



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน-10 Small Interfering RNA ในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome ของสุกร
Evaluation of Plasmid Expressing Interleukin-10 Small Interfering RNA in Induction of Cell-Mediated Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

โดย

วสิน เจริญทัศน์ชนกุล และ วัชระ กลิ่นอุกษ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2554

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-52-019



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน-10 Small Interfering RNA
ในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส Porcine
Reproductive and Respiratory Syndrome ของสุกร
Evaluation of Plasmid Expressing Interleukin-10 Small Interfering RNA in
Induction of Cell-Mediated Immune Response to Porcine Reproductive and
Respiratory Syndrome Virus

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2552

จำนวน 360,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายวสิน เจริญทัศน์ธนกุล

ผู้ร่วมโครงการ

นายวัชร กสินฤกษ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31/1/2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	7
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	37
กิตติกรรมประกาศ	41
ภาคผนวก	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ pIL-10sh1-4 และ pScr1-4	10
ตารางที่ 2 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1-4 ในการยับยั้งการสร้าง IL-10	13
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ของยีนต่างๆ ที่ศึกษา	14
ตารางที่ 4 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ต่อการแสดงออกของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ในโมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสฟิอาร์อาร์เอส	17
ตารางที่ 5 การแสดงออกระดับ mRNA ของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในโมโนซัยต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 และถูกกระตุ้นด้วย LPS	32
ตารางที่ 6 การแสดงออกระดับ mRNA ของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในโมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสฟิอาร์อาร์เอสและได้รับ pIL-10sh1 และ LPS	35

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh1 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing forward primer	19
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh1 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing reverse primer	20
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh2 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing forward primer	21
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh2 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing reverse primer	22
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh3 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing forward primer	23
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh3 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing reverse primer	24
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh4 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing forward primer	25
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh4 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้ sequencing reverse primer	26
ภาพที่ 2	
การแสดงผลของยีน IL-10 และ RPL32 ในโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Positive), LPS ร่วมกับ transfection reagent (TR), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr)	27
ภาพที่ 3	
ระดับการแสดงออกของยีน IL-10 ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ในโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4)	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4	ปริมาณ IL-10 ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4) 29
ภาพที่ 5	ร้อยละการมีชีวิตของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4) 30
ภาพที่ 6	ปริมาณ IFNγ และ TNFα ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pIL-10sh1) และ LPS pScr1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1) 33
ภาพที่ 7	ระดับการแสดงออกของยีน IL-10 ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 และปริมาณ IL-10 ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ mock antigen (Mock Ctrl), LPS ร่วมกับไวรัสพรีอาร์เอส (PRRSV), LPS ร่วมกับ transfection reagent และไวรัสพรีอาร์เอส (Tr media+PRRSV), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมและไวรัสพรีอาร์เอส (pIL-10sh1+PRRSV) และ LPS ร่วมกับ pScr1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และไวรัสพรีอาร์เอส (pScr1+PRRSV) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Pos Ctrl อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV 34

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 8

ปริมาณ IFN γ และ TNF α ใน cell culture supernatant ของ
 โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ mock
 antigen (Mock Ctrl), LPS ร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอส (PRRSV),
 LPS ร่วมกับ transfection reagent และไวรัสพรีอาร์อาร์เอส
 (Tr media+PRRSV), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม
 และไวรัสพรีอาร์อาร์เอส (pIL-10sh1+PRRSV) และ LPS ร่วมกับ pScr1
 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมและไวรัสพรีอาร์อาร์เอส (pScr1+PRRSV)
 สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
 เมื่อเทียบกับ Pos Ctrl อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ
 ทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV

36



การประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน-10 Small Interfering RNA ในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome ของสุกร

Evaluation of Plasmid Expressing Interleukin-10 Small Interfering RNA in Induction of Cell-Mediated Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

วสิน เจริญตันธนกุล¹ และ วัชร กสินฤกษ์^{2,3}

Wasin Charerntantanakul¹ and Watchara Kasinrerk^{2,3}

¹สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

³ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

ไวรัสพอร์อาร์เอส (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) กระตุ้นการสร้าง interleukin-10 (IL-10) ของสุกร ทำให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสลดลง งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้พลาสมิดที่สร้าง IL-10 small interfering RNA (pIL-10sh) ที่จำเพาะกับ IL-10 mRNA ของสุกรเพื่อควบคุมการสร้าง IL-10 mRNA และโปรตีนในโมโนซัยต์ของสุกรซึ่งบ่มร่วมกับไวรัสพอร์อาร์เอสและกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น lipopolysaccharide พร้อมกันนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ pIL-10sh ต่อการสร้าง IL-1 β , IL-12p35, IL-12p40, tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ), transforming growth factor beta (TGF β), CD80, CD86, Toll-like receptor 2 (TLR2) และ TLR4 mRNA และ TNF α และ IFN γ โปรตีนในโมโนซัยต์ของสุกร ผลการศึกษาพบว่า pIL-10sh ที่จำเพาะกับบริเวณ translation initiation ของ IL-10 mRNA สามารถยับยั้งการสร้าง IL-10 mRNA และโปรตีนได้อย่างมีนัยสำคัญ และช่วยกระตุ้นการสร้าง TNF α และ IFN γ mRNA และโปรตีนในโมโนซัยต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพอร์อาร์เอส pIL-10sh ไม่มีผลต่อการสร้าง IL-1 β , IL-12p35, IL-12p40, TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 mRNA ผลการศึกษาบ่งชี้ว่า pIL-10sh สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสในอนาคต

คำสำคัญ: ไมโทเจน, เลคติน, โมโนไซต์, อินเตอร์ลิวคิน-10

Abstract

Up-regulation of interleukin-10 (IL-10) expression has been suggested to be the mechanism by which the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses the innate and adaptive immune response in infected pigs. This study evaluates the potential of plasmids expressing IL-10 small interfering RNA (pIL-10sh) specific to various regions of porcine IL-10 mRNA in enhancing innate and adaptive cytokine and immune markers' responses to PRRSV. Naïve monocytes from eight PRRSV-seronegative pigs were transfected with pIL-10sh *in vitro* prior to PRRSV inoculation and lipopolysaccharide stimulation. The effects of pIL-10sh on mRNA expression of IL-10, IL-1 β , IL-12p35, IL-12p40, tumor necrosis factor alpha (TNF α), interferon gamma (IFN γ), transforming growth factor beta (TGF β), CD80, CD86, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 were evaluated by real-time PCR. The effects of pIL-10sh on protein production of IL-10, TNF α , and IFN γ were tested by ELISA. Compared to the controls, pIL-10sh expressing IL-10 small interfering RNA specific to the translation initiation region of porcine IL-10 mRNA has potential to suppress IL-10 expression and protein production. The reduced IL-10 production correlated significantly with enhanced TNF α and IFN γ production. The pIL-10sh has no significant effects on other cytokine and immune markers' expressions. Our results suggest that pIL-10sh has the potential to enhance innate and adaptive cytokine response to PRRSV infection.

Keyword: Mitogen, Lectin, Monocyte, Interleukin-10

คำนำ

ไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือไวรัสพอร์อาร์เอส เป็น RNA ไวรัสที่ก่อปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงปัญหาผสมติดยาก แท้ง ลูกตายแรกคลอดสูง ลูกที่เกิดมาโตช้าและมีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนสูง สุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงอาการปอดอักเสบ โตช้า และเสียชีวิต

โรคติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสเป็นโรคอุบัติใหม่ของสุกร พบครั้งแรกในทวีปยุโรปเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2534 จากนั้นมีการระบาดทั่วโลกอย่างรวดเร็ว พบครั้งแรกในประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2536 ปัจจุบันฟาร์มสุกรในทุกภาคของประเทศไทยติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส

เชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสมีความสามารถในการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกรทั้งต่อตัวไวรัสเองและต่อเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสสัวัดสุกร ไวรัสพิษสุนัขบ้าเทียม และกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อโรคทางระบบทางเดินหายใจในสุกร ส่งผลให้สุกรป่วยด้วยโรคติดเชื้อต่างๆ ยากขึ้น และรุนแรงขึ้น สุกรมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ จากเดิมสุกรขุนใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมดตั้งแต่แรกคลอดจนถึงส่งโรงงานแปรรูปประมาณ 6 เดือน ปัจจุบันใช้ระยะเวลาเลี้ยงทั้งหมด 6.5 ถึง 7 เดือน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรมีต้นทุนการผลิตสุกรสูงขึ้น รวมถึงมีค่าใช้จ่ายด้านเวชภัณฑ์เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อแทรกซ้อนมากขึ้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการประเมินมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรคิดเป็นมูลค่าประมาณปีละ 500 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในประเทศไทย มูลค่าความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากไวรัสพอร์อาร์เอสยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการแต่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตสุกรว่าไวรัสพอร์อาร์เอสทำให้ผลผลิตสุกรของฟาร์มลดลงอย่างชัดเจน

ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการจัดการใดที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสในสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ การฉีดวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสเป็นวิธีหนึ่งในหลายวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เพราะมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากและสามารถป้องกันโรคได้ แต่ว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพอร์อาร์เอสมีข้อจำกัดคือวัคซีนจะป้องกันโรคได้ต่อเมื่อสุกรมีการติดเชื้อซ้ำภายหลังได้รับวัคซีนไปแล้วอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลานานมาก ถ้าหากสุกรติดเชื้อซ้ำภายในระยะเวลา 1 เดือนหลังฉีดวัคซีน สุกรจะแสดงอาการป่วยไม่แตกต่างจากสุกรที่ไม่ได้รับวัคซีนเลย

ผู้วิจัยได้รายงานสาเหตุของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ช้าต่อวัคซีนพอร์อาร์เอสว่าเป็นเพราะวัคซีนกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ (cytokine) interleukin-10 (IL-10) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์กดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้รายงานการใช้โมโน

โคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะกับ IL-10 ของสุกรในการยับยั้งการสร้าง IL-10 ของเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (monocyte) ซึ่งส่งผลให้ไซโตไคน์ interferon gamma (IFN γ) มีการสร้างมากขึ้น ซึ่ง IFN γ มีหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพาร์อาร์เอส ทำให้สุกรมีปริมาณไวรัสพาร์อาร์เอสในกระแสเลือดลดลง แต่ว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีค่าใช้จ่ายที่สูง ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในทางปฏิบัติ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาการใช้พลาสมิด (plasmid) ที่สร้าง small interfering RNA (siRNA) ที่จำเพาะกับ IL-10 mRNA ของสุกรเพื่อควบคุมการสร้าง IL-10 ซึ่งพลาสมิดที่สร้าง siRNA มีต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมากและสามารถนำไปใช้ได้จริงในภาคปฏิบัติ อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์พลาสมิดที่สร้าง IL-10 siRNA ที่มีความจำเพาะต่อ IL-10 mRNA ของสุกร (pIL-10sh)
2. เพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเข้าสู่เซลล์ (transfection) โมโนไซต์ของ pIL-10sh
3. เพื่อศึกษาความสามารถของ pIL-10sh ในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ IL-10 ในโมโนไซต์
4. เพื่อศึกษาความสามารถของ pIL-10sh ต่อการสร้างไซโตไคน์ IFN γ และไซโตไคน์อื่นๆ รวมถึงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ IL-1, IL-12, tumor-necrosis factor alpha (TNF α), transforming growth factor beta (TGF β), CD80, CD86, Toll-like receptor 2 (TLR2) และ TLR4 ในโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสุกร

pIL-10sh อาจจะช่วยควบคุมระดับการสร้าง IL-10 ในสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอส ทำให้สุกรมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้น ซึ่งชีวิตได้โดยปริมาณ IFN γ ที่สร้างเพิ่มมากขึ้น ปริมาณ IFN γ ที่สูงขึ้นอาจจะทำให้ปริมาณของไวรัสพาร์อาร์เอสที่อยู่ในตัวสุกรลดลง เป็นการลดโอกาสของการถ่ายเชื้อไวรัสจากสุกรที่ติดเชื้อไปสู่สุกรที่ยังไม่ติดเชื้อ ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคพาร์อาร์เอสในฟาร์มและช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อแทรกซ้อน อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนค่ายาในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแทรกซ้อน ช่วยให้เกษตรกรมีผลผลิตและรายได้จากการเลี้ยงสุกรเพิ่มขึ้น

2. การผลิตเชิงอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์

pIL-10sh สามารถผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (adjuvant) สำหรับสุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอส เพื่อลดระดับความรุนแรงของโรค และใช้ร่วมกับวัคซีนพอร์อาร์เอสเพื่อ กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ (cell-mediated immunity) pIL-10sh ยังสามารถผลิตเพื่อการพาณิชย์เพื่อใช้กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อวัคซีนของสุกรชนิดอื่นๆที่ให้ระดับภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ไม่ดี เช่น วัคซีนโรคอหิวาต์สุกรและวัคซีนโรคปอดอักเสบจากเชื้อ *Mycoplasma hyopneumoniae*

3. ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างสถาบันการศึกษา

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นผลงานวิจัยร่วมระหว่างผู้วิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผลงานที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติที่มี impact factor

การตรวจเอกสาร

ไวรัส porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) หรือไวรัสพอร์อาร์เอส เป็น RNA ไวรัสที่ก่อปัญหาทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจของสุกร ไวรัสแบ่งตัวในเม็ดเลือดขาวประเภทโมโนไซต์ แมคโครฟาจ (macrophage) และเดนดริติกเซลล์ (dendritic cell) (Charerntantanakul et al., 2006a; Halbur et al., 1996; Thacker et al., 1998; Thanawongnuwech et al., 1997; Voicu et al., 1994) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีความสามารถในการเก็บกักและทำลายเชื้อแบคทีเรียลดลงและจะตายในที่สุด (Chiou et al., 2000; Thanawongnuwech et al., 1997) สุกรติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสจะแสดงปัญหาผสมติดยาก แท้ง ลูกตายแรกคลอดสูง ลูกที่เกิดมาโตช้า แคระแกร็นและมีอัตราการติดเชื้อแทรกซ้อนจากไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆสูง (Mengeling et al., 1998; Thacker et al., 1998; van der Linden et al., 2003) สุกรขุนที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสแสดงอาการปอดอักเสบ โตช้า และเสียชีวิต (Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996; Rossow et al., 1994; van der Linden et al., 2003)

สุกรที่ติดเชื้อไวรัสพอร์อาร์เอสมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันช้ามาก (ประมาณ 3-8 อาทิตย์ภายหลังการติดเชื้อ) และภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นมีระดับต่ำเมื่อเทียบกับภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคอื่นๆของสุกร เช่น โรคพิษสุนัขบ้าเทียม (pseudorabies) หรือโรคไข้หวัดใหญ่ในสุกร (swine influenza) (Thacker, 2001) ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นโดยเฉพาะภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์มี

ความสำคัญต่อการลดระดับความรุนแรงของโรค ลดการที่ปอดและปริมาณไวรัสที่แพร่กระจาย ในกระแสเลือด (Charerntantanakul et al., 2006b) ภูมิคุ้มกันแบบแอนติบอดีมีประสิทธิภาพค่อนข้างจำกัดในการปกป้องสุกรจากการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสและการลดระดับความรุนแรงของโรค มีรายงานว่าภูมิคุ้มกันแบบแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในระดับต่ำสามารถเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสของแมคโครฟาจผ่านทางกระบวนการ antibody-dependent enhancement of infection (Yoon et al., 1996)

ไวรัสพาร์อาร์เอสมีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างไซโตไคน์ interleukin-10 (IL-10) จากเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (Charerntantanakul et al., 2006a) IL-10 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ interferon gamma (IFN γ) ซึ่งสร้างโดยเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์และทีลิมโฟไซต์ ชนิด CD8 และ CD4 T helper 1 (Charerntantanakul et al., 2006a; Charerntantanakul and Kasinrerak, 2010; Waters et al., 1999) IFN γ มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสพาร์อาร์เอสในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น เซลล์แมคโครฟาจของปอดสุกร (pulmonary alveolar macrophage) และ continuous cell line เช่น MARC-145 (Bautista and Molitor, 1999; Rowland et al., 2001)

การลดระดับความรุนแรงของโรคติดเชื้อไวรัสพาร์อาร์เอสมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับจำนวนของเซลล์ที่สร้าง IFN γ ที่เพิ่มขึ้น (Charerntantanakul et al., 2006b) การกระตุ้นการสร้าง IFN γ สามารถทำได้โดยการลดการสร้าง IL-10 ในการศึกษาก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้รายงานถึงการใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ IL-10 ของสุกรในยับยั้งการจับกันของ IL-10 กับ IL-10 receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ของทีลิมโฟไซต์ (Charerntantanakul et al., 2006a) วิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มการสร้าง IFN γ ของทีลิมโฟไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อเพิ่มการสร้าง IFN γ ในภาคปฏิบัติมีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ไม่เหมาะสมในการนำไปใช้จริง ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาการใช้สารลดการสร้าง IL-10 ที่มีต้นทุนการผลิตที่ถูกลงกว่าและสามารถที่จะพัฒนาให้นำไปใช้จริงได้ในภาคปฏิบัติ

Small interfering RNA (siRNA) เป็น RNA สายสั้นที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 19 ถึง 21 นิวคลีโอไทด์ (Hannon, 2002) siRNA มีความสามารถในการจับกับ mRNA ของยีนเป้าหมายและทำหน้าที่เป็น primer สำหรับเอนไซม์ RNA polymerase เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่สร้าง RNA สายใหม่โดยอาศัย siRNA เป็น primer และ mRNA เป็น template RNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะสร้างพันธะกับ mRNA สายเดิมเกิดเป็น double-stranded RNA (dsRNA) เอนไซม์ dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม RNase III ที่พบได้ในเซลล์พืชและสัตว์จะจับกับ dsRNA และตัด dsRNA เป็นสายสั้นๆ ทำให้ไม่มี mRNA ที่สมบูรณ์สำหรับการสร้างโปรตีน (translation) (Elbashir et al.,

2002) ในสุกร การใช้ siRNA ในการควบคุมการสร้างโปรตีนมีรายงานการทดลองใน glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น housekeeping gene โดย siRNA ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีสามารถลดปริมาณ GAPDH mRNA และโปรตีนของเซลล์แมคโครฟาจของปอดสุกรได้อย่างมีนัยสำคัญ (Zhang et al., 2005)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina air flow)
2. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
3. Autopipette และ pipette tips
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
5. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
6. เครื่องทำความเย็น (Freezer) ที่ความเย็นต่างๆ ได้แก่ 4 องศาเซลเซียส -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical balance)
8. เครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (Filter system) (Corning®, Corning, NY)
9. ถาดหลุมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (Nunc, Denmark)
10. Hemacytometer (Bright-Line®, Hausser Scientific, Horsham, PA)
11. กล้องจุลทรรศน์และกล้อง fluorescent (Olympus BX51)
12. ไมโครเวฟ (Microwave)
13. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่สามารถปรับอุณหภูมิ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์และความชื้นได้ (Humidified CO₂ incubator)
14. Water bath ที่สามารถปรับอุณหภูมิได้
15. ELISA plate reader
16. ชุด electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA)
17. เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
18. เครื่องผสม (Vortex)
19. เครื่อง ultraviolet transilluminator (Bio-Rad, Hercules, CA)
20. เครื่อง real-time PCR รุ่น PTC-200 (Bio-Rad, Hercules, CA)

21. เครื่อง Magnet plate (IBA GmbH, Germany)
22. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ (beaker) ขนาดต่างๆ ขวดรูปชมพู่ (flask) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipette) และแท่งแก้วคนสาร (stirrer) เป็นต้น
23. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ หลอดทดลองขนาดต่างๆ ซ้อนตักสาร กระจกยั้งสาร กระจกยัดดินฉลาก กระจกยทึบ กระจกพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระจกยพาราฟิล์ม ถุงมือ และกรรไกร เป็นต้น

สารเคมี

1. pSilencer 4.1-CMV neo plasmids (Applied Biosystems, Foster city, CA)
2. Plasmid DNA MiniPreps kit (Bio Basic Inc, Canada)
3. BamHI และ Hind III (Fermentas, Glen Burnie, MD)
4. EndoFree[®] Plasmid maxi kit (Qiagen)
5. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
6. Sodium chloride (NaCl) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
7. Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
8. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
9. Potassium chloride (KCl) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
10. Deionized water (dH_2O)
11. Hydrochloric acid (HCl) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
12. Sodium hydroxide (NaOH) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
13. Histopaque[®]-1077 (Sigma, St. Louis, MO)
14. Ammonium chloride (NH_4Cl) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
15. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)
16. RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY)
17. MEM (Gibco, Grand Island, NY)
18. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY)
19. Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (Gibco, Grand Island, NY)
20. Trypan blue (Gibco, Grand Island, NY)
21. Lipopolysaccharide (Fluka, Germany)
22. Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany)
23. First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Glen Burnie, MD)

24. Forward และ Reverse primers ของ IL-10, IFN γ , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, TNF α , TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4
25. QuantiTect SYBR Green PCR master mix kit (Qiagen)
26. β -mercaptoethanol (Bio Basic Inc., Canada)
27. 95% ethanol (Merck, Germany)
28. DNase I (Fermentas, Glen Burnie, MD)
29. Agarose (Research Organics, Cleveland, OH)
30. Tris-borate-EDTA buffer (National diagnostics, Atlanta, GA)
31. Ethidium bromide (Bio Basic Inc., Canada)
32. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Herdchek®, IDEXX, Westbrook, ME)
33. Porcine IFN γ , TNF α และ IL-10 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN)
34. Primary mouse anti-SWC3 monoclonal antibodies (clone 74-22-15, isotype IgG1, Southern Biotech, Birmingham, AL)
35. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)
36. IBAfect (IBA GmbH, Germany)
37. MATra-A (IBA GmbH, Germany)
38. Optimem (Gibco, Grand Island, NY)

