแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งผลการทดสอบในครั้งที่ 2 แสดงในรูปที่ 9 (c) พบว่ามีความเข้มของแถบน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบในครั้งที่ 1 แต่ช่องที่ 4, 7, 8, 11 และ 12 ไม่พบแถบปรากฏขึ้น และในช่องที่ 3 พบแถบปรากฏขึ้นที่ขนาดประมาณ 40 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นแถบที่ไม่จำเพาะต่อยีน miRNA-744 โดยอาจเกิดจากประสิทธิภาพของ cDNA ที่ลดลง เนื่องจากการทดลองครั้งแรกและครั้งที่ 2 ใช้เวลาห่างกันถึง 12 วัน นอกจากนี้ควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน miRNA-744 ในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2 ที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี Real time PCR

5. ผลการทำ PCR จากยีน miRNA-U6



M : 0.5 µg/µl Ultra low range DNA ladder
1 : ชุดควบคุม 1 ที่ 0 ชั่วโมง
2 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 0 ชั่วโมง
3 : ชุดควบคุม 2 ที่ 0 ชั่วโมง
4 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 0 ชั่วโมง
5 : ชุดควบคุม 1 ที่ 24 ชั่วโมง
6 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 24 ชั่วโมง
7 : ชุดควบคุม 2 ที่ 24 ชั่วโมง
8 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 24 ชั่วโมง
9 : ชุดควบคุม 1 ที่ 48 ชั่วโมง
10 : ชุดทดสอบ 1 ที่ 48 ชั่วโมง
11 : ชุดควบคุม 2 ที่ 48 ชั่วโมง
12 : ชุดทดสอบ 2 ที่ 48 ชั่วโมง
14 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ cDNA
15 : ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ RNA

รูปที่ 10 แสดงผล 8% acrylamide gel electrophoresis ของการทำ PCR จากยีน miRNA-U6

ผลการทดสอบยีน miRNA-U6 (รูปที่ 10) เป็นยีนที่ใช้ในการควบคุมการทดสอบ miRNA เนื่องจากพบการแสดงออกของยีน miRNA-U6 ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุก ๆ เซลล์ โดยพบว่ามีแถบปรากฏขึ้นที่ขนาดประมาณ 100 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากผลการทดสอบนี้ ควรทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการนำมาเปรียบเทียบกับยีน miRNA-let-7c และ miRNA-744 เพื่อทดสอบหาปริมาณการแสดงออกในเซลล์ HEK293T ที่ติดไวรัส DENV2 ที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี Real time PCR

เอกสารอ้างอิง

ATCC® CRL-3216™, 293T. From website: https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3216.aspx.

Bäck, A. T., Lundkvist, A. 2013. Dengue viruses - an overview. Infect ecol epidemiol, 3, 10.3402/iee.v3i0.19839. doi:10.3402/iee.v3i0.19839

Betancur, J. C. C., Inchima, S. U., 2017. Overexpression of miR-484 and miR-744 in Vero cells alters Dengue virus replication. Mem Inst Oswaldo Cruz, 112(4), 281-291.

Center for Disease Control and Prevention. 2017. How the Flu Virus Can Change: “Drift” and “Shift”. From website: https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm.

Cueto, M. E., Martinez, I. M., Angel, R. M., Campos, J. B., Escolano, A. L. G., Monroy, M. Y. 2015. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. Virus Research, 196, 105-112.

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., Calos, M. P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. Mol. Cell. Biol, 7(1), 379–387.

Fatima, K., Syed, N. I. 2018. Dengvaxia controversy: impact on vaccine hesitancy. J Glob Health, 8(2), 020312.

Hulo, C., Castro, E. D., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., et al. 2011. Viralzone: a knowledge resource to understand virus diversity. Nucleic Acids Res. 39, 576-582.

Ishikawa, H. 1977. Evolution of ribosomal RNA. Comparative Biochemistry and Physiology. 58(1 B), 1-7.

Jitoboam, K., Phaonakrop, N., Libsittikul, S., Thepparit, C., Roytraku3, S., Smith, D. R. 2016. Actin Interacts with Dengue Virus 2 and 4 Envelope Proteins. Research Article. DOI:10.1371/journal.pone.0151951.

