



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การหาลำดับและศึกษาประสิทธิภาพของ antisense oligodeoxynucleotide ที่จำเพาะต่อ transforming growth factor beta ของสุกร
Sequence determination and efficacy evaluation of antisense oligodeoxynucleotide specific for porcine transforming growth factor beta

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2555

จำนวน 200,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นายวศิน เจริญตันธนกุล

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

24 ธันวาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การหาลำดับและศึกษาประสิทธิภาพของ antisense oligodeoxynucleotide ที่จำเพาะต่อ transforming growth factor beta ของสุกร (Sequence Determination and Efficacy Evaluation of Antisense Oligodeoxynucleotide Specific for Porcine Transforming Growth Factor Beta) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2555 ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเรือนแก้ว ประพฤติ ที่ช่วยเหลือเรื่องการทำปฏิบัติการและการใช้อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	๗
สารบัญภาพ	๘
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	5
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	18
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	24

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ TGF β AS-ODN และ Scramble ODN	15
ตารางที่ 2 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ TGF β AS-ODN ในการยับยั้งการสร้าง TGF β	17
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ของยีนที่ศึกษา	18

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน TGF β ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ใน
โมโนซัยต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent
(Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ TGF β AS-ODN ที่ปริมาณ 0.5, 1 และ 2 μ M
และ LPS ร่วมกับ Scr ที่ปริมาณ 2 μ M เครื่องหมาย * แสดงถึงความ
แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ Pos Ctrl

21

ภาพที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของโมโนซัยต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl) LPS
ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl) LPS ร่วมกับ TGF β AS-ODN
ที่ปริมาณ 2 μ M และ LPS ร่วมกับ Scr ที่ปริมาณ 2 μ M

22

**การหาลำดับและศึกษาประสิทธิภาพของ antisense oligodeoxynucleotide ที่จำเพาะต่อ
transforming growth factor beta ของสุกร**

**Sequence determination and efficacy evaluation of antisense oligodeoxynucleotide
specific for porcine transforming growth factor beta**

วสิน เจริญตันธนกุล

Wasin Charerntantanakul

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็น antisense oligodeoxynucleotides (AS-ODN) ที่จำเพาะกับ transforming growth factor beta (TGFβ) ของสุกร เพื่อลด (knock down) การแสดงออกของ TGFβ ในเซลล์โมโนซัยต์ของสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ผลการศึกษาพบว่า TGFβ AS-ODN ที่จำเพาะกับตำแหน่ง 2172-2191 (AS1) ของ TGFβ mRNA สามารถลดการแสดงออกของ TGFβ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ที่ระดับ 2 μM ในขณะที่เมื่อใช้ที่ระดับ 0.5 และ 1 μM สามารถช่วยลดระดับการแสดงออกของ TGFβ mRNA ได้บ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ TGFβ AS-ODN ที่จำเพาะกับตำแหน่ง 2844-2863 (AS2) เมื่อใช้ที่ระดับ 0.5, 1 และ 2 μM ช่วยลดระดับการแสดงออกของ TGFβ mRNA ได้บ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาในอนาคตในเรื่องบทบาทของ TGFβ ต่อกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกร โดยสามารถศึกษาผลที่เกิดขึ้นจากการลดลงของระดับ TGFβ เช่น การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ต่างๆ และโมเลกุลต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันของสุกร

คำสำคัญ: antisense oligodeoxynucleotides transforming growth factor beta สุกร

Abstract

This research investigates the proper antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) sequence specific for transforming growth factor beta (TGF β) mRNA of the pig. Results showed that AS-ODN specific for the position 2172-2191 (AS1) of porcine TGF β mRNA was able to knock down significantly TGF β mRNA expression when used at 2 μ M. When used at 0.5 and 1 μ M, the AS1, however, could only reduce slightly TGF β mRNA expression. The AS-ODN specific for the position 2844-2863 (AS2) of porcine TGF β mRNA, on the other hand, could not reduce significantly TGF β mRNA expression when used at either 0.5, 1 or 2 μ M. Findings of this study will be useful for future investigation on the role of TGF β on porcine immune system. This can be done by observing the modulation of other cytokines and immunological molecules in response to the reduced level of TGF β .

Key words: antisense oligodeoxynucleotides, transforming growth factor beta, pig

คำนำ

ปัจจุบันองค์ความรู้พื้นฐานด้านวิทยาภูมิคุ้มกันของสุกรยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด สุกรมีไซโตไคน์ (cytokine) หลายชนิดเหมือนมนุษย์ แต่หน้าที่ของไซโตไคน์นั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน

ในมนุษย์ ไซโตไคน์ transforming growth factor beta ($TGF\beta$) เป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammation) และช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย (tissue remodeling) ไซโตไคน์นี้ถูกสร้างโดยเม็ดเลือดขาวจำพวกโมโนไซต์ (monocyte) แมคโครฟาจ (macrophage) นิวโทรฟิล (neutrophil) และทีลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) และเซลล์เยื่อบุต่างๆ (epithelial cell) ไซโตไคน์ $TGF\beta$ มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ส่งเสริมกระบวนการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) หลายชนิด เช่น interleukin-1 (IL-1), tumor-necrosis factor alpha ($TNF\alpha$) และ interferon gamma (IFN γ) เป็นต้น ฤทธิ์ของไซโตไคน์ $TGF\beta$ ยังไม่เคยมีการศึกษาในสุกร

RNA interference (RNAi) เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ใช้สำหรับการศึกษาน้ำที่ของยีน โดยการ knock down การแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาโดยทำให้เกิด mRNA degradation หรือโดยการยับยั้งการแปลรหัสโปรตีนของยีนโดยไรโบโซม (translational repression)

Antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) เป็นเครื่องมือหนึ่งของเทคโนโลยี RNAi ที่ใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับ mRNA ของยีนเป้าหมายเพื่อจับกับและกระตุ้นการทำลาย mRNA นั้นโดยเอนไซม์ Rnase H ส่งผลทำให้ไม่มี mRNA ที่สมบูรณ์ของยีนเป้าหมายสำหรับการสร้างโปรตีน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์ AS-ODN ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ $TGF\beta$ ของสุกร เพื่อใช้ knock down การแสดงออกของยีน ข้อมูลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่สำหรับการวิจัยต่อเนื่องในเรื่องหน้าที่ของ $TGF\beta$ ในสุกร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์ $TGF\beta$ AS-ODN ที่มีความจำเพาะต่อ $TGF\beta$ mRNA ของสุกร
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ (transfection) ของ $TGF\beta$ AS-ODN
3. เพื่อศึกษาความสามารถของ $TGF\beta$ AS-ODN ในการยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ $TGF\beta$

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. องค์ความรู้ใหม่ด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของสุกร

TGF β AS-ODN ที่มีความจำเพาะต่อ TGF β mRNA ของสุกรจะช่วยควบคุมระดับการสร้าง TGF β ในสุกร ทำให้นักวิจัยสามารถศึกษาถึงผลต่อเนื่องที่เกิดขึ้นจากการควบคุมการแสดงออกของ TGF β นั้นต่อการแสดงออกของไซโตไคน์อื่น ๆ รวมถึงโมเลกุลต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของสุกร

2. การเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ

ผลงานที่ได้จากงานวิจัยนี้จะถูกตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนานาชาติที่มี impact factor ซึ่งขณะนี้อยู่ในระหว่างการเตรียมต้นฉบับ

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันสุกรถูกใช้เป็น โมเดล (model) สำหรับการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์หลายแขนง เช่น การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ การศึกษาโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคตับ และโรคกระดูกและข้อ เป็นต้น (Gock et al., 2011; Nishida et al., 2010) ทั้งนี้เนื่องจากสุกรมีสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อหลายประการที่คล้ายคลึงกับของมนุษย์

อย่างไรก็ตามองค์ความรู้พื้นฐานทางสรีรวิทยาของสุกรหลายประการที่จำเป็นกับการศึกษาต่อเนื่องในมนุษย์ยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด องค์ความรู้เหล่านี้ เช่น องค์ความรู้ด้านวิทยาภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ การแสดงออกของ adhesion molecules และกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เป็นต้น

องค์ความรู้พื้นฐานเหล่านี้นอกจากจะเป็นประโยชน์กับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้วยังมีความสำคัญทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์ด้วย โดยช่วยอธิบายถึงพยาธิกำเนิดของโรคและอาจรวมถึงการป้องกันโรคในสุกร ทั้งนี้เพราะโรคติดเชื้อในสุกรหลายโรคมีการเปลี่ยนแปลงของระดับไซโตไคน์ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่ออาการทางคลินิกที่แตกต่างกัน (Charemontanakul et al., 2006; Charemontanakul and Kasinrer, 2010; Summerfield et al., 2009)

ในมนุษย์ ไซโตไคน์ TGF β เป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบและช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย (Mantel and Schmidt-Weber, 2011) ไซโตไคน์นี้ถูกสร้างโดยเม็ดเลือดขาวจำพวกโมโนไซต์ แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล และทีลิมโฟไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์กระดูก

อ่อนและเซลล์เชื้อต่างๆ (Mantel and Schmidt-Weber, 2011) ไซโตไคน์ TGF β มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ส่งเสริมการอักเสบหลายชนิด เช่น IL-1, TNF α และ IFN γ เป็นต้น (Mantel and Schmidt-Weber, 2011) ฤทธิ์ของไซโตไคน์ TGF β ยังไม่เคยมีการศึกษาในสุกร

RNA interference (RNAi) เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ใช้สำหรับการศึกษาหน้าที่ของยีน โดยการ knock down การแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษาโดยทำให้เกิด mRNA degradation หรือโดยการยับยั้งการแปลรหัสโปรตีนของยีนโดยไรโบโซม (translational repression) (Ketting, 2011)

Antisense oligodeoxynucleotide (AS-ODN) เป็นเครื่องมือหนึ่งของเทคโนโลยี RNAi ที่ใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 19-21 นิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับ mRNA ของยีนเป้าหมายเพื่อจับกับและกระตุ้นการทำลาย mRNA นั้นโดยเอนไซม์ Rnase H ส่งผลทำให้ไม่มี mRNA ที่สมบูรณ์ของยีนเป้าหมายสำหรับการสร้างโปรตีน (Xu and Anchordoquy, 2011)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไซโตไคน์ TGF β ของสุกรเพื่อการศึกษาในเชิงลึกในอนาคต โดยงานวิจัยนี้สังเคราะห์ AS-ODN ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ TGF β ของสุกร เพื่อใช้ knock down การแสดงออกของยีนดังกล่าว

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 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาดต่างๆ ขวดรูปชมพู่ (flask) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipette) และแท่งแก้วคนสาร (stirrer) เป็นต้น

23. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ หลอดทดลองขนาดต่างๆ ซ้อนดักสาร กระดาษชั่งสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษทิชชู ถุงพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระดาษพาราฟิล์ม ถุงมือ และกรรไกร เป็นต้น

สารเคมี

1. Optimem (Gibco, Grand Island, NY)

2. MATra-A (IBA GmbH, Germany)

3. IBAdfect (IBA GmbH, Germany)

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Herdchek®, IDEXX, Westbrook, ME)

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 (Na₂HPO₄) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)

8. Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)

9. Potassium chloride (KCl) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)

10. Deionized water (dH₂O)

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 (NH₄Cl) (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 $\text{TGF}\beta$ และ RPL32
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. Primary mouse anti-SWC3 monoclonal antibodies (clone 74-22-15, isotype IgG1, Southern Biotech, Birmingham, AL)
33. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

วิธีการทดลอง

1. การสังเคราะห์ $\text{TGF}\beta$ AS-ODN ที่มีความจำเพาะต่อ $\text{TGF}\beta$ mRNA ของสุกร
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ $\text{TGF}\beta$ mRNA (NM_214015.1) ซึ่งใช้เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ $\text{TGF}\beta$ AS-ODN มีดังนี้

LOCUS NM_214015 3206 bp mRNA linear MAM 15-DEC-2013

DEFINITION *Sus scrofa* transforming growth factor, beta 1 (TGFB1), mRNA.