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์ pIL-10sh1-4 และ pScr1-4

ทำการออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์และสังเคราะห์ต้นแบบ IL-10 siRNA ที่มีความจำเพาะกับ IL-10 mRNA ของสุกร จำนวน 4 ต้นแบบ (ตารางที่ 1) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ทำการออกแบบและสังเคราะห์ต้นแบบ scramble อีกจำนวน 4 ต้นแบบ (ตารางที่ 1) โดย scramble จากต้นแบบ IL-10 siRNA วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบ scramble ที่ได้ว่าไม่เหมือนกับยีนใดๆ ของสุกร โดยวิเคราะห์จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ทำการโคลน (clone) ต้นแบบ IL-10 siRNA ในพลาสมิด pSilencer 4.1-CMV neo plasmids (Applied Biosystems) และเพิ่มจำนวนพลาสมิดใน *Escherichia coli* DH5 α (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ทำ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ pIL-10sh1-4 และ pScr1-4

Plasmids	Sequence	Complementary to position on IL-10 mRNA
pIL-10sh1	5'- GATCCTACCATGCCCAGCTCAGCATTCAAGAGATGCTGAGCTGGGCATGGTAGAA- 3' 5'- AGCTTTCTACCATGCCCAGCTCAGCATCTCTTGAATGCTGAGCTGGGCATGGTAG- 3'	-6 -15
pIL-10sh2	5'- GATCCGAGTTTCTTTCAAACGAAGTTCAAGAGACTTCGTTTGAAAGAACTCTTA- 3' 5'- AGCTTAAGAGTTTCTTTCAAACGAAGTCTCTTGAAGTTTCGTTTGAAAGAACTCG- 3'	142-162
pIL-10sh3	5'- GATCCGCCTTGTCAGAGATGATCCTTCAAGAGAGGATCATCTCTGACAAGGCTTA- 3' 5'- AGCTTAAGCCTTGTCAGAGATGATCCTCTCTTGAAGGATCATCTCTGACAAGGCG- 3'	230-250
pIL-10sh4	5'- GATCCGAGTGCCTTTAGCAAGCTCTTCAAGAGAGAGCTTGCTAAAGGCACTCTTA- 3' 5'- AGCTTAAGAGTGCCTTTAGCAAGCTCTCTCTTGAAGAGCTTGCTAAAGGCACTCG- 3'	415-435
pScr1	5'- GATCCCACGCAGTACTCCCACTCTTTCAAGAGAAGAGTGGGAGTACTGCGTGTCA- 3' 5'- AGCTTGACACGCAGTACTCCCACTCTTCTCTTGAAAGAGTGGGAGTACTGCGTGG- 3'	-
pScr2	5'- GATCCAATTCATATGCGCTGATAATTCAAGAGATTATCAGCGCATATGAATTTCA- 3' 5'- AGCTTGAAATTCATATGCGCTGATAATCTCTTGAATTATCAGCGCATATGAATTG- 3'	-
pScr3	5'- GATCCGACCACTGAGTTAGCTACATTCAAGAGATGTAGCTAACTCAGTGGTCACA- 3' 5'- AGCTTGTGACCACTGAGTTAGCTACATCTCTTGAATGTAGCTAACTCAGTGGTCG- 3'	-
pScr4	5'- GATCCCGAGCCAGATCCGATTATATTCAAGAGATATAATCGGATCTGGCTCGACA- 3' 5'- AGCTTGTGCGAGCCAGATCCGATTATATCTCTTGAATATAATCGGATCTGGCTCGG- 3'	-

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ plasmid DNA MiniPreps kit (Bio Basic Inc) ตรวจสอบการโคลนได้ด้วยวิธี restriction analysis โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI และ Hind III (Fermentas) และวิเคราะห์ความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายหลังการโคลนโดยการทำ DNA sequencing โดยใช้ primer ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ F5'AGGCGATTAAGTTGGGTA3' และ R5'CGGTAGGCGTGTACGGTG3' ทำการสกัดพลาสมิดเพื่อการ transfection โดยใช้ EndoFree® Plasmid maxi kit (Qiagen) พลาสมิดที่ได้มี lipopolysaccharide (LPS) ปนเปื้อนอยู่น้อยกว่า 0.0625 EU/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี Limulus Amebocyte Lysate assay

2. การเตรียมตัวอย่างเลือดของสุกร

เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 60 มิลลิลิตร (มล.) จากสุกรอายุ 24 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัวจากฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งในอำเภอสนทราย จ.เชียงใหม่ แบ่งเลือดจำนวน 20 มล. ใส่ในหลอดทดลองเพื่อแยกเก็บซีรัม (serum) สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสพาร์อาร์เอสโดยวิธี ELISA (Herdchek®, IDEXX) โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แบ่งเลือดจำนวน 40 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มี 4 มล. ของ 0.5M EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวเพื่อแยกเก็บ peripheral blood mononuclear cell (PBMC)

3. การเตรียมโมโนซัยต์

เจาะเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากัน ดูดเลือดที่เจาะแล้วจำนวน 30 มล./หลอด ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 5 มล. ของสารละลาย Histopaque® -1077 (Sigma) นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 xg นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อปั่นแยก PBMC (Charemtantanakul et al., 2006b)

ปิเปต 10 มล. ของ PBMC ที่ได้ ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม 10 มล. ของ PBS นำไปปั่นที่ความเร็ว 270 xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อล้าง PBMC จากนั้นเติม 10 มล. ของ RBC lysis buffer (คูภาคผนวก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงใน PBMC pellet ปิเปตขึ้นลงให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติม 10 มล. ของ PBS แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 270 xg นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 5 มล. ของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI⁺⁺ (RPMI-1640 with L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) และ amphotericin B (250 ng/ml) (Gibco)) ลงใน PBMC pellet ปิเปตขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วนับเซลล์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วย RPMI⁺⁺ ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์/มล.

เปิด 200 ไมโครลิตรของ PBMC ใน RPMI⁺⁺ ใส่ลงในภาชนะหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิดก้นแบน แบบ 96 หลุม (96-well flat-bottom plate) (Nunc) แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่ม CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเปิดเซลล์ที่ไม่ติดที่ก้นภาชนะหลุมออก (non-adherent cells) เหลือเฉพาะเซลล์ที่เกาะที่ก้นภาชนะหลุม (adherent cells) ล้างเซลล์ที่เกาะที่ก้นภาชนะหลุมด้วย 150 ไมโครลิตรของ PBS ที่อุ่นแล้วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (pre-warmed PBS) จำนวน 2 ครั้ง

ทำการตรวจสอบชนิดของ adherent cell ด้วยวิธี indirect immunofluorescent assay โดยใช้ primary mouse anti-SWC3 monoclonal antibodies (clone 74-22-15, isotype IgG1; ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ศพ.ญ.ดร.สันนิษา สุรทัตต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อโมโนไซต์ของสุกร และ secondary FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Becton Dickinson; ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วัชร กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) พบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของ adherent cell เป็นโมโนไซต์ (Chareerntantanakul et al., 2006a)

4. การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIL-10sh และความสามารถของ pIL-10sh ในการยับยั้งการสร้าง IL-10

ทำการเตรียม pIL-10sh: transfection reagent mixture โดย transfection reagent ที่ใช้ได้แก่ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) ในความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ปริมาณของ pIL-10sh ที่ศึกษา ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัม ทำการ resuspend pIL-10sh 1-4 ที่ปริมาณต่างๆ ด้วย pre-warmed Optimem (Gibco; 37 องศาเซลเซียส) ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร และทำการ resuspend IBAfect ใน pre-warmed Optimem ให้ได้ความเข้มข้น 3.5% v/v ที่ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร ผสม resuspended pIL-10sh 1-4 กับ resuspended IBAfect เข้าด้วยกัน แล้วบ่ม pIL-10sh: transfection reagent mixture ที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นเติม 1, 2, 3 หรือ 4 ไมโครลิตรของ MATra-A ลงใน mixture ที่มี 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัมของ pIL-10sh ตามลำดับ (ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต) ทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

เปิด 150 ไมโครลิตรของ pre-warmed Optimem ลงในโมโนไซต์และเปิดตามด้วย 20 ไมโครลิตรของ pIL-10sh: transfection reagent mixture วาง cell culture plate บน Magnet plate (IBA GmbH) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในตู้บ่ม 5% CO₂ จากนั้นเอา Magnet plate ออก แล้วบ่ม cell culture plate ในตู้บ่มต่ออีก 12 ชั่วโมง เติม 50 ไมโครลิตรของ lipopolysaccharide (LPS; 10 µg/ml final concentration; Fluka) และ 130 ไมโครลิตรของ RPMI⁺⁺

และบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อการสกัด mRNA และแยกเก็บ cell culture supernatant เพื่อการตรวจวัดปริมาณ IL-10 โดยวิธี ELISA (R&D Systems)

กลุ่มควบคุมของการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ โมโนซัยต์ที่ได้รับเพียง RPMI⁺⁺ (untransfected/unstimulated control) โมโนซัยต์ที่ได้รับ LPS (positive control) โมโนซัยต์ที่ได้รับ transfection reagent (IBAfect และ 4 ไมโครลิตรของ MATra-A) และ LPS (transfection media control) และ โมโนซัยต์ที่ได้รับ pScr ที่ 0.4 ไมโครกรัมและ LPS (pScr control) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1-4 ในการยับยั้งการสร้าง IL-10

Treatment	LPS	Transfection reagent	pScr
Untransfected/unstimulated control	-	-	-
Positive control	+	-	-
Transfection media control	+	+	-
pScr control	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง ได้รับ และเครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ได้รับ

ทำการสกัด total mRNA ด้วย Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) และสังเคราะห์ full-length cDNA ด้วย First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas) จากนั้นใช้ cDNA เป็นต้นแบบสำหรับการทำ real-time PCR โดยใช้ QuantiTect SYBR Green PCR master mix kit (Qiagen) และ primers ที่จำเพาะต่อ IL-10 ของสุกร (ตารางที่ 3) Housekeeping gene ที่ใช้เป็น internal control ได้แก่ ribosomal L32 (RPL32) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers แสดงในตารางที่ 3

PCR reaction ประกอบด้วย cDNA 2 ไมโครลิตร, PCR master mix 25 ไมโครลิตร, primers (0.3 μ M each), และ nuclease-free water ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร และ PCR condition ที่ใช้ ได้แก่ initial activation (95 องศาเซลเซียส, 15 นาที), 40 รอบของ Denature (94 องศาเซลเซียส, 15 วินาที), Annealing (55 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) และ Extension (72 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) Melting curve analysis condition หลังการทำ PCR ได้แก่ 60-96 องศาเซลเซียส, read every 0.2 องศาเซลเซียส, และ hold 00:00:01 วินาที ทำการคำนวณความแตกต่างของการแสดงออกของ IL-10 mRNA โดยเทียบกับ RPL32 mRNA ด้วยวิธี $\Delta\Delta C_T$ method และนำ PCR product ที่ได้ทำ agarose gel electrophoresis เพื่อยืนยันความถูกต้องของ molecular weight