Kanokudom, S., Vilaivan, T., Wikan, N., Thepparit, C., Smith, D., Assavalapsakul, W. 2017. miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. Antiviral Res. 142, 169-177

Li, D., Wei, T., Abbott, C. M., Harrich, D. 2013. The Unexpected Roles of Eukaryotic Translation Elongation Factors in RNA Virus Replication and Pathogenesis, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77(2), 253-266.

Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., et al. 2013. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. Trends in Microbiology, 22(3), 138-146.

Roberts, T.C. 2015. The microRNA Machinery, In: Santulli G. (eds) microRNA: Basic Science. Advances in Experimental Medicine and Biology,. Springer, Cham. 887, 15-30

Shahen, M., Guo, Z., Shar, A. H., Ebaid, R., Tao, Q., Zhang, W., et al. 2018. Dengue virus causes changes of MicroRNA-genes regulatory network revealing potential targets for antiviral drugs. BMC systems Biology, 12:2

Tsai, T. T., Chuang, Y. J., Lin, Y. S., Wan, S. W., Chen, C, L., Lin, C. F. 2013. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. J Biomed Sci. 20(1), 40.

Varkony-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., Hellens, R. P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant methods, 3(12)

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y. 2010. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. Biochimica et Biophysica Acta, 1803, 1231-1243.

World Health Organization. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. From website: https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf

World Health Organization. 2018. Dengue and severe dengue. From website: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue. (Last access date: 13 September 2018)

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2017. กรมควบคุมโรค เตรียมหารือในคณะอนุกรรมการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรค เกี่ยวกับวัคซีนป้องกันไข้เลือดออกในประเทศไทย. From website: http://www.riskcomthai.org/2017/detail.php?id=36661.

ศูนย์การแพทย์กาญจนาภิเษก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. 2017. วัคซีนป้องกันไข้เลือดออก. From website: http://www.gj.mahidol.ac.th/th/dengue-vaccine/.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2017. ไข้เลือดออก. From website: https://ddc.moph.go.th/th/site/disease/detail/44/view.

สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2019. สถานการณ์โรคไข้เลือดออก ประจำสัปดาห์ที่ 22 ปี พ.ศ.2562. From website: https://ddc.moph.go.th/uploads/ckeditor/6f4922f45568161a8cdf4ad2299f6d23/files/Dangue/Situation/2562/DHF%2022.pdf.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1X Minimum Essential Medium (MEM) ปริมาตร 1 ลิตร

MEM powder สำหรับ	1	ลิตร
$NaHCO_3$	2.2	กรัม
HEPES	5.206	กรัม
Sterile MilliQ water	900	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl เป็น	7.4	
เติม Sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

กรองผ่าน 0.22 µm membrane filter แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1X Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ปริมาตร 1 ลิตร

DMEM powder	13.4	กรัม
$NaHCO_3$	3.7	กรัม
Sterile MilliQ water	900	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl เป็น	7.4	
เติม Sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

กรองผ่าน 0.22 µm membrane filter แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม complete MEM/DMEM with 10% Fetal Bovine Serun (FBS) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1X MEM/DMEM	445	มิลลิลิตร
Heat-inactivated FBS	50	มิลลิลิตร
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10,000 U/ml)	5	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8.075	กรัม
KCl	0.203	กรัม
Na_2HPO_4	0.61	กรัม
เติม Sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 0.25% (w/v) Trypsin/EDTA ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Trypsin	1.25	กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	1	มิลลิลิตร
เติม 1X PBS จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

กรองผ่าน 0.22 µm membrane filter เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 0.4 (w/v) Trypan blue ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Trypan blue	0.4	กรัม
1X PBS	100	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 7.5% (w/v) $NaHCO_3$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$NaHCO_3$	75	กรัม
เติม sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 20X Earl's Balance Salts Solution (EBSS) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

$CaCl_2.2H_2O$	2.65	กรัม
KCl	4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2	กรัม
NaCl	68	กรัม
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.25	กรัม
Glucose	10	กรัม
เติม Sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	500	มิลลิลิตร
กรองผ่าน 0.22 µm membrane filter เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