ACCESSION NM_214015

VERSION NM_214015.1 GI:55741796

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE *Sus scrofa* (pig)

ORGANISM *Sus scrofa*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Yi,S., Pierucci-Alves,F. and Schultz,B.D.

TITLE Transforming growth factor-beta1 impairs CFTR-mediated anion secretion across cultured porcine vas deferens epithelial monolayer via the p38 MAPK pathway

JOURNAL Am. J. Physiol., Cell Physiol. 305 (8), C867-C876 (2013)

PUBMED 23903699

REMARK GeneRIF: TGF-beta1, via TGF-beta1 receptor I and p38 MAPK signaling, reduces CFTR expression to impair CFTR-mediated anion secretion, which would likely compound the effects associated with mild CFTR mutations and ultimately would compromise male fertility.

REFERENCE 2 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Sibiya,S.J., Olivier,E.I. and Duneas,N.

TITLE High yield isolation of BMP-2 from bone and in vivo activity of a combination of BMP-2/TGF-betaI

JOURNAL J Biomed Mater Res A 101 (3), 641-646 (2013)

PUBMED 22927042

REMARK GeneRIF: High yield isolation of BMP-2 from bone and in vivo activity of a combination of BMP-2/TGF-betaI.

REFERENCE 3 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Jiwakanon,J. and Dalin,A.M.

TITLE Short communication: Concentration of TGF-beta1, IL-10 and IL-6 in boar seminal plasma and TGF-betaI level in different fractions of ejaculates

JOURNAL Anim. Reprod. Sci. 131 (3-4), 194-198 (2012)

PUBMED 22482797

REMARK GeneRIF: Boar seminal plasma contained TGF- beta1 and IL-10 but with high individual variation.

REFERENCE 4 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Liska,V., Treska,V., Mirka,H., Kobr,J., Sykora,R., Skalicky,T., Sutnar,A., Vycital,O., Bruha,J., Pitule,P., Chlumska,A., Racek,J., Benes,J. and Holubec,L.

TITLE Inhibition of transforming growth factor beta-1 augments liver regeneration after partial portal vein ligation in a porcine experimental model

JOURNAL Hepatogastroenterology 59 (113), 235-240 (2012)

PUBMED 22251543

REMARK GeneRIF: Inhibition of transforming growth factor beta-1 augments liver regeneration after partial portal vein ligation in a porcine experimental model.

REFERENCE 5 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Li,C. and Gotlieb,A.I.

TITLE Transforming growth factor-beta regulates the growth of valve interstitial cells *in vitro*

JOURNAL Am. J. Pathol. 179 (4), 1746-1755 (2011)

PUBMED 21851806

REMARK GeneRIF: TGF-beta prevents excessive heart valve growth under normal physiological conditions while it promotes cell proliferation in the early stages of repair.

REFERENCE 6 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Yerle,M., Archibald,A.L., Dalens,M. and Gellin,J.

TITLE Localization of the PGD and TGF beta-1 loci to pig chromosome 6q

JOURNAL Anim. Genet. 21 (4), 411-417 (1990)

PUBMED 2090012

REFERENCE 7 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Kondaiah,P., Van Obberghen-Schilling,E., Ludwig,R.L., Dhar,R., Sporn,M.B. and Roberts,A.B.

TITLE cDNA cloning of porcine transforming growth factor-beta 1 mRNAs. Evidence for alternate splicing and polyadenylation

JOURNAL J. Biol. Chem. 263 (34), 18313-18317 (1988)

PUBMED 2461367

REFERENCE 8 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Jakowlew,S.B., Dillard,P.J., Sporn,M.B. and Roberts,A.B.

TITLE Nucleotide sequence of chicken transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1)

JOURNAL Nucleic Acids Res. 16 (17), 8730 (1988)

PUBMED 3166520

REFERENCE 9 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Derynck,R. and Rhee,L.

TITLE Sequence of the porcine transforming growth factor-beta precursor

JOURNAL Nucleic Acids Res. 15 (7), 3187 (1987)

PUBMED 3470708

REFERENCE 10 (bases 1 to 3206)

AUTHORS Cheifetz,S., Weatherbee,J.A., Tsang,M.L., Anderson,J.K., Mole,J.E., Lucas,R. and Massague,J.

TITLE The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors

JOURNAL Cell 48 (3), 409-415 (1987)

PUBMED 2879635

COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from M23703.1.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Gene record to access additional publications.

##Evidence-Data-START##

Transcript exon combination :: M23703.1 [ECO:0000332]

##Evidence-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3206

/organism="Sus scrofa"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:9823"

/chromosome="6"

```

        /map="6"
gene      1..3206
        /gene="TGFB1"
        /gene_synonym="TGF-BETA-1"
        /note="transforming growth factor, beta 1"
        /db_xref="GeneID:397078"
misc_feature 765..767
        /gene="TGFB1"
        /gene_synonym="TGF-BETA-1"
        /note="upstream in-frame stop codon"
CDS       906..2078
        /gene="TGFB1"
        /gene_synonym="TGF-BETA-1"
        /note="transforming growth factor-beta-1; Transforming growth factor beta-1;
transforming growth factor, beta 1
        (Camurati-Engelmann disease)"
        /codon_start=1
        /product="transforming growth factor beta-1 precursor"
        /protein_id="NP_999180.1"
        /db_xref="GI:55741797"
        /db_xref="GeneID:397078"
        /translation="MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKRK
RIEAIRGQILSKLRLASPPSQGDVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESVEPEPEPEAD
YYAKEVTRVLMVESGNQIYDKFKGTPHSLYMLFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRL
KLKVEQHVELYQKYSNDSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLTRREAIEGFR
LSAHCSCDSKDNTHVEINGFN SGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLHSSRH
RRALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS"
sig_peptide 906..992
        /gene="TGFB1"