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ของยีนต่างๆ ที่ศึกษา

Gene	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
IL-1 β	5'-TTGAATTCGAGTCTGCCCTGT-3'	5'-CCCAGGAAGACGGGCTTT-3'
IL-10	5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA-3'
IL-12p35	5'-GCCCAGGAATGTTCAAATGC-3'	5'-GGGTTTGTTTGGCCTTCTGA-3'
IL-12p40	5'-AAGCTGTTCAACAAGCTCAAGTATGA-3'	5'-TCTTGGGAGGGTCTGGTTTG-3'
TNF α	5'-TGGCCCCTTGAGCATCA-3'	5'-CGGGCTTATCTGAGGTTTGAGA-3'
IFN γ	5'-TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG-3'	5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'
TGF β	5'-AGGGCTACCATGCCAATTTCT-3'	5'-CCGGGTGTGCTGGTTGT-3'
CD80	5'-ATGGAGAAGAATTAAATGCTACCAACAC-3'	5'-GCCTGTCACATTGAAATCCAGTT-3'
CD86	5'-TGGGTCGCACAAGCTTTGA-3'	5'-TGAGCCCTTGTCTTGATTTG-3'
TLR2	5'-TATCCAGCACGAGAATACACAGTTTAA-3'	5'-CGAGTTGAGATTGTTATTGCTAATATCTAAAA-3'
TLR4	5'-TGGCAGTTTCTGAGGAGTCATG-3'	5'-CCGCAGCAGGGACTTCTC-3'
RPL32	5'-TGGAAGAGACGTTGTGAGCAA-3'	5'-CGGAAGTTTCTGGTACACAATGTAA-3'

ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ treatment ต่างๆ โดยการย้อมด้วยสี trypan blue (Gibco) และนับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เทียบกับจำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด คำนวณหาและเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละของเซลล์มีชีวิตของแต่ละ treatment เทียบกับ positive control

5. การศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ และไซโตไคน์อื่นๆรวมถึงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ IL-1, IL-12, TNF α , TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 ในโมโนไซต์

ทำการสกัด PBMC จากสุกรอายุ 24 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัวที่ปลอดจากโรคพาร์อาร์เอส จากนั้น resuspend เซลล์ด้วยอาหาร RPMI⁺⁺ ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์/ไมโครลิตร

ปิเปตเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน 96-well flat bottom plate (Nunc) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงในตู้บ่ม humidified 5% CO₂ จากนั้นปิเปต non-adherent cell ออกและล้าง adherent cell ด้วย pre-warmed PBS (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 2 ครั้ง

ทำการเตรียม pIL-10sh1: transfection reagent mixture โดย transfection reagent ที่ใช้ได้แก่ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) ในความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และปริมาณของ pIL-10sh1 ที่ใช้ได้แก่ 0.4 ไมโครกรัม ทำการ resuspend pIL-10sh1 ด้วย pre-warmed Optimem (37 องศาเซลเซียส) ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร และทำการ resuspend IBAfect ใน pre-warmed Optimem ให้ได้ความเข้มข้น 3.5% v/v ที่ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร ผสม pIL-10sh1 ที่ resuspended แล้วกับสารละลาย IBAfect เข้าด้วยกัน แล้วบ่ม pIL-10sh1: transfection reagent mixture ที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นเติม 4 ไมโครลิตรของ MATra-A ลงใน mixture ทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

ปิเปต 150 ไมโครลิตรของ pre-warmed Optimem ลงใน โมโนไซต์และปิเปตตามด้วย 20 ไมโครลิตรของ pIL-10sh: transfection reagent mixture วาง cell culture plate บน Magnet plate (IBA GmbH) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในตู้บ่ม 5% CO₂ จากนั้นเอา Magnet plate ออก แล้วบ่ม cell culture plate ในตู้บ่มต่ออีก 12 ชั่วโมง เติม 50 ไมโครลิตรของ LPS (10 μ g/ml final concentration; Fluka) และ 130 ไมโครลิตรของ RPMI⁺⁺ และบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อการสกัด mRNA และแยกเก็บ cell culture supernatant เพื่อการตรวจวัดปริมาณ IFN γ และ TNF α โดยวิธี ELISA (R&D Systems)

ทำการสกัด total mRNA ด้วย Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) และตั้งคราะที่ full-length cDNA ด้วย First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas) จากนั้นใช้ cDNA เป็นต้นแบบสำหรับการทำ real-time PCR โดยใช้ QuantiTect SYBR Green PCR master mix kit

(Qiagen) และ primers ที่จำเพาะต่อ IFN γ , TNF α , IL-1, IL-12p35, IL-12p40, TGF β , CD80, CD86, TLR2, TLR4 และ RPL32 ของสุกร ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers เหล่านี้มาจากรายงานของ Royace et al (2004) (ตารางที่ 3)

PCR reaction ประกอบด้วย cDNA 2 ไมโครลิตร, PCR master mix 25 ไมโครลิตร, primers (0.3 μ M each), และ nuclease-free water ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร และ PCR condition ที่ใช้ ได้แก่ initial activation (95 องศาเซลเซียส, 15 นาที), 40 รอบของ Denature (94 องศาเซลเซียส, 15 วินาที), Annealing (55 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) และ Extension (72 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) Melting curve analysis condition หลังการทำ PCR ได้แก่ 60-96 องศาเซลเซียส, read every 0.2 องศาเซลเซียส, และ hold 00:00:01 วินาที ทำการคำนวณความแตกต่างของการแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์ต่างๆ โดยเทียบกับ RPL32 mRNA ด้วยวิธี $\Delta\Delta C_T$ method และนำ PCR product ที่ได้ทำ agarose gel electrophoresis เพื่อยืนยันความถูกต้องของ molecular weight

6. การศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ต่อการแสดงออกของ IL-10, IFN γ , IL-1, IL-12, TNF α , TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 ในโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส

ทำการสกัด PBMC จากสุกรอายุ 24 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัวที่ปลอดจากโรคพาร์อาร์เอส จากนั้น resuspend เซลล์ด้วยอาหาร RPMI⁺ ให้ได้ความเข้มข้น 5×10^6 เซลล์/ไมโครลิตร

ปิเปตเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงใน 96-well flat bottom plate (Nunc) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงในตู้บ่ม humidified 5% CO₂ จากนั้นปิเปต non-adherent cell ออก และล้าง adherent cell ด้วย pre-warmed PBS (37 องศาเซลเซียส) จำนวน 2 ครั้ง

ทำการเตรียม pIL-10sh1: transfection reagent mixture โดย transfection reagent ที่ใช้ได้แก่ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) ในความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และปริมาณของ pIL-10sh1 ที่ใช้ได้แก่ 0.4 ไมโครกรัม ทำการ resuspend pIL-10sh1 ด้วย pre-warmed Optimem (37 องศาเซลเซียส) ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร และทำการ resuspend IBAfect ใน pre-warmed Optimem ให้ได้ความเข้มข้น 3.5% v/v ที่ปริมาตรสุทธิ 100 ไมโครลิตร ผสม pIL-10sh1 ที่ resuspended แล้วกับสารละลาย IBAfect เข้าด้วยกัน แล้วบ่ม pIL-10sh1: transfection reagent mixture ที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นเติม 4 ไมโครลิตรของ MATra-A ลงใน mixture ทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

ปิเปต 150 ไมโครลิตรของ pre-warmed Optimem ลงใน โมโนไซต์และปิเปตตามด้วย 20 ไมโครลิตรของ pIL-10sh1: transfection reagent mixture วาง cell culture plate บน Magnet plate

(IBA GmbH) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในตู้บ่ม 5% CO₂ จากนั้นเอา Magnet plate ออก แล้วบ่ม cell culture plate ในตู้บ่มต่ออีก 12 ชั่วโมง ปิดเปิด transfection mixture ออก แล้วเติม 100 ไมโครลิตรของไวรัสพาร์อาร์เอส (เสตรน 01NP1; 10⁶ TCID₅₀/ml; ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.น.สพ.ดร.รุ่งโรจน์ ธนวงษ์นุเวช คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และ 100 ไมโครลิตรของ RPMI⁺⁺ และบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติม 50 ไมโครลิตรของ LPS (10 µg/ml final concentration) ลงใน culture plate แล้วบ่มเซลล์ต่ออีก 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บ เซลล์เพื่อการสกัด mRNA และแยกเก็บ cell culture supernatant เพื่อการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ ต่างๆ โดยวิธี ELISA (R&D Systems)

กลุ่มควบคุมของการทดลอง แสดงสรุปในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ต่อการแสดงออกของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ในโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส

Treatment	LPS	Mock antigen	PRRSV	Transfection reagent	pScr1
Unstimulated control	-	-	-	-	-
Positive control	+	-	-	-	-
Mock control	+	+	-	-	-
PRRSV control	+	-	+	-	-
PRRSV+Transfection media control	+	-	+	+	-
pScr1 control	+	-	+	+	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + หมายถึง ได้รับ และเครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ได้รับ

ทำการสกัด total mRNA ด้วย Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) และสังเคราะห์ full-length cDNA ด้วย First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas) จากนั้นใช้ cDNA เป็นต้นแบบสำหรับการทำ real-time PCR โดยใช้ QuantiTect SYBR Green PCR master mix kit (Qiagen) และ primers ที่จำเพาะต่อ IFN γ , TNF α , IL-1, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TGF β , CD80, CD86, TLR2, TLR4 และ RPL32 ของสุกร (ตารางที่ 3)

PCR reaction ประกอบด้วย cDNA 2 ไมโครลิตร, PCR master mix 25 ไมโครลิตร, primers (0.3 µM each), และ nuclease-free water ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร และ PCR

condition ที่ใช้ ได้แก่ initial activation (95 องศาเซลเซียส, 15 นาที), 40 รอบของ Denature (94 องศาเซลเซียส, 15 วินาที), Annealing (55 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) และ Extension (72 องศาเซลเซียส, 30 วินาที) Melting curve analysis condition หลังการทำ PCR ได้แก่ 60-96 องศาเซลเซียส, read every 0.2 องศาเซลเซียส, และ hold 00:00:01 วินาที ทำการคำนวณความแตกต่างของการแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์ต่างๆ โดยเทียบกับ RPL32 mRNA ด้วยวิธี $\Delta\Delta C_T$ method และนำ PCR product ที่ได้ทำ agarose gel electrophoresis เพื่อยืนยันความถูกต้องของ molecular weight

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยโปรแกรม SPSS version 16 (Somers, NY) เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ด้วยวิธี One-way Analysis of Variance และ Dunnett's t test โดยใช้ positive control เป็นกลุ่มควบคุมทางสถิติ กำหนดให้ค่า p-value ที่น้อยกว่า 0.05 เป็นระดับที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์ pIL-10sh1-4 และ pScr1-4

ได้พลาสมิดที่มีต้นแบบ IL-10 siRNA และต้นแบบ scramble อย่างละ 4 พลาสมิด ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องเมื่อตรวจสอบโดยวิธี nucleotide sequencing (ภาพที่ 1) ยกเว้น pIL-10sh4 ที่มี nucleotide addition จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ใน insert ซึ่งแสดงด้วยตัวอักษรสีแดง

2. การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ pIL-10sh และความสามารถของ pIL-10sh ในการยับยั้งการสร้าง IL-10