การเตรียม YE-LAH medium ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Yeast extract	2	กรัม
Lactalbuminhydrolysate	10	กรัม
เติม Sterile MilliQ water จนมีปริมาตรเป็น	200	มิลลิลิตร
กรองผ่าน 0.22 µm membrane filter เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

การเตรียม 1st overlay 2X nutrient solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

20X EBSS	1.47	มิลลิลิตร
FBS	0.9	มิลลิลิตร
YE-LAH medium	0.99	มิลลิลิตร
Sterile MilliQ water	10.8	มิลลิลิตร
7.5% $NaHCO_3$	0.9	มิลลิลิตร
P/S	75	ไมโครลิตร

การเตรียม 2nd overlay 2X nutrient solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

20X EBSS	0.98	มิลลิลิตร
YE-LAH medium	1.26	มิลลิลิตร
Sterile MilliQ water	5.91	มิลลิลิตร
7.5% $NaHCO_3$	0.6	มิลลิลิตร
P/S	50	ไมโครลิตร
0.5% neutral red	1.2	มิลลิลิตร

การเตรียม 0.5% (w/v) neutral red ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Neutral red	0.25	กรัม
เติม Distrilled water จนมีปริมาตรเป็น	50	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที
เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 1.6% (w/v) Seakem LE agarose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Seakem LE agarose	1.6	กรัม
เติม Distrilled water จนมีปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที
เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมน้ำที่ปราศจาก RNase หรือ น้ำ DEPC ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Distrilled water	500	มิลลิลิตร
0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC)	0.5	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที
เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 50X Tris, acetic acid, EDTA (TAE) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	242	กรัม
Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
เติม Distrilled water จนมีปริมาตรเป็น	1	ลิตร

การเตรียม 1X TAE ปริมาตร 1 ลิตร

1X TAE	20	มิลลิลิตร
Distrilled water	980	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันและเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 1% agarose gel ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Agarose powder	1	กรัม
เติม 1X TAE จนมีปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร
ละลาย agarose powder ด้วยความร้อนจากไมโครเวฟ		

การเตรียม 30% acrylamide mix solution ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

Acrylamide	89	กรัม
N, N'-methylene-bis acrylamide	3	กรัม
เติม MilliQ water ที่อุ่น จนมีปริมาตรเป็น	300	มิลลิลิตร

การเตรียม 10% Ammonium persulfate (10% APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น	10	มิลลิลิตร

การเตรียม 8% acrylamide gel ปริมาตร 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร

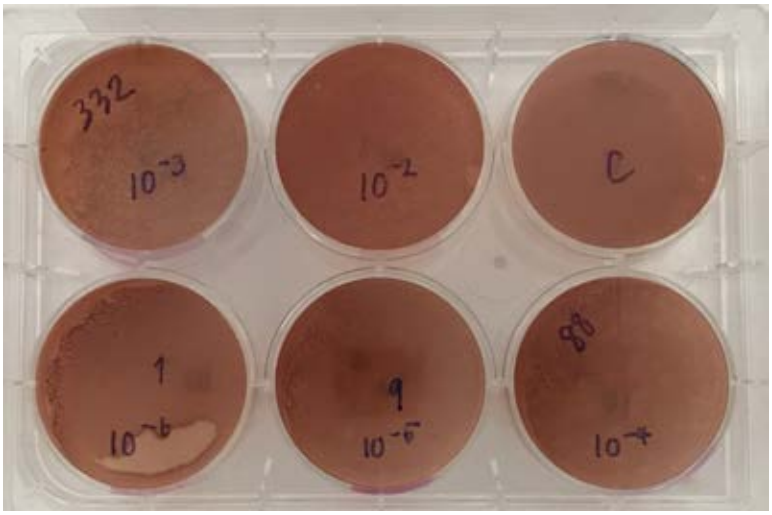
ส่วนประกอบ	10 มิลลิลิตร	20 มิลลิลิตร	30 มิลลิลิตร
1X TAE	6.7 มิลลิลิตร	13.4 มิลลิลิตร	20.1 มิลลิลิตร
30% acrylamide mix	3.33 มิลลิลิตร	6.66 มิลลิลิตร	9.99 มิลลิลิตร
10% APS	100 ไมโครลิตร	200 ไมโครลิตร	300 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข

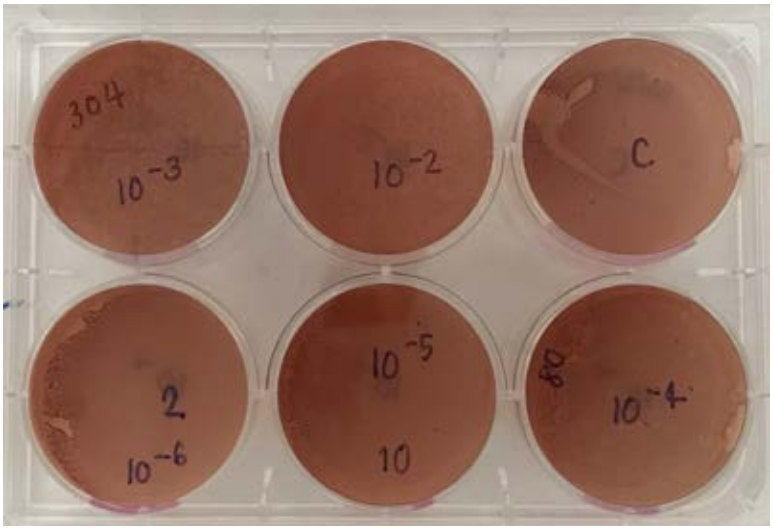
การคำนวณหาปริมาณไวรัส DENV2 ด้วยวิธี Plaque assay

1. ปริมาณไวรัส DENV2 จาก stock

<u>เพลตที่ 1</u>

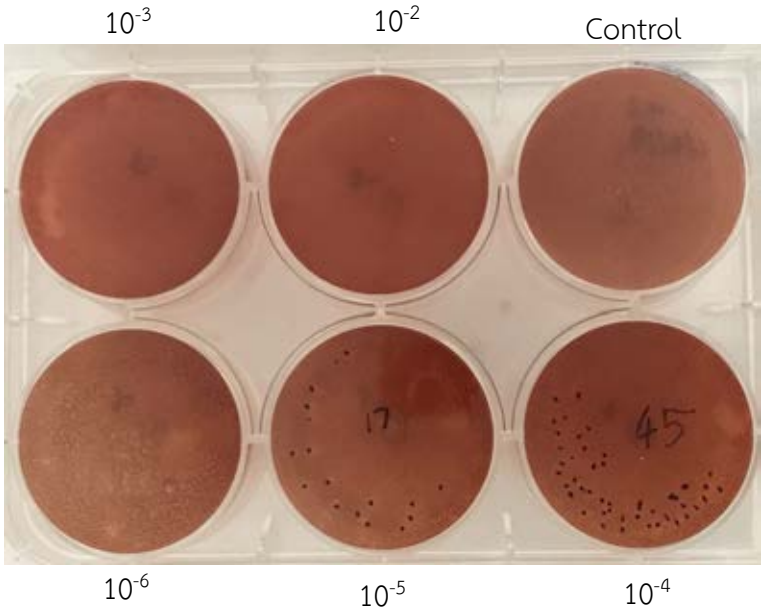


<u>เพลตที่ 2</u>



เพลต	Dilution factor	จำนวน plaque	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)
1	10^{-4}	88	$88 \times 10^4 \times 2.5 = 2.2 \times 10^6$
	10^{-5}	9	$9 \times 10^5 \times 2.5 = 2.25 \times 10^6$
2	10^{-4}	80	$80 \times 10^4 \times 2.5 = 2.0 \times 10^6$
	10^{-5}	10	$10 \times 10^5 \times 2.5 = 2.5 \times 10^6$
		ค่าเฉลี่ย	2.1625×10^6