```

```

    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
    /inference="COORDINATES: ab initio prediction:SignalP:4.0"
misc_feature 993..1127
    /gene="TGFB1"
    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
    /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
    /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07200.1);
    Region: Straightjacket domain"
misc_feature 1128..1718
    /gene="TGFB1"
    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
    /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
    /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07200.1);
    Region: Arm domain"
misc_feature 1635..1643
    /gene="TGFB1"
    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
    /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
    /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07200.1);
    Region: Cell attachment site"
mat_peptide 1740..2075
    /gene="TGFB1"
    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
    /product="Transforming growth factor beta-1"
    /experiment="experimental evidence, no additional details recorded"
    /note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P07200.1)"
polyA_signal 3186..3191
    /gene="TGFB1"
    /gene_synonym="TGF-BETA-1"
polyA_site 3206

```

/gene="TGFB1"

/gene_synonym="TGF-BETA-1"

ORIGIN

1 cagccgccgc cgcgccctt cgcgccgcgc ttcgtccac cccctctc cgcgccgga
 61 tccaccagac agctaggccc cggccgggg gcagggggga cccccctc ggggcacccc
 121 ccggctcgga gccgcctcgc gggccagcct cagccagaag aggaggaaga agccgccgag
 181 gagcagccc aggccccagg gtctgaggcg agccgcgcc ccccgccgc cgcgccgcc
 241 gccgctcgg ggaggagggg gaggaggagc gggaggagg acgagctggt tgggagaaga
 301 ggaaaaaag tttgagact ttccgctgc cgctgggagc ccgaggcgcg gggaccgttc
 361 gcgcagcgt cccccgcgag gcaggacttg gggacccag accgcacct accaccgct
 421 cggacgttg ctccctccc gcccctcgc cggcgttcc taggtgccc cattccggac
 481 ctgccgtcg gagccgaaa ccgactccc gcgaagactt gacccaaaag ctggggcgca
 541 cccccctga cactcccca ctctcagcct ctctgtgag cccctgcga tccaaggacc
 601 cttctcgga cgggagacg gaattgtct cagacctgcc tcagtttcc tattcaagac
 661 caccaccte tggtagcaga tctgcccac ctggtttt tccgtaggat accgagaacc
 721 caccatcag agcctccct ccacctctgc tctcgttc tccctgagag cctcaacttc
 781 cctccacc cagatctcc tacctttct ggggagacc ctcagccct gtagggcg
 841 ggctccctc ttctacccc agccggtcg cactctcggc tgtccgggg ggcgccgct
 901 ccccatgcc gccttgggg ctggtgtct tgcgctgt gctgccgtg ctgtggtgc
 961 tagtgtgac gcctggccg ccggccgccc gactgtccac ctgaagacc atcgacatgg
 1021 agctggtgaa gcggaagcg atcgaggcca ttcgaggcca gattctgtcc aagcttcggc
 1081 tcgccagccc ccgagccag ggggacgtgc cccccggcc gctgcctgag gccgtactgg
 1141 ctcttaca cagtaccgc gaccggtag ccgggaaag tgcgaaccg gagcccgagc
 1201 cagaggcgga ctactagcc aaggaggta cccgctgct aatggtgaa agcggcaacc
 1261 aaatctatgaa taaattcaag ggcaccccc acagcttata tatgtgttc aacacgtcg
 1321 agctccggga agcgtgccc gaacctgtat tgcctctcg ggcagagctg cgcctgtga
 1381 ggctcaagt aaaagtggag cagcacgtg agctatacca gaaatacagc aatgattct
 1441 ggcgtacct cagcaaccg ctgctggccc ccagtactc accggagtgg ctgtccttg
 1501 atgtaccgg agttgtcgg cagtggctga cccgagaga ggctatagag ggttttcgc
 1561 tcagtccca ctgttctgt gacagcaaag ataacacact ccagtggaa attaacgggt

1621 tcaattctgg cgcgggggt gacctggcca ccattcacgg catgaaccgg cccttcctgc
 1681 tctcatggc caccgccgtg gagagggcc agcacctgca cagctcccgg caccgccgag
 1741 ccctggatac caactactgc ttcagctcca cggagaagaa ctgctgcgtg cggcagctct
 1801 acattgactt ccggaaggac ctgggctgga agtggattca tgaaccaag ggctaccatg
 1861 ccaattctg cctggggccc tgccctaca tctggagcct agacactcag tacagcaagg
 1921 tctggctct gtacaaccag cacaaccgg gcgcgtcggc ggccgctgc tgcgtgccgc
 1981 aggcgtgga gccactgccc atcgtgtact acgtgggccc caagcccaag gtggagcagc
 2041 tgccaacat gatcgtcgt tctgcaagt gcagctgagg ccccgccccg cccacagccc
 2101 cgcccaccgg gcaggccgg cccaccccc gcccgccca ccggggctgt atttaaggac
 2161 atcgtcccc aagcccactt gggatcgatt aaagtgagg agaggactgg gtctccgtgt
 2221 gttgggcacc tgactggggt ctctctcgg acgttaccgg accccactc ccagcctcgg
 2281 cctgcctcgg cctgtgtctg tccaccattc attgttct cctctcatg caaacgcgtt
 2341 ccttgagcag gtactcctgg tgaactctac ttagatttac ttactgagca tcttgacat
 2401 tatcctgaat gccttatatt aattaactca ttaaccacc ataacaagc taaaaggagc
 2461 tctgataaca cccactttaa aaaggaaacg gaagctggag ttccattgt ggtcagtggt
 2521 taacctacc gactggtatc ctgaagaca caggttcaat ccctggccct gttctgtaag
 2581 ttaaaggctc ggctgtggca gctgtggtat aggccggcca gctgtccaac atcgtgcgtt
 2641 cctcgaagtg cagctgagct ccgattaac ccctagcctg ggaactcca tatgtctcag
 2701 gtgcggccct aaaaagacaa aaagaaagga aaaggagcc catagtgggt aagggaataa
 2761 ttctgcccc ccaagaacct gcttcgggt ttctggggg gagacagaca tagcaaagt
 2821 gtgtgaaaac aggaaggcag tgtgggtcag agagggttt ggagggtggg agggcttctt
 2881 ggaggaggtg gcacctgggc ctgaaggaa gccaaagaa cagcctaggg gagcatgggg
 2941 gaggggtgtc atggtaggag gacaaaagca aagtcctgga agtgaagatg aatttggggt
 3001 gagctacacc ggccgggaaag aggccagtc ggttggaagg gaggggcaag gggaaaaagt
 3061 aataacagt ctccaggcta ggtatggagc tactagctca aggcattctt cccacagccc
 3121 agcagaacag aggtgtgtaa actattgccc tgcaggcaca ttctgaccg ctgcctgttt
 3181 ctgtaataa agttttattg gagaac

//

ออกแบบลำดับนิวคลีโอไทด์และสังเคราะห์ต้นแบบ TGF β AS-ODN ที่มีความจำเพาะกับ
 TGF β mRNA ของสุกร จำนวน 2 ต้นแบบ (ตารางที่ 1) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์วิเคราะห์จาก

<http://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx> พันธะที่ใช้เชื่อมระหว่างแต่นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พันธะ phosphorothioate

ออกแบบและสังเคราะห์ต้นแบบ scramble อีกจำนวน 2 ต้นแบบ (ตารางที่ 1) โดย scramble จากต้นแบบ TGF β AS-ODN วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบ scramble ที่ได้ว่าไม่เหมือนกับชิ้นใดๆ ของสุกร โดยวิเคราะห์จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ตารางที่ 1 ลำดับและคุณสมบัติของนิวคลีโอไทด์ของต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ TGF β AS-ODN และ Scramble (Scr) ODN

Type	Sequence	Complementary to position	%GC	Tm	MW
AS1	5'- CCCAGTCCTCTCTCCACCTT - 3'	2172-2191	60	58.2	6336.2
AS2	5'- TCCAAGAAGCCCTCCCACCT - 3'	2844-2863	60	60.8	6269.1
Scr1	5'- TGACCTCTCTCTCACTCCCC - 3'	-	60	57.6	6336.2
Scr2	5'- GGCACCTACCTCCACCATAACC - 3'	-	60	57.2	6269.1

2. การเตรียมตัวอย่างเลือดของสุกร

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

3. การเตรียมโมโนซัยต์

เจือจางเลือดในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากัน คูดเลือดที่เจือจางแล้วจำนวน 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)

ปีเปิด 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 (ดูภาคผนวก) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงใน PBMC pellet ปิเปตขึ้นลงให้เข้ากัน ค้างไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 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.

ปิเปต 200 ไมโครลิตรของ PBMC ใน RPMI⁺⁺ ใส่ลงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิดกันแบนแบบ 96 หลุม (96-well flat-bottom plate) (Nunc) แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่ม CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเซลล์ที่ไม่ติดที่ก้นถาดหลุมออก (non-adherent cells) เหลือเฉพาะเซลล์ที่เกาะที่ก้นถาดหลุม (adherent cells) ล้างเซลล์ที่เกาะที่ก้นถาดหลุมด้วย 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.สพ.ญ.ดร.ต้นนิภา สุรทัตต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อโมโนแซ็คของสุกร และ secondary FITC-conjugated goat anti-mouse IgG1 (Becton Dickinson; ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.วัชร กสิณฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) พบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของ adherent cell เป็น โมโนแซ็ค (Charerntantanakul et al., 2006a)

4. การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ TGFβ AS-ODN และความสามารถของ TGFβ AS-ODN ในการยับยั้งการสร้าง TGFβ

ทำการเตรียม TGFβ AS-ODN: transfection reagent mixture โดย transfection reagent ที่ใช้ได้แก่ IBAfect (IBA GmbH) และ MATra-A (IBA GmbH) ในความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ปริมาณของ TGFβ AS-ODN ที่ศึกษา ได้แก่ 0.5, 1 และ 2 µM ทำการ resuspend TGFβ AS-ODN 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 TGFβ AS-ODN กับ resuspended IBAfect เข้าด้วยกัน แล้วบ่ม TGFβ AS-ODN: transfection reagent mixture ที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นเติม 0.5, 1 หรือ 2 ไมโครลิตรของ MATra-A ลงใน mixture ที่มี 0.5, 1 และ 2 µM ของ

TGF β AS-ODN ตามลำดับ (ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต) ทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

ปีเปิด 150 ไมโครลิตรของ pre-warmed Optimem ลงในโมโนชัคและปีเปิดตามด้วย 20 ไมโครลิตรของ TGF β AS-ODN: 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 เติมน้ำ 50 ไมโครลิตรของ lipopolysaccharide (LPS; 10 μ g/ml final concentration; Fluka) และ 130 ไมโครลิตรของ RPMI⁺ และบ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อการสกัด mRNA

กลุ่มควบคุมของการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ โมโนชัคที่ได้รับเพียง RPMI⁺ (untransfected/unstimulated control) โมโนชัคที่ได้รับ LPS (positive control) โมโนชัคที่ได้รับ transfection reagent (IBAfect และ 2 ไมโครลิตรของ MATra-A) และ LPS (transfection media control) และ โมโนชัคที่ได้รับ Scr ที่ 2 μ M และ LPS (Ser control) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 กลุ่มควบคุมต่างๆ ในการศึกษาความสามารถของ TGF β AS-ODN ในการยับยั้งการสร้าง TGF β

Treatment	LPS	Transfection reagent	Scr
Untransfected/unstimulated control	-	-	-
Positive control	+	-	-
Transfection media control	+	+	-
Ser 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 TGF β 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 อ่านทุกๆ 0.2 องศาเซลเซียส และ hold 00:00:01 วินาที ทำการคำนวณความแตกต่างของการแสดงออกของ TGF β 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 ของยีนที่ศึกษา

Gene	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
TGF β	5'-AGGGCTACCATGCCAATTTCT-3'	5'-CCGGGTGTGCTGGTTGT-3'
RPL32	5'-TGGAAGAGACGTTGTGAGCAA-3'	5'-CGGAAGTTTCTGGTACACAATGTAA-3'

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

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์ TGF β AS-ODN ที่มีความจำเพาะต่อ TGF β mRNA ของสุกร

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยซอฟต์แวร์วิเคราะห์จาก <http://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx> พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 2172-2191 และ 2844-2863 ของสาย TGF β mRNA เป็นลำดับที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตำแหน่งต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ TGF β AS-ODN ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตำแหน่งทั้งสองตำแหน่งนี้ไม่มีโครงสร้างเป็น hairpin ทำให้ TGF β AS-ODN ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถเข้าถึงและจับกับ TGF β mRNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การศึกษาความสามารถของ TGF β AS-ODN ในการยับยั้งการแสดงออกของ TGF β mRNA ของสุกร

หลักการของขั้นตอนนี้ได้แก่ การทดสอบ TGF β AS-ODN ทั้งสองสายที่สังเคราะห์ขึ้นที่ปริมาณที่แตกต่างกันโดยถ่ายใส่ (transfect) ให้กับเซลล์โมโนซัยต์ จากนั้นกระตุ้นเซลล์โมโนซัยต์ด้วย LPS เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ TGF β mRNA TGF β AS-ODN สายที่เหมาะสมและปริมาณที่เพียงพอจะสามารถลดระดับการแสดงออกของ TGF β mRNA ได้เมื่อเทียบกับเซลล์โมโนซัยต์ที่ไม่ได้รับ TGF β AS-ODN แต่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Pos Ctrl) (ภาพที่ 1) และเพื่อเป็นการยืนยันว่าระดับการแสดงออกที่ลดลงของ TGF β mRNA ในเซลล์โมโนซัยต์ที่ได้รับ TGF β AS-ODN นั้นเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ Scr ODN ที่มีจำนวนเบสเหมือนกับ TGF β AS-ODN แต่มีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างออกไปและไม่จำเพาะต่อยีนใดๆของสุกรถูกเลือกใช้เป็นอีกหนึ่งกลุ่มควบคุม (scramble control)

จากการศึกษาพบว่า TGF β AS1 ที่ระดับ 2 μ M สามารถลดระดับการแสดงออกของ TGF β mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ระดับอื่นๆ (0.5 และ 1 μ M) สามารถช่วยลดระดับการแสดงออกของ TGF β mRNA ได้บ้างแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับ TGF β AS2 พบว่าทั้งสามปริมาณที่ศึกษา ได้แก่ 0.5, 1 และ 2 μ M ช่วยลดระดับการแสดงออกของ TGF β mRNA ได้เล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

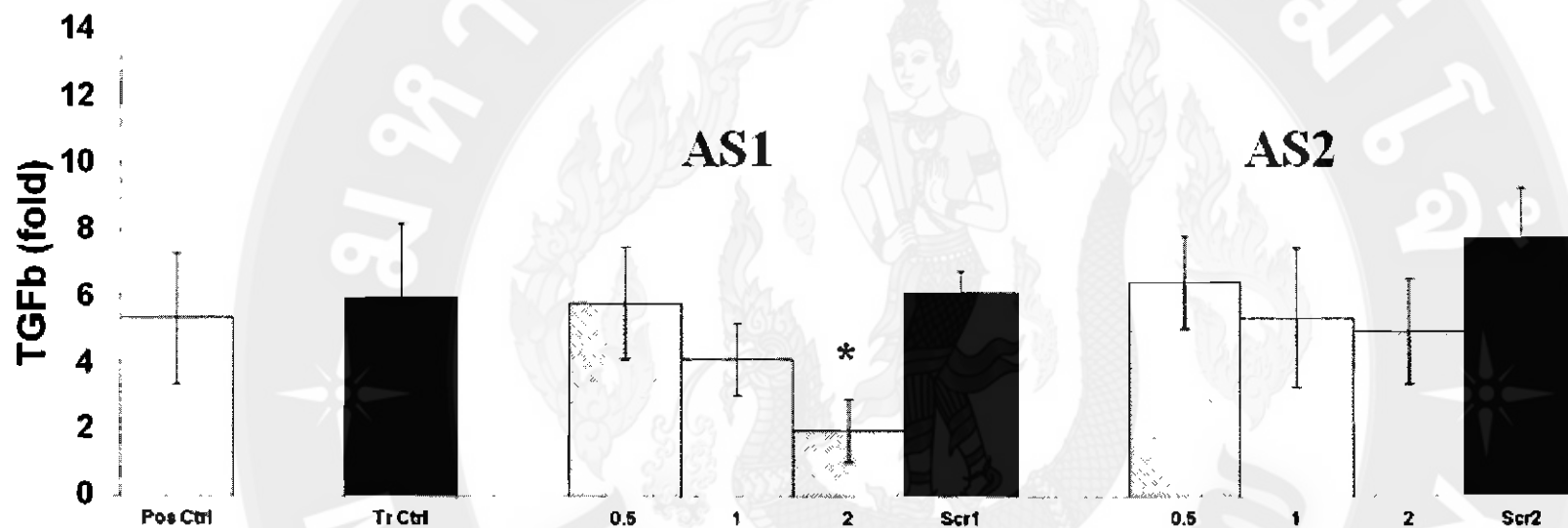
การแสดงออกของ TGF β mRNA ที่ลดลงเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะเพราะระดับดังกล่าวพบลดลงเฉพาะในเซลล์ที่ได้รับ TGF β AS-ODN เท่านั้น ไม่พบในเซลล์ที่ได้รับ Scr ODN แต่อย่างใด (ภาพที่ 1)

การแสดงออกของ TGF β mRNA ที่ลดลงในเซลล์โมโนซัยต์ที่ได้รับ TGF β AS1 ที่ระดับ 2 μ M ไม่ได้เกิดจากการที่เซลล์โมโนซัยต์ที่ได้รับ TGF β AS-ODN ตายเพิ่มมากขึ้น (apoptosis และ necrosis) หลังการ transfection เพราะร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตหลังได้รับ TGF β AS-ODN ในทั้งสองสายและในทุกปริมาณทดสอบไม่แตกต่างจากร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ TGF β AS-ODN (ภาพที่ 2)

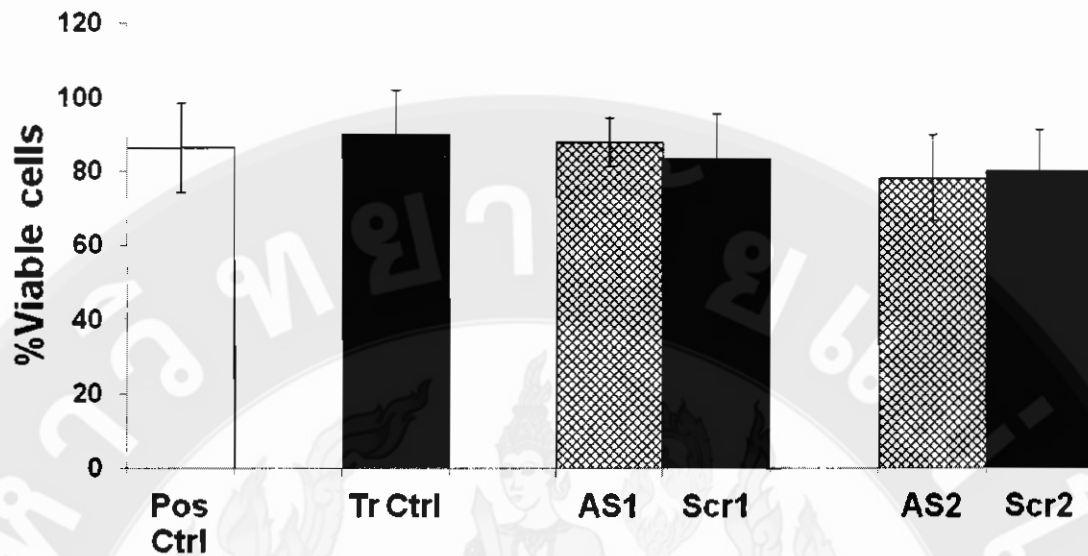
ผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษต่อเนื่องในเรื่องบทบาทของ TGF β ต่อกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุกร โดยสามารถใช้ TGF β AS1 ถ่ายใส่ให้กับโมโนซัยต์ของสุกรและกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS จากนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นจากการลดลงของระดับ TGF β เช่น การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของไซโตไคน์ต่างๆและโมเลกุลต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันของสุกร การศึกษาดังกล่าวนี้อาจทำให้เข้าใจถึงบทบาทของ TGF β ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงภายหลังการติดเชื้อก่อโรคต่างๆด้วย รวมถึงอาจนำ TGF β AS1 ไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมระดับ

การแสดงออกของ TGF β ในกรณีที่มีการแสดงออกมากขึ้น (up-regulation) หรือรบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่เหมาะสมของสุกร





ภาพที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน TGFβ ที่ถูก normalized ด้วย RPL32 ในโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl), LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl), LPS ร่วมกับ TGFβ AS-ODN ที่ปริมาณ 0.5, 1 และ 2 μM และ LPS ร่วมกับ Scr ที่ปริมาณ 2 μM เครื่องหมาย * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ Pos Ctrl



ภาพที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของโมโนไซต์ที่ได้รับ LPS (Pos Ctrl) LPS ร่วมกับ transfection reagent (Tr Ctrl) LPS ร่วมกับ TGF β AS-ODN ที่ปริมาณ 2 μ M และ LPS ร่วมกับ Scr ที่ปริมาณ 2 μ M

เอกสารอ้างอิง

- Charemtantanakul, W., R. Platt and J.A. Roth. 2006. 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 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.
- 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.
- Gock, H., M. Nottle, A.M. Lew, A.J. d'Apice and P. Cowan. 2011. Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation. **Transplant Rev.** 25(1): 9-20.
- Ketting, R.F. 2011. The many faces of RNAi. **Dev Cell.** 20(2): 148-161.
- Mantel, P.Y. and C.B. Schmidt-Weber. 2011. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. **Methods Mol Biol.** 677: 303-338.
- Nishida, K., G. Michael, D. Dobrev and S. Nattel. 2010. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. **Europace.** 12(2): 160-172.
- Royace, A.R., R.J. Husmann, H.D. Dawson, G. Calzada-Nova, W.M. Schnitzlein, F.A. Zuckermann and J.K. Lunney. 2004. Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. **Vet Immunol Immunopathol.** 102: 199-216.
- Summerfield, A., L. Guzylack-Pirou, L. Harwood and K.C. McCullough. 2009. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: current understanding and future directions. **Vet Immunol Immunopathol.** 128(1-3): 205-210.
- Xu, L and T. Anchordoquy. 2011. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. **J Pharm Sci.** 100(1): 38-52.
- Zhou, Y., R. Scamurra, T.W. Molitor and M.P. Murtaugh. 1992. Characterization of transforming growth factor-beta 1 gene expression in porcine immune cells. **Mol Immunol.** 29(7-8): 965-970.



ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายต่างๆ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร MEM⁺⁺

- dH ₂ O	938	มล.
- MEM	10	กรัม
- NaHCO ₃	2.2	กรัม
- FBS	50	มล.
- Antibiotic-Antimycotic	10	มล.
ปรับ pH ให้ได้ 7.2		

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μ m ลงขวดปลอดเชื้อ

2. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI⁺⁺

- RPMI-1640	1	ซอง (10.4 กรัม)
- Na ₂ HPO ₄	2	กรัม
- Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	10	มล.
- Heat-inactivated FBS	100	มล.
- dH ₂ O	800	มล.

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

นำไปกรองผ่านเครื่องกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ (ขนาด 0.22 ไมครอน)

3. การเตรียมสารละลาย EDTA

- EDTA	7.2	กรัม
- dH ₂ O	400	มล.

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

นำไปอบแห้งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน

4. สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) ประกอบด้วย

- Sodium chloride (NaCl)	8	กรัม
- Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
- Sodium phosphate (NaHPO ₄)	1.25	กรัม

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 0.2 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 975 มล. จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 แล้ว
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม Trypsin 0.25% (w/v)

- Trypsin 0.25 กรัม

- PBS 100 มล.

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 -7.6

กรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm ลงหลอดบรรจุ

6. การเตรียม crystal violet (0.5%; w/v)

- สารละลาย citric acid 0.1 M 95 มล.

- Crystal violet 0.5 กรัม

7. การเตรียม RBC lysis buffer

- NH_4Cl 8.02 กรัม

- NaHCO_3 0.84 กรัม

- EDTA 0.37 กรัม

- dH_2O 950 มล.

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

นำไปบ่มน้ำเชื้อภายใต้ความดัน

8. การเตรียมสารละลาย PBS+5 mM EDTA

- NaCl 8 กรัม

- Na_2HPO_4 1.44 กรัม

- KH_2PO_4 0.25 กรัม

- KCl 0.2 กรัม

- EDTA 1.86 กรัม

- dH_2O 800 มล.

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

นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน

9. การเตรียม 70% เอทานอล

- 95% เอทานอล	736	มล.
- dH ₂ O	264	มล.

10. การเตรียม 0.6% agarose gel

- dH ₂ O	50	มล.
- Agarose	0.3	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้ ให้อุ่นในไมโครเวฟจนเดือด ควมคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

11. สารละลาย Sorenson's buffer

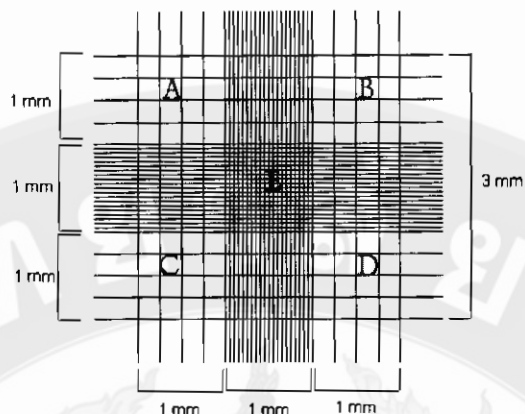
- Sodium citrate	5.88	กรัม
- เอทานอล	100	มล.
- dH ₂ O	100	มล.
- ปรับ pH ให้ได้ 4.2		

12. สารละลาย 1 N NaOH (100 มล.)

- Sodium hydroxide	4	กรัม
- dH ₂ O	100	มล.

การนับจำนวนเซลล์และสูตรคำนวณ

นำเซลล์ 20 มล. ผสมกับ 0.2% trypan blue ใน PBS 20 มล. ผสมกันในหลอด microcentrifuge จากนั้นใช้ micropipette ดูดส่วนผสมที่ได้ออกมาประมาณ 10 มล. เติมลงใน hemacytometer ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ นับเซลล์ภายในช่อง A, B, C และ D



ภาพผนวก 1 ตารางนับเซลล์ในเครื่องนับจำนวนเซลล์

ที่มา: http://web.agri.cmu.ac.th/ppath/course/360301/lesson5_inoculation_prepare.htm

สูตรการหาจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total cell count)

$$T = (N \times V) \times 10^4 / 4$$

- T = Total cell count (เซลล์/มล.)
 N = จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้ในช่อง A, B, C, D
 V = ปริมาตรรวมของเซลล์ที่หยอดเข้าไป

สูตรการหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% viability)

$$\% \text{ Viability} = 100X / X + Y$$

- % = % การรอดชีวิตของเซลล์
 X = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี trypan blue)
 Y = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ตายแล้ว (ติดสี trypan blue)

สูตรคำนวณความเข้มข้นของไวรัสโดยวิธี Reed and Muench

TCID₅₀/มล. เป็นค่า 50% ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับไวรัส การคำนวณหาค่า TCID₅₀/มล. ซึ่งอยู่ระหว่างค่า 2 ค่า ทำได้โดยการหาค่า Proportionate distance (PD) โดยกำหนดให้

$$PD = (A-50) / (A-B)$$

- A = % สะสม ค่าแรกที่มีมากกว่า 50%
 B = % สะสมค่าแรกที่มีน้อยกว่า 50%

เมื่อได้ค่า PD แล้วนำมาคำนวณต่อตามสูตร Log of 50% end point

$$\text{Log 50\% end point} = (\log C) - (PD \times \log D)$$

C = ความเจือจางของไวรัสที่ให้ค่า A

D = Dilution factor