โมโนซัยต์ที่ถูก transfect ด้วย pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมมีระดับ IL-10 mRNA และ โปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ positive control (ภาพที่ 2-4) โมโนซัยต์ที่ถูก transfect ด้วย pIL-10sh1 ที่ปริมาณอื่นๆ (0.1, 0.2 และ 0.3 ไมโครกรัม) และด้วย pIL-10sh2-4 และ pScr1-4 ที่ทุกปริมาณที่ศึกษาไม่แสดงการลดลงของ IL-10 mRNA และโปรตีน (ภาพที่ 2-4)

โมโนซัยต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมมีร้อยละของเซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากโมโนซัยต์ของ positive control และโมโนซัยต์ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอื่นๆ (ภาพที่ 5)

>1st_BASE_467898_Sh1_PS_F

NNNTCGAGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCGGCCGCATACAAAAACCA
 ACACACAGATCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTATTAAGCTTTCTACCATGCCCAGC
TCAGCATCTCTTGAATGCTGAGCTGGGCATGGTAGGATCCACGGTTCATAAACCAG
 CTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTGCGTCAATGGGGC
 GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCCCA
 TTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAATCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCACGC
 CCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGTAG
 ATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGGCG
 GGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTTGAT
 GTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGAAAG
 TCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGTC
 GTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACCTCCAT
 ATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAAGATCTGGT
 ACCTTGAATTCATGCTTCTCCTCCCTTTAGTGAGGGTAATTCTCTCTCTCTCCCTATAG
 TGAGTCGTATTAATTCCTTCTCTTCTATAGTGCACCTAAATCGTTGCAATTCGTAATC
 ATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAC
 GAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT
 TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA
 TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAAAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCG
 GTTTTCCTCG

ภาพที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh1 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing forward primer

>1st_BASE_467899_Sh1_PS_R.ab1

NNNNNNNNNNNCNNGGGNNTNGNNGAANNNNNNNNNTCCTACNANGCCCAGCTCAG
 CATTCAAGAGATGCTGAGCTGGGCATGNNAGAAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTT
 TCATTGGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCG
 TTTTACAACGTCTGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGC
 ACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTC
 CCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACG
 CATCTGTGCGGTATTTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG
 CCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGG
 CTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCAT
 GTGTCAGAGGTTTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGAT
 ACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGC
 ACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
 ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGGGTGTG
 GAAAGTCCCCAGGCTCCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAG
 TCAGCAACCCAGGGTGTGGAAAGTCCCCCAGGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGC
 AAAAGCATTGCATCTCAATTAGNCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCA
 ATCCCGCCCCCTAAACTCCGNNCAGTTCCNNNCCATTCTCCGCCCAATGGGCTTGACTT
 AATTTTTTTTTTTATTTATGCCANAAGGCCCAGAGNNCCGCCTTCNTGCCNTCTGAGC
 TATCCCAAGAANGTTGGTGNAAGGGANGNTTTTTTNNNGNNAGNCNNTANNGCCTT
 TTTCGCCAAACAAAANNCNTCCCCNNGGNAGACN

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh1 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing reverse primer

>1st_BASE_467900_Sh2_PS_F

GNCGTGCCGCATACAAAAACCAACACACAGTTCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTA
TTAAGCTTAAGAGTTTCTTTCAAACGAAGTCTCTTGAACTTCGTTTGAAAGAACTCG
 GATCCACGGTTCCTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTAC
 CGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAGTCCCGTTGATT
 TTGGTGCCAAAACAACTCCCATTTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAATCCCCG
 TGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGT
 AATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCAT
 GTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGT
 ACTTGGCATATGATACACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCC
 ACCCATTTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATT
 ATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTA
 AGTTATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGAT
 TACTATTAATAACTAAGATCTGGTACCTTGAATTCATGCTTCTCCTCCCTTTAGTGAG
 GGTAATTCTCTCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCCTTCTCTTCTATAGTGTC
 ACCTAAATCGTTGCAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
 CCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAAGCATAAAAGTGTAAGCCTG
 GGGTGCCTAATGGAGTGAGGCTAACTCACATTAAATTGGGGTTGCGGCTCACTGCCC
 GCTTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTCGGGGCCAGCCTGCTTTAATGGAATCCGGCCAA
 CGCCGCGGGGAAAAAGGCGGGTTTTGAGTTAATTGGG

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh2 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing forward primer

>1st_BASE_467901_Sh2_PS_R

GGANTTGTGAACCGTGGATCCGAGTTTCTTTCAAACGAAGTTCAAGAGACTTCGTTTG
AAAGAAACTCTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTTGGT
 TTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGG
 AAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTG
 GCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA
 TGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACAC
 CGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCC
 GACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCG
 CTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
 ATCACC GAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAA
 TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC
 GGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
 AATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
 CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGT
 CCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
 CCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCA
 TTCTCCCGCCCCATGGCTGGACTAAATTTTTTTTATTTATGCAAAAGGCCGAAGGCCG
 CCTCTGCCTCTGAACTATTCCAAAAATAAATGGAGGAGGCTTTTTTTGGAAGGCCTAG
 GGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCCGGGGAGCT

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh2 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing reverse primer

>1st_BASE_467902_Sh3_PS_F

NANGTCGAGTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTAGCGGCCGCATACAAAAAAC
AACACACAGCCCCCTATGAAAATAAAAGATCCTTTATTAAGCTTAAGCCTTGTCAGA
GATGATCCTCTCTTGAAGGATCATCTCTGACAAGGCGGATCCACGGTTCACTAAACC
AGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGG
GCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGCCAAAACAACTCC
CATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAATCCCCGTGAGTCAAACCGCTATCCAC
GCCCATTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGACTAATACGT
AGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGTACTGGGCATAATGCCAGG
CGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTACTTGGCATATGATACACTT
GATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGA
AAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGG
GGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACT
CCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAAGATC
TGGTACCTTGAATTCATGCTTCTCCTCCCTTTAGTGAGGGTAATTCTCTCTCTCCT
ATAGTGAGTCGTATTAATTCCTTCTCTTCTATAGTGTCACCTAAATCGTTGCAATTCGT
AATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC
ATACGAGCCCGGAAGCATAAAAGTGTAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCCGGGAAACCTGCCTG
GCC

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh3 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
sequencing forward primer

>1st_BASE_467903_Sh3_PS_R.ab1

NNNNNNNNNGNNNNNTTNGTGACCGTGNANCGCCTTGTCAGAGATGATCCTTCAAGA
 GAGGATCATCTCTGNC AAGGCTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATC
 TGTGTGTTGGTTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACG
 TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCT
 TTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
 CGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCG
 GTATTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTT
 AAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCT
 CCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAG
 GTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATT
 TTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGG
 GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC
 CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGGTGTGGAAAGTCC
 CCAGGCTCCCCAGCAGGCNAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACC
 AGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCANGCAGAAGTATGCAAAAGCATGCATCT
 CAATTAGTCAGCAACCATAGNCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTTCC
 GCCCAGTTCNCGCCCATNTNCNGCCCCATGGGGTGAACNAATTTTTTTTTTTGATTNTA
 TGCAGAGGGCCNGAGGGCCCGCCNTCGGCCCTCTGGAAGCTATTTCCCAGAANTNAG
 GTGGNNGGAAGGNCTTTTTTTGGGGAAGGCCCTAGGCTTTTNGCAAAAAGNNNNNT
 CCCNNGGGAGCCTTGGGTANTATTCCCNTTNTNTCCNNNNACTCNTNNNNNNNAGAG
 ANNNNNN

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh3 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing reverse primer

>1st_BASE_467904_Sh4_PS_F

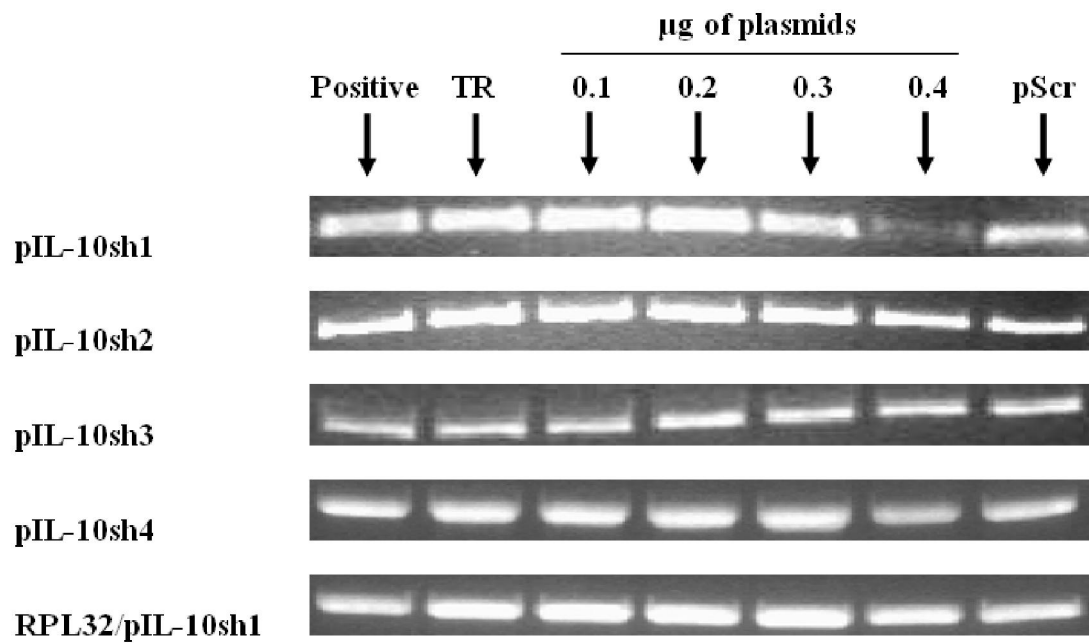
AGCGGCCGCATACAAAAACCAACACACAGATCCAATGAAAATAAAAGATCCTTTA
 TTAAGCTTAAGAGTGCCTTTAGCAAGCTCTCTCTTGAAGAGCTTGCTAAAAGGCACTC
 GGATCCACGGTTCATAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTA
 CCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGAT
 TTTGGTGCCAAAACAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGGAATCCCC
 GTGAGTCAAACCGCTATCCACGCCCATTTGATGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGG
 TAATAGCGATGACTAATACGTAGATGTACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCATAAGGTCA
 TGTACTGGGCATAATGCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCG
 TACTTGGCATATGATACTTGATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTC
 CACCCATTGACGTCAATGGAAAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATT
 ATTGACGTCAATGGGCGGGGGTCGTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTA
 AGTTATGTAACGCGGAACTCCATATATGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGAT
 TACTATTAATAACTAAGATCTGGTACCTTGAATTCATGCTTCTCCTCCCTTTAGTGAG
 GGTAATTCTCTCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCCTTCTCTTCTATAGTGC
 ACCTAAATCGTTGCAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
 CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGGAAAGCCTGGGG
 TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCCCATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
 TCGGGAAACCTGGTCTTTGCCGTTGC

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh4 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing forward primer