2. ปริมาณไวรัส DENV2 จากที่ทำการเพิ่มจำนวนได้

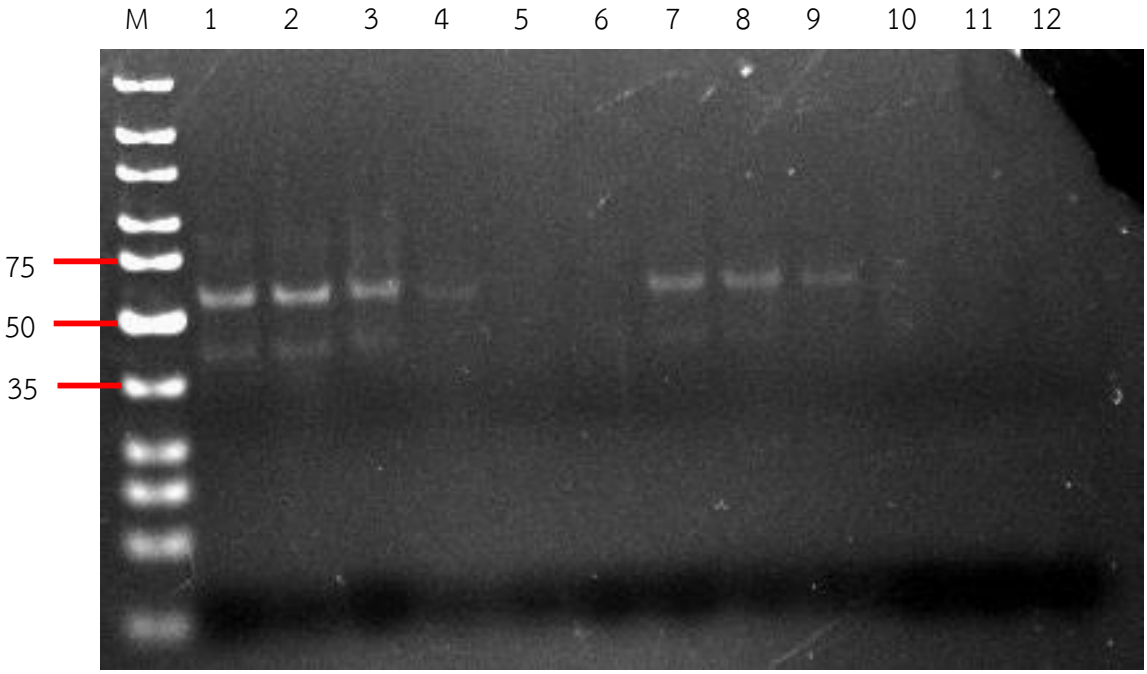


เพลต	**Dilution factor**	**จำนวน Plaque**	**ปริมาณไวรัส (PFU/ml)**
1	10^{-4}	45	$45 \times 10^4 \times 2.5 = 1.1 \times 10^6$
	10^{-5}	17	$17 \times 10^4 \times 2.5 = 4.2 \times 10^6$
		ค่าเฉลี่ย	2.65×10^6

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
miRNA-let-7c RT	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCAT 3'
miRNA-744 RT	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAACGACTGCTGT 3'
miRNA-U6 RT	5' TATGGAACGCTTC 3'
miRNA-let-7c Forward	5' GTTGTTGAGGTAGTAGGTTGT 3'
miRNA-744 Forward	5' TTTTATGCGGGGCTAGGGCTA 3'
Universal reverse primer	5' CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA 3'
miRNA-U6 Forward	5' CTCGCTTCGGCAGCACA 3'
miRNA-U6 Reverse	5' ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC 3'

การหาสภาวะ PCR ที่เหมาะสมต่อยีน miRNA-let-7c ด้วยวิธี temperature gradient PCR



ช่องที่	ปริมาณไพรเมอร์ miR-let-7c F และ universal reverse	อุณหภูมิในขั้นตอน annealing (องศาเซลเซียส)
1	1 µM ปริมาตร 1 µl	60
2		62.6
3		65.1
4		68.3
5		72.3
6		73
7	1 µM ปริมาตร 0.5 µl	60
8		62.6
9		65.1
10		68.3
11		72.3
12		73