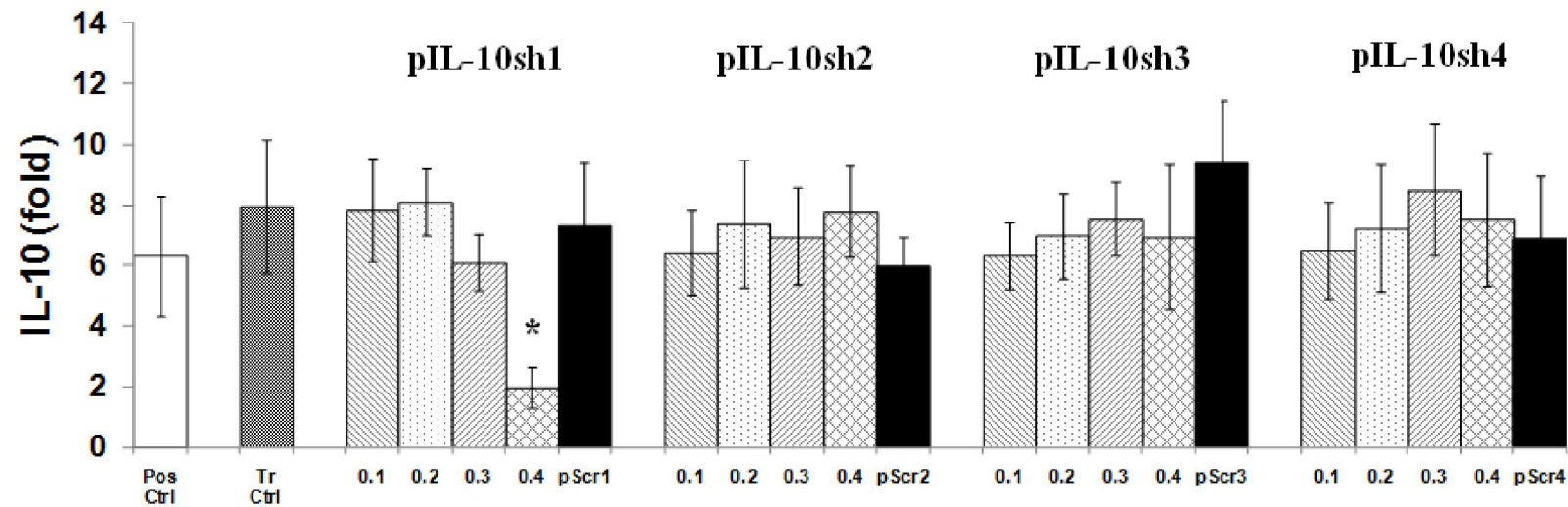
>1st_BASE_467905_Sh4_PS_R

NNGGAGCTGGTTAGTGACCGTGGATCCGAGTGCCTTTTAGCAAGCTCTTCAAGAGAG
AGCTTGCTAAAGGCACTCTTAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGT
 GTGTTGGTTTTTTTGTATGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
 TGA CTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTC
 GCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGC
 AGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
 TTTACACCGCATATGGTGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAG
 CCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCC
 GGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTT
 TTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTT
 ATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGA
 AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
 TCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGGTGTGGAAAGTCCCCAG
 GCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGT
 GTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT
 AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAG
 TTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAAGGCCCG
 AGGCCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGGAGGCTTTTTTTGGG
 AGGCCTAGGGCTTTTTGCAAAAAAGCTCCCGGGGAGCTTTGAA

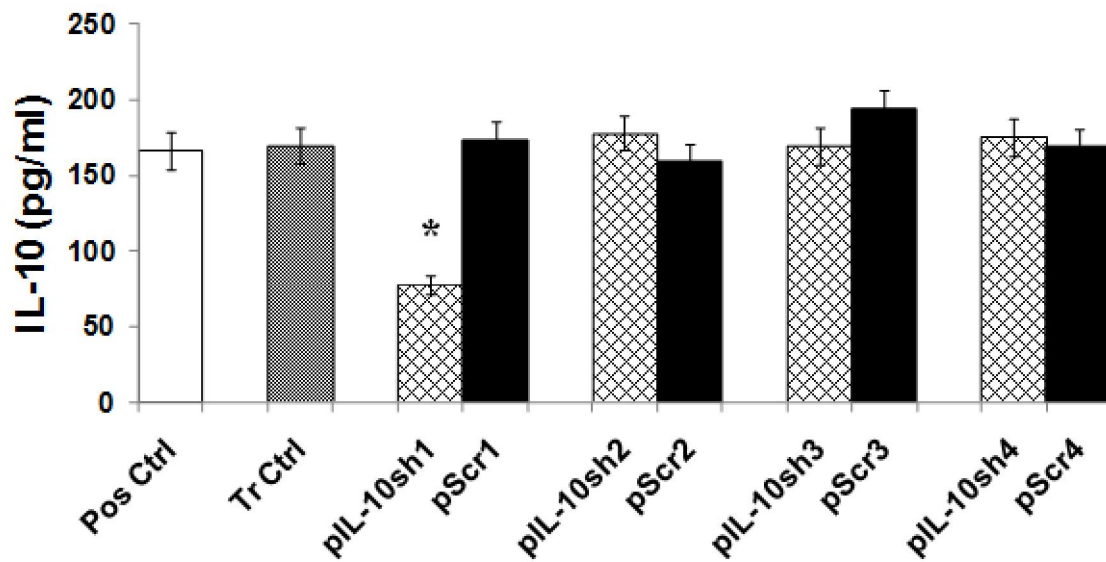
ภาพที่ 1 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pIL-10sh4 หลังการทำ DNA sequencing โดยใช้
 sequencing reverse primer



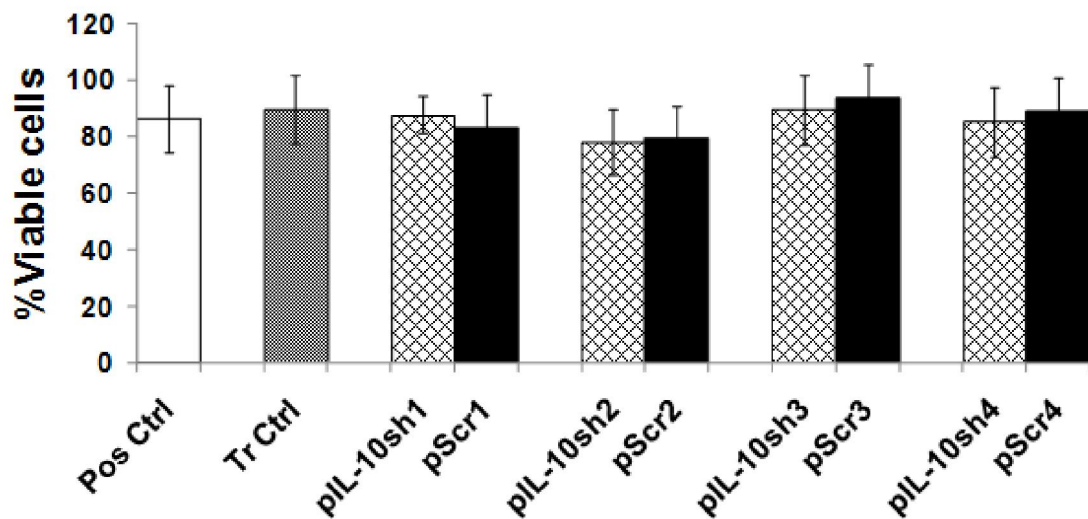
ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน IL-10 และ RPL32 ในโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Positive), LPS ร่วมกับ transfection reagent (TR), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr)



ภาพที่ 3 ระดับการแสดงออกของยีน IL-10 ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ในโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4)



ภาพที่ 4 ปริมาณ IL-10 ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4)



ภาพที่ 5 ร้อยละการมีชีวิตของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และ LPS ร่วมกับ pScr1-4 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1-4)

3. การศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ และไซโตไคน์อื่นๆรวมถึงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ IL-1, IL-12, TNF α , TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 ในโมโนไซต์

โมโนไซต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมมีระดับ IFN γ และ TNF α mRNA (ตารางที่ 5) และโปรตีน (ภาพที่ 6) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ positive control โมโนไซต์ไม่มีการแสดงออกของยีนอื่นๆ ได้แก่ IL-1, IL-12p35, IL-12p40, TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 แตกต่างจากของ positive control (ตารางที่ 5)

4. การศึกษาความสามารถของ pIL-10sh1 ต่อการแสดงออกของ IL-10, IFN γ , IL-1, IL-12, TNF α , TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 ในโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอส

โมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง IL-10 mRNA และโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 7) โมโนไซต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสและ LPS มีระดับการสร้าง IL-10 mRNA และโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ที่ไม่ได้รับ pIL-10sh1 (ภาพที่ 7)

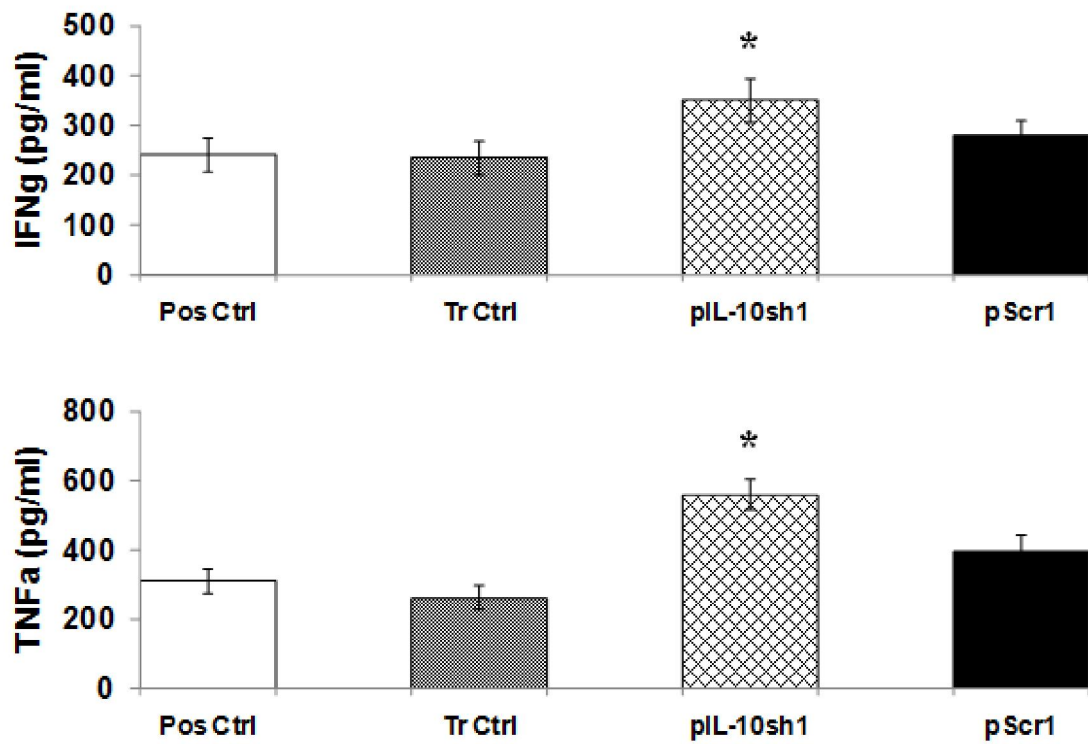
โมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอสและ LPS มีการสร้าง IFN γ และ TNF α mRNA และโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 6) โมโนไซต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 ก่อนบ่มร่วมกับไวรัสและ LPS มีระดับการสร้าง IFN γ และ TNF α mRNA (ตารางที่ 6) และโปรตีน (ภาพที่ 8) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ที่ไม่ได้รับ pIL-10sh1

ไวรัสพาร์อาร์เอสไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน IL-1, IL-12p35, IL-12p40, TGF β , CD80, CD86, TLR2 และ TLR4 (ตารางที่ 6) การ transfection ด้วย pIL-10sh1 ไม่มีผลต่อการแสดงออกของไซโตไคน์และโมเลกุลเหล่านี้ (ตารางที่ 6)

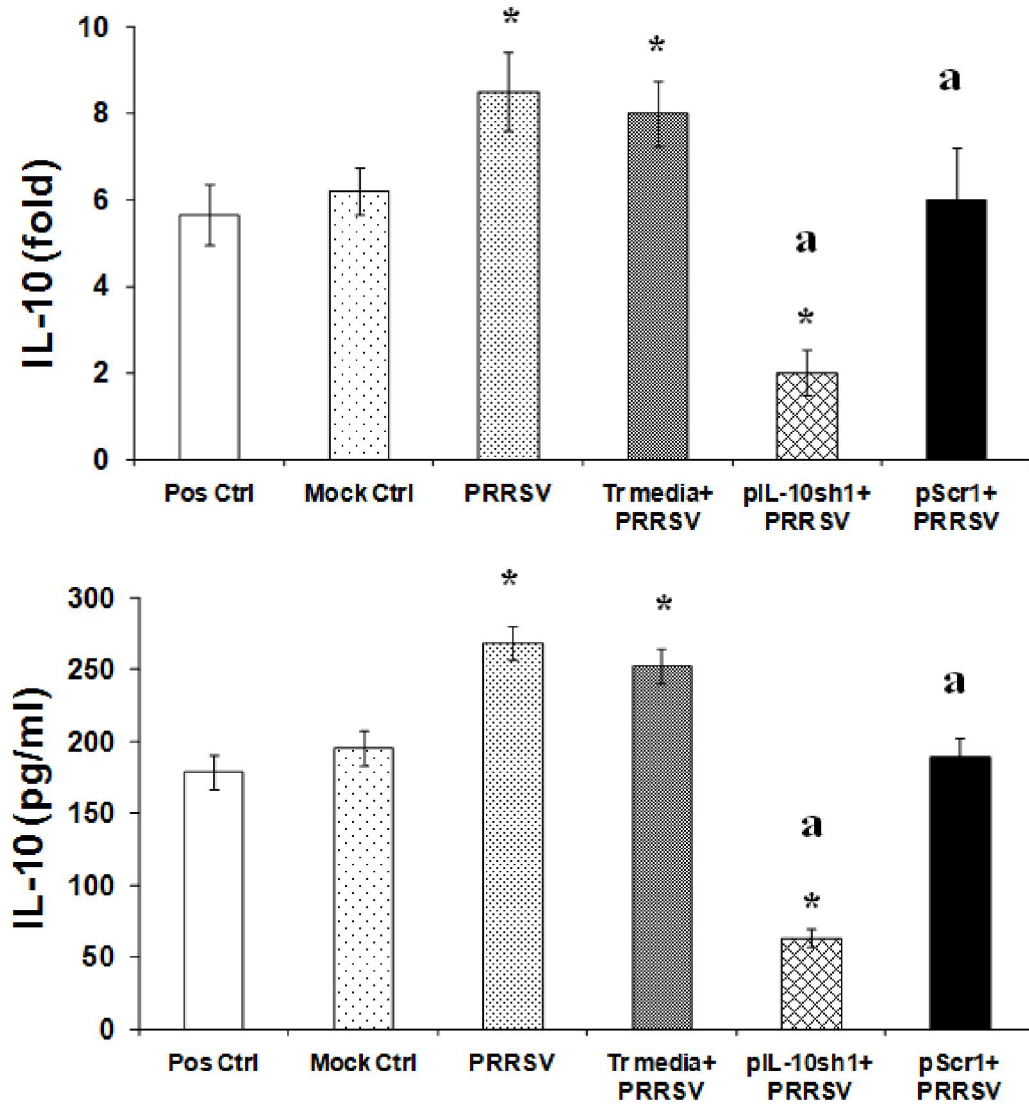
ตารางที่ 5 การแสดงออกระดับ mRNA ของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในโมโนไซต์ที่ได้รับ pIL-10sh1 และถูกกระตุ้นด้วย LPS

Gene	Positive control	Transfection media control	pIL-10sh1	pScr1
IL-1 β	2.29 $\pm$ 0.56	2.19 $\pm$ 0.56	3.18 $\pm$ 0.82	1.98 $\pm$ 0.45
IL-12p35	2.69 $\pm$ 0.41	2.55 $\pm$ 0.63	2.85 $\pm$ 0.78	2.75 $\pm$ 0.84
IL-12p40	2.35 $\pm$ 0.55	2.47 $\pm$ 0.43	2.58 $\pm$ 0.81	2.55 $\pm$ 0.65
TNF α	2.31 $\pm$ 0.78	2.10 $\pm$ 0.60	4.46 $\pm$ 0.84*	3.29 $\pm$ 0.46
IFN γ	4.94 $\pm$ 1.62	4.81 $\pm$ 1.45	7.20 $\pm$ 1.98*	5.75 $\pm$ 1.64
TGF β	2.13 $\pm$ 0.74	2.34 $\pm$ 0.41	2.82 $\pm$ 0.84	2.65 $\pm$ 0.76
CD80	1.56 $\pm$ 0.35	1.64 $\pm$ 0.54	3.85 $\pm$ 0.78	2.48 $\pm$ 0.44
CD86	1.32 $\pm$ 0.67	1.20 $\pm$ 0.38	1.53 $\pm$ 0.49	1.21 $\pm$ 0.42
TLR2	1.55 $\pm$ 0.57	1.51 $\pm$ 0.63	1.93 $\pm$ 0.49	2.04 $\pm$ 0.87
TLR4	1.74 $\pm$ 0.41	1.83 $\pm$ 0.68	1.81 $\pm$ 0.84	1.66 $\pm$ 0.55

สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ positive control



ภาพที่ 6 ปริมาณ IFN γ และ TNF α ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pIL-10sh1) และ LPS ร่วมกับ pScr1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (pScr1)



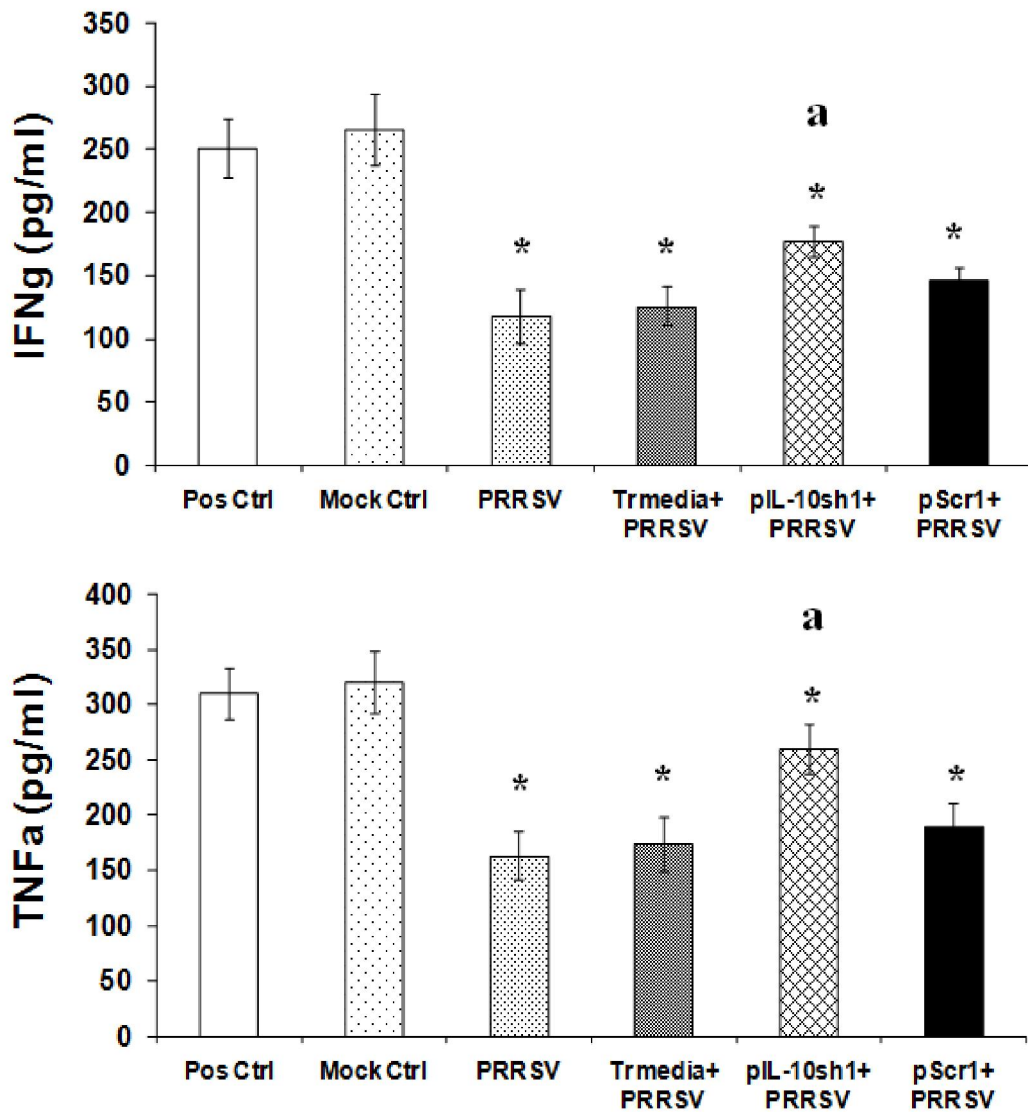
ภาพที่ 7 ระดับการแสดงออกของยีน IL-10 ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 และปริมาณ IL-10 ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ mock antigen (Mock Ctrl), LPS ร่วมกับไวรัสพอร์อาร์เอส (PRRSV), LPS ร่วมกับ transfection reagent และไวรัสพอร์อาร์เอส (Tr media+PRRSV), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และไวรัสพอร์อาร์เอส (pIL-10sh1+PRRSV) และ LPS ร่วมกับ pScr1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม และไวรัสพอร์อาร์เอส (pScr1+PRRSV) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Pos Ctrl อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV

ตารางที่ 6 การแสดงออกระดับ mRNA ของไซโตไคน์และโมเลกุลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในโมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพาร์อาร์เอสและได้รับ pIL-10sh1 และ LPS

Gene	Positive control	Mock	PRRSV	Tr media +PRRSV	pIL-10sh1 +PRRSV	pScr1 +PRRSV
IL-1 β	2.87 $\pm$ 0.62	2.63 $\pm$ 0.74	2.25 $\pm$ 0.45	2.23 $\pm$ 0.44	3.23 $\pm$ 0.77	2.31 $\pm$ 0.63
IL-12p35	2.91 $\pm$ 0.53	2.73 $\pm$ 0.71	2.37 $\pm$ 0.55	2.39 $\pm$ 0.62	2.98 $\pm$ 0.83	2.77 $\pm$ 0.67
IL-12p40	2.57 $\pm$ 0.47	2.64 $\pm$ 0.45	2.28 $\pm$ 0.56	2.33 $\pm$ 0.52	2.61 $\pm$ 0.41	2.51 $\pm$ 0.37
TNF α	2.43 $\pm$ 0.45	2.51 $\pm$ 0.53	1.59 $\pm$ 0.38*	1.57 $\pm$ 0.32*	2.69 $\pm$ 0.39 ^a	2.12 $\pm$ 0.37
IFN γ	4.73 $\pm$ 0.78	4.89 $\pm$ 0.85	2.41 $\pm$ 0.56*	2.64 $\pm$ 0.59*	4.16 $\pm$ 0.82 ^a	3.53 $\pm$ 0.72
TGF β	2.34 $\pm$ 0.54	2.41 $\pm$ 0.36	2.62 $\pm$ 0.47	2.53 $\pm$ 0.73	2.48 $\pm$ 0.51	2.66 $\pm$ 0.64
CD80	1.91 $\pm$ 0.33	1.96 $\pm$ 0.57	1.36 $\pm$ 0.42	1.45 $\pm$ 0.55	2.16 $\pm$ 0.64	1.51 $\pm$ 0.67
CD86	1.45 $\pm$ 0.25	1.53 $\pm$ 0.28	1.26 $\pm$ 0.27	1.29 $\pm$ 0.35	1.56 $\pm$ 0.28	1.42 $\pm$ 0.27
TLR2	1.58 $\pm$ 0.27	1.67 $\pm$ 0.25	1.46 $\pm$ 0.29	1.59 $\pm$ 0.27	1.83 $\pm$ 0.32	1.76 $\pm$ 0.28
TLR4	1.67 $\pm$ 0.33	1.64 $\pm$ 0.51	1.74 $\pm$ 0.38	1.65 $\pm$ 0.47	1.87 $\pm$ 0.42	1.56 $\pm$ 0.52

สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ positive control

อักษร a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ PRRSV



ภาพที่ 8 ปริมาณ IFN γ และ TNF α ใน cell culture supernatant ของโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ mock antigen (Mock Ctrl), LPS ร่วมกับไวรัสพ็อราร์อาร์เอส (PRRSV), LPS ร่วมกับ transfection reagent และไวรัสพ็อราร์อาร์เอส (Tr media+PRRSV), LPS ร่วมกับ pIL-10sh1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมและไวรัสพ็อราร์อาร์เอส (pIL-10sh1+PRRSV) และ LPS ร่วมกับ pScr1 ที่ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัมและไวรัสพ็อราร์อาร์เอส (pScr1+PRRSV) สัญลักษณ์ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ Pos Ctrl อักษร a แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ PRRSV

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

พลาสมิด pIL-10sh1 เป็นพลาสมิดที่สามารถแสดงออก IL-10 siRNA ที่จำเพาะกับ IL-10 mRNA ของสุกรและมีประสิทธิภาพในการควบคุมการแสดงออกของ IL-10 mRNA และโปรตีนของโมโนไซต์ของสุกรได้

ประสิทธิภาพการควบคุมการสร้าง IL-10 ของ pIL-10sh1 ไม่ได้เกิดจากการที่พลาสมิดทำให้โมโนไซต์ของสุกรตายหลังการ transfection เพราะร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตหลังได้รับ pIL-10sh1 ไม่แตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับพลาสมิด

ประสิทธิภาพการควบคุมการสร้าง IL-10 ของ pIL-10sh1 น่าจะเกิดจากกลไก RNA interference ภายในเซลล์โมโนไซต์ คือ IL-10 siRNA ที่สร้างโดย pIL-10sh1 จับกับ IL-10 mRNA และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง dsRNA จากนั้น dsRNA ถูกตัดทำลายโดยเอนไซม์ dicer ทำให้ IL-10 mRNA ถูกตัดและทำให้ไม่มีต้นแบบที่สมบูรณ์สำหรับการสร้าง IL-10 โปรตีน

พลาสมิด pIL-10sh1 นอกจากจะช่วยควบคุมการสร้าง IL-10 ในโมโนไซต์แล้ว ยังช่วยกระตุ้นการสร้าง IFN γ และ TNF α mRNA และโปรตีนด้วย การกระตุ้นดังกล่าวไม่ได้เกิดจากตัวพลาสมิดเองเพราะพลาสมิดควบคุม pScrl ไม่ได้กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ทั้งสองนี้ การเพิ่มขึ้นของ IFN γ และ TNF α น่าจะเป็นผลมาจากการลดลงของ IL-10 เพราะ IL-10 มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง IFN γ และ TNF α ได้ (de Waal Malefyt et al., 1991; Moore et al., 2001)

พลาสมิด pIL-10sh1 เมื่อนำไป transfect โมโนไซต์ที่บ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสช่วยลดระดับการสร้าง IL-10 mRNA และโปรตีนลงได้อย่างมีนัยสำคัญและพลาสมิดยังช่วยกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ IFN γ และ TNF α ในโมโนไซต์ด้วย

การที่ pIL-10sh1 สามารถช่วยลดระดับการสร้าง IL-10 และช่วยกระตุ้นการสร้าง IFN γ และ TNF α ในโมโนไซต์ของสุกรที่บ่มร่วมกับไวรัสพรีอาร์อาร์เอสทำให้เป็นไปได้ที่ว่า pIL-10sh1 จะถูกใช้เพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ของสุกรต่อเชื้อไวรัสพรีอาร์อาร์เอส ซึ่งภูมิคุ้มกันดังกล่าวจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการลดระดับความรุนแรงของโรคนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bautista, E.M. and T.W. Molitor. 1999. IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. **Arch Virol.** 144(6):1191-200.
- Charerntantanakul, W., R. Platt and J.A. Roth. 2006a. Effects of porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. **Viral Immunol.** 19(4):646-661.
- Charemtantanakul, W., R. Platt, W. Johnson, M. Roof, E. Vaughn and J.A. Roth. 2006b. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet Immunol Immunopathol.** 109(1-2):99-115.
- Charemtantanakul, W and W. Kasinrerk. 2010. Interleukin-10 antisense oligodeoxynucleotide suppresses IL-10 expression and effects on pro-inflammatory cytokine responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Viral Immunol.** 23(4):425-435.
- Chiou, M.T., C.R. Jeng, L.L. Chueh, C.H. Cheng and V.F. Pang. 2000. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. **Vet Microbiol.** 71:9-25
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med.** 174:1209-20.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber and T. Tuschl. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods.** 26(2):199-213.
- Halbur, P.G., P.S. Paul, M.L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X.J. Meng, et al. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. **Vet Pathol.** 32:648-60
- Halbur, P.G., P.S. Paul, M.L. Frey, J. Landgraf, K. Eernisse, X.J. Meng, et al. 1996. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. **Vet Pathol.** 33:159-70
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. **Nature.** 418(6894):244-51.
- Mengeling, W.L., K.M. Lager and A.C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. **Am J Vet Res.** 59:1540-4
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** 19:683-765.
- Rossow, K.D., E.M. Bautista, S.M. Goyal, T.W. Molitor, M.P. Murtaugh, R.B. Morrison, D.A.

- Benfield and J.E. Collins. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. **J Vet Diagn Invest.** 6, 3-12.
- Rowland, R.R., B. Robinson, J. Stefanick, T.S. Kim, L. Guanghua, S.R. Lawson and D.A. Benfield. 2001. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. **Arch Virol.** 146, 539-55.
- Royae, A.R., R.J. Husmann, H.D. Dawson, G. Calzada-Nova, W.M. Schnitzlein, F.A. Zuckermann, et al. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. **Vet Immunol Immunopathol.** 102:199-216
- Thanawongnuwech, R., E.L. Thacker and P.G. Halbur. 1997. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). **Vet Immunol Immunopathol.** 59:323-35
- Thacker, E.L. 2001. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** 17, 551-65.
- Thacker, E.L., P.G. Halbur, P.S. Paul and B.J. Thacker. 1998. Detection of intracellular porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in porcine macrophages by flow cytometry. **J Vet Diagn Invest.** 10:308-11
- van der Linden, I.F., J.J. Voermans, E.M. van der Linde-Bril, A.T. Bianchi and P.J. Steverink. 2003. Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. **Vaccine.** 21:1952-7
- Voicu, I.L., A. Silim, M. Morin and M.A. Elazhary. 1994. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. **Vet Rec.** 134:422-3
- Waters, W.R., R.E. Sacco, A.D. Dorn, R. Hontecillas, F.A. Zuckermann and M.J. Wannemuehler. 1999. Systemic and mucosal immune responses of pigs to parenteral immunization with a pepsin-digested *Serpulina hyodysenteriae* bacterin. **Vet Immunol Immunopathol.** 69(1):75-87.

- Yoon, K.J., L.L. Wu, J.J. Zimmerman, H.T. Hill and K.B. Platt. 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. **Viral Immunol.** 9:51-63
- Zhang, X., N. Stieber and M.S. Rutherford. 2005. An interfering RNA protocol for primary porcine alveolar macrophages. **Anim Biotechnol.** 16(1):31-40.



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการประเมินประสิทธิภาพของพลาสมิดที่สร้างอินเตอร์ลิวคิน-10 Small Interfering RNA ในการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบใช้เซลล์ต่อเชื้อไวรัส Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome ของสุกร (Evaluation of Plasmid Expressing Interleukin-10 Small Interfering RNA in Induction of Cell-Mediated Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2552 ผู้วิจัย ขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเรณูแก้ว ประพฤติ ที่ช่วยเหลือเรื่องการทำปฏิบัติการและการใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ผู้วิจัย





การเตรียมสารละลายต่างๆ

การเตรียมสารละลาย PBS

NaCl	8 กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.25 กรัม
KCl	0.2 กรัม
dH ₂ O	800 มล.

หยด 1N HCl เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มล.
นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autoclave)

การเตรียมสารละลาย EDTA

EDTA	7.2 กรัม
dH ₂ O	400 มล.

หยด 1N NaOH เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.5 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 500 มล.
นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน

การเตรียม RBC lysis buffer

NH ₄ Cl	8.02 กรัม
NaHCO ₃	0.84 กรัม
EDTA	0.37 กรัม
dH ₂ O	950 มล.

หยด 1N NaOH เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มล.
นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI⁺⁺

RPMI-1640	1 ซอง (10.4 กรัม)
Na ₂ HPO ₄	2 กรัม
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	10 มล.
Heat-inactivated fetal bovine serum	100 มล.

dH₂O

800 มล.

หยด 1N HCl เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มล.

นำไปกรองผ่านเครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 0.22 ไมครอน)

การเตรียมสารละลาย PBS+5 mM EDTA

NaCl

8 กรัม

Na₂HPO₄

1.44 กรัม

KH₂PO₄

0.25 กรัม

KCl

0.2 กรัม

EDTA

1.86 กรัม

dH₂O

800 มล.

หยด 1N HCl เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.5 จากนั้นปรับปริมาตรรวมให้เป็น 1,000 มล.

นำไปบ่มนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน

