

การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอของกุ้งก้ามกราม
เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide และ Polyinosinic: Polycytidylic acid



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี
ตุลาคม 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอของกุ้งก้ามกราม
เมื่อถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide และ Polyinosinic-polycytidylic acid"


ของ นางสาวรัตติกรณ์ ธรรมสอน

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

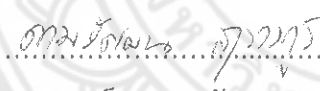
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)


.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา)


.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.รัตน์สุดา ยะป้อม)


.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดามรรัตน์ สุวางกูร)


.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

15 08 757

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ พร้อมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลา มาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และ ขอขอบคุณประธานคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.รัตน์สุดา ยะป้อม กรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดามรงค์มน สุรางกูร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง ของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และ ทรงคุณค่า

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุน ในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มี พระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กุ้ง และการแก้ปัญหาการติดโรคของกุ้งก้ามกรามในประเทศและผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

รัตติกกรณ์ ธรรมสอน

ชื่อเรื่อง	การวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของไมโครอาร์เอ็นเอของ กิ้งก่ามกรามเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide และ Polyinosinic: Polycytidylic acid
ผู้วิจัย	รัตติกรณ์ ธรรมสอน
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อำนาจ เพชรรุ่งนภา
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.รัตน์สุดา ยะป้อม
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ จ.ท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2562
คำสำคัญ	miRNA Lipopolysaccharide Polyinosinic: Polycytidylic acid กิ้งก่ามกราม

บทคัดย่อ

miRNA เป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการหลังการถอดรหัส (post-transcription) ของยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ รวมไปถึงระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา miRNA และยีนเป้าหมายในกิ้งก่ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด lipopolysaccharide (LPS) และ Polyinosinic: Polycytidylic acid (PIC) โดยสร้างและหาลำดับเบสของ small RNA library ด้วยเทคนิค high-throughput sequencing พบว่า สามารถระบุ miRNA ได้ทั้งหมด 1,581, 1,934 และ 1,724 ชนิดจากกลุ่ม LPS, PIC และกลุ่มควบคุม (NaCl) ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของ miRNA พบว่ามี miRNA จำนวน 83 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยมี 37 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และ 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง นอกจากนี้ พบว่า มี miRNA จำนวน 170 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PIC โดยมี 124 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และ 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง เมื่อวิเคราะห์ Gene ontology (GO) ของยีนเป้าหมายของ miRNA ดังกล่าว พบว่า ส่วนใหญ่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolic process และ cellular process และผลการวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมาย พบว่า ยีนเป้าหมายมีความเกี่ยวข้องกับหลายกลไกที่สำคัญรวมถึงกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ผลการวิจัยที่ได้ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของ miRNA ในกิ้งก่ามกรามและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น

Title COMPARATIVE ANALYSIS OF MIRNA EXPRESSION IN THE GIANT FRESHWATER PRAWN STIMULATED BY LIPOPOLYSACCHARIDE AND POLYINOSINIC: POLYCYTIDYLIC ACID

Author Rattikon Thammason

Advisor Assistant Professor Amnat Phetrungnapha, Ph.D.

Co-advisor Ratsuda Yapom, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Biochemistry, Naresuan University, 2019

Keywords miRNA, Lipopolysaccharide, Polyinosinic: Polycytidylic acid, *Macrobrachium rosenbergii*

ABSTRACT

miRNA is a small non coding RNA that regulates gene expression in post-transcription processes. In this study, we aimed to study miRNA and target genes in *Macrobrachium rosenbergii* that respond to Lipopolysaccharide (LPS) and Polyinosinic: polycytidylic acid (PIC). Prawns were stimulated by LPS and PIC. Hepatopancreas was subsequently collected for small RNA library construction and high-throughput sequencing techniques. We found that 1,581, 1,934 and 1,724 miRNAs could be identified from LPS PIC and NaCl libraries, respectively. The differential expression analysis showed that 83 miRNAs were expressed differentially upon LPS injection. Of these, 37 miRNAs were significantly up regulated and 46 miRNAs were significantly down-regulated upon LPS. We also found that, 170 miRNAs were expressed differentially upon PIC injection. Of these, 124 miRNAs were significantly up regulated and 46 miRNAs were significantly down-regulated upon PIC. Gene ontology (GO) analysis revealed that the target genes mainly belong in metabolic process and cellular process. KEGG analysis of the target genes revealed immune- associated pathways. The results of this study provide better understanding of the relationships of miRNA in prawns and immune stimulants.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
สมมติฐานของการวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
กึ่งก้ามกราม	4
ระบบภูมิคุ้มกันกึ่ง	7
Crustacean hepatopancreas และหน้าที่ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน	15
MicroRNAs (miRNAs).....	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	24
วิธีทดลอง	25
4 ผลการวิจัย	32
การสร้าง small RNA library และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์	32
การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ.....	35
การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ (differential expression) เพื่อระบุ miRNA ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC	36
การทำนายยีนเป้าหมายสำหรับ DEMs และการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนเป้าหมาย	42
การตรวจยืนยันการแสดงออกของ miRNA ด้วย stem-loop qPCR	49
5 บทสรุป.....	52
สรุปผลการวิจัย	52
อภิปรายผล	52

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	61
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้วิจัย.....	88



อักษรย่อ

µg	=	ไมโครกรัม
µl	=	ไมโครลิตร
ng	=	นาโนกรัม
nm	=	นาโนเมตร
g	=	กรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
°C	=	องศาเซลเซียส
µg/µl	=	ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
WSSV	=	White spot syndrome virus
LPS	=	Lipopolysaccharide
PIC	=	Polyinosinic: Polycytidylic acid
EMS	=	Early Mortality Syndrome
DEMs	=	Differentially expressed miRNA
SEM	=	Mean ± standard error of the mean
PAMP	=	Pathogen-associated molecular patterns
LTA	=	Lipotechoic acid
bG	=	β-1,3- glucan
PRR	=	Pattern recognition receptor
PTI	=	PAMPs-triggered immunity
ppA	=	Prophenoloxidase activating enzyme
proPO	=	Prophenoloxidase
ROS	=	Reactive oxygen species
AMP	=	Antimicrobial peptides
PRD	=	Unconstrained proline rich domain
DGCR8	=	DiGeorge syndrome critical region gene 8
pre-miRNA	=	Precursor miRNA

อักษรย่อ (ต่อ)

TRBP	=	TAR-RNA binding protein
RISC	=	RNA-induce silencing complex
MyD88	=	Myeloid differentiation primary response gene 88
IRAK	=	Serine kinase IL-1 Rassociated kinase



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงชนิดและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง	8
2 แสดง Primers ที่ใช้ในการทดลอง	25
3 แสดงจำนวน reads ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบใน small RNA library ของ NaCl, LPS และ PIC	34
4 แสดงชนิดของ small RNA ที่พบใน small RNA library ของ NaCl, LPS และ PIC	35
5 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงสุด 10 อันดับแรก เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS	39
6 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงสุด 10 อันดับแรก เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย PIC	41
7 แสดงยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและ miRNA ที่เกี่ยวข้อง	44
8 แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miR-242, miR-375b-3p, miR-100, miR-1647 และ bantam	49
9 แสดงการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อถูกได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย PIC	71
10 แสดงการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อถูกได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS	80

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามกราม.....	5
2 แสดงผลผลิตและมูลค่ากุ้งก้ามกรามของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 (a) ผลผลิตในหน่วยตัน (b) มูลค่าในหน่วยล้านบาท	6
3 แสดงกลไกต่างๆ ที่ใช้ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง.....	11
4 แสดงโครงสร้างของ LPS.....	12
5 แสดงกลไกการกระตุ้น innate immunity โดย LPS	13
6 แสดงโครงสร้างของ PIC	14
7 แสดงกลไกการสร้างและทำหน้าที่ของ miRNA	18
8 แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ใน <i>M. japonicus</i> (A) Microarray analysis (B) Northern hybridization.....	19
9 แสดงบริเวณเป้าหมายของ miR-965 และความสำคัญของ miR-965 ต่อการยับยั้ง การติดเชื้อ WSSV ใน <i>M. japonicus</i>	21
10 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-1000 หลังการติดเชื้อ WSSV ใน <i>M. japonicus</i>	21
11 แสดงระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของยีนที่ทำหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับ ระบบภูมิคุ้มกัน หลังการติดเชื้อ WSSV ใน <i>M. Japonicus</i>	22
12 แสดงแผนภาพทำนายความสัมพันธ์ของ miRNAs ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และยีนเป้าหมายในกุ้งกุลาดำ	23
13 แสดงแผนภาพการทดลองเพื่อสร้าง small RNA library	27
14 แสดงขั้นตอนการสร้าง small RNA library	28
15 แสดงการวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศ.....	29
16 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer A, B และ C คือ Total RNA จากกลุ่ม NaCl, LPS และ PIC ตามลำดับ.....	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
17	แสดง Length distribution ของ small RNA ที่พบใน library จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl โดย แกน x คือ ความยาวของ small RNA (nt) แกน y คือ เปอร์เซ็นต์ของ small RNA (%)..... 34
18	แสดง Venn diagram แสดงการกระจายของ functional miRNAs ของ NaCl, LPS และ PIC library 37
19	แสดง Scattered plot แสดงระดับการแสดงออกของ miRNA ที่เปลี่ยนไปเมื่อถูก ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เกณฑ์ \log_2 fold change ≥ 1.0 และ $P < 0.05$ พิจารณาว่าเป็น miRNAs ที่แสดงแตกต่างกัน (differentially expressed miRNAs; DEMs) ระดับการแสดงออก (RPM) ของกลุ่ม LPS จะแสดงในแกน Y ในขณะที่กลุ่มควบคุม (NaCl) อยู่ในแกน X สำหรับจุด แต่ละจุดแสดงถึง functional miRNA โดย จุดสีเขียวแสดงถึง miRNA ที่มี ระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น จุดสีแดงแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออก ลดลง จุดสีน้ำเงินแสดงถึง miRNAs ซึ่งระดับการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง..... 38
20	แสดง Scattered plot แสดงระดับการแสดงออกของ miRNA ที่เปลี่ยนไปเมื่อถูก ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย PIC โดยใช้เกณฑ์ \log_2 fold change ≥ 1.0 และ $P < 0.05$ พิจารณาว่าเป็น miRNAs ที่แสดงแตกต่างกัน (differentially expressed miRNAs; DEM) ระดับการแสดงออก (RPM) ของกลุ่ม LPS จะแสดงในแกน Y ในขณะที่กลุ่มควบคุม (NaCl) อยู่ในแกน X สำหรับจุด แต่ละจุดแสดงถึง functional miRNA โดย จุดสีเขียวแสดงถึง miRNA ที่มี ระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น จุดสีแดงแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออก ลดลง จุดสีน้ำเงินแสดงถึง miRNAs ซึ่งระดับการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง..... 40
21	แสดง GO analysis ทำนายเป้าหมายยีนของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC 43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
22	แสดงการวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมายของ miRNA ที่ตอบสนองต่อ LPS โดย KEGG pathway ที่มีค่ามากที่สุดจะแสดงโดยยีนเป้าหมายที่ทำนายไว้ Rich factor คือ อัตราส่วนของจำนวนยีนเป้าหมายและจำนวนของยีนทั้งหมดใน pathway นั้น ขนาดของวงกลมแสดงถึงจำนวนของยีน..... 47
23	แสดงการวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมายของ miRNA ที่ตอบสนองต่อ PIC โดย KEGG pathway ที่มีค่ามากที่สุดจะแสดงโดยยีนเป้าหมายที่ทำนายไว้ Rich factor คือ อัตราส่วนของจำนวนยีนเป้าหมายและจำนวนของยีนทั้งหมดใน pathway นั้น ขนาดของวงกลมแสดงถึงจำนวนของยีน 48
24	แสดงการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ miRNA (A) miR-375b-3p, (B) miR-242, (C) miR-100c, (D) miR-1647 และ (E) bantam โดยเทคนิค stem-loop qPCR โดยฉีด LPS และ PIC เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งกล้ามเนื้อ เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตับและตับอ่อนมาสกัด total RNA และ stem-loop qPCR โดยกลุ่มที่ฉีด NaCl ถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม ระดับการแสดงออกของ miRNA จะถูก normalized และคำนวณด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ระดับการแสดงออกถูกวิเคราะห์โดย one-way ANOVA และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM เครื่องหมายดอกจันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการรักษา (LPS และ PIC) และกลุ่มควบคุม (NaCl) 50
25	แสดง Venn diagram แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miR-100, bantam, miR-375b-3p, miR-242 และ miR-1647 58

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำจืดที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายและส่งออกอย่างแพร่หลาย กุ้งก้ามกราม จึงถูกจัดว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างมหาศาล จากการสำรวจรวบรวมข้อมูลของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สำราชนนทศ กรมประมงในปี 2551-2561 พบว่า มูลค่าการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยมีมูลค่าเฉลี่ยมากกว่า 4,000 ล้านบาทต่อปี (Na-Nakorn, & Jintasataporn, 2012) แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรก็ยังคงประสบปัญหาโรคติดเชื้อจากจุลินทรีย์ในกุ้งก้ามกราม โดยเฉพาะโรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย เช่น *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus และ Extra small virus ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค White tail disease และแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. เช่น *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกราม และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) กุ้งที่ได้รับเชื้อเหล่านี้จะมีอัตราการตายสูง อีกทั้งพ่อแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อยังสามารถถ่ายทอดเชื้อมาสู่ลูกกุ้งได้ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008) ซึ่งปัญหาดังกล่าวส่งผลกระทบต่อเกษตรกรทำให้สูญเสียรายได้อย่างมากและยังมีผลทำให้อัตราการส่งออกกุ้งก้ามกรามของไทยลดลงอีกด้วย ดังนั้นเพื่อรองรับปัญหาโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นจึงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกราม รวมไปถึงกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในกุ้ง

MicroRNA (miRNA) เป็น Non-coding RNA ขนาดประมาณ 20-24 นิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ post-transcription ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายอย่างจำเพาะโดยเข้าจับที่บริเวณ 3'-untranslated regions (3'UTR) ของ Messenger RNA (mRNA) และส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือกระตุ้นการสลาย mRNA จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์มากมาย เช่น กระบวนการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน กระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการเกิดมะเร็ง และยังทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Bushati, & Cohen, 2007; Huang, Xu, & Zhang, 2012) จากการศึกษา miRNA ในกุ้งที่นิยมได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งขาวจีน (*Fenneropenaeus chinensis*) และในกุ้งอีกหลายชนิด พบว่า miRNA ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและการ

ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในกิ้ง (Aderem, & Ulevitch, 2000; Flegel, & Sritunyalucksana, 2011; Janeway Jr, & Medzhitov, 2002; Li et al., 2017; Z. Wang, & Zhu, 2017; G. Yang, Yang, Zhao, Wang, & Zhang, 2012)

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) คือ โมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ของจุลชีพ เช่น lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบ lipoteichoic acid (LTA) ของแบคทีเรียแกรมบวก และ beta-1,3-glucan (bG) ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังรวมถึง unmethylated CpG DNA, single-strand และ double-strand RNA ของ viruses อีกด้วย โมเลกุลดังกล่าวจะถูกจดจำอย่างจำเพาะโดย โปรตีน pattern recognition receptors (PRRs) ที่เป็นตัวรับบนผิวเซลล์แล้วทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านกลไกที่เรียกว่า PAMPs-triggered immunity (PTI) นำไปสู่กลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) เช่น Toll pathway Imd pathway และ prophenoloxidase (proPO) system เป็นต้น (Cerenius, Lee, & Söderhäll, 2008; Chen et al., 2016; Wang, & Wang, 2013) ปัจจุบัน PAMPs หลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นตัวกระตุ้นทางภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) เช่น LPS และ PIC ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า LPS และ PIC ยังสามารถกระตุ้นระบบต่างๆ ที่เกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้ เช่น ระบบต้านอนุมูลอิสระ ระบบ prophenoloxidase และ TLR-signaling pathway เป็นต้น (Ji, Yao, & Wang, 2009)

จากการศึกษา ในกิ้งชนิดต่างๆ พบว่า miRNAs มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งอย่างมีนัยยะสำคัญ อย่างไรก็ตามชนิดและกลไกของ miRNAs ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งยังไม่มีข้อมูลในเชิงลึกมากนัก ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญอย่างมากที่จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์กิ้งปลอดโรคและแก้ปัญหาโรคติดเชื้อในกิ้งก้ามกราม ดังนั้น ในการศึกษา ผู้วิจัยจึงสร้าง miRNA library และใช้วิธีทางชีวสารสนเทศเพื่อศึกษา miRNome และยืนยันเป้าหมายในกิ้งก้ามกรามที่การตอบสนองต่อ immunostimulant ได้แก่ LPS และ PIC จากนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของ miRNAs ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค stem-loop quantitative real-time PCR (qPCR)

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษา miRNome และยืนยันเป้าหมายในกิ้งก้ามกรามที่การตอบสนองต่อ LPS และ PIC

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ ทำการศึกษา miRNome ของกิ้งก่ามกรมเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ PIC แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 เป็นการเตรียมตัวอย่างและการสร้าง Small RNA library ทั้งหมด 3 library ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ได้รับ NaCl และกลุ่มทดลองที่ได้รับ LPS และ PIC

ส่วนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

ส่วนที่ 3 เป็นการยืนยันผลการแสดงออกของ miRNA ด้วยวิธี stem-loop qPCR

สมมติฐานของการวิจัย

miRNome มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกิ่งได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ PIC



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

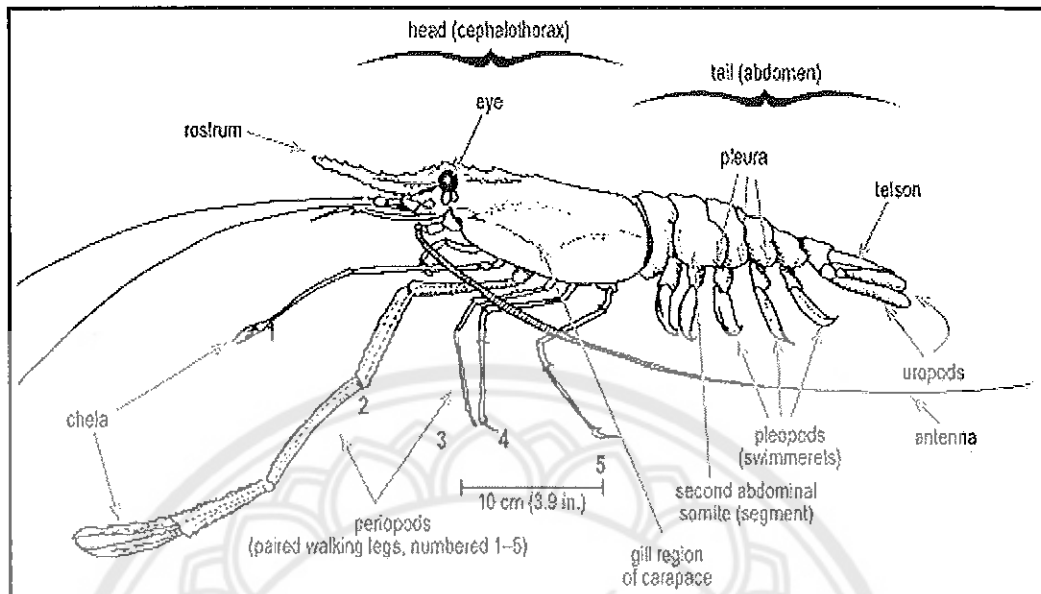
กุ้งก้ามกราม

1. ข้อมูลทั่วไป

กุ้งก้ามกราม (Giant Freshwater Prawn) เป็นสัตว์น้ำจืดขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบทวีปเอเชียใต้ เช่น บังคลาเทศอินเดียไปจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และบางส่วนของหมู่เกาะแปซิฟิก แต่ในปัจจุบันได้มีการนำไปเลี้ยงอย่างแพร่หลายทั่วโลกการจัดลำดับชั้นทางวิทยาศาสตร์กุ้งก้ามกรามจัดอยู่ในอาณาจักร Animalia ไฟลัม Arthropoda ชั้น Crustacea อันดับ Decapoda วงศ์ Palaemonidae สกุล *Macrobrachium* และมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Macrobrachium rosenbergii* (New, 2002)

กุ้งก้ามกราม เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) ลักษณะโดยรวมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัวซึ่งรวมกับส่วนอก (Cephalothorax) ประกอบไปด้วย ตา (Eye) กรี (Rostrum) ที่อยู่บริเวณปลายหัว ส่วนโคนของกรีนหา ปลายลักษณะงอนขึ้นที่สันกรีด้านบนและล่างมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อยภายใต้ส่วนหัวมีอวัยวะสำคัญคือ ตับหรือตับอ่อน กระเพาะ ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบย่อยอาหาร นอกจากนี้มีขาหน้า 5 คู่ คู่แรกจะใช้สำหรับนำอาหารเข้าปาก คู่ที่สองจะมีขนาดใหญ่ที่สุดและบริเวณปลายขาจะมีก้ามหนีบ (Chela) จะใช้สำหรับการเดินและป้องกันตัวจากศัตรู สำหรับส่วนลำตัวและหาง (Tail) ประกอบด้วยปล้องลำตัวทั้งหมด 6 ปล้อง ด้านล่างลำตัวมี ขา 5 คู่ (Pleopods) ที่ใช้สำหรับว่ายน้ำส่วนหางประกอบด้วยแพนหาง (Uropodes) ข้างละ 1 คู่ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม (Telson) ใช้สำหรับเคลื่อนไหวหรือถอยหลัง (Carpenter, & Niem, 1998; D'Abramo, & Brunson, 1996; Hicks, & Pierce, 2011)

แสดงดังภาพ 1

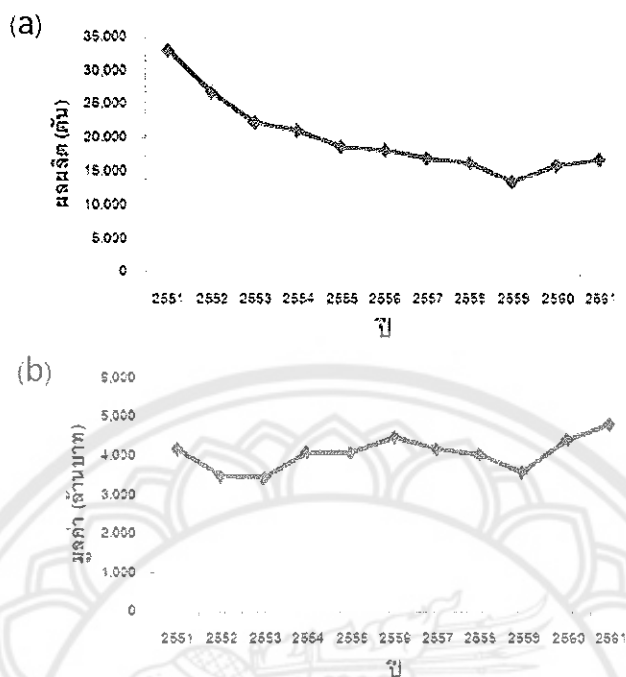


ภาพ 1 แสดงสัณฐานวิทยาของกุ้งก้ามกราม

ที่มา: Hicks, & Pierce, 2011

2. ความสำคัญของกุ้งก้ามกรามต่อระบบเศรษฐกิจของไทย

ในปัจจุบัน พบว่า กุ้งก้ามกรามกลายเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเพาะเลี้ยงง่าย ต้นทุนการเพาะเลี้ยงต่ำ สึกทั้งเป็นอาหารที่นิยมรับประทานของคนไทย จึงทำรายได้มหาศาลให้กับเกษตรกร โดยรายได้เฉลี่ยต่อปีมูลค่ามากกว่า 4,000 ล้านบาท ด้วยเหตุนี้จึงมีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างแพร่หลายในประเทศไทยและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในแถบภาคกลาง ได้แก่ ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม จากการสำรวจของกรมประมง ในปี 2553 พบว่า เนื้อที่เลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทย มีประมาณ 120,000 ไร่ ผลผลิตจึงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ทำให้รายได้ในการจำหน่ายสูงขึ้นด้วย (Na-Nakorn, & Jintasataporn, 2012) แสดงดังภาพ 2



ภาพ 2 แสดงผลผลิตและมูลค่ากึ่งกัมกรวมของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561
(a) ผลผลิตในหน่วยตัน (b) มูลค่าในหน่วยล้านบาท

ที่มา: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง กรมประมง ปี 2561, 2561

3. ปัญหาโรคติดเชื้อในกึ่งกัมกรวม

กึ่งกัมกรวมสร้างรายได้มากมายให้กับเกษตรกรแต่มีปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรไทยและทั่วโลก คือการติดเชื้อในกึ่งกัมกรวมทำให้ผลผลิตลดลงและขาดทุน สำหรับปี 2559 ได้ประมาณการว่าปริมาณผลผลิตกึ่งกัมกรวมจากการเพาะเลี้ยงของโลกลดลง ร้อยละ 17 จากปีที่ผ่านมา เนื่องจากประเทศผู้ผลิตหลักได้แก่อินเดียประสบปัญหาจากโรคไมโครสปอริเดียนส่วนเวียดนาม และจีนยังประสบปัญหาโรคตายด่วน สำหรับประเทศไทยก็ประสบปัญหานี้เช่นกัน ซึ่งจะเห็นได้ชัดจากการสำรวจของกรมประมงในปี 2561 ซึ่งได้รวบรวมข้อมูลผลผลิตกึ่งกัมกรวมในปี 2551-2561 แสดงดังภาพ 2 พบว่า ผลผลิตกึ่งกัมกรวมลดลงมากโดยเฉพาะในปี 2559 โดยมีสาเหตุมาจากการเพาะเลี้ยง รวมทั้งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แม้ว่าในปีต่อมาจะมีการแก้ปัญหาจนผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นแต่ปัญหานี้ก็ยังคงส่งผลกระทบต่อจนถึงปัจจุบันยังไม่สามารถแก้ไขได้ (กรมประมง, 2561)

สำหรับโรคติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามที่พบบ่อยส่วนใหญ่จะเกิดจากการติดเชื้อไวรัส เช่น โรคเอ็มเอ็มวี มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส Parvo-like virus มักจะติดเชื้อในลูกกุ้งหลังติดเชื้อเนื้อเยื่อจะกลายเป็นสีทึบและตายภายใน 2-3 วัน โรคจุดขาว (White Spot Syndrome) ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส White spot syndrome virus หลังติดเชื้อจะพบจุดสีขาว และทำให้ลูกกุ้งอ่อนแอและตาย โรคหางขาว (white tail disease) ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อในกลุ่ม Nodavirus ที่ทำให้กุ้งมีอาการกล้ามเนื้อตายเป็นสีขาวขุ่น แบคทีเรียก็เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* เช่น โรคตายด่วนในกุ้ง (Shrimp Early Mortality Syndrome: EMS) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* กุ้งที่ได้รับเชือดังกล่าวจะมีอาการตับและตับอ่อนเสื่อมสภาพอย่างฉับพลันและล้มตายเป็นจำนวนมาก โรคจุดดำบนเปลือกกุ้ง (Shell Disease) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonashydrophila* และโรคเรืองแสง (Luminescence disease) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* โดยกุ้งที่ได้รับเชื้อจะมีอาการเรืองแสงบริเวณตัวสังเกตเห็นได้ในเวลากลางคืน ซึ่งมีผลทำให้กุ้งอ่อนแอและตายในที่สุด (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008)

ระบบภูมิคุ้มกันกุ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง มีลักษณะคล้ายกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบปรับตัว (adaptive immunity) เหมือนกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจาก ไม่มี โมเลกุล immunoglobulin (Ig), T cell receptor (TCR) และ Major histocompatibility complex (Mhc) ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity (Arala-Chaves, & Sequeira, 2000; Vazquez et al., 2009) ดังนั้น ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจึงอาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) เป็นระบบหลักที่ใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อและกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยการตอบสนองนี้จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด หรือ hemocyte สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังสามารถแบ่งเซลล์เม็ดเลือดตามลักษณะการมีแกรนูลในไซโทพลาซึมของเซลล์ได้เป็น 3 ชนิดคือ hyaline cells (ไม่มีแกรนูล) semi granulocyte (แกรนูลขนาดเล็ก) และ granulocyte (แกรนูลขนาดใหญ่) ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่เฉพาะหรือทำหน้าที่ร่วมกันในหลายกระบวนการในระบบภูมิคุ้มกัน (Johansson, Keyser, Sritunyalucksana, & Söderhäll, 2000; Na-Nakorn, & Jintasataporn, 2012; New, Lister, Hulme, & Makin, 2002; Sung, Wu, & Song, 1999; Tsing, Arcier, & Brehélin, 1989) แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงชนิดและหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

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

ที่มา: Johansson, Keyser, Sritunyalucksana, & Söderhäll, 2000

ในระบบภูมิคุ้มกันจะมีโมเลกุลทำหน้าที่สำคัญที่เรียกว่า Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) เป็น polysaccharide และ glycoprotein ซึ่งเป็นองค์ประกอบบนผิวเซลล์ของจุลินทรีย์เช่น lipopolysaccharide (LPS) ของแบคทีเรียแกรมลบหรือ lipoteichoic acid (LTA) ของแบคทีเรียแกรมบวกและ β -1,3- glucan (bG) ของเชื้อรา นอกจากนี้ยังรวมถึง unmethylated CpG DNA single-strand และ double-strand RNA ของ viruses (Janeway Jr, & Medzhitov, 2002; Wang, & Wang, 2013) โมเลกุลดังกล่าวจะถูกจดจำอย่างจำเพาะโดยโปรตีน pattern recognition receptors (PRRs) ที่เป็นตัวรับบนผิวเซลล์ เช่น lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP), β -1,3-glucan binding protein (β GBP), C-type lectin, tachylectin, masquerade-like protein และ peptidoglycan recognition protein (PGRP) (Chen et al., 2016) กลไกการจดจำดังกล่าวจะเรียกว่า PAMPs-triggered immunity (PTI) สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง กลไก PTI จะส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immune response) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response) เพื่อต่อต้านการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมต่างๆ

1. ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune response)

เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยการสร้างสารน้ำ เช่น เอนไซม์ เพื่อไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆ และนำไปสู่การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ มีหลายกระบวนการดังนี้

1.1 ระบบ prophenoloxidase (ProPO)

ระบบนี้เป็นระบบที่ถูกกระตุ้นจากกลไก PTI คือการจับกันของ PAMPs และ PRRs หลังจากนั้น จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดขบวนการสลายแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือดที่มีแกรนูล ส่งผลให้มีการหลั่งเอนไซม์ prophenoloxidase activating enzyme (ppA) และ prophenoloxidase (proPO) ที่อยู่ภายในแกรนูลออกมา ซึ่งเอนไซม์ ppA ในรูป active สามารถเปลี่ยน prophenoloxidase ไปเป็น active phenoloxidase (PO) เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสร้างเมลานิน (melanization) โดยทำปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนสารกลุ่ม phenol ไปเป็น quinone และเปลี่ยนไปเป็น melanin ซึ่งจะยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ และมีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่มีความเป็นพิษสูงออกมาทำลายเชื้อ (Jiravanichpaisal, Lee, & Söderhäll, 2006)

1.2 กระบวนการแข็งตัวของเลือด (clotting)

เป็นกระบวนการหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองหลังถูกกระตุ้น โดยจะเกิดกระบวนการสลายแกรนูล เซลล์เม็ดเลือดชนิดไฮยาลินจะปล่อยเอนไซม์ transglutaminase ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยน fibrinogen ในพลาสมาไปเป็น fibrin ทำให้เลือดแข็งตัวจากนั้นจะเป็นการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มีแกรนูลจะรับรู้และหลั่งสารให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ที่ทำหน้าที่พื้นฟูหรือสมานแผลในบริเวณดังกล่าว (Jiravanichpaisal et al., 2006)

1.3 Antimicrobial peptides (AMP)

เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีขนาดประมาณ 15-20 กรดอะมิโน ที่ถูกสร้างขึ้นและเก็บไว้ในแกรนูลของเซลล์เม็ดเลือด เมื่อมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและเกิดกระบวนการสลายแกรนูล AMP ที่ถูกเก็บอยู่ด้านในก็จะถูกหลั่งออกมาทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส เป็นต้น AMP มีหลายชนิด เช่น penaeidins, lysozymes, crustins เป็นต้น แต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกัน penaeidins เป็น AMP ที่มีลักษณะจำเพาะคือที่ด้านปลาย N จะมี unconstrained proline-rich domain (PRD) และปลาย C จะมีกรดอะมิโนซิสเตอีน 6 ตัวที่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 3 พันธะ โดย penaeidins มีหน้าที่ยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น cytokine ที่จะนำไปสู่กระบวนการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ Crustin เป็น AMP อีกชนิดหนึ่งที่พบได้ในกุ้ง และสัตว์ขาข้อชนิดอื่นๆ โดยภายในสายเปปไทด์ส่วนจะประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน และมีหน้าที่ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก Lysozyme เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะไกลโคไซด์ระหว่าง N-acetylmuramic acid และ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย ดังนั้น เมื่อมี

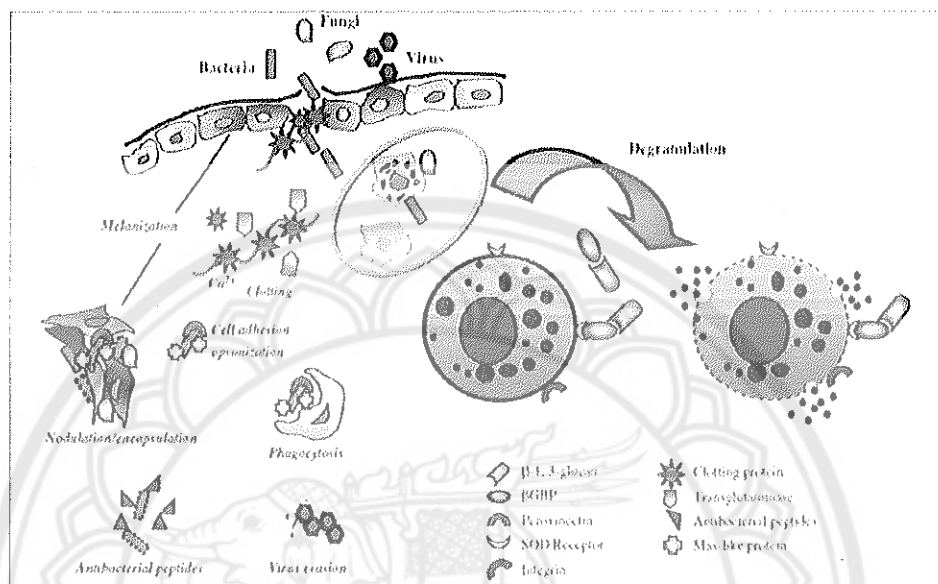
การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน lysozyme ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดจะถูกหลั่งออกมากำจัดเชื้อจุลินทรีย์ (Tassanakajon, Somboonwivat, Supungul, & Tang, 2013)

2. ภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (cellular immune response)

เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดเป็นหลัก ประกอบด้วย วิธีฟาโกไซโทซิส (phagocytosis), เอนแคปซูลชัน (encapsulation) และโนดูลเฟอร์เมชัน (nodule formation) วิธีฟาโกไซโทซิสเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ hemocyte ด้วยการยื่นไซโทพลาซึมไปล้อมสิ่งแปลกปลอมเป็น phagosomes จากนั้น phagosomes จะรวมกับ endosomes และ lysosomes ได้เป็น phagolysosomes และทำลายเชื้อโดยใช้ความเป็นกรดเนื่องจากภายใน phagolysosomes มีค่า pH ที่ต่ำ และใช้สาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และไฮดรอกซิลเรดิคัล (OH) ที่สร้างขึ้นมา (Xu, Liu, Alvarez, & Huang, 2014) เมื่อสิ่งแปลกปลอมมีจำนวนมากเกินกว่าจะกำจัดโดยวิธีฟาโกไซโทซิสได้ เซลล์จะอาศัยการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดกลายเป็น nodule เพื่อร่วมกันกำจัดสิ่งแปลกปลอม สำหรับในกรณีที่เชื้อจุลินทรีย์มีขนาดใหญ่เซลล์จะให้วิธีเอนแคปซูลชัน ซึ่งวิธีนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดชนิดมีแกรนูลทำหน้าที่หลักในการเข้าล้อมสิ่งแปลกปลอมให้รวมอยู่กับเซลล์เม็ดเลือดแล้วกำจัดออกจากร่างกาย นอกจากนี้ยังรวมถึงกระบวนการ RNA interference (RNAi) ที่เกิดตามธรรมชาติในเซลล์ยูคาริโอตทั่วไปมีหน้าที่ป้องกันและต่อต้านการติดเชื้อไวรัสโดยควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) อย่างจำเพาะได้แก่ small Interfering RNA (siRNA) และ Micro RNA (miRNA) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า dsRNA เหล่านี้มีบทบาทหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่างๆ มากมายภายในเซลล์เช่น กระบวนการเจริญเติบโต (Cell growth), กระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (Cell differentiation), กระบวนการตายและการอยู่รอดของเซลล์ (Cell death and cell survival), กระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (Metabolism) และที่สำคัญยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Hutvagner, & Zamore, 2002)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจะเริ่มต้นจากการเกิดกลไก PTI คือ โปรตีน PRRs จะจดจำ PAMPs จากนั้น จะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate immune response ทั้งสองแบบคือ แบบระดับเซลล์ซึ่งจะอาศัยกลไกต่างๆ ได้แก่ ฟาโกไซโทซิส (phagocytosis), เอนแคปซูลชัน (encapsulation), โนดูลเฟอร์เมชัน (nodule formation), apoptosis และ RNA interference (RNAi) และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ ได้แก่ การสร้างเมลานิน (melanization) และสารอนุมูลอิสระจากการทำงานของระบบ prophenoloxidase (ProPO),

สิ่งแปลกปลอม (Flegel, & Sritunyaluksana, 2011; Janeway Jr, & Medzhitov, 2002) แสดง
 ดังภาพ 3



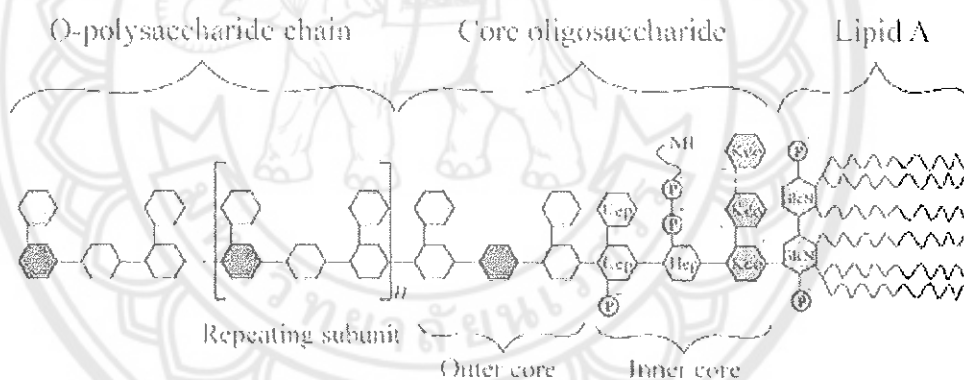
ภาพ 3 แสดงกลไกต่างๆ ที่ใช้ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ที่มา: Jiravanichpaisal et al., 2006

จะเห็นได้ว่า การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งก่งนั้นเริ่มต้นจากการกระตุ้นกลไก PTI และนำไปสู่การกระตุ้นกระบวนการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ หลากหลายกระบวนการขึ้นอยู่กับชนิดของ PAMPs ที่มากระตุ้น ในการศึกษาครั้งนี้ สนใจศึกษา PAMPs 2 ชนิด คือ lipopolysaccharide (LPS) และ polyinosinic: Polycytidylic acid (PIC)

3. Lipopolysaccharide (LPS)

เป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่พบในเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย polysaccharide และ lipid มีโครงสร้างหลัก 3 ส่วน ได้แก่ O-polysaccharides chains, core oligosaccharide และ lipid A โดย O-polysaccharides chains เกิดจาก polysaccharides หน่วยย่อยหลายหน่วยรวมกันซึ่งจะแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ สำหรับ core oligosaccharide จะแบ่งออกเป็น core ด้านนอกและด้านใน core ด้านนอกจะประกอบด้วย น้ำตาลทั่วไป เช่น น้ำตาลเฮกไซส หรือ มอโนแซ็กคาไรด์ซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอม เป็นต้น core ด้านในประกอบด้วยน้ำตาลกรดได้แก่ 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) และ D-glycero-D-manno-heptose (Hep) และส่วนในสุดคือ lipid A ประกอบด้วย กลูโคซามีน (GlcN) 2 โมเลกุล ที่มีกรดไขมันแนบด้วยพันธะเอไมด์หรือเอสเทอร์และมีกลุ่มฟอสเฟตหนึ่งกลุ่มในแต่ละโมเลกุลของกลูโคซามีน (Reynolds, & Raetz, 2009; Wang et al., 2016) แสดงดังภาพ 4

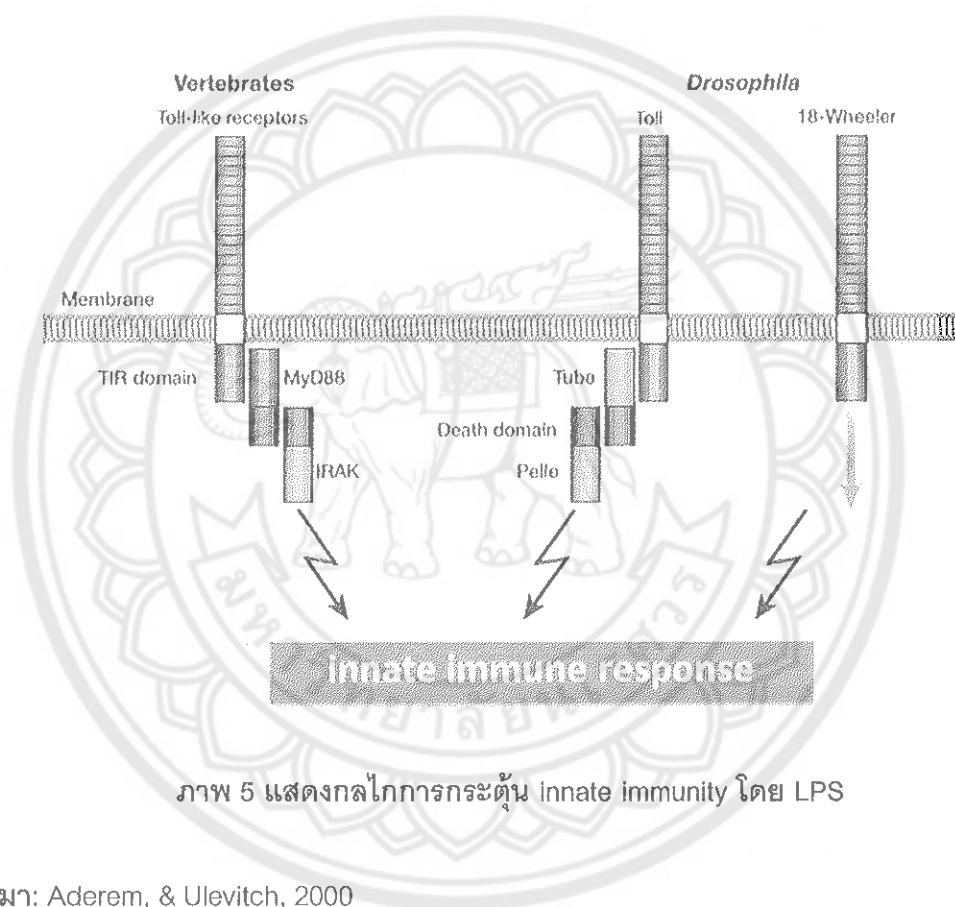


ภาพ 4 แสดงโครงสร้างของ LPS

ที่มา: Wang et al., 2016

จากการศึกษา ในปี 2000 พบว่า LPS สามารถกระตุ้น innate immunity ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังผ่านทางกลไกการจับอย่างจำเพาะกับโปรตีน PRRs ที่มีวิวัฒนาการได้แก่ Toll-like receptors 2 (TLR2) และ Toll-like receptors 4 (TLR4) โดยกลไกนี้จะอาศัย LPS-binding protein (LBP) และ CD14 เข้าารวมกับ LPS เป็น LPS-LBP-CD14 complex และพา LPS ไปจับอย่างจำเพาะกับ TLR4 นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ adaptor protein myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) และ serine kinase IL-1 Related

kinase (IRAK) และทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity สำหรับในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่า มีลักษณะคล้ายกันแต่จะมีโปรตีน PRRs ที่จำเพาะแตกต่างกัน คือ Toll และ 18-wheeler การจับกันระหว่าง LPS และ PRRs ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ adaptor protein tube และโปรตีน pelle ซึ่งทำหน้าที่เหมือนกับโปรตีน MyD88 และ IRAK และนำไปสู่การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity เช่นเดียวกัน (Aderem, & Ulevitch, 2000) แสดงดังภาพ 5

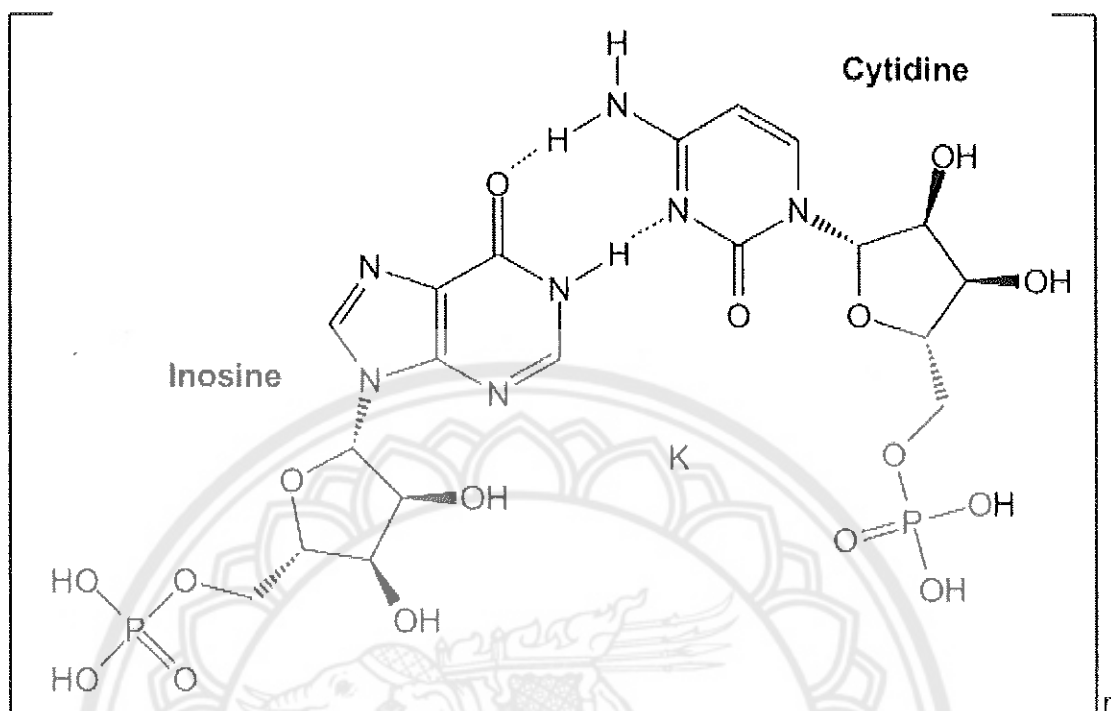


ภาพ 5 แสดงกลไกการกระตุ้น innate immunity โดย LPS

ที่มา: Aderem, & Ulevitch, 2000

4. Ppolyinosinic: Polycytidylic acid (PIC)

PIC คือ อาร์เอ็นเอสายคู่ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้จำลองการติดเชื้อไวรัสในร่างกาย (Fortier et al., 2004) มีโครงสร้างประกอบด้วย พอลิเมอร์ 2 สาย ได้แก่ inosinic acid และ cytidylic acid (ภาพ 6) เป็น PAMPs ชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันเหมือนการติดเชื้อไวรัส



ภาพ 6 แสดงโครงสร้างของ PIC

ที่มา: AdiepoGen Life Science, 2013

ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสส่วนมากจะมีการเหนี่ยวนำให้สร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ในระหว่างขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Jacobs, & Langland, 1996) PIC จึงถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เลียนแบบการติดเชื้อไวรัสในการศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านไวรัส ข้อดีของการใช้ PIC คือ ปลอดภัยและสะดวกสบายจึงเป็นที่นิยมใช้มากกว่าการใช้ไวรัสที่มีชีวิต (Fortier et al., 2004) จากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า PIC เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลันและทำให้เกิดพฤติกรรมก้าวร้าวในสิ่งมีชีวิตหลากหลายสายพันธุ์ เช่น กระต่าย หมู หนู และลิง (Cooper, & Istok, 1988; Homan, Zendzian, Schott, Levy, & Adamson, 1972; Kimura et al., 1994; Toth, 1996)

จากการศึกษาของ Vareille et al. (2011) พบว่า PIC สามารถใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเหนี่ยวนำกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ cytokine, การหลั่ง mucus ที่มากเกินไป, ความสมบูรณ์ของ epithelial ลดลง และการบาดเจ็บของทางเดินหายใจ (Vareille, Kieninger, Edwards, & Regamey, 2011) ในปี 2013 Wang et al. (2013) ใช้ PIC ที่สังเคราะห์ขึ้นฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านไวรัสใน *L. vannamei* โดยใช้วิธี suppression subtractive hybridization (SSH) ผลการทดลอง พบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเพื่อการต่อต้านไวรัส 480 ยีน และมีหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ interferon (IFN) เช่น double stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), toll – like receptor 3 (TLR3) และ IFN γ - inducible protein 30 ซึ่งยีนเหล่านี้ เป็นยีนที่ควบคุมระบบ IFN ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้น IFN receptor gene ในเซลล์ HEK293T cell (Wang, Weng, & He, 2015)

Crustacean hepatopancreas และหน้าที่ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ของสัตว์ในกลุ่ม crustacean ทำหน้าที่คล้ายคลึงกับ ตับ และตับอ่อนของสัตว์มีกระดูกสันหลัง คือจะเป็นอวัยวะหลักในระบบย่อยอาหาร (Rószler, 2014) ตับและตับอ่อน มีหน้าที่หลากหลาย เช่น ดูดซึมคาร์บอนไดออกไซด์ และ ไนโตรเจน, metabolism, สมดุลเกลือแร่, การสังเคราะห์และกำจัดฮอร์โมน, การขับสารพิษ และสะสมโลหะหนัก (Ahearn, Mandal, & Mandal, 2004; McGaw & Curtis, 2013; Mykles, 2011) และหน้าที่ที่สำคัญคือ ระบบภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์ตับและตับอ่อนสามารถกลืนกินซากเซลล์และเซลล์แบคทีเรียจาก gut lumen จากการศึกษานใน *P. monodon* พบว่า เซลล์ตับและตับอ่อนสามารถปล่อยโปรตีนที่ต่อต้านแบคทีเรียทำให้เกิด phagocytosing hemocytes เพิ่มขึ้น (Alday-Sanz, Roque, & Turnbull, 2002; Kulkarni et al., 2013) นอกจากนี้ เมื่อทำการศึกษานในสัตว์กลุ่ม crustacean หลายชนิด พบว่า หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย LPS, *Vibrio* และ viral ในตับและตับอ่อนมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ vertebrate-type antigen เช่น Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT), cathepsin L, cathepsin B และ legumain รวมไปถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และกระบวนการ immune deficiency (IMD) (Chen et al., 2013; De Zoysa, & Lee, 2007; Rószler, 2014; Wang et al., 2009)

Xi et al. (2015) ได้ศึกษาการแสดงออกของ miRNA จาก เหงือก กล้ามเนื้อ ตับและตับอ่อน ของกุ้งขาว พบว่า miR-100, miR-276a, miR-998, miR-305, let-7, miR-279, miR-71, miR-

276c และ miR-995 มีการแสดงออกทั้ง 3 เนื้อเยื่อในระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน ซึ่งคาดว่า miRNA เหล่านี้ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกิ้ง (Xi et al., 2015)

MicroRNAs (miRNAs)

1. ข้อมูลทั่วไป

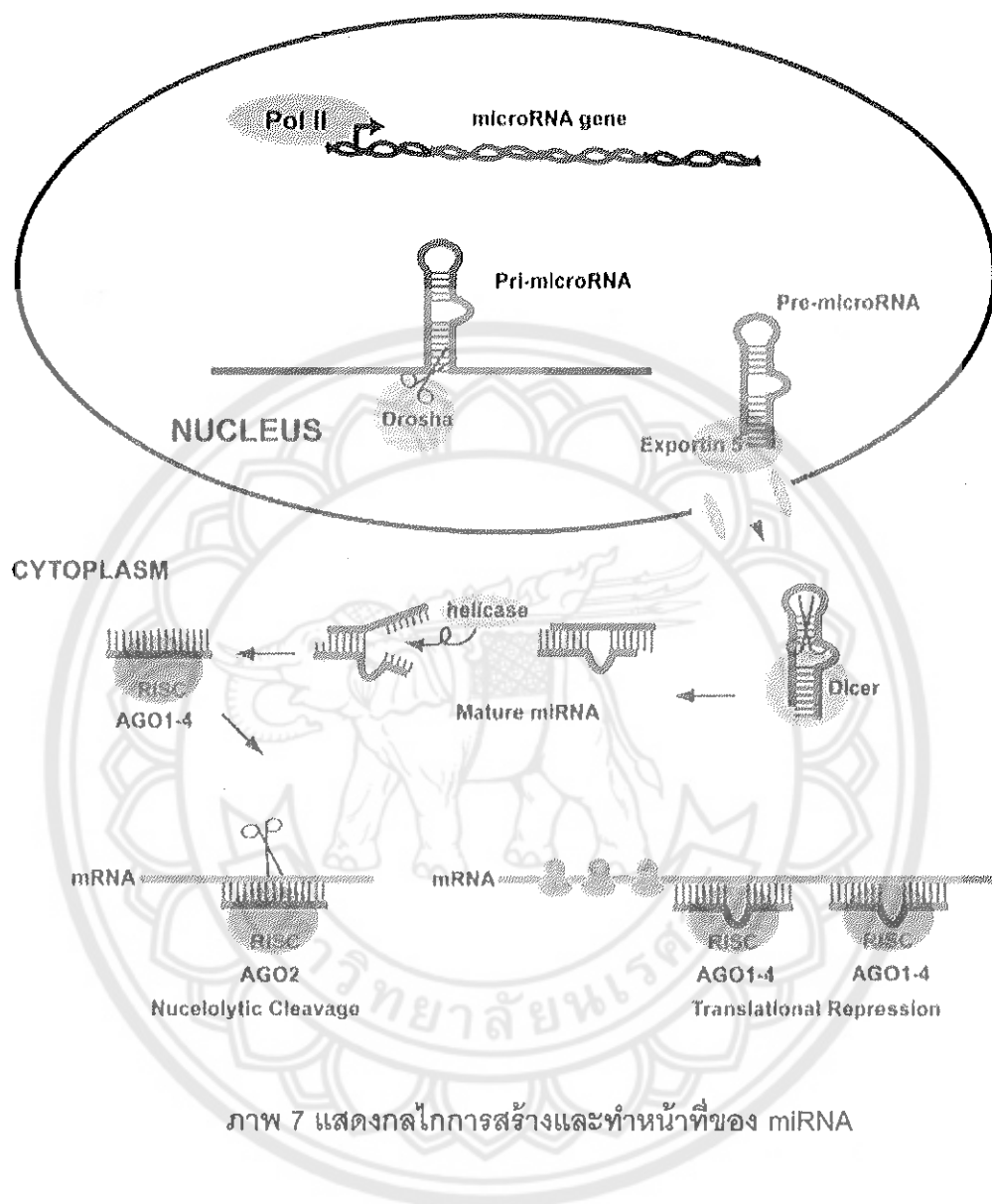
miRNAs คืออาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน (non-coding region) มีความยาวประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในขบวนการหลังการถอดรหัส (post-transcription) (Bushati, & Cohen, 2007) ในปีค.ศ. 1993 ได้มีการค้นพบ miRNA เป็นครั้งแรกซึ่งมีชื่อว่า lin-4 และ let-7 ซึ่งพบว่า ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการพัฒนาตัวอ่อนของ *Caenorhabditis elegans* หรือหนอนตัวกลม (Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993; Pasquinelli, Reinhart, Slack, Maller, & Ruvkun, 2000) หลังจากที่ได้มีการค้นพบดังกล่าวทำให้ miRNA ได้รับความสนใจและมีศึกษาเพิ่มมากขึ้นจนมีการตีพิมพ์เผยแพร่ข้อมูลเป็นจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการค้นพบ miRNA และจัดเก็บในฐานข้อมูล miRBase หลายชนิด miRNA ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสัตว์ ในกลุ่มคริสเตียน หนอนตัวกลม พืชและไวรัส และพบว่า miRNA มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของยีนในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ยูแคริโอต เช่น ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ (Developmental timing) การเปลี่ยนแปลงตัวเองของเซลล์ (Cell differentiation) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Cell proliferation) กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) และกระบวนการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ (Immune defense) (Huang et al., 2012)

2. การสังเคราะห์ miRNA

miRNA มีความยาวไม่เท่ากันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดโดยจะมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 18-24 นิวคลีโอไทด์ โครงสร้างด้านปลาย 5' ประกอบด้วยฟอสเฟตและด้าน 3' เป็นไฮดรอกซิล และประกอบด้วยส่วนที่สำคัญที่ใช้รับรู้เป้าหมาย ที่เรียกว่า seed region ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 6-7 เบส บริเวณปลายด้าน 5' ของ miRNA สายเดียวจะมีความสำคัญในการรับรู้ mRNA เป้าหมายที่แตกต่างกัน โดยจะมีตำแหน่งจับอยู่บริเวณ 3' untranslated region (3'-UTR) ของ mRNA เป้าหมาย (Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002) การสังเคราะห์ miRNA เกิดขึ้นภายในเซลล์ดังนี้ เริ่มต้นในนิวเคลียสโดยเอนไซม์ RNA polymerase II จะทำหน้าที่สังเคราะห์ primary miRNA (pri-miRNA) ซึ่งจะมีการเติม cap ที่ปลายด้าน 5' และ poly A ที่ปลายด้าน 3' โดยโมเลกุลจะมีลักษณะเป็นก๊ีบติดผม (hairpin-shaped) จากนั้น pri-miRNA จะถูกตัดโดยเอนไซม์ Drosha

ซึ่งเป็น dsRNA-specific RNase III endonuclease ที่ทำงานร่วมกับโปรตีน DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) จะได้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) ที่มีความยาวประมาณ 60-100 นิวคลีโอไทด์และปลายด้าน 3' ของไมโครอาร์เอ็นเอมีนิวคลีโอไทด์ยื่นออกมา 1-4 เบส pre-miRNA จะถูกขนส่งออกมายังไซโทพลาซึมโดยโปรตีน exportin-5 จากนั้นเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์ nuclease ในไซโทพลาซึมจะทำหน้าที่ตัด pre-miRNA โดยทำงานร่วมกับโปรตีน TAR-RNA binding protein (TRBP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ RNA สายคู่ทำให้ได้ miRNA ที่นิวคลีโอไทด์ภายในโมเลกุลเข้าคู่กันอย่างไม่สมบูรณ์มีขนาดประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์โดยปลายด้าน 3' มีนิวคลีโอไทด์ยื่นออกมา 1-4 เบสอาร์เอ็นเอสายคู่ที่ได้นี้จะมีเพียง 1 สายเท่านั้นเป็นไมโครอาร์เอ็นเอสมบูรณ์ (mature miRNA) RNA สายคู่นี้จะถูกแยกโดยเอนไซม์ RNA helicase และสาย RNA เส้นที่มีปลายด้าน 5' เสถียรต่ำกว่าจะไปรวมกับ RNA-induce silencing complex (RISC) ซึ่งมีโปรตีน Argonaute (Ago) เป็นส่วนประกอบหลักและจะถูกพาไปยัง mRNA เป้าหมายโดยเข้าจับบริเวณ 3'-untranslated region (3'-UTR) และควบคุมการแสดงออกของ mRNA ผ่าน 2 กลไก ได้แก่ กระตุ้นให้มีการตัดและสลาย mRNA เป้าหมาย และ ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Bartel, 2004) แสดงดังภาพ 7



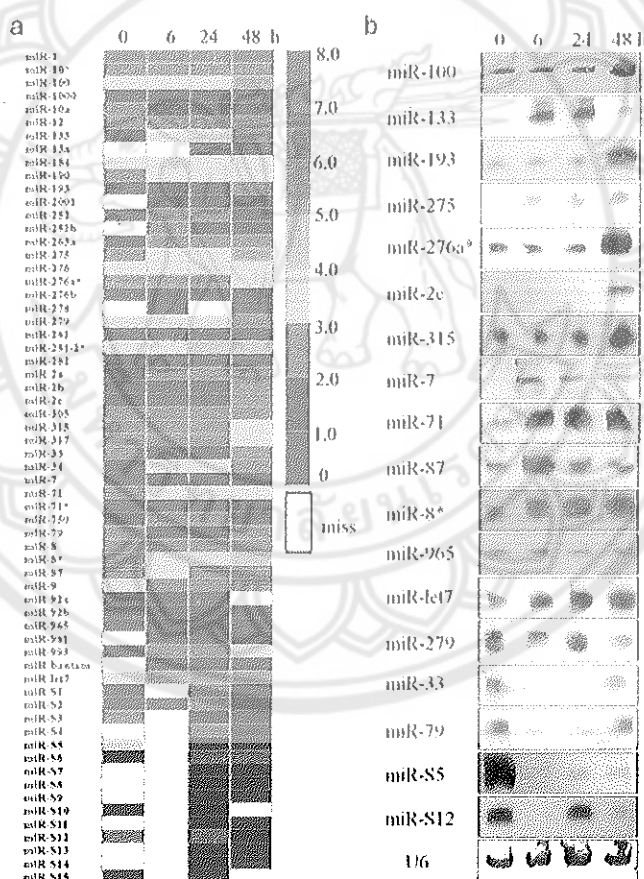
ภาพ 7 แสดงกลไกการสร้างและทำหน้าที่ของ miRNA

ที่มา: Hammond, 2005

3. ความเกี่ยวข้องของไมโครอาร์เอ็นเอกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง

มีการศึกษามากมาย ที่พบว่า miRNA มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ในปี 2012 Huang และ Zhang ศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ใน *M. japonicus* หลังจากติดเชื้อไวรัส WSSV (Huang et al., 2012) และพบว่า miRNA 63 ชนิด (ภาพ 8) มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปและส่วนใหญ่มีเป้าหมายเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ยีนในกลุ่ม small GTPase-mediated signaling transduction pathway ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย

ของเซลล์แบบ autophagy และ apoptosis ยืนยันที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบ เซลล์และสารน้ำ เช่น Toll-like receptor signal pathway การสร้าง antimicrobial humoral response การเกิด endocytosis และ phagocytosis และยืนยันในกระบวนการ RNA interference (RNAi) ตัวอย่างเช่น let-7 มีเป้าหมายคือ transmembrane protein 14C-like ที่ทำหน้าที่สำคัญใน กระบวนการ proPO miR-12 เป้าหมายคือ signaling (initiator) caspase, miR-1 มีเป้าหมายคือ endonuclease- reverse transcriptase รวมไปถึง miR-190 มีเป้าหมายคือ choline acetyltransferase ซึ่งเป้าหมายเหล่านี้ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis และ phagocytosis (Huang et al., 2012)

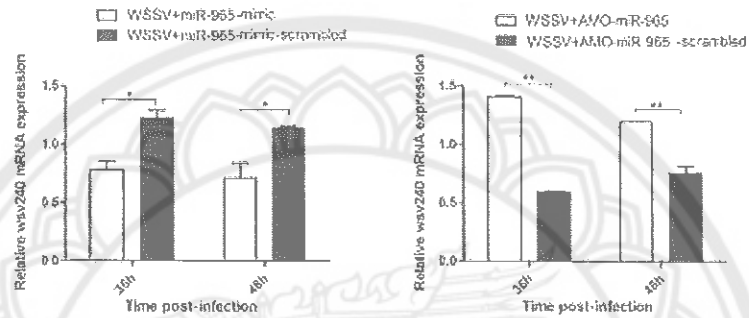
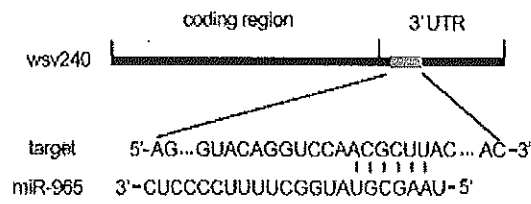


ภาพ 8 แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ WSSV ใน *M. japonicus* (A) Microarray analysis (B) Northern hybridization

ที่มา: Huang et al., 2012

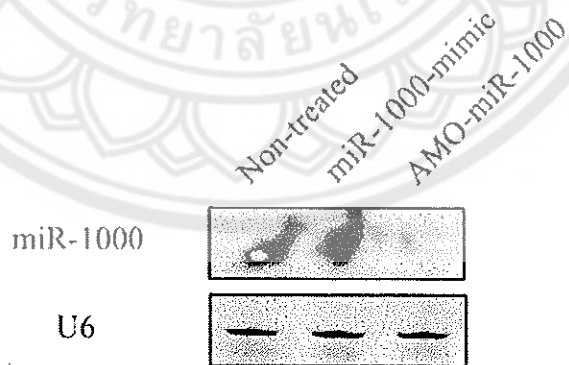
ในปี 2016 Shu et al. (2016) ได้ศึกษาการแสดงออกของ miR-965 ทำหน้าที่สำคัญในการต่อต้านการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง *M. japonicas* โดยพบว่า miR-965 มีเป้าหมายเป็นยีน wsv240 ของไวรัส WSSV ซึ่งจำเป็นต่อการติดเชื้อ WSSV ในกุ้ง โดยพบว่า miR-965 สามารถเข้าจับที่ปลาย 3'UTR ของยีน trypsin ได้ และยังพบว่า การฉีดกระตุ้นกุ้งติดเชื้อด้วย miR-965 ยังมีผลให้การแสดงออกของยีน wsv240 ลดต่ำลง และการยับยั้งการแสดงออกของ miR-965 ด้วย anti-miRNA oligonucleotide (AMO) ทำให้การแสดงออกของยีน wsv240 เพิ่มมากขึ้น (ภาพ 9) (Shu, Li, & Zhang, 2016) นอกจากนี้ Gong et al. (2015) ได้ศึกษาการแสดงออกของ miR-1000 เมื่อกระตุ้นให้ติดเชื้อ WSSV ในกุ้งชนิดเดียวกัน พบว่า miR-1000 มีเป้าหมายเป็นยีน p53 โดยพบว่า miR-1000 สามารถเข้าจับที่ปลาย 3'UTR ของยีน p53 ที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตายของเซลล์ และยังพบว่า หลังฉีดกระตุ้นกุ้งให้ติดเชื้อ miR-1000 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นและนำไปสู่การลดลงของปริมาณไวรัสทำให้อัตรการตายของกุ้งลดลง (ภาพ 10) (Gong, Ju, & Zhang, 2015)

Wang, Zhu (2017) ศึกษาการแสดงออกของ miR-100 ในกุ้งหลังจากติดเชื้อ WSSV และ *V. alginolyticus* พบว่า เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 มีผลให้มีระดับการแสดงออกที่ยีนที่ทำหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเปลี่ยนไป เช่น p53, MAPK, hemocyanin, myosin และ proPO ส่งผลให้เกิดกระบวนการ apoptosis มากขึ้นนำไปสู่การลดจำนวน WSSV copies ในกุ้ง และลดอัตราการตายของกุ้งจากการติดเชื้อ WSSV (ภาพ 11) (Wang, & Zhu, 2017)



ภาพ 9 แสดงบริเวณเป้าหมายของ miR-965 และความสำคัญของ miR-965 ต่อการยับยั้งการติดเชื้อ WSSV ใน *M. japonicas*

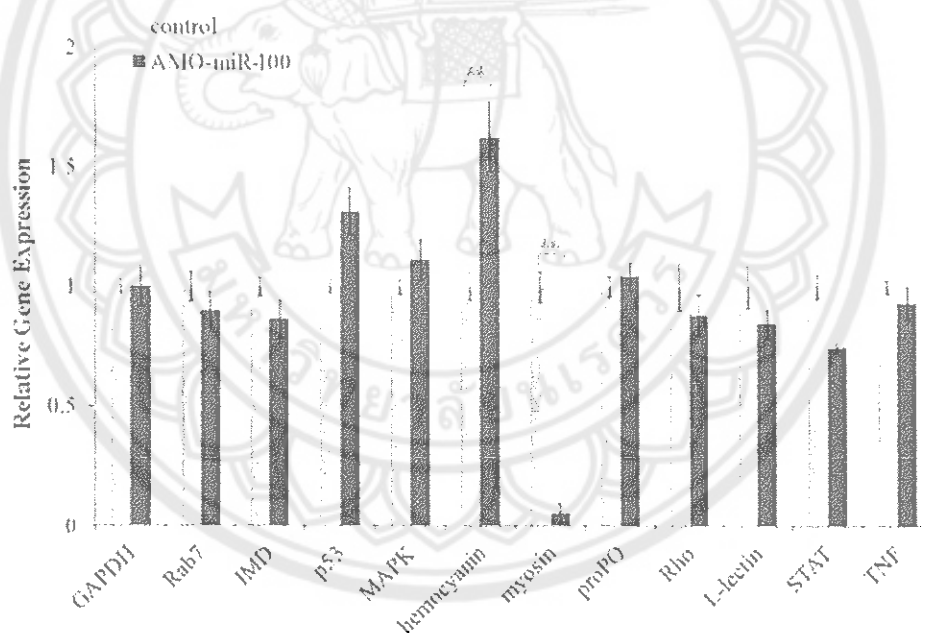
ที่มา: Shu et al., 2016



ภาพ 10 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-1000 หลังการติดเชื้อ WSSV ใน *M. japonicas*

ที่มา: Gong, Ju, & Zhang., 2015

Kaewkascholkul et al. (2016) ศึกษา miRNAs ในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส WSSV ใน hemocyte พบว่ามี miRNAs 11 ชนิดที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกุ้งติดเชื้อ WSSV ซึ่งเมื่อทำนายเป้าหมายของ miRNAs เหล่านี้ พบว่าเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง antimicrobial peptides ยีนในกลุ่ม signaling transduction proteins ยีนในกลุ่ม heat shock proteins ยีนในกลุ่ม oxidative stress proteins ยีนในกลุ่ม proteinases or proteinase inhibitors ยีนในระบบการแข็งตัวของเลือด ยีนในกลุ่ม apoptosis-related proteins ยีนในระบบ proPO และ pattern recognition proteins (ภาพ 12) นอกจากนี้ Kaewkascholkul et al. (2016) ยังพบว่า pmo-bantam มีเป้าหมายคือ Kunitz-type serine protease inhibitor (KuSPI) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการต่อต้านไวรัสในกุ้ง (Kaewkascholkul et al., 2016)



ภาพ 11 แสดงระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปของยีนที่ทำหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับ ระบบภูมิคุ้มกัน หลังการติดเชื้อ WSSV ใน *M. Japonicas*

ที่มา: Wang, & Zhu., 2017

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

กึ่งก้ามกราม น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม ซึ่งจากฟาร์มเลี้ยงกึ่งในจังหวัดพิษณุโลก นำมาเลี้ยงในภาชนะทรงสี่เหลี่ยมความจุ 100 ลิตร โดยให้อากาศและให้อาหารอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้กึ่งปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมใหม่และลดความเครียด เป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นกึ่งที่สุขภาพดีจะถูกคัดเลือกโดยดูจากลักษณะภายนอก เพื่อไปทำการทดลองต่อไป

2. สารเคมี

lipopolysaccharide (LPS) และ polyinosinic: Polycytidylic acid (PIC) จากบริษัท Sigma-Aldrich โดยเตรียมเป็น stock ความเข้มข้น 5mg/ml ใน NaCl ความเข้มข้น 150 mM และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองของ LPS และ PIC คือ 0.125 µg/µl และ 1 µg/µl ตามลำดับ

สารเคมีอื่นๆ ที่ซื้อมาจากหลายบริษัท เช่น Pacific science, Bio Basic Canada, Thermo Science, Zymo Research, Sigma-Aldrich, Invitrogen และ Toyobo

3. Enzymes และ ชุดน้ำยา

Direct-zol™ RNA Miniprep kit (Zymo Research)

TruSeq Small RNA Library Preparation Kits (Illumina)

Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)

THUNDERBIRD®SYBR® qPCR Mix (Toyobo)

4. Primers

Primers ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดง Primers ที่ใช้ในการทดลอง

miRNA	Primers	Sequence 5' → 3'
miR-1647	Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGAGTA
	Forward	CGGCCGTGCTCTCCTGTAA
miR-100	Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTAA GTT
	Forward	CTATGCCGAACCCGTAGATC
Bantam	Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAATCAG
	Forward	CCGGCGTGAGATCATTGT
miR-375-3p	Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCCAAG
	Forward	GCGCGAGCCTTTGTTCTTCT
miR-242	Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGTCCG
	Forward	CCGGCCGCGATTTAGTGAGG
EF1 α	Forward	ACTGCGCTGTGTTGATTGTAG CT
	Reverse	ACAACAGTACGTGTTACAGGGTC
Universal reverse primer		ACAGTGCAGGGTCCGAGGTA
PRT		CCGGAATTCAAGCTTCTAGAGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT

วิธีทดลอง

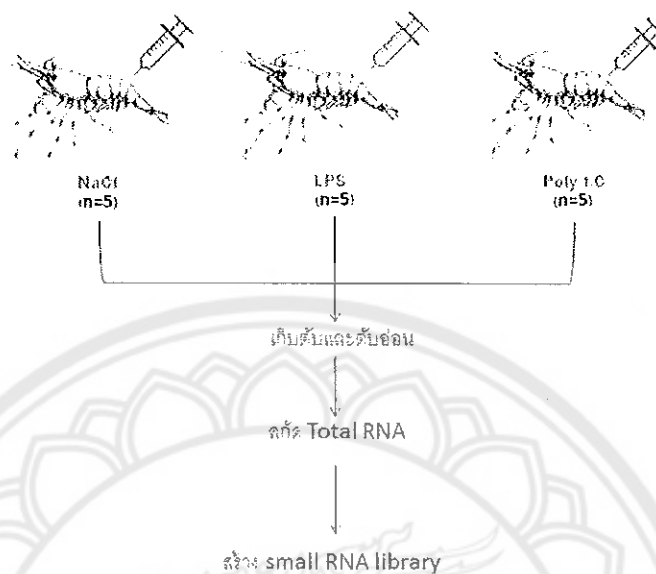
1. การเตรียมและเก็บตัวอย่าง

เลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นเวลา 5-7 วันเพื่อการปรับตัวและลดความเครียด จากนั้นเลือกกุ้งสุขภาพดีมาใช้ในการทดลอง โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว ($n = 5$) โดยกลุ่มแรกฉีดด้วย LPS ความเข้มข้น 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณ 100 μl กลุ่มที่สองฉีดด้วย PIC ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณ 100 μl และกลุ่มที่สามฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาณ 100 μl ซึ่งจะใช้เป็นกลุ่มควบคุม (ภาพ 13) หลังจากฉีดกระตุ้นนาน 12 ชม. ทำการเก็บตับและตับอ่อนปริมาณ 0.1-0.5 กรัมมาสกัด RNA ด้วย Direct-zol™ RNA Miniprep kit (Zymo Research) ตามวิธีการของผู้ผลิต โดยเก็บตับและตับอ่อนเติม TRI Reagent® 600 μl จากนั้นทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง pro250 homogenizer (PRO Scientific Inc.) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วน supernatant มาเติมด้วย ethanol 95-100% และย้ายตัวอย่างทั้งหมดลง Zymo-Spin™ III CG

Column ที่อยู่ใน Collection Tube จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน Collection Tube อันใหม่ และเติม RNA Wash Buffer ปริมาณ 400 μ l และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมระหว่าง DNase I 5 μ l และ DNA Digestion Buffer 75 μ l ลงไปและป่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Direct-zol™ RNA PreWash ปริมาณ 400 μ l และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 1 นาที ต่อไปเติม RNA Wash Buffer 700 μ l และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 2 นาที เปลี่ยน Zymo-Spin™ IIICG Column มาใส่ในหลอด RNase-free และเติม DNase/RNase-Free Water พร้อมทั้งปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อชะ RNA ออกมาจาก Column มายังหลอด RNase-free จากนั้นนำ Total RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วย NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm โดยความเข้มข้นของ RNA จะถูกคำนวณจาก ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้น RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times \text{diution factor} \times 40}{1000}$$

ความบริสุทธิ์ของ RNA หาได้จากอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} โดยค่าที่อยู่ในช่วง 1.8-2.0 คือค่าที่บ่งบอกถึง RNA มีความบริสุทธิ์สูง จากนั้นนำ Total RNA จากกึ่งแต่ละตัวในกลุ่มการทดลองในปริมาณเท่าๆ กันมาผสมกัน แล้วใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มการทดลองนั้นๆ ในการสร้าง small RNA library ในขั้นตอนต่อไป



ภาพ 13 แสดงแผนภาพการทดลองเพื่อสร้าง small RNA library

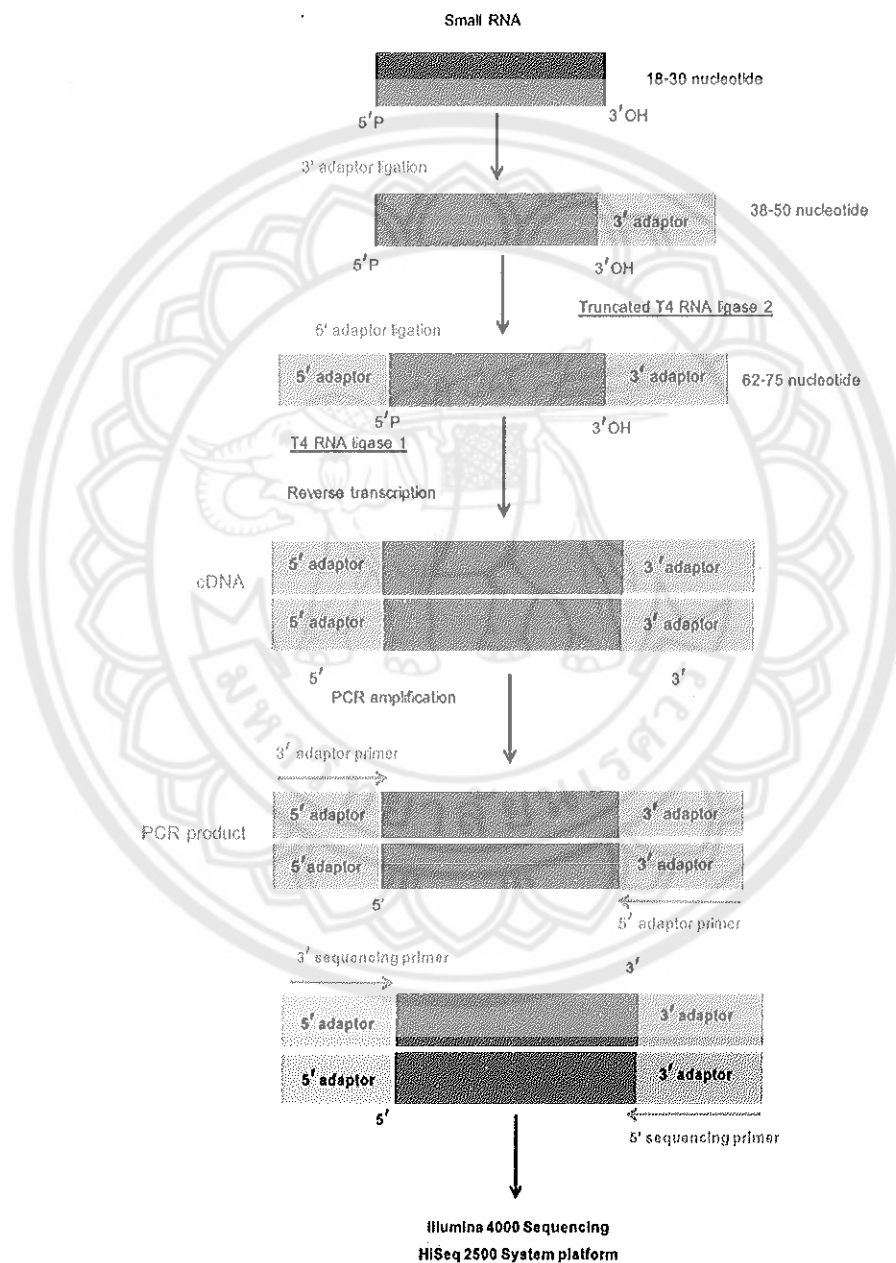
2. การตรวจสอบคุณภาพของ Total RNA

นำ Total RNA ตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies) ซึ่งผลที่ได้จะรายงานเป็นค่า RNA integrity number (RIN) โดยค่า RIN ของ RNA ตั้งแต่ 7 ขึ้นไปนั้นอยู่ในระดับ Level A ซึ่งหมายถึง RNA มีคุณภาพ ไม่มีการแตกหัก และสามารถนำไปสร้าง small RNA library ได้

3. การสร้าง small RNA library

Total RNA ปริมาณ 10 μ g จะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้เทคนิค native polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นตัด small RNA ขนาด 18-30 นิวคลีโอไทด์ออกมาจากเจล นำมาแยกให้บริสุทธิ์แล้วนำไปสร้าง small RNA library โดยใช้ TruSeq Small RNA Library Preparation Kits (Illumina) โดยนำ small RNA มาเติม 3' adaptor และ 5' adaptor โดยใช้ T4 RNA ligase ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 62-75 นิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำมาสังเคราะห์เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) และนำมาเพิ่มจำนวนโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จำนวน 15 รอบ จากนั้น PCR product ขนาด 145-160 bp จะถูกนำมาแยกด้วย 6% TBE-polyacrylamide gel และทำให้บริสุทธิ์ คุณภาพของ small RNA libraries จะถูกประเมินโดยใช้ Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) ร่วมกับ DNA High Sensitivity Chips จากนั้นจึงนำ small RNA library

ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ HiSeq 2500 System (Illumina) ขั้นตอนการสร้าง small RNA library แสดงดังภาพ 14 การสร้าง small RNA libraries จะทำโดยบริษัท BGI Tech Solutions Co., Ltd. เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน

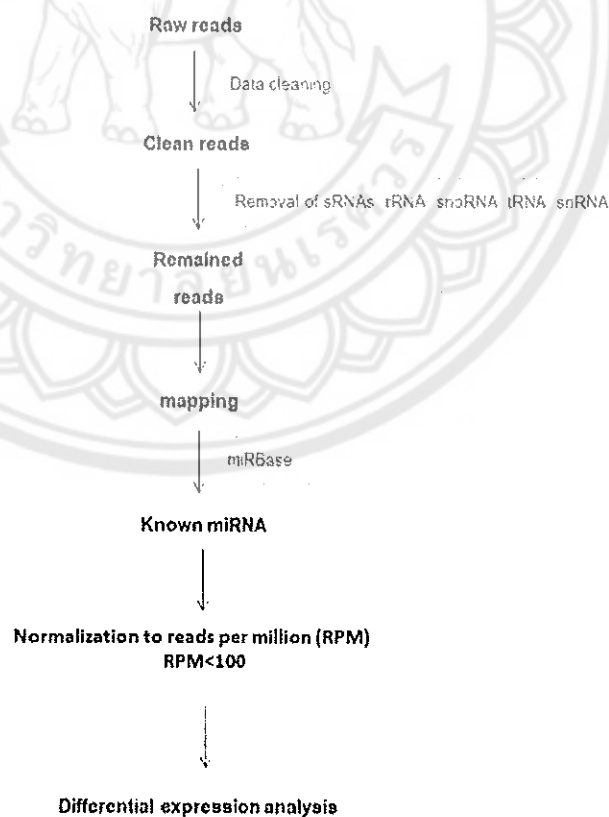


ภาพ 14 แสดงขั้นตอนการสร้าง small RNA library

4. การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศ

4.1 การกรองข้อมูลและการระบุ miRNA

นำข้อมูลที่ได้จากการทำ high throughput sequencing ซึ่งเป็นข้อมูล raw reads มาทำ data cleaning เพื่อตัดลำดับของ adapter และ poly A ออก ซึ่งจะได้ข้อมูลที่เป็น clean reads นำ clean reads ที่ได้มาแยก small RNA ที่ไม่เกี่ยวข้อง เช่น rRNA, snoRNA, tRNA, snRNA ออกจาก libraries โดยนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) และ Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ข้อมูลส่วนที่เหลือ (remained reads) จะถูกนำมา mapping เทียบกับ *de novo* transcriptome ของ *M. rosenbergii* (GenBank accession number: PRJNA73259) โดยให้ SOAP2 เนื่องจาก ปัจจุบันยังไม่มีรายงานลำดับจีโนมของ *M. rosenbergii* จากนั้นข้อมูลจะถูกนำมาเทียบกับฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลของ miRNA เพื่อทำการระบุชนิดของ miRNA ขั้นตอนการวิเคราะห์ small RNA libraries แสดงดังภาพ 15



ภาพ 15 แสดงการวิเคราะห์ small RNA library ด้วยชีวสารสนเทศ

4.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของ miRNA

นำ miRNA ที่แสดงออกในแต่ละ library มาทำ normalization ให้อยู่ในรูป reads per million (RPM) values โดยจะเพิ่ม pseudocount จำนวน 1 read เข้าไปที่ miRNA แต่ละชนิด จากนั้นนำมาคำนวณให้อยู่ในรูป RPM โดยใช้สูตร

$$\text{Reads per million (RPM) values} = \frac{(\text{จำนวน reads ของ miRNA} + 1 \text{ pseudocount}) \times 10^6}{\text{จำนวน clean reads ทั้งหมด ใน library}}$$

จากนั้น miRNA ที่มีการแสดงออกต่ำกว่า 100 RPM จะถูกคัดออก เนื่องจากเป็น miRNA ที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ นำ miRNA ที่มีการแสดงออกมากกว่า 100 RPM มาคำนวณค่า fold change โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ระหว่างกลุ่ม LPS หรือ PIC กับกลุ่มควบคุม NaCl ค่า fold change ที่ได้จะถูกแปลงให้อยู่ในรูปของ \log_2 ซึ่ง miRNA ที่มีค่า \log_2 fold change ≥ 1 จะถูกพิจารณาว่าเป็น miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญ (differentially expressed miRNAs หรือ DEMs) เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS หรือ PIC (ภาพ 15)

5. การทำนายยีนเป้าหมายและหน้าที่ของ miRNA

การทำนายยีนเป้าหมายจะใช้ *de novo* transcriptome ของ *M. rosenbergii* (GenBank accession number: PRJNA73259) เป็นแม่แบบสำหรับการทำนาย โดยใช้โปรแกรม miRanda และกำหนดค่าในการทำนายดังนี้ free energy < -20 kcal/mol และ score > 50 จากนั้นจะทำนายหน้าที่ของยีนเป้าหมายโดยใช้ฐานข้อมูล Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org>) และ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)

6. การตรวจสอบความถูกต้องของระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงของ miRNA

คัดเลือก miRNAs 5 ชนิด ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญและมีรูปแบบการแสดงออกที่น่าสนใจ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ PIC มาทำการยืนยันการแสดงออกด้วยเทคนิค stem-loop quantitative real time PCR (qPCR) โดย primer ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตาราง 2 แบ่งกึ่งก้ามกรามออกเป็น 3 กลุ่ม ($n = 5$) กลุ่มแรกฉีดด้วย LPS ความเข้มข้น 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณ 100 μl กลุ่มที่สองฉีดด้วย PIC ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณ 100 μl และกลุ่มที่สามฉีดด้วย 0.85% NaCl ปริมาณ 100 μl ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นเก็บตับและตับ

อ่อนกึ่งหลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ PIC เป็นเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาสกัด RNA และตรวจสอบความเข้มข้นดังที่อธิบายข้างต้น จากนั้นนำ Total RNA 1 μg มาทำปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ stem loop RT primer ร่วมกับชุดน้ำยา Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) ตามวิธีการของผู้ผลิต โดยใช้ RNA 500 ng, PRT primer 10 mM, dNTP 20 mM และ sterile water จะได้ปริมาตรรวม 7 μl จากนั้นนำไปบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที และเติม 5X FS buffer 2 μl , DTT 0.5 μl , Superscript III 0.5 μl ปริมาตรรวมทั้งหมดคือ 10 μl จากนั้นนำไปบ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 60 นาทีและ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา qPCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ miRNA แต่ละชนิด ร่วมกับชุดน้ำยา THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Toyobo) โดยใช้ cDNA 1 μl ชุดน้ำยา THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix 10 μl forward primer และ universal miRNA reverse primers (ตาราง 2) และ sterile water ปฏิกิริยา qRT-PCR จะทำขั้นตอน pre-denaturation 95 °C เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 °C เวลา 15 วินาที และ 60 °C 1 นาที จะทำทั้งหมด 40 รอบ และทำปฏิกิริยา 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง Exicycler™ 96 Real-time PCR System (Bioneer) หลังจากเสร็จปฏิกิริยา qPCR จะตรวจสอบความจำเพาะโดยวิธี melting curve analysis การแสดงออกของ miRNA จะคำนวณโดยใช้วิธี comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) โดยใช้ยีน EF-1 เป็นยีนควบคุมตามวิธีที่รายงานโดย He et al. (2018) ระดับการแสดงออกของ miRNA จะแสดงในรูป mean \pm standard error of the mean (SEM) นัยสำคัญทางสถิติจะวิเคราะห์ด้วย One Way-ANOVA ค่า P น้อยกว่า 0.05 จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

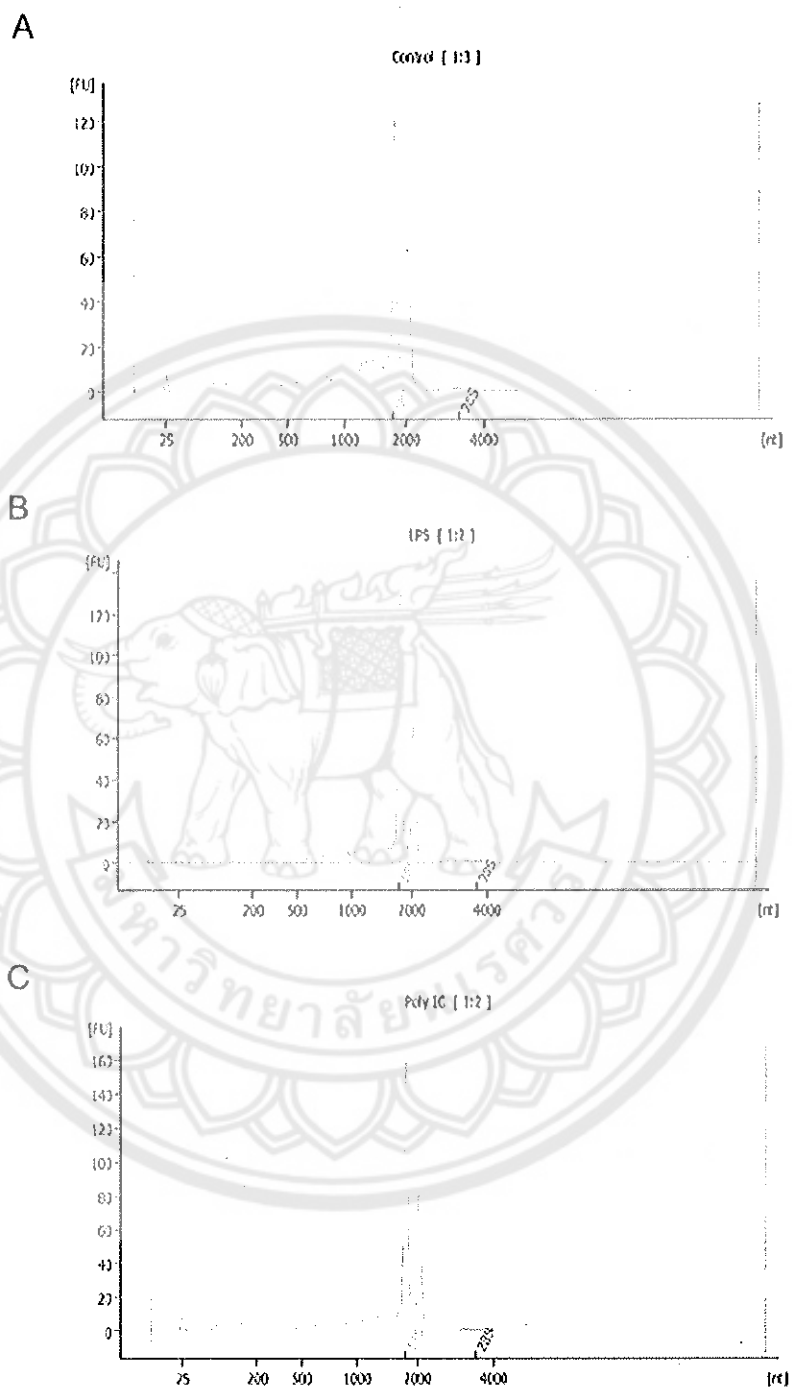
ผลการวิจัย

การสร้าง small RNA library และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผู้วิจัยต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของ miRNA กับ immunostimulant ในกึ่งก้ามกราม จึงได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กุ้งที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS กุ้งที่ฉีดกระตุ้นด้วย PIC และกุ้งที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้น อีก 12 ชม. จึงเก็บอวัยวะส่วนตับและตับอ่อนไปทำการสกัด Total RNA และนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer พบว่า เมื่อทำการคำนวณค่า RNA integrity number (RIN) ของตัวอย่าง Total RNA ของกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ได้ค่าเท่ากับ 6.9, 7 และ 6.3 ตามลำดับ และยังพบว่า Total RNA จากทั้ง 3 กลุ่ม มีคุณภาพในระดับ Level A แปลผลได้ว่า ตัวอย่าง Total RNA ทั้ง 3 กลุ่มมีคุณภาพสูงและมีปริมาณเพียงพอสำหรับใช้สร้าง small RNA library ได้อย่างน้อย 2 ครั้ง แสดงดังภาพ 16

จากนั้นสร้าง small RNA library จาก RNA ทั้ง 3 กลุ่ม คือ LPS, PIC และ NaCl ตามวิธีการในภาพ 14 และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small RNA ใน library ทั้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิค high throughput sequencing โดยใช้ HiSeq 2500 System (Illumina) พบว่า สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (total reads) ของกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ได้เป็นจำนวน 14,949,095 17,201,150 และ 20,569,166 reads ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทำการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้คุณภาพออก เช่น 3'adapter, insert null, 5' adapter contaminants, RNA smaller than 18 nt และ poly A จะเหลือลำดับที่มีคุณภาพหรือ clean reads ในกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl เป็นจำนวน 13,916,666 16,173,017 และ 19,157,854 reads ตามลำดับ แสดงดังตาราง 3

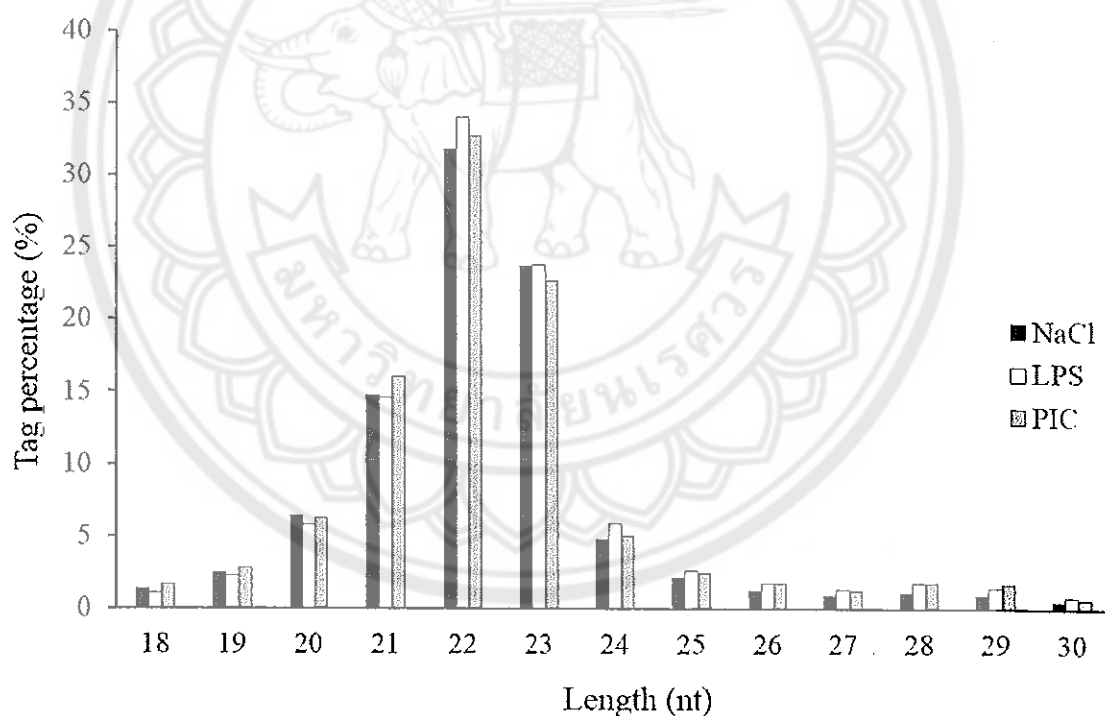
เมื่อวิเคราะห์ length distribution ของลำดับที่พบใน library ทั้ง 3 ชนิด พบว่า ลำดับของ small RNA ใน library ส่วนใหญ่มีความยาว 22 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็นสัดส่วนอยู่ที่ 34.02%, 32.70% และ 31.77% ในกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ตามลำดับ length distribution ของ small RNA แสดงดังภาพ 17



ภาพ 16 แสดงการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer A, B และ C คือ Total RNA จากกลุ่ม NaCl, LPS และ PIC ตามลำดับ

ตาราง 3 แสดงจำนวน reads ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบใน small RNA library ของ NaCl, LPS และ PIC

Type	NaCl group	LPS group	PIC group
total reads (%)	20,569,166 (100%)	14,949,095 (100%)	17,201,150 (100%)
total clean reads (%)	19,157,854 (93.14%)	13,916,666 (93.09%)	16,173,017 (94.02%)
3'adapter_null (%)	473,163 (2.30%)	427,489 (2.86%)	265,393 (1.54%)
insert_null (%)	179,968 (0.87%)	136,636 (0.91%)	130,080 (0.76%)
5'adapter_contaminants (%)	69,349 (0.34%)	66,322 (0.44%)	88,931 (0.52%)
smaller_than_18nt (%)	688,816 (3.35%)	401,970 (2.69%)	543,709 (3.12%)
polyA (%)	16 (0.00%)	12 (0.00%)	21 (0.00%)



ภาพ 17 แสดง Length distribution ของ small RNA ที่พบใน library จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl โดย แกน x คือ ความยาวของ small RNA (nt) แกน y คือ เปอร์เซ็นต์ของ small RNA (%)

การวิเคราะห์ small RNA library ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

เมื่อทำการตัดลำดับที่ไม่ได้คุณภาพออกแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ชนิดของ small RNA ด้วยการนำลำดับของนิวคลีโอไทด์แบบ clean reads ที่พบใน library ทั้ง 3 ชนิดไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆ เช่น Rfam (<http://rfam.janelia.org/>) และ GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เพื่อทำการแยก small RNA อื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการศึกษา เช่น rRNA, snoRNA, tRNA และ snRNA ออกจาก library จากนั้นนำข้อมูลส่วนที่เหลือ (remained reads) ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล miRBase (<http://www.mirbase.org/>) เพื่อทำการระบุชนิดของ miRNA พบว่า สามารถระบุ miRNA ได้ทั้งหมด 1,581, 1,934 และ 1,724 ชนิด จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า ในกลุ่ม LPS มี unannotated reads อยู่ 10.82% ใน total reads และ 81.36% ใน unique reads กลุ่ม PIC มี unannotated reads 14.04% ใน total reads และ 80.45% ใน unique reads และในกลุ่ม NaCl มี unannotated reads อยู่ 12.76% ใน total read และ 81.12% ใน unique reads ตาราง 4 แสดงชนิดของ small RNA ที่พบใน small RNA ของ NaCl, LPS และ PIC

ตาราง 4 แสดงชนิดของ small RNA ที่พบใน small RNA library ของ NaCl, LPS และ PIC

Category	NaCl group		LPS group		PIC group	
	Unique reads (%)	Total reads (%)	Unique reads (%)	Total reads (%)	Unique reads (%)	Total reads (%)
exon_antisense	558 (0.14%)	1,644 (0.01%)	520 (0.14%)	1,047 (0.01%)	566 (0.13%)	1,112 (0.01%)
exon_sense	391 (0.09%)	3,165 (0.02%)	391 (0.11%)	2,112 (0.02%)	439 (0.10%)	2,887 (0.02%)
intron_antisense	40 (0.01%)	142 (0.00%)	43 (0.01%)	155 (0.00%)	73 (0.02%)	115 (0.00%)
intron_sense	1,268 (0.31%)	5,298 (0.03%)	113 (0.03%)	4,345 (0.03%)	740 (0.17%)	3,715 (0.02%)
miRNA	1,724 (0.42%)	15,279,555 (79.76%)	1,581 (0.43%)	11,301,115 (81.21%)	1,934 (0.45%)	12,440,109 (76.92%)
rRNA	61,094 (14.79%)	1,154,824 (6.03%)	53,597 (14.68%)	861,855 (6.19%)	66,244 (15.57%)	1,140,021 (7.05%)
tRNA	11,919 (2.88%)	265,772 (1.39%)	11,336 (3.10%)	238,802 (1.72%)	12,065 (2.84%)	311,469 (1.93%)
snRNA	667 (0.16%)	1,236 (0.01%)	646 (0.18%)	1,183 (0.01%)	720 (0.17%)	1,236 (0.01%)
snoRNA	328 (0.08%)	1219 (0.01%)	270 (0.07%)	939 (0.01%)	424 (0.10%)	2,055 (0.01%)
unannotated	335,154 (81.12%)	2,444,999 (12.76%)	297,352 (81.36%)	1,505,113 (10.82%)	342,339 (80.45%)	2,269,961 (14.04%)

การวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ (differential expression) เพื่อระบุ miRNA ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC

จากรายงานของ Mullokandov et al. ในปี 2012 พบว่า miRNA ที่มีค่า RPM น้อยกว่า 100 เป็น miRNA ที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (non-functional miRNA) (Mullokandov et al., 2012) ดังนั้นจึงตัด miRNA ที่มี RPM น้อยกว่า 100 ออกจาก library ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบว่า เหลือ miRNA ที่สามารถทำหน้าที่ได้ (functional miRNA) อยู่ทั้งหมด 213, 282, 214 ชนิดจากกลุ่ม LPS PIC และ NaCl ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ intersection analysis พบว่า miRNA 146 ชนิด เป็น miRNA ที่พบได้ในทุก library และมี miRNA จำนวน 23, 98 และ 32 ชนิด ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม LPS PIC และ NaCl ตามลำดับ (ภาพ 18 Venn diagram แสดงการกระจายของ functional miRNAs ของแต่ละ library)

หลังจากได้ชนิดของ miRNA ก็จะนำมาวิเคราะห์เชิงเปรียบเทียบ (differential expression) เพื่อระบุชนิดของ miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป (differentially expressed miRNAs; DEMs) เมื่อถูกได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS หรือ PIC โดยใช้เกณฑ์ว่า miRNA ที่มีค่า $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.0$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะถูกพิจารณาว่าเป็น DEMs ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ LPS library กับ NaCl พบว่า มี DEMs จำนวน 83 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 เท่า ($\log_2 \text{LPS/NaCl}$) เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยพบว่า มี DEMs 37 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี DEMs 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง ภาพ 19 แสดง scatter plot ของ miRNA expression ในกลุ่ม LPS เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม NaCl

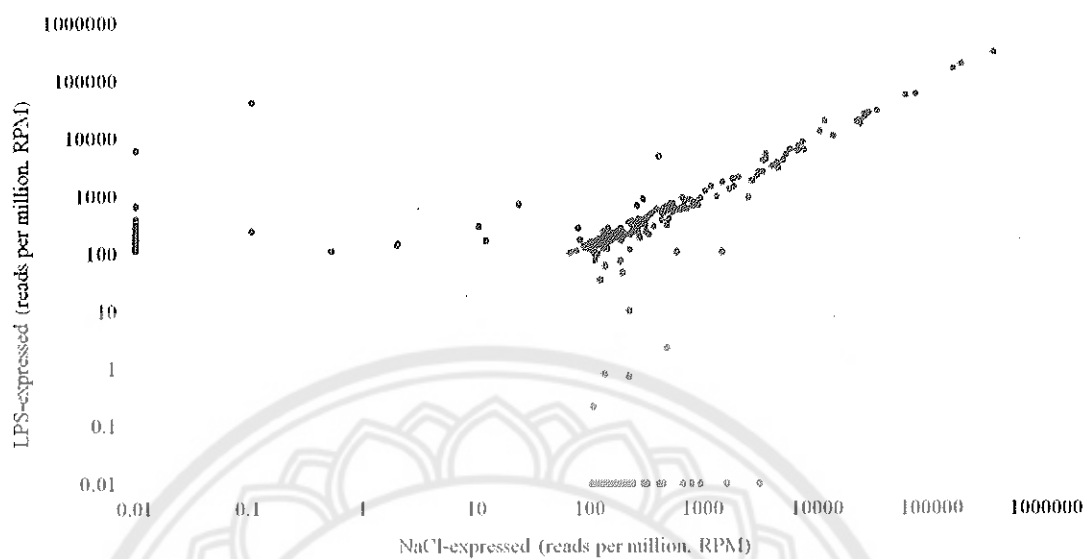
DEMs หลายชนิดมีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงมากเมื่อถูกได้รับการกระตุ้นด้วย LPS ตัวอย่างเช่น miR-3689f, miR-375b-3p, miR-2970-5p และ miR-9856-3p ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 19.22, 18.59, 16.03 และ 15.26 $\log_2 \text{fold}$ ตามลำดับ และ miR-7358-3p, miR-1647, miR-6078 และ miR-3277 มีการแสดงออกที่ลดลง 18.23, 17.28, 16.51 และ 16.25 $\log_2 \text{fold}$ ตามลำดับ ดังตาราง 5 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงที่สุด 10 อันดับแรกเมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ PIC library กับ NaCl พบว่า มี DEM จำนวน 170 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 เท่า ($\log_2 \text{PIC/NaCl}$) เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย PIC โดยพบว่า มี DEMs 124 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี DEM 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง ภาพ 20 แสดง scatter plot ของ miRNA expression ในกลุ่ม PIC เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม NaCl

โดย miRNA หลายชนิดมีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมาก เช่น miR-733, miR-8932, miR-242 และ miR-6416-5p มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 18.73, 16.63, 16.61 และ 16.25 \log_2 fold ตามลำดับ นอกจากนี้ miR-7358-3p, miR-2786, miR-6078 และ miR-1502d-3p มีระดับแสดงออกลดลง 18.23, 17.90, 16.51 และ 16.01 \log_2 fold ตามลำดับ ตาราง 6 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงสุด 10 อันดับแรกเมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย PIC



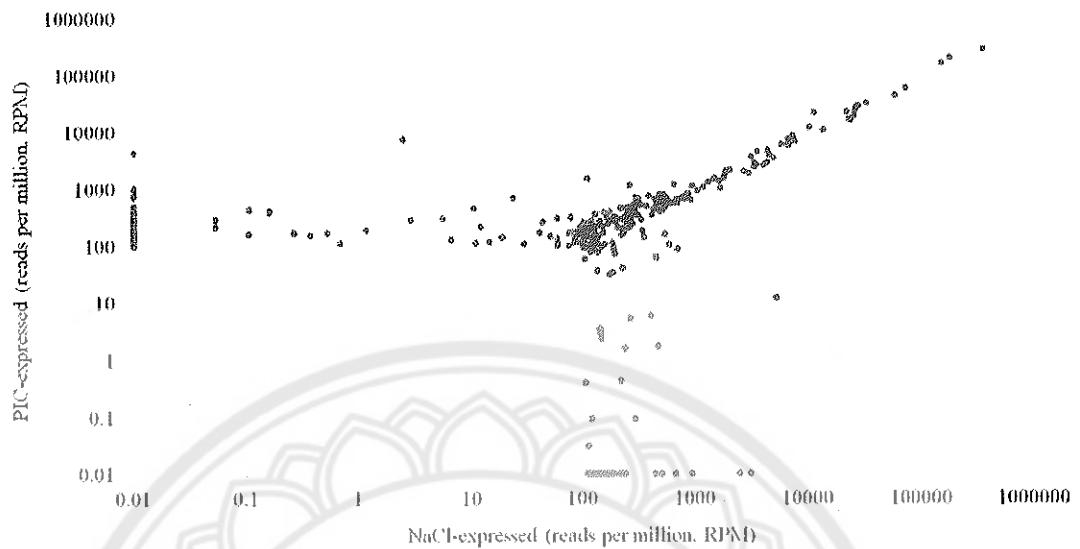
ภาพ 18 แสดง Venn diagram แสดงการกระจายของ functional miRNAs ของ NaCl, LPS และ PIC library



ภาพ 19 แสดง Scattered plot แสดงระดับการแสดงออกของ miRNA ที่เปลี่ยนไปเมื่อถูกได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยใช้เกณฑ์ \log_2 fold change ≥ 1.0 และ $P < 0.05$ พิจารณาว่าเป็น miRNAs ที่แสดงแตกต่างกัน (differentially expressed miRNAs; DEMs) ระดับการแสดงออก (RPM) ของกลุ่ม LPS จะแสดงในแกน Y ในขณะที่กลุ่มควบคุม (NaCl) อยู่ในแกน X สำหรับจุดแต่ละจุดแสดงถึง functional miRNA โดย จุดสีเขียวแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น จุดสีแดงแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกลดลง จุดสีน้ำเงินแสดงถึง miRNAs ซึ่งระดับการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง

ตาราง 5 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงที่สุด 10 อันดับแรก เมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย LPS

miRNAs	Sequence (5'→3')	Log ₂ fold change (LPS vs NaCl)
Top 10 up-regulated		
miR-3689f	TTTGTTCGTTCTTCCTGGGA	19.229
miR-375b-3p	TTTGTTCGTTCTACTCGGTATG	18.595
miR-2970-5p	GAAGTCAAGCAACGTTGGGTCTGG	16.031
miR-9856-3p	GTTCCGGATTGGGGTGGG	15.260
miR-1842	ATTGGCTCTGAGGGTCGGGTCAG	15.013
miR-7911c-5p	GTCTCCCGGCCGATGCACCA	14.893
miR-1420e-5p	GTTTCGACACAGACTGTACTCATCT	14.761
miR-4970-5p	CTGGGAGCACCAGATGCTGTTGGCG	14.626
miR-4634	CGGGCGACCGGACCGGGA	14.408
miR-7965-3p	TTTTGGTAAGCAGAACAGGCGCT	14.395
Top 10 down-regulated		
miR-1273c	GGCGACGAACGAGACTCTGG	-14.550
miR-309a-5p	ATGATGGATCGCTCGGCT	-14.847
miR-4984-3p	AAGTGTGACGATTCCTGG	-14.977
miR-609	CGGGAAGCGGGTGCGGGGC	-15.307
miR-4266	CTTAGTGAGGCCTTCGGACC	-15.429
miR-1502d-3p	ACTTACTCCCGGACGAGTGTCTGC	-16.015
miR-3277	TGGGCCAGTGTCTCTGAAATTCT	-16.257
miR-6078	CCGTTAAGCTAGCTGTGGT	-16.510
miR-1647	GCTCTCCTGTAAGGGTACTCT	-17.287
miR-7358-3p	AGTGTGTCGCCACTTCGGAC	-18.237



ภาพ 20 แสดง Scattered plot แสดงระดับการแสดงออกของ miRNA ที่เปลี่ยนไปเมื่อถูก
 'ได้รับ การฉีดกระตุ้นด้วย Poly IC โดยใช้เกณฑ์ \log_2 fold change ≥ 1.0 และ P
 < 0.05 พิจารณาว่าเป็น miRNAs ที่แสดงแตกต่างกัน (differentially expressed
 miRNAs; DEM) ระดับการแสดงออก (RPM) ของกลุ่ม LPS จะแสดงในแกน Y
 ในขณะที่กลุ่มควบคุม (NaCl) อยู่ในแกน X สำหรับจุดแต่ละจุดแสดงถึง
 functional miRNA โดย จุดสีเขียวแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น
 จุดสีแดงแสดงถึง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกลดลง จุดสีน้ำเงินแสดงถึง
 miRNAs ซึ่งระดับการแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง

ตาราง 6 แสดง miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นและลดลงสูงที่สุด 10 อันดับแรกเมื่อถูกฉีดกระตุ้นด้วย PIC

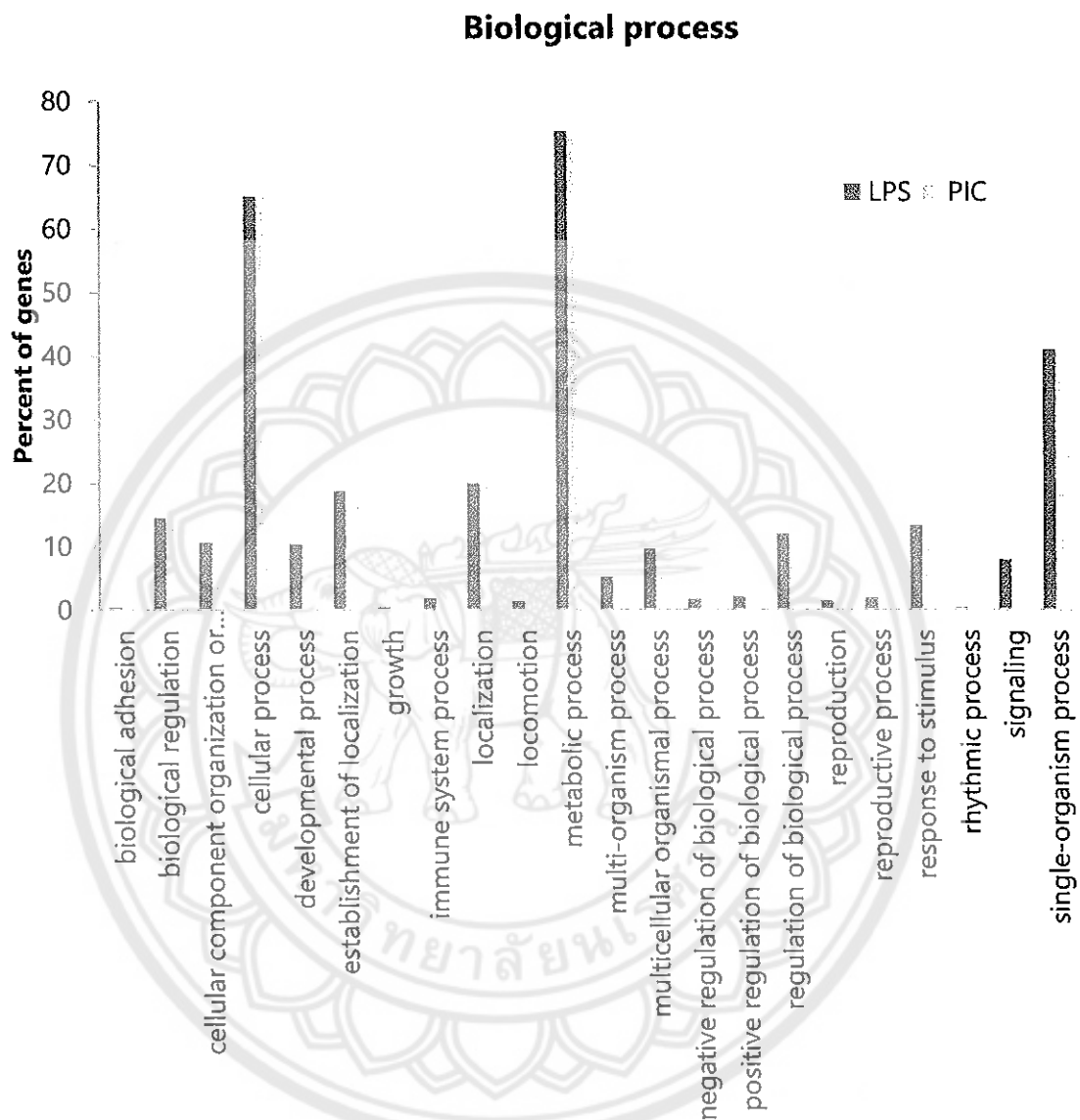
miRNAs	Sequence (5'→3')	Log ₂ fold change (PIC vs NaCl)
Top 10 up-regulated		
miR-733	TGGGGTGTAGCTCAGTGGTT	18.740
miR-8932	TGTGCGGAGCGCTGAGAC	16.635
miR-242	TTTTTTTGTGGTTGTTGT	16.618
miR-6416-5p	CTCCGATGTCGGCTCTTCT	16.254
miR-8192-3p	CGAACGAGACTCTGGCCTGC	16.219
miR-4260	GCTTGGGGATGTAGCCCA	15.603
miR-9312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

การทำนายยีนเป้าหมายสำหรับ DEMs และการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนเป้าหมาย

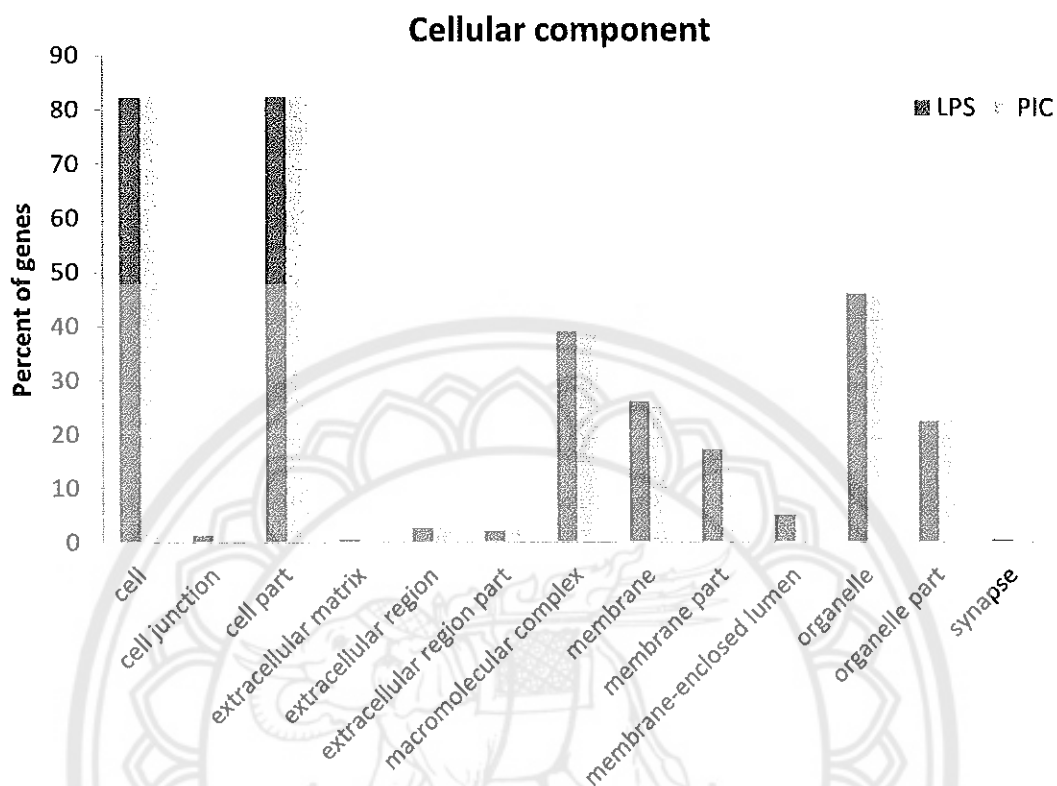
การทำนายยีนเป้าหมายจะใช้ *de novo* transcriptome ของ *M. rosenbergii* (GenBank accession number: PRJNA73259) เป็นแม่แบบสำหรับการทำนายด้วยโปรแกรม miRanda ผลการทดลอง พบว่า จาก DEMs 83 ชนิดที่ตอบสนองต่อ LPS พบยีนเป้าหมายทั้งหมด 5,200 ชนิด และจาก DEMs 170 ชนิดที่ตอบสนองต่อ PIC พบยีนเป้าหมายทั้งหมด 10,517 ชนิด ตามลำดับ

จากการทำการวิเคราะห์ GO ของยีนเป้าหมาย พบว่า เมื่อจัดจำแนกด้วย GO biological process (BP) ยีนเป้าหมายจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolic process (31.8%) และ cellular process (33.6%) เมื่อจัดจำแนกด้วย GO cellular component (CC) พบว่า ยีนเป้าหมายส่วนใหญ่ทำหน้าที่บริเวณ cell (82.2%) และ cell part (82.2%) และเมื่อจัดจำแนกด้วย molecular function (MF) ยีนเป้าหมายส่วนใหญ่ทำหน้าที่ binding (60.3%) และ catalytic activity (57.6%) ภาพ 21 และ 22 แสดง GO analysis เพื่อทำนายหน้าที่ของยีนเป้าหมายของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC

DEMs หลายชนิด พบว่า มีเป้าหมายมากกว่า 1 ยีน เมื่อวิเคราะห์ยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (BP: immune response) พบว่า DEMs ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC มียีนเป้าหมายคล้ายกัน เช่น polyubiquitin, ribosomal proteins, immunoglobulin-like domain containing proteins, interleukin enhancer-binding factor 2-like protein, guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha, and high mobility group protein DSP1 ตาราง 7 แสดงยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและ miRNA ที่เกี่ยวข้อง



ภาพ 21 แสดง GO analysis ทำนายเป้าหมายยีนของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC



ภาพ 21 (ต่อ)

ตาราง 7 แสดงยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและ miRNA ที่เกี่ยวข้อง

Accession number	Target genes	Corresponding DEMs (LPS vs NaCl groups)	Corresponding DEMs (PIC vs NaCl groups)
JP352090.1	Polyubiquitin B	miR-7174-5p	miR-3187-3p, miR-4260, miR-569, miR-242, miR-64b, miR-646
JP352083.1	Polyubiquitin B-like protein	miR-8875	n/a
JP354494.1	Polyubiquitin C	miR-1420e-5p, miR-4634	miR-1422h-3p, miR-7425-3p, miR-33, miR-675-3p, miR-4331
JP352875.1	Ribosomal protein L22 (RPL22)	miR-1673, miR-4466	miR-10d-5p, miR-924, miR-309a- 5p

ตาราง 7(ต่อ)

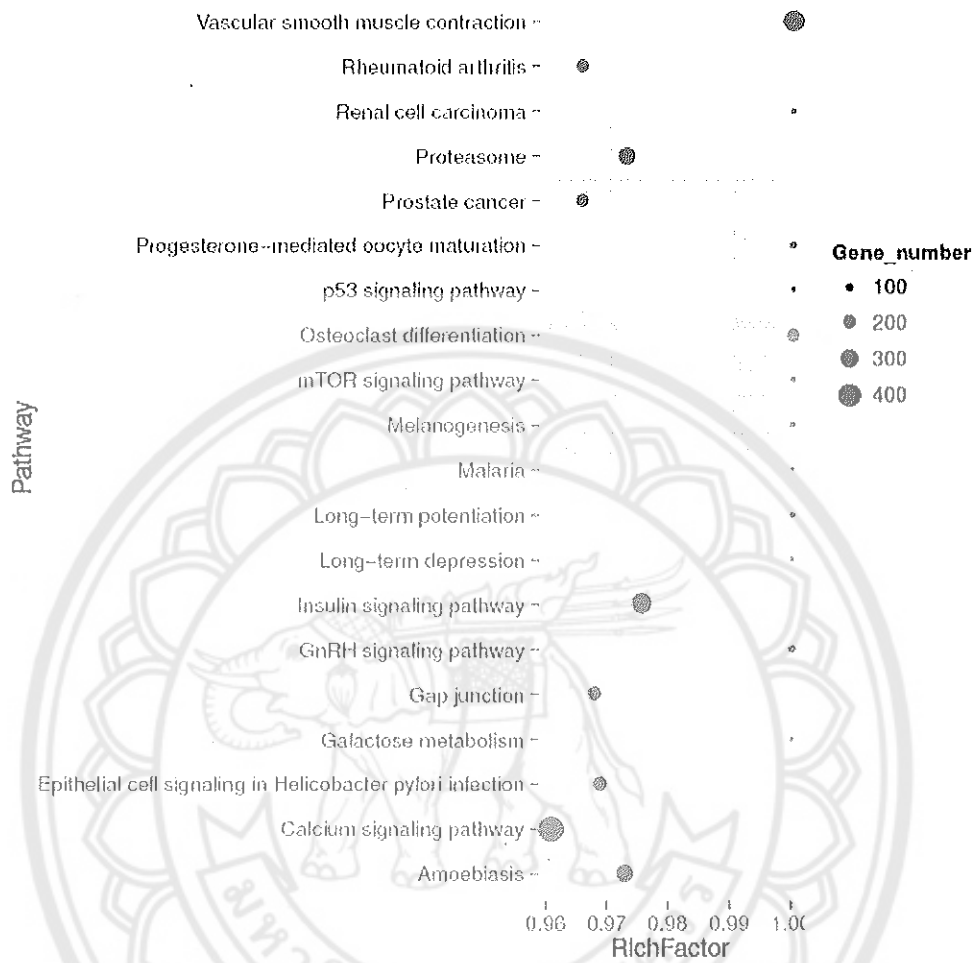
Accession number	Target genes	Corresponding DEMs (LPS vs NaCl groups)	Corresponding DEMs (PIC vs NaCl groups)
JP352913.1	Ribosomal protein S14 (RPS14)	miR-6596-5p	miR-128, miR-7409-5p, miR-5399-5p, miR-1761, miR-64b, miR-6596-5p, miR-6992-5p, miR-7255-5p
JP352935.1	Ribosomal protein S19 (RPS19)	miR-1586, miR-44-3p, miR-2852	miR-411, miR-43a-3p, miR-2852, miR-9340
JP352686.1	Ribosome maturation protein SBDS-like	miR-1842, miR-7358-3p	miR-7358-3p, miR-24b, miR-26c, miR-5106, miR-3930-5p
JP353650.1	High mobility group protein DSP1	miR-2287, miR-184-5p, miR-460b-3p, miR-965, miR-6078, miR-4266	miR-309a-5p, miR-3817-5p, miR-133a-5p, miR-184-5p, miR-1273c, miR-135b-2-3p, miR-1193-5p, miR-8973, miR-6992-5p, miR-965, miR-750-5p, miR-7425-3p
JP353876.1	Interleukin enhancer- binding factor 2-like protein	miR-8457-5p	miR-1644, miR-341-5p, miR-318-3p, miR-3086-5p, miR-3201, miR-497a-3p, miR-4133-3p, miR-21, miR-8457-5p, miR-6789-3p, miR-675-3p, miR-7160-3p, miR-7255-5p
JP352802.1	Guanine nucleotide- binding protein G subunit alpha	miR-342	miR-342, miR-64b
JP352950.1	Orosomucoid 1	miR-6789-3p, miR-4514, miR-4008a-5p, miR-2852, miR-1673, miR-80-3p	miR-4008a-5p, miR-4965-5p, miR-750-5p, miR-7409-5p, miR-6888-5p, miR-6789-3p, miR-1764-5p, miR-1957b, miR-1618-5p, miR-1369, miR-2966, miR-9164
JP352540.1	Nucleoside diphosphate kinase- like	miR-57-5p, miR-9380-5p, miR-2970-5p	miR-1247-3p, miR-1715-3p, miR-2568a-3p

ตาราง 7(ต่อ)

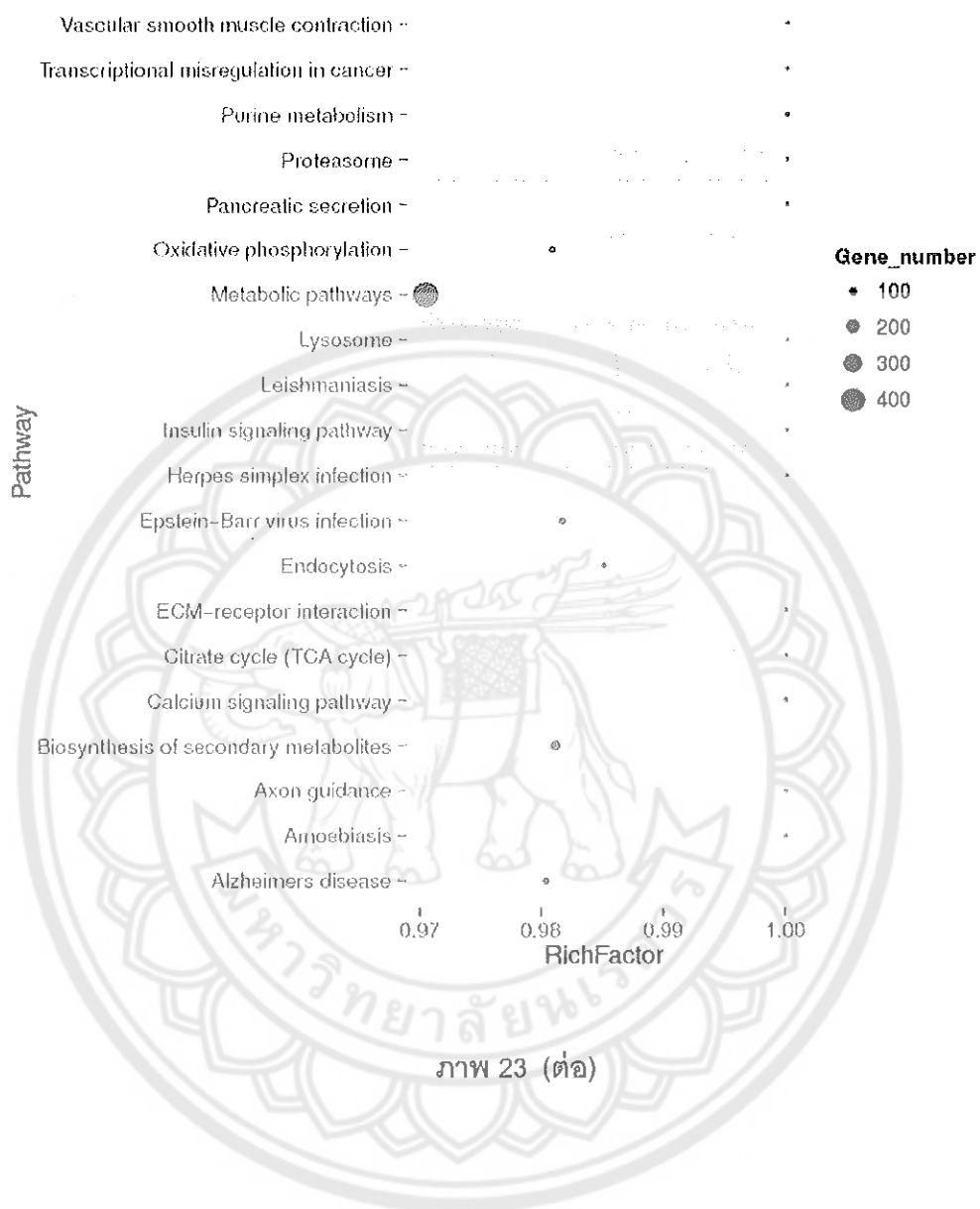
Accession number	Target genes	Corresponding DEMs (LPS vs NaCl groups)	Corresponding DEMs (PIC vs NaCl groups)
JP352787.1	Immunoglobulin-like domain containing protein	miR-43a-3p, miR-965, miR-4514, miR-510-3p	miR-7642-3p, miR-3656, miR-6789-3p, miR-1193-5p, miR-2712, miR-2059-3p, miR-458-3p, miR-4514, miR-9164, miR-57-5p
JP352888.1	Immunoglobulin-like domain containing protein	n/a	miR-7255, miR-318-3p
JP353650.1	High mobility group protein DSP1	miR-2287, miR-184-5p, miR-460b-3p, miR-965, miR-6078, miR-4266	miR-309a-5p, miR-3817-5p, miR-133a-5p, miR-184-5p, miR-1273c, miR-135b-2-3p, miR-1193-5p, miR-8973, miR-6992-5p, miR-965, miR-750-5p, miR-7425-3p

n/a = not available

จากการวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมาย พบว่า มีความเกี่ยวข้องกับหลายกลไกที่สำคัญ โดยพบว่า ยีนเป้าหมายของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ LPS อยู่ในหลาย pathway ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น amoebiasis และ epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection ในส่วนของยีนเป้าหมายของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ PIC นั้น พบว่าอยู่ในหลาย pathway ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน ได้แก่ endocytosis, amoebiasis, Epstein-Barr infection และ Herpes simplex infection นอกจากนี้ยังพบว่า เป้าหมายยีนบางชนิดของทั้งสองกลุ่ม พบว่า มีความเกี่ยวข้องในกลไกเดียวกัน เช่น mTOR signaling pathway, p53 signaling pathway, calcium signaling pathway และ ubiquitin-proteasome pathway (ภาพ 22 และ ภาพ 23)



ภาพ 22 แสดงการวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมายของ miRNA ที่ตอบสนองต่อ LPS โดย KEGG pathway ที่มีค่ามากที่สุดจะแสดงโดยยีนเป้าหมายที่ทำนายไว้ Rich factor คือ อัตราส่วนของจำนวนยีนเป้าหมายและจำนวนของยีนทั้งหมดใน pathway นั้น ขนาดของวงกลมแสดงถึงจำนวนของยีน



ภาพ 23 (ต่อ)

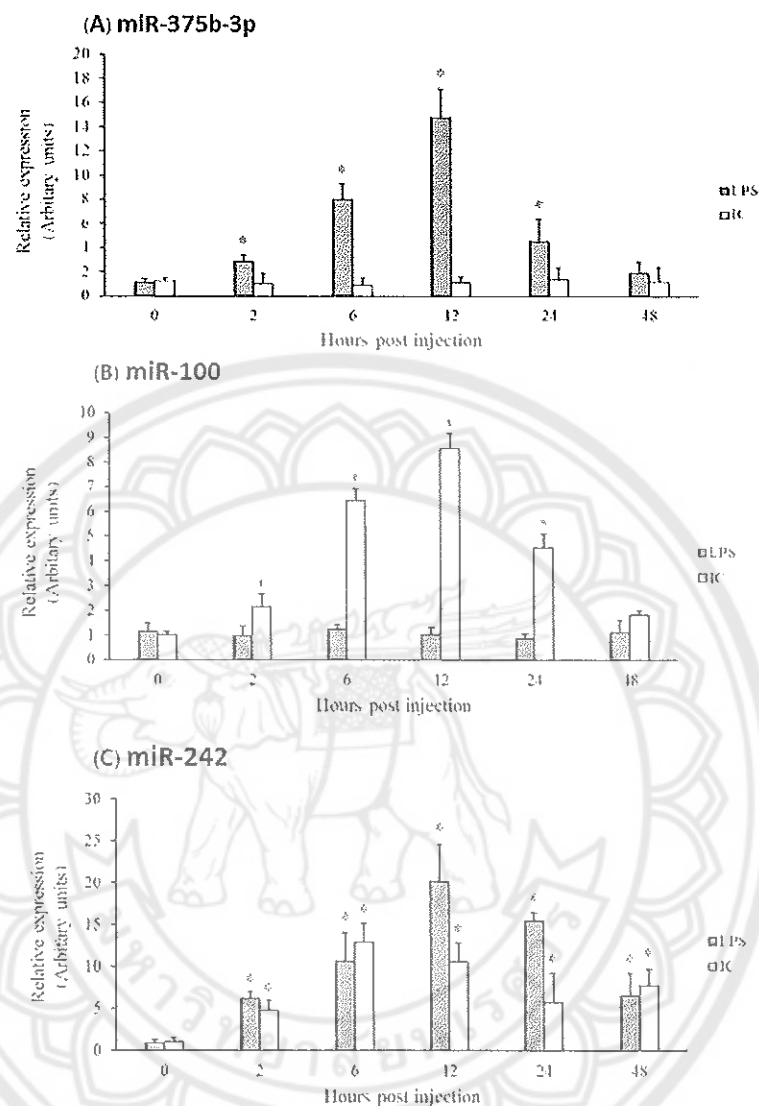
การตรวจยืนยันการแสดงออกของ miRNA ด้วย stem-loop qPCR

คัดเลือก miRNAs 5 ชนิด ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยยะสำคัญและมีรูปแบบการแสดงออกที่น่าสนใจ เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ PIC (ตาราง 8) ได้แก่ miR-242, miR-375b-3p, miR-100, miR-1647 และ bantam มาตรวจสอบด้วยเทคนิค stem-loop qPCR โดยดูระดับการแสดงออกหลังจากกึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ PIC เป็นเวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพ 24) ผลการทดลอง พบว่า miR-375b-3p และ miR-100 (ภาพ 24A, B) มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม LPS และ PIC ตามลำดับในเวลาที่เหมาะสม รวมถึง miR-242 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่ม LPS และ PIC (ภาพ 24C) สำหรับ miR-1647 พบว่า มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม LPS (ภาพ 24D) นอกจากนี้ ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของ bantam ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งใน LPS และ PIC (ภาพ 24E)

รูปแบบการแสดงออกของ DEMs ที่วิเคราะห์โดย stem-loop qPCR ให้ผลคล้ายคลึงกันกับการวิเคราะห์โดย high-throughput sequencing แม้ว่าวิธีการประเมินระดับการแสดงออก DEMs ของทั้งสองวิธีจะแตกต่างกันก็ตาม

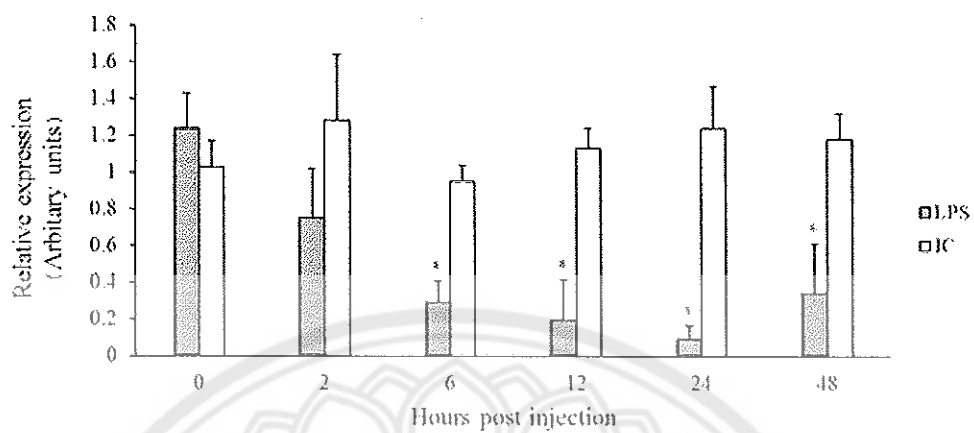
ตาราง 8 แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miR-242, miR-375b-3p, miR-100, miR-1647 และ bantam

miRNA	NaCl-RPM	LPS-RPM	PIC-RPM	log ₂ fold change
miR-242	0.01	0.01	1005.532858	16.6176007
miR-375b-3p	0.104395826	41365.79839	0.01	18.59601487
miR-100	173519.5393	188374.6438	192020.2953	0.146160675, 0.118506656
miR-1647	1600.127029	0.01	1362.732754	-17.28782691
bantam	4326.110847	3655.473229	4755.606205	0.136558624, -0.243012446

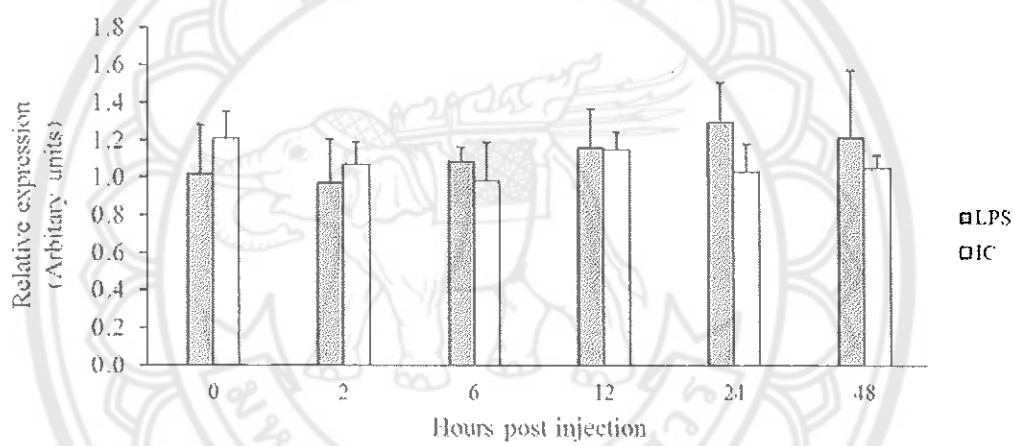


ภาพ 24 แสดงการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ miRNA (A) miR-375b-3p, (B) miR-242, (C) miR-100c, (D) miR-1647 และ (E) bantam โดยเทคนิค stem-loop qPCR โดยฉีด LPS และ PIC เข้าไปบริเวณกล้ามเนื้อของกึ่งก้ามกราม เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตับและตับอ่อนมาสกัด total RNA และ stem-loop qPCR โดยกลุ่มที่ฉีด NaCl ถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุม ระดับการแสดงออกของ miRNA จะถูก normalized และคำนวณด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method ระดับการแสดงออกถูกวิเคราะห์โดย one-way ANOVA และนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM เครื่องหมายดอกจันบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการรักษา (LPS และ PIC) และกลุ่มควบคุม (NaCl)

(D) miR-1647



(E) Bantam



ภาพ 24 (ต่อ)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปในงานวิจัยนี้ทำการสร้าง small RNA library และวิเคราะห์ด้วย high-throughput sequencing เพื่อระบุ miRNA ที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 2 ชนิด คือ LPS และ PIC ซึ่งเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA ที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS และ PIC กับ NaCl พบว่า miRNome มีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อกึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ PIC เมื่อระบุเป้าหมาย พบว่า ของ miRNA พบว่ามี miRNA ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและกลไกที่สำคัญต่างๆ ข้อมูลที่ได้นี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการทำการทดลองต่อไป เพื่อแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในกึ่งก้ามกรามและคัดเลือกสายพันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ปลอดเชื้อ รวมไปถึงพัฒนาวิธีการป้องกันและตรวจสอบกันการติดเชื้อจุลชีพในลูกกึ่ง

อภิปรายผล

ปัญหาโรคติดเชื้อจากไวรัสและแบคทีเรียในกึ่งก้ามกราม เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อมาอย่างยาวนานแก่เกษตรกร ในการที่จะพัฒนาวิธีที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น มีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องเข้าใจกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องโดยเฉพาะกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกึ่งก้ามกราม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามี miRNAs ทำหน้าที่สำคัญในกึ่งที่เนียดและสัตว์ในกลุ่ม crustacean หลายชนิด โดยทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ post-transcription ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือกระตุ้นการสลาย mRNA ในกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ (Bushati, & Cohen, 2007; Huang et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลต่างๆ ของ miRNAs ในระบบภูมิคุ้มกันของกึ่ง ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ประกอบกับมีข้อมูลที่รายงานค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษา miRNome และยืนยันเป้าหมายในกึ่งก้ามกรามที่มีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) 2 ชนิด ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS) และ Polyinosinic: Polycytidylic acid (PIC) เป็นตัวแทนของแบคทีเรียและไวรัสตามลำดับ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการสร้าง small RNA library จากกึ่งที่ฉีดกระตุ้นด้วย LPS, PIC และ NaCl จากนั้นจึงเก็บอวัยวะส่วนตับและตับอ่อนไปทำการสกัด Total RNA และนำไปตรวจสอบคุณภาพด้วย Agilent 2100 Bioanalyzer พบว่า ค่า RNA integrity number (RIN) ของตัวอย่าง

Total RNA จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl มีค่าเท่ากับ 6.9, 7 และ 6.3 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า Total RNA จากทั้ง 3 กลุ่ม มีคุณภาพในระดับ Level A ตามเกณฑ์ของบริษัท BGI Tech Solutions Co., Ltd. แปลผลได้ว่า ตัวอย่าง Total RNA ทั้ง 3 กลุ่มมีคุณภาพสูงและมีปริมาณเพียงพอสำหรับใช้สร้าง small RNA library ได้อย่างน้อย 2 ครั้ง (ภาพ 16) เมื่อนำ Total RNA ทั้ง 3 กลุ่มมาสร้าง small RNA library และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค high throughput sequencing พบว่า สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (total reads) ของกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ได้เป็นจำนวน 14,949,095, 17,201,150 และ 20,569,166 reads ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทำการตัดลำดับที่ไม่ได้คุณภาพออก จะเหลือลำดับที่มีคุณภาพหรือ clean reads จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl คิดเป็น 93.09%, 94.02% และ 93.14% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ small RNA library ทั้ง 3 library ส่วนมากเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพสูง (ตาราง 3)

เมื่อทำการวิเคราะห์ length distribution ของ small RNA ใน library ทั้ง 3 ชนิด พบว่า small RNA ใน library ส่วนใหญ่มีความยาว 22 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็นสัดส่วนอยู่ที่ 34.02%, 32.70% และ 31.77% ในกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษา miRNA ในกิ้งก่าชนิดต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า miRNA ที่พบในกิ้งก่ามีขนาดอยู่ที่ประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นลักษณะของ miRNA ที่พบในสัตว์ (Huang et al., 2012; Kaewkascholkul et al., 2016; Li et al., 2017; Sun, Liu, Yang, & Huang, 2016)

จากนั้น ทำการระบุชนิดของ small RNA โดยนำ clean reads ที่พบใน library ทั้ง 3 ชนิด ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลต่างๆ เช่น Rfam และ GenBank เพื่อทำการแยก small RNA อื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการศึกษา เช่น rRNA, snoRNA, tRNA และ snRNA ออกจาก library จากนั้นนำข้อมูลส่วนที่เหลือ (remained reads) จะนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล miRBase เพื่อทำการระบุชนิดของ miRNA ผลการทดลอง พบว่า สามารถระบุ miRNA ที่ตรงกับฐานข้อมูล miRBase ได้ทั้งหมด 1,581, 1,934 และ 1,724 ชนิดจากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ตามลำดับ โดย miRNA มีสัดส่วนคิดเป็น 81.36%, 80.45% และ 81.12% ของ clean reads จากกลุ่ม LPS, PIC และ NaCl ตามลำดับ (ตาราง 4) และมีความเป็นไปได้ว่าจะมี miRNA ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานอยู่ในส่วนของ unannotated reads ใน small RNA library ทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งต้องการการวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศขั้นสูงเพื่อที่จะระบุ miRNA ดังกล่าว

miRNA ที่แสดงออกในแต่ละ library จะถูกนำมาทำ normalization ให้อยู่ในรูป reads per million (RPM) จากการรายงานของ Mullokandov et al. ในปี 2012 miRNA ที่มีค่า RPM น้อยกว่า 100 เป็น miRNA ที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (non-functional miRNA) (Mullokandov

et al., 2012) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงตัด miRNA ที่มี RPM น้อยกว่า 100 ออกจาก library ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบว่า จะเหลือ miRNA ที่สามารถทำหน้าที่ได้ (functional miRNA) อยู่ทั้งหมด 213, 282 และ 214 ชนิดจากกลุ่ม LPS PIC และ NaCl ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ intersection analysis พบว่า miRNA 146 ชนิด เป็น miRNA ที่พบได้ในทุก library ซึ่งเป็น general miRNA (ภาพ 18) เช่น Let-7 เป็น miRNA ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ innate immune response (Jiang, 2018) มีรายงานวิจัยใน mammalian พบว่า let-7 ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบผ่านทางกระบวนการแสดงออกของยีน TLR-4 ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ส่งผลให้ let-7 มีการแสดงออกลดลง ส่งผลให้ TLR-4 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Chen, Splinter, O'Hara, & LaRusso, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า let-7 ควบคุม bactericidal และ phagocytic activities ของ macrophages อีกด้วย (Banerjee et al., 2013) จากการศึกษาของ (Yang et al. (2012) พบว่า let-7 ยังมีส่วนในการควบคุมระบบ prophenoloxidase system ในกิ้ง

จากการวิเคราะห์ intersection analysis มี specific miRNA จำนวน 23, 98 และ 32 ชนิด ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม LPS PIC และ NaCl ตามลำดับ (ภาพ 18) เช่น miR-1842 ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม LPS จากการรายงานของ Zhang et al. (2009) พบว่า miR-1842 มีการแสดงออกลดลงมากในผู้ป่วย acute lymphoblastic leukemia (ALL) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมชี้ให้เห็นว่า miR-1842 ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเกิดและดำเนินไปของโรค ALL (Zhang et al., 2009) miR-4260 ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม PIC จากการรายงานของ Xiao et al. (2017) พบว่า miR-4260 ทำหน้าที่เป็น oncomiR สำหรับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยมีเป้าหมายเป็นยีน mutated in colorectal cancer (MCC) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของ miR-4260 สามารถรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Xiao et al., 2017)

จากนั้น นำมาวิเคราะห์การแสดงออกเชิงเปรียบเทียบ (differential expression) เพื่อระบุชนิดของ miRNA ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป (differentially expressed miRNA; DEM) เมื่อกิ้งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS หรือ PIC โดยเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ LPS library กับ NaCl Library พบว่า มี DEM จำนวน 83 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 เท่า (\log_2 LPS/NaCl) โดยพบว่า มี 37 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง (ภาพ 19) ตัวอย่างเช่น miR-3689f, miR-375b-3p และ miR-2970-5p ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 19.22, 18.59 และ 16.03 \log_2 fold ตามลำดับ และ miR-7358-3p, miR-1647 และ miR-6078 มีระดับการแสดงออก

ที่ลดลง 18.23, 17.28 และ 16.51 \log_2 fold ตามลำดับ (ตาราง 5) miRNA เหล่านี้มีรายงานการศึกษาว่าทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการทางชีวภาพ Vidal et al. (2018) ได้ศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อระดับการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ Endothelial cells พบว่า miR-3689f มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนไป 24 ชั่วโมง และพบว่า miR-3689f ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ cell cycle, cellular compromise, cellular function และ maintenance ใน endothelial cells (Vidal-Gómez et al., 2018) Chiba et al. (2018) รายงานว่า miR-375b-3p มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเลือดของหนูที่ได้รับรังสี ดังนั้นระดับการแสดงออกของ miR-375b-3p จะใช้ทำนายระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีของหนูได้ (Chiba et al., 2018) และยังมีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ miR-375 ในระบบภูมิคุ้มกัน Shaffie et al. (2016) รายงานว่า miR-375 เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเยื่อบุผิว โดยพบว่า miR-375 มีเป้าหมายเป็น lncRNA SOX2OT การยับยั้งการแสดงออกของเป้าหมายดังกล่าวส่งผลให้เกิดการลดการอักเสบที่เกิดจาก *Helicobacter pylori* (Shafiee, Aleyasin, Mowla, Vasei, & Yazdanparast, 2016)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ miRNA ของ PIC library กับ NaCl library พบว่า มี DEM จำนวน 170 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 1 เท่า (\log_2 PIC/NaCl) โดยพบว่า มี 124 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และมี 46 ชนิด ที่มีระดับการแสดงออกลดลง (ภาพ 20) ตัวอย่างเช่น miR-733, miR-8932 และ miR-242 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น 18.73, 16.63 และ 16.61 \log_2 fold ตามลำดับ นอกจากนี้ miR-7358-3p, miR-2786 และ miR-6078 มีระดับการแสดงออกลดลง 18.23, 17.90 และ 16.51 \log_2 fold ตามลำดับ (ตาราง 6) จากการศึกษาที่ผ่าน พบว่า miR-733 มีระดับการแสดงออกสูงในเหงือก โต ของปลาหมอลาย (*Danio rerio*) ซึ่งพบว่า ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการปรับสมดุลน้ำและเกลือควบคุมการเข้าออกของไอออนต่างๆ (Hyndman, & Pannabecker, 2015) ในงานวิจัยนี้จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า immunostimulant มีผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs ในกึ่งอย่างมีนัยยะสำคัญทั้งในแง่ของชนิดและระดับการแสดงออก และยังแสดงให้เห็นว่าชนิดของ immunostimulant ที่ต่างกัน จะส่งผลให้รูปแบบการแสดงออกของ miRNA แตกต่างกันไปด้วย

ในการทำนายยีนเป้าหมายของ DEM จะใช้ *de novo* transcriptome ของ *M. rosenbergii* (GenBank accession number: PRJNA73259) เป็นแม่แบบสำหรับการทำนายด้วยโปรแกรม miRanda ผลการทดลอง พบว่า จาก DEM 83 ชนิดที่ตอบสนองต่อ LPS พบยีนเป้าหมายทั้งหมด 5,200 ชนิด และจาก DEM 170 ชนิดที่ตอบสนองต่อ PIC พบยีนเป้าหมาย

ทั้งหมด 10,517 ชนิด ตามลำดับ เมื่อได้ยื่นเป้าหมายแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ GO พบว่า ทั้งยื่นเป้าหมายของ DEM ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC ให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกันโดยเมื่อจัดจำแนกด้วย GO biological process (BP) ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolic process (31.8%) และ cellular process (33.6%) เมื่อจัดจำแนกด้วย GO cellular component (CC) พบว่า ยื่นเป้าหมายส่วนใหญ่ทำหน้าที่บริเวณ cell (82.2%) และ cell part (82.2%) และเมื่อจัดจำแนกด้วย molecular function (MF) ยื่นเป้าหมายส่วนใหญ่ทำหน้าที่ binding (60.3%) และ catalytic activity (57.6%) (ภาพ 21, 22) นอกจากนี้ ยังพบว่า DEM หลายชนิดมีเป้าหมายมากกว่า 1 ยีน และเมื่อวิเคราะห์ยื่นเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (BP: immune response) พบว่า DEM ที่ตอบสนองต่อ LPS และ PIC มียื่นเป้าหมายคล้ายกัน เช่น polyubiquitin, ribosomal proteins, immunoglobulin-like domain containing proteins, interleukin enhancer-binding factor 2-like protein, guanine nucleotide-binding protein G subunit alpha และ high mobility group protein DSP1 (ตาราง 7) โดยยื่น polyubiquitin ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ ubiquitin-proteasome system (UPS) เป็นกลไกสำคัญในการสลายโปรตีนใน cytosol และนิวเคลียสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ควบคุมกระบวนการทางชีวภาพหลากหลายรวมถึง การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยควบคุม pattern-recognition receptor signaling ที่เกี่ยวข้องกับ innate immune responses นอกจากนี้ ubiquitination ยังควบคุมกระบวนการ development, activation และ differentiation ของ T cells โดยการสลายโปรตีนผ่านกลไก ubiquitin-proteasome pathway นั้น โดยเริ่มจากโปรตีน ubiquitin จะถูกกระตุ้นการทำงานโดย E1 ubiquitin-activating enzyme โดยอาศัยพลังงาน ATP จากนั้นโปรตีน ubiquitin ที่ถูกกระตุ้นจะถูกย้ายไปยัง E2 ubiquitin-conjugating enzyme และ E3-ligating enzyme จะทำหน้าที่เชื่อมต่อกับ ubiquitin จากเอนไซม์ E2 ubiquitin-conjugating enzyme กับโปรตีนเป้าหมายและเข้าสู่การสร้าง polyubiquitin chain เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการสลายโดย 26S proteasome และโมโนเมอร์ ubiquitin สามารถหมุนเวียนกลับไปทำงานได้อีก (Hu & Sun, 2016; Lecker, Goldberg, & Mitch, 2006) interleukin enhancer-binding factor 2-like protein (ILF2) ทำหน้าที่ควบคุม ยื่น Interleukin-2 (IL-2) ในกระบวนการ transcription, splicing และ translation IL-2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ T cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน (Yang et al., 2011) สำหรับ immunoglobulin-like domain containing proteins ทำหน้าที่สำคัญในหลากหลายกระบวนการ ได้แก่ cell-cell recognition, cell-surface receptors, muscle structure และ immune system (Teichmann, & Chothia, 2000)

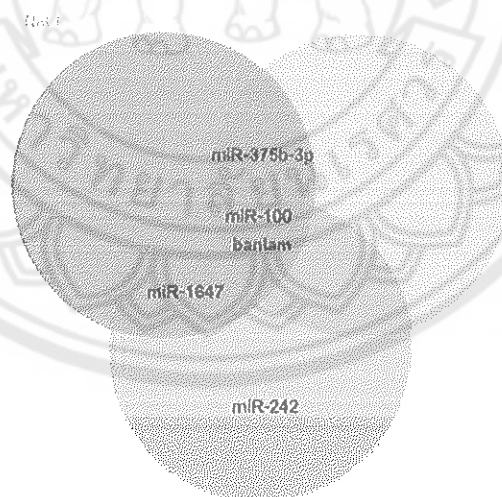
การวิเคราะห์ KEGG pathway ของยีนเป้าหมาย พบว่า มีความเกี่ยวข้องกับหลายกลไกที่สำคัญ โดยพบว่า ยีนเป้าหมายของ DEM ที่ตอบสนองต่อ LPS อยู่ในหลาย pathway ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น amoebiasis และ epithelial cell signaling ของ *Helicobacter pylori* infection โดยมีรายงานการศึกษาในมนุษย์ พบว่า กลไก amoebiasis เป็นการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่มี mucin ปกคลุมโดยเฉพาะลำไส้ จุลชีพจะหลั่งเอนไซม์ proteases และ glycosidases เพื่อบุกรุกทำลาย mucin และ extracellular matrix ทำให้เกิดการระคายเคืองและลดลงของ mucin รวมถึง lectin และ LPPG บริเวณผิวของปรสิตทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการทำงานของ NFκB signaling นำไปสู่การหลั่ง pro-inflammatory cytokine ออกมาเพื่อกำจัดเชื้อปรสิต เมื่อมีการบุกรุกเข้าไปในชั้น epithelial cell สามารถกระตุ้นกลไก hyperproliferative processes, epithelial cell signaling, tyrosine kinase receptors และ cell-cell interactions ซึ่งกลไกเหล่านี้จะนำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน เช่น neutrophils และ macrophages ให้หลั่งสารพิษ reactive oxygen species (ROS) และ ไนตริกออกไซด์ (NO) รวมไปถึงการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis และ trogocytosis เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ (Nakada-Tsukui, & Nozaki, 2016; Naumann, & Crabtree, 2004)

ในส่วนของยีนเป้าหมายของ DEMs ที่ตอบสนองต่อ PIC นั้น พบว่า อยู่ในหลาย pathway ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน ได้แก่ endocytosis, amoebiasis, Epstein-Barr infection และ Herpes simplex infection เมื่อมีการบุกรุกของเชื้อไวรัสโดยการเข้าจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ และ fusion รวมกับเยื่อหุ้มของเซลล์เป้าหมายเข้าไปยังภายในเซลล์นำไปสู่การกระตุ้นกระบวนการ endocytosis เป็นกลไกการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (cellular immune) ใช้กระบวนการกลืนกิน วิธีการนี้เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันจะอาศัยการโอบสารหรือเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เข้าในเซลล์แล้วย่อยสลาย (Doherty, & McMahon, 2009)

นอกจากนี้ ยังพบว่า เป้าหมายยีนบางชนิดของทั้งสองกลุ่มมีความเกี่ยวข้องในกลไกเดียวกัน เช่น mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, p53 signaling pathway, calcium signaling pathway และ ubiquitin-proteasome pathway (ภาพ 22, 23) โดย mTOR signaling pathway เป็น serine/threonine kinase ที่สามารถควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน โดยควบคุมเมตาบอลิซึมและการทำงานของเซลล์ อีกทั้งยังสามารถควบคุมเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันได้ที่หลากหลาย เช่น neutrophils, mast cells, natural killer cells, macrophages, dendritic cells

Heikamp, & Horton, 2012) เช่นเดียวกับกลไก p53 signaling pathway โดยยีน p53 เป็น tumor suppressor gene ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งโดยเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์และสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้หลั่ง cytokines เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งหรือสิ่งแปลกปลอมอื่น (Cui, & Guo, 2016)

เพื่อตรวจยืนยันผลของ high throughput sequencing ผู้วิจัยคัดเลือก miRNA มา 5 ชนิดโดยเลือกจากรูปแบบการแสดงออกที่น่าสนใจจากผลการวิเคราะห์ intersection analysis (ภาพ 18) โดย miRNA ที่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันหลังกระตุ้นด้วย LPS PIC และ NaCl อาจจะมีเป้าหมายที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงเลือก miR-100 และ bantam ที่มีการแสดงออกที่พบได้ในทุก library miR-375b-3p ที่มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม LPS และ NaCl miR-242 มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม PIC และ miR-1647 มีการแสดงออกเฉพาะในกลุ่ม PIC และ NaCl (ภาพ 26) มาตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิค stem-loop qPCR ซึ่งพบว่า การแสดงออกของ miRNA ที่ตรวจสอบได้จาก stem-loop qPCR มีความสอดคล้องกับผลจาก high throughput sequencing แสดงให้เห็นว่า library ที่สร้างขึ้นนั้นมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ



ภาพ 25 แสดง Venn diagram แสดงรูปแบบการแสดงออกของ miR-100, bantam, miR-375b-3p, miR-242 และ miR-1647

ในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ miR-375b-3p จากทั้ง high throughput sequencing และ stem-loop qPCR พบว่า มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อกุ้งก้ามกรามได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย LPS โดยมีการรายงาน family ของ miR-375 เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ มากมาย Poy et al. (2009) พบว่า miR-375 มีการแสดงออกมากในตับอ่อน และมีเป้าหมายเป็นยีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น caveolin1 (Cav1), inhibitor of DNA binding 3 (Id3), Smarca2, Ras-dexamethasone-induced-1 (Rasd1), regulator of G protein signaling 16 (Rgs16), eukaryotic elongation factor 1 epsilon 1 (Eef1e1), apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1 (Aifm1) และ cell adhesion molecule 1 (Cadm1) ดังนั้น miR-375 จึงทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเพิ่มจำนวนและการรักษาระดับของเซลล์และเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออินซูลินของเบต้าเซลล์ รวมไปถึงการรักษาระดับของกลูโคส (Poy et al., 2009) มีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นบทบาทของ miR-375 ที่เกี่ยวข้องกับ gut mucosal immunity ด้วยเช่นกัน (Biton et al., 2011)

miR-100 มีระดับการแสดงออกลดลงเมื่อกุ้งได้รับ LPS แต่มีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อกุ้งได้รับ PIC แสดงให้เห็นถึงบทบาทของ miR-100 ที่แตกต่างกันไปเมื่อกุ้งได้รับการกระตุ้นด้วย PAMPs ที่ต่างชนิดกัน มีรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า miR-100 ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง Yang et al. (2014) พบว่า miR-100 ทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการ apoptosis ในกุ้งโดยยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย คือ trypsin (L. Yang, Yang, & Zhang, 2014) Wang et al. รายงานว่า miR-100 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกุ้ง *M. japonicus* ติดเชื้อ WSSV และ *Vibrio alginolyticus* การยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 ด้วย anti-miRNA oligonucleotide (AMO) ส่งผลให้ phenoloxidase (PO) activity, superoxide dismutase (SOD) activity และ total hemocyte count (THC) ในกุ้งลดลง การยับยั้งการแสดงออกของ miR-100 ยังส่งผลให้ลดการตายของกุ้งเมื่อติดเชื้อ WSSV แต่กลับเพิ่มอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* แสดงให้เห็นว่า miR-100 เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในบทบาทที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของ pathogen ที่มาก่อโรคในกุ้ง (Wang, & Zhu, 2017)

Bantam เป็น miRNA ที่มีความอนุรักษ์ในสัตว์กลุ่ม arthropods และยังพบว่า มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการต่างๆ มากมาย ความเกี่ยวข้องของ bantam กับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีรายงาน พบว่า การติดเชื้อปรสิตทำให้การแสดงออกของ bantam ลดลงมากใน

Plutella xylostella (Etebari, Hussain, & Asgari, 2013) จากการศึกษาของ Kaewkascholkul et al. (2016) พบว่า ระดับการแสดงออกของ bantam ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อกึ่งกลางดำติดเชื้อ WSSV แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า bantam มีเป้าหมายเป็นยีน Serine protease inhibitor *KuSPI* ซึ่งทำหน้าที่สำคัญ ในกระบวนการ coagulation, fibrinolysis และ immune response ในกึ่ง (Kaewkascholkul et al., 2016) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัย พบว่า ระดับการแสดงออกของ bantam ไม่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนไปในการกระตุ้นด้วย PIC

miR-242-3p พบว่า มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญในเลือดผู้ป่วย Alzheimer's disease ซึ่งในคนที่สุขภาพดี miR-242 จะมีระดับการแสดงออกที่สูง Kumar et al. (2017) จึงรายงานว่ miR-242-3p เป็น Biomarkers ในการตรวจโรค Alzheimer's disease (Kumar, Vijayan, Bhatti, & Reddy, 2017) ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัย พบว่า ระดับการแสดงออกของ miR-242 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อกึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย PIC

miR-1647 ทำหน้าที่สำคัญ ในกระบวนการ macrophage differentiation และ activation ในไก่ และพบว่า เป้าหมายของ miR-1647 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไก Wnt signaling, ubiquitination, PPAR-mediated macrophage function, vesicle mediated cytokine trafficking และ WD40 domain protein functions (JL Irizarry et al., 2017) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัย พบว่า ระดับการแสดงออกของ miR-1647 มีระดับการแสดงออกที่ลดลงเมื่อกึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย LPS



บรรณานุกรม

- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782.
- Ahearn, G., Mandal, P., & Mandal, A. (2004). Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174(6), 439-452.
- Alday-Sanz, V., Roque, A., & Turnbull, J. (2002). Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, 48(2), 91-99.
- Arala-Chaves, M., & Sequeira, T. (2000). Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates?. *Aquaculture*, 191(1-3), 247-258.
- Banerjee, S., Xie, N., Cui, H., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., ... Liu, G. (2013). MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *The Journal of immunology*, 190(12), 6542-6549.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Biton, M., Levin, A., Slyper, M., Alkalay, I., Horwitz, E., Mor, H., ... Zreik, F. (2011). Epithelial microRNAs regulate gut mucosal immunity via epithelium-T cell crosstalk. *Nature immunology*, 12(3), 239.
- Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). MicroRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 175-205.
- Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (1998). *The living marine resources of the western Central Pacific* (Vol. 1): *Seaweeds, corals, bivalves and gastropods*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology*, 29(6), 263-271.

- Chen, X.-M., Splinter, P. L., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2007). A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28929-28938.
- Chen, X., Zeng, D., Chen, X., Xie, D., Zhao, Y., Yang, C., ... Yang, Q. (2013). Transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei* in response to white spot syndrome virus infection. *PloS one*, 8(8), e73218.
- Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., Kuo, Y.-H., Lin, Y.-C., Chang, Y.-H., Gong, H.-Y., & Huang, C.-L. (2016). Lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 55, 144-151.
- Chiba, M., Monzen, S., Iwaya, C., Kashiwagi, Y., Yamada, S., Hosokawa, Y., ... Wojcik, A. (2018). Serum miR-375-3p increase in mice exposed to a high dose of ionizing radiation. *Scientific reports*, 8(1), 1302.
- Cooper, R. M., & Istok, J. D. (1988). Geostatistics applied to groundwater contamination. II: Application. *Journal of Environmental Engineering*, 114(2), 287-299.
- Cui, Y., & Guo, G. (2016). Immunomodulatory function of the tumor suppressor p53 in host immune response and the tumor microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1942.
- D'Abramo, L. R., & Brunson, M. W. (1996). *Biology and life history of freshwater prawns*: Southern Aquaculture Center. Mississippi: Mississippi State University.
- De Zoysa, M., & Lee, J. (2007). Molecular cloning and expression analysis of interferon- γ inducible lysosomal thiol reductase (GILT)-like cDNA from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Journal of invertebrate pathology*, 96(3), 221-229.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, 857-902.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). Cultured Aquatic Species Information Programme, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Flegel, T., & Sritunyalucksana, K. (2011). Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Marine Biotechnology*, 13(4), 587-607.
- Fortier, M.-E., Kent, S., Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2004). The viral mimic, polyinosinic: Polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), R759-R766.
- Gong, Y., Ju, C., & Zhang, X. (2015). The miR-1000-p53 pathway regulates apoptosis and virus infection in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 516-522.
- Hicks, C. E., & Pierce, R. A. (2011). Freshwater Prawn Production in Missouri. *University of Missouri Extension*. Retrived May 5, 2017, from <http://www.extension.missouri.edu/publications/DisplayPrinterFriendlyPub.aspx?P=G9471>
- Homan, E. R., Zendzian, R. P., Schott, L. D., Levy, H. B., & Adamson, R. H. (1972). Studies on poly I: C toxicity in experimental animals. *Toxicology and applied pharmacology*, 23(4), 579-588.
- Huang, T., Xu, D., & Zhang, X. (2012). Characterization of host microRNAs that respond to DNA virus infection in a crustacean. *Bmc Genomics*, 13(1), 159.
- Hutvagner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589), 2056-2060.
- Hyndman, K. A., & Pannabecker, T. L. (2015). *Sodium and Water Homeostasis: Comparative, Evolutionary and Genetic Models*: Springer.
- Jacobs, B. L., & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219(2), 339-349.
- Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20(1), 197-216.

- Ji, P.-F., Yao, C.-L., & Wang, Z.-Y. (2009). Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(4), 563-570.
- Jiang, S. (2018). Recent findings regarding let-7 in immunity. *Cancer letters*, 434, 130-131.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213-236.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1-3), 45-52.
- Kaewkascholkul, N., Somboonviwat, K., Asakawa, S., Hirono, I., Tassanakajon, A., & Somboonviwat, K. (2016). Shrimp miRNAs regulate innate immune response against white spot syndrome virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 60, 191-201.
- Kimura, K., Nozaki, N., Saijo, M., Kikuchi, A., Ui, M., & Enomoto, T. (1994). Identification of the nature of modification that causes the shift of DNA topoisomerase II beta to apparent higher molecular weight forms in the M phase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(40), 24523-24526.
- Kulkarni, A., Rombout, J., Singh, I., Sudheer, N., Vlak, J., Caipang, C., ... Kiron, V. (2013). Truncated VP28 as oral vaccine candidate against WSSV infection in shrimp: an uptake and processing study in the midgut of *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology*, 34(1), 159-166.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), 4663-4670.

- Li, X., Meng, X., Luo, K., Luan, S., Shi, X., Cao, B., & Kong, J. (2017). The identification of microRNAs involved in the response of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 220-231.
- McGaw, I. J., & Curtis, D. L. (2013). A review of gastric processing in decapod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology B*, 183(4), 443-465.
- Mullochandov, G., Baccharini, A., Ruzo, A., Jayaprakash, A. D., Tung, N., Israelow, B., ... Brown, B. D. (2012). High-throughput assessment of microRNA activity and function using microRNA sensor and decoy libraries. *Nature methods*, 9(8), 840.
- Mykles, D. L. (2011). Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(3-5), 196-203.
- Na-Nakorn, U., & Jintasataporn, O. (2012). Current status & prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man 1879) in Thailand. *Aquaculture Research*, 43(7), 1015-1022.
- Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in immunology*, 7, 175.
- Naumann, M., & Crabtree, J. E. (2004). Helicobacter pylori-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends in microbiology*, 12(1), 29-36.
- New, M., Lister, D., Hulme, M., & Makin, I. (2002). A high-resolution data set of surface climate over global land areas. *Climate research*, 21(1), 1-25.
- New, M. B. (2002). *Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (Macrobrachium rosenbergii)*: Food & Agriculture Org. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Pasquinelli, A., Reinhart, B., Slack, F., Maller, B., & Ruvkun, G. (2000). Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide *C. elegans* let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-89.
- Powell, J. D., Pollizzi, K. N., Heikamp, E. B., & Horton, M. R. (2012). Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology*, 30, 39-68.

- Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., ... Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5813-5818.
- Reynolds, C. M., & Raetz, C. R. (2009). Replacement of lipopolysaccharide with free lipid A molecules in *Escherichia coli* mutants lacking all core sugars. *Biochemistry*, 48(40), 9627-9640.
- Rószler, T. (2014). The invertebrate midintestinal gland ("hepatopancreas") is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell and tissue research*, 358(3), 685-695.
- Shafiee, M., Aleyasin, S. A., Mowla, S. J., Vasei, M., & Yazdanparast, S. A. (2016). The effect of microRNA-375 overexpression, an inhibitor of *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis, on lncRNA SOX2OT. Retrieved May 5, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5081003/>
- Shu, L., Li, C., & Zhang, X. (2016). The role of shrimp miR-965 in virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 427-434.
- Sun, X., Liu, Q.-h., Yang, B., & Huang, J. (2016). Differential expression of microRNAs of *Litopenaeus vannamei* in response to different virulence WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 58, 18-23.
- Sung, H.-H., Wu, P.-Y., & Song, Y.-L. (1999). Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical differentiation of three major haemocyte types. *Fish & shellfish immunology*, 9(3), 167-179.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 954-967.
- Teichmann, S. A., & Chothia, C. (2000). Immunoglobulin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, 296(5), 1367-1383.
- Toth, L. (1996). Strain differences in the somnogenic effects of interferon inducers in mice. *Journal of interferon & cytokine research*, 16(12), 1065-1072.

- Tsing, A., Arcier, J. M., & Brehélin, M. (1989). Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53(1), 64-77.
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R., & Regamey, N. (2011). The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 210-229.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., & Zenteno, E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15(3), 179-188.
- Vidal-Gómez, X., Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Dantas, A. P., Novella, S., & Hermenegildo, C. (2018). MicroRNA as crucial regulators of gene expression in estradiol-treated human endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(5), 1878-1892.
- Wang, C., Bendle, J., Yang, Y., Yang, H., Sun, H., Huang, J., & Xie, S. (2016). Impacts of pH and temperature on soil bacterial 3-hydroxy fatty acids: Development of novel terrestrial proxies. *Organic geochemistry*, 94, 21-31.
- Wang, P.-H., Gu, Z.-H., Huang, X.-D., Liu, B.-D., Deng, X.-x., Ai, H.-S., ... Yu, X.-Q. (2009). An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. *Molecular Immunology*, 46(8-9), 1897-1904.
- Wang, P.-H., Weng, S.-P., & He, J.-G. (2015). Nucleic acid-induced antiviral immunity in invertebrates: An evolutionary perspective. *Developmental & Comparative Immunology*, 48(2), 291-296.
- Wang, X. W., & Wang, J. X. (2013). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, (4), 981-989.
- Wang, Z., & Zhu, F. (2017). MicroRNA-100 is involved in shrimp immune response to white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection. Retrieved May 5, 2017, from <https://www.nature.com/articles/srep42334>

- Xi, Q.-Y., Xiong, Y.-Y., Wang, Y.-M., Cheng, X., Qi, Q.-E., Shu, G., ... Zhu, X.-T. (2015). Genome-wide discovery of novel and conserved microRNAs in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Molecular biology reports*, 42(1), 61-69.
- Xiao, J., Lv, D., Zhou, J., Bei, Y., Chen, T., Hu, M., ... Huang, Q. (2017). Therapeutic inhibition of miR-4260 suppresses colorectal cancer via targeting MCC and SMAD4. *Theranostics*, 7(7), 1901.
- Xu, D., Liu, W., Alvarez, A., & Huang, T. (2014). Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. *Developmental & Comparative Immunology*, 47(2), 287-297.
- Yang, G., Yang, L., Zhao, Z., Wang, J., & Zhang, X. (2012). Signature miRNAs involved in the innate immunity of invertebrates. *PLoS one*, 7(6), e39015.
- Yang, J., Wang, L., Huang, M., Wang, L., Gai, Y., Qiu, L., ... Song, L. (2011). An interleukin-2 enhancer binding factor 2 homolog involved in immune response from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 30(6), 1303-1309.
- Yang, L., Yang, G., & Zhang, X. (2014). The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 146-153.
- Zhang, H., Yang, J.-H., Zheng, Y.-S., Zhang, P., Chen, X., Wu, J., ... Zhou, H. (2009). Genome-wide analysis of small RNA and novel microRNA discovery in human acute lymphoblastic leukemia based on extensive sequencing approach. *PLoS one*, 4(9), e6849.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์

ตาราง 9 แสดงการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อถูกได้รับการฉีด
กระตุ้นด้วย PIC

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-733	4377.352723	0.01	437735.2723	18.73969911	0
miR-8932	1017.620893	0.01	101762.0893	16.63484067	0
miR-242	1005.532858	0.01	100553.2858	16.6176007	0
miR-6416-5p	781.7650844	0.01	78176.50844	16.25444753	0
miR-8192-3p	762.5664401	0.01	76256.64401	16.21857542	0
miR-4260	497.835376	0.01	49783.5376	15.60338113	0
miR-9312	415.9087943	0.01	41590.87943	15.34397957	0
miR-646	396.4319088	0.01	39643.19088	15.27478547	0
miR-3575	379.2737001	0.01	37927.37001	15.21095171	0
miR-6327	370.3699811	0.01	37036.99811	15.17667955	0
miR-341-5p	355.4067865	0.01	35540.67865	15.11718361	0
miR-593-3p	342.9168472	0.01	34291.68472	15.06557116	0
miR-1644	330.9524747	0.01	33095.24747	15.01433644	0
miR-8476-5p	330.3959923	0.01	33039.59923	15.01190857	0
miR-2712	321.8941772	0.01	32189.41772	14.97429886	0
miR-675-3p	318.6789453	0.01	31867.89453	14.95981608	0
miR-5415	304.5195587	0.01	30451.95587	14.89424727	0
miR-6888-5p	304.3340646	0.01	30433.40646	14.89336821	0
miR-497a-3p	297.9654322	0.01	29796.54322	14.86285735	0
miR-2052	294.9975258	0.01	29499.75258	14.84841523	0
miR-7915-3p	283.6205514	0.01	28362.05514	14.79167446	0
miR-7911c-5p	278.6740408	0.01	27867.40408	14.766291	0
miR-6238	278.6431252	0.01	27864.31252	14.76613094	0
miR-6820-5p	268.9665138	0.01	26896.65138	14.71513895	0
miR-64b	267.6680548	0.01	26766.80548	14.70815735	0
miR-4868c-5p	259.8773006	0.01	25987.73006	14.665543	0
miR-7642-3p	250.0461108	0.01	25004.61108	14.60990654	0
miR-7149-5p	247.7892653	0.01	24778.92653	14.59682607	0
miR-511-5p	244.4194549	0.01	24441.94549	14.5770715	0
miR-1618-3p	232.6096609	0.01	23260.96609	14.5056234	0
miR-6789-3p	230.8165508	0.01	23081.65508	14.49445906	0
miR-1422h-3p	228.4051269	0.01	22840.51269	14.47930741	0
miR-4970-5p	217.275478	0.01	21727.5478	14.40723774	0
miR-3817-5p	216.7499113	0.01	21674.99113	14.40374378	0

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-4634	208.5572531	0.01	20855.72531	14.34815587	0
miR-3187-3p	197.1184473	0.01	19711.84473	14.26677518	0
miR-5413-3p	194.4596979	0.01	19445.96979	14.24718356	0
miR-6989-3p	191.9555269	0.01	19195.55269	14.22848448	0
miR-200c	190.7807306	0.01	19078.07306	14.21962784	0
miR-6992-5p	187.9983184	0.01	18799.83184	14.19843214	0
miR-4008a-5p	186.4216182	0.01	18642.16182	14.18628155	0
miR-133a-5p	183.7010374	0.01	18370.10374	14.16507215	0
miR-2284f	179.3419249	0.01	17934.19249	14.13042517	0
miR-1741	173.622522	0.01	17362.2522	14.08366648	0
miR-9164	170.2527117	0.01	17025.27117	14.05539016	0
miR-4707-5p	161.9982221	0.01	16199.82221	13.98369036	0
miR-8351-5p	158.4738333	0.01	15847.38333	13.95195703	0
miR-4066-3p	153.9910581	0.01	15399.10581	13.91055896	0
miR-7243-5p	151.0849831	0.01	15108.49831	13.88307265	0
miR-6080	145.983894	0.01	14598.3894	13.83352159	0
miR-2568a-3p	145.7056528	0.01	14570.56528	13.83076923	0
miR-1193-5p	145.6747371	0.01	14567.47371	13.83046309	0
miR-4331	143.2323975	0.01	14323.23975	13.80607023	0
miR-3930-5p	141.686613	0.01	14168.6613	13.79041583	0
miR-7255-5p	138.3168026	0.01	13831.68026	13.7556888	0
miR-6237	134.6069197	0.01	13460.69197	13.71646496	0
miR-6596-5p	131.7626761	0.01	13176.26761	13.68565414	0
miR-7927e-5p	130.1550601	0.01	13015.50601	13.66794378	0
miR-2162-5p	128.7329383	0.01	12873.29383	13.65209362	0
miR-4133-3p	122.4879687	0.01	12248.79687	13.58035243	0
miR-5410-3p	121.2204254	0.01	12122.04254	13.56534519	0
miR-9294	118.5616759	0.01	11856.16759	13.53335013	0
miR-1761	118.4689288	0.01	11846.89288	13.53222111	0
miR-2344	116.1811677	0.01	11618.11677	13.50408861	0
miR-750-5p	115.9338422	0.01	11593.38422	13.50101414	0
miR-1764-5p	114.2025634	0.01	11420.25634	13.47930741	0
miR-9340	113.3369241	0.01	11333.69241	13.46833033	0
miR-7361-5p	113.2132613	0.01	11321.32613	13.46675534	0
miR-135b-2-3p	112.3785377	0.01	11237.85377	13.45607891	0
miR-7160-3p	112.0075494	0.01	11200.75494	13.45130835	0

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-7382-5p	111.2964885	0.01	11129.64885	13.44212045	0
miR-458-3p	110.3071863	0.01	11030.71863	13.42923916	0
miR-7854-3p	106.6900505	0.01	10669.00505	13.38113802	0
miR-33	103.2584087	0.01	10325.84087	13.33397165	0
miR-10d-5p	101.3416359	0.01	10134.16359	13.3069394	0
miR-1811	100.9397319	0.01	10093.97319	13.30120654	0
miR-301a-5p	290.2365094	0.052197913	5560.308672	12.44094926	0
miR-342	430.7483261	0.104395826	4126.106771	12.01056544	0
miR-3377-5p	212.4526302	0.052197913	4070.136471	11.99086145	0
miR-411	7470.684041	2.45330192	3045.154769	11.57229984	0
miR-2966	410.1893914	0.15659374	2619.449491	11.35504793	0
miR-34-3p	392.2273748	0.15659374	2504.744927	11.29044798	0
miR-8973	160.3906062	0.104395826	1536.369908	10.5853099	0
miR-6948-5p	170.4382058	0.260989566	653.0460526	9.351040923	0
miR-873-3p	154.4857091	0.365385392	422.8020944	8.723838713	0
miR-3656	169.2324939	0.521979132	324.2131409	8.340798757	0
miR-1199-5p	187.1326791	1.14835409	162.9572975	7.348350149	0
miR-932-3p	110.3999334	0.678572871	162.6942928	7.346019833	0
miR-7155-5p	282.3839238	2.870885225	98.36127244	6.620018493	0
miR-569	307.4565494	5.532978798	55.56799702	5.796182333	0
miR-7174-5p	450.4416214	10.2829889	43.80454222	5.45300857	0
miR-2287	701.1369616	23.22807137	30.18489785	4.915755014	0
miR-9163	126.3833458	6.576937062	19.21614037	4.26424669	0
miR-57-5p	217.677382	12.00552003	18.13144132	4.180421709	0
miR-3178	1486.859255	108.7282532	13.67500361	3.773469309	0
miR-7346-3p	111.2346571	10.80496803	10.29476966	3.363839646	0
miR-24b	117.7578679	14.30222821	8.233532997	3.041511622	0
miR-21	138.4404654	18.32146753	7.556188671	2.917658725	0
miR-21-5p	142.3667582	19.0000404	7.492971339	2.905537933	0
miR-219-3p	264.1127503	43.5330596	6.066946654	2.600970626	0
miR-8434-5p	302.5409545	59.24463147	5.10663915	2.352374118	0
miR-8457-5p	1141.685562	258.6928578	4.413285978	2.141853236	0
miR-81a	170.1290489	40.45338272	4.205558039	2.072297245	0
miR-216a-3p	316.5766783	78.03588022	4.056809219	2.020345458	0
miR-1813	108.5449919	29.2830293	3.706754203	1.890156453	1.93E-243
miR-5106	146.3239666	50.99736119	2.869245844	1.520671587	3.86E-243

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-2059-3p	355.9632689	127.3629082	2.794873908	1.482783197	0
miR-316-3p	388.4556604	151.1129587	2.570631029	1.36212255	0
miR-1369	251.3445698	102.203514	2.459255655	1.29822172	0
miR-1661	689.7599873	292.5171055	2.358015905	1.237573449	0
miR-7940b-5p	274.2221813	118.437065	2.315340905	1.211224628	1.97626258336499 e-323
miR-510-5p	221.5418434	96.61833731	2.292958558	1.197210281	5.20E-257
miR-2373-5p	392.9693514	172.0443219	2.284116948	1.191636519	0
miR-1247-3p	132.6283154	58.51386069	2.266613651	1.180538502	2.35E-151
miR-7409-5p	245.0068531	108.9370448	2.24906829	1.169327467	7.89E-274
miR-256	346.9358871	155.5497813	2.230384924	1.157292714	0
miR-7962-5p	671.5506451	303.9484485	2.209422843	1.14366955	0
miR-3201	163.9768263	75.94796369	2.159068109	1.110408755	1.09E-169
miR-8059	460.1182327	214.8466107	2.141612713	1.098697608	0
miR-4427	202.4050306	95.00020201	2.130574739	1.091242661	2.46E-203
miR-3086-5p	175.1992223	82.57709867	2.121644198	1.085182735	9.91E-175
miR-184-5p	170.0981332	80.43698423	2.114675666	1.08043641	1.57E-168
miR-4965-5p	242.5335978	117.7584922	2.059584777	1.042353512	3.72E-226
miR-301b	196.7783747	95.88756653	2.052178211	1.03715602	2.08E-182
miR-4557	757.3416883	380.1574018	1.992179252	0.994347464	0
miR-7094-3p	458.386954	232.698297	1.969876703	0.978105332	0
miR-61-5p	224.8498224	115.9315652	1.939504759	0.955688316	2.00E-182
miR-1654	267.2661508	139.1074387	1.921293019	0.942077563	1.88E-211
miR-9269	21456.75726	11173.4331	1.920337024	0.94135953	0
miR-4044-5p	172.7877983	90.6155773	1.906822243	0.93117036	7.97E-135
miR-5890b-5p	556.9461777	295.1270012	1.887140707	0.916201996	0
miR-2981	193.9650468	104.1870347	1.861700425	0.896620941	4.83E-142
miR-1579	470.7841462	254.360431	1.850854492	0.88819148	0
miR-1292-3p	191.5845386	103.9260452	1.843469924	0.88242388	1.09E-136
miR-7561	1173.466892	638.3282804	1.838343887	0.878406668	0
miR-6898-5p	109.6579568	59.81880852	1.833168523	0.874339418	7.38E-78
miR-4034-5p	505.6261302	276.3357524	1.829752849	0.871648792	0
miR-6126	295.2448513	161.5003434	1.828137607	0.870374669	7.47E-205
miR-7311-5p	198.8188104	109.7200135	1.812056014	0.857627552	2.95E-135
let-7d	565.0770045	312.091323	1.810614275	0.856479234	0
miR-8530-5p	153.7746482	86.02216094	1.787616662	0.838037397	4.13E-101
miR-6520	213.070944	122.1953148	1.743691601	0.802144899	1.52E-129

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-927-3p	326.4387838	189.0608416	1.726633506	0.78796189	1.43E-191
miR-6794-5p	170.2836274	98.70625384	1.725155405	0.786726328	1.35E-100
miR-8908d	453.4713591	263.7560553	1.719283216	0.781807218	8.06E-262
miR-5112	100.2905024	58.61825651	1.710908996	0.774763024	1.72E-58
miR-365-5p	447.7519562	263.9126491	1.696591496	0.762639236	7.07E-248
miR-2316	494.0636617	291.9429285	1.692329608	0.759010584	4.34E-271
miR-6092	796.6046162	473.5394685	1.682234891	0.750379164	0
miR-9308	229.8581644	136.8107305	1.680117953	0.748562521	3.01E-124
miR-320d	205.7748409	124.2832313	1.655692717	0.727434945	3.72E-106
miR-4984-3p	519.0744559	322.5309056	1.609378968	0.686504084	1.21E-239
miR-1391-5p	153.9292267	96.04416027	1.602692202	0.680497381	2.41E-71
miR-9830-5p	191.8318641	121.7255336	1.575937756	0.656210554	4.00E-83
miR-4583	410.1893914	261.8769305	1.566344124	0.647401206	1.74E-171
miR-6534	131.669929	84.61281728	1.556146376	0.637977771	6.34E-55
miR-1673	161.00892	103.8216493	1.550822213	0.633033305	7.00E-66
miR-4486	306.8691513	198.1432785	1.548723498	0.631079595	3.26E-123
miR-2383	786.1241969	508.720862	1.545295772	0.627882998	0.00E+00
miR-6577-3p	164.8424657	106.7969304	1.543513143	0.626217768	3.63E-66
miR-1491	272.8928066	178.2036756	1.531353411	0.614807272	6.41E-105
miR-305-3p	653.743207	432.4075129	1.51186829	0.596332461	1.36E-235
miR-99b	218.7594312	145.4233861	1.50429334	0.589085922	1.90E-78
miR-2772a	276.4790268	184.2586336	1.500494286	0.585437825	1.37E-97
miR-3871-5p	240.307668	164.9454057	1.456892158	0.54289409	1.46E-74
miR-7359-5p	754.4974447	524.0670484	1.439696403	0.525764615	3.46E-217
miR-1670	743.2132174	516.6549448	1.438509831	0.524575081	4.16E-213
miR-4206-3p	389.5067939	273.4126693	1.424611357	0.510568397	2.36E-107
miR-6569-3p	339.7943624	239.5884215	1.418242001	0.504103727	8.50E-92
miR-1182	178.5690326	126.6843353	1.409558902	0.495243766	1.33E-47
miR-301a-3p	143.2942289	102.6210973	1.396342786	0.481653149	1.01E-36
miR-2b-5p	325.1094091	235.2037968	1.382245582	0.467013961	9.45E-77
miR-315	499.0101723	361.7837363	1.379305154	0.463941671	2.03E-115
miR-2900	114.2643948	83.98644232	1.360510002	0.444147563	9.09E-26
miR-2035-5p	387.497274	286.5665434	1.352206958	0.435315976	2.40E-80
miR-206	101.2179731	74.95620334	1.350361526	0.433345705	4.62E-22
miR-9e-5p	260.433783	194.1762371	1.341223761	0.423549947	5.32E-52
miR-10a	143.8507113	110.3985864	1.303012258	0.381850656	1.26E-24

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-202-3p	287.1758559	220.4317874	1.302787857	0.381602178	1.91E-47
miR-10a-5p	132.4119056	101.8381286	1.300219352	0.378755032	1.78E-22
miR-4175-3p	4480.178312	3463.018353	1.293720638	0.37152612	0
miR-99a	618.8393916	484.8664156	1.276309044	0.351977704	2.06E-86
miR-99a-5p	551.5977631	441.1767623	1.250287436	0.322259803	9.58E-66
miR-615	1136.739051	930.793188	1.221258456	0.288368551	1.27E-108
miR-100b	157.7936881	129.9206059	1.214539349	0.280409231	9.79E-16
miR-306a-5p	603.9380284	499.690623	1.208623898	0.273365373	4.08E-53
miR-412-5p	661.9358652	548.0780885	1.207740063	0.272309983	1.24E-57
miR-315a	322.5743224	267.7230968	1.204880439	0.268889994	2.57E-28
miR-100	3641.219199	3044.025704	1.196185431	0.258441052	2.20E-279
miR-375	8547.570314	7187.600448	1.189210554	0.250004173	0
miR-7357-5p	152.7853461	128.667856	1.1874399	0.247854496	2.13E-12
miR-1451-3p	532.4918659	448.9020534	1.186209468	0.246358792	6.58E-39
miR-1-3p	12015.84714	10196.13157	1.178471173	0.236916469	0
miR-4448	354.5720628	302.4869069	1.172189786	0.229206172	2.89E-23
miR-6744-5p	112.2857906	95.99196236	1.169741589	0.226189855	3.44E-08
miR-12a-5p	171.4893393	149.2338338	1.149131768	0.200544238	1.23E-09
miR-276-3p	7415.190375	6547.340845	1.132549924	0.179574647	6.27E-283
miR-9b	2056.759107	1825.674212	1.1265751	0.171943489	1.26E-73
miR-12-5p	145.7674842	131.695335	1.106853817	0.146464697	3.60E-05
miR-100-5p	192020.2953	173519.5393	1.106620592	0.146160675	0
miR-7282-3p	337.939421	306.2451567	1.103493112	0.142077624	9.89E-10
bantam	4755.606205	4326.110847	1.099279786	0.136558624	6.54E-108
miR-1002-3p	147.6533414	137.0195221	1.07760806	0.107832546	0.002050909
miR-375-3p	2123.598831	1995.735013	1.064068535	0.089591075	1.68E-22
miR-4466	213.0400283	200.805372	1.060927933	0.08532666	0.003249222
miR-100a-5p	156208.3933	147679.4844	1.057752835	0.081002553	0
miR-276a-3p	5935.348983	5625.055917	1.055162663	0.077465421	2.13E-45
miR-7-5p	256.7239001	244.6516191	1.049344783	0.069488781	0.008316322
miR-1b	1900.387541	1811.998358	1.048779946	0.068712005	1.18E-12
miR-1c	1883.445742	1799.784047	1.046484296	0.065550663	1.43E-11
miR-10-5p	136.2145356	131.5387412	1.035546899	0.050392894	0.162606758
miR-200b-5p	1504.295704	1454.077268	1.034536292	0.048984256	6.05E-06
miR-99b-5p	22284.18482	21581.80139	1.032545172	0.046204898	9.95E-61
miR-9a-5p	27767.5464	27019.4146	1.027688676	0.039403286	2.43E-55

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-8-5p	1481.201683	1445.25582	1.024871626	0.035443211	0.001127689
miR-10	127.4963107	125.7969708	1.013508591	0.019358319	0.603614346
miR-383-3p	1314.968011	1300.92859	1.010791846	0.015485931	0.178671098
miR-4008b-5p	427.9040825	423.5860655	1.010193954	0.014632313	0.469474517
miR-4138-5p	106.0717366	105.4919826	1.005495717	0.007906936	0.848763477
miR-9c-5p	27873.21623	27817.10311	1.002017217	0.002907297	0.243585817
miR-2a-3p	120.7257743	121.8821273	0.99051253	-0.013752869	0.712359475
let-7-5p	31436.89888	32588.51435	0.964661922	-0.051904675	1.38E-110
miR-9-5p	24983.40291	25925.92051	0.963645742	-0.053425218	1.81E-93
miR-236	801.9221151	834.1226528	0.96139592	-0.056797414	9.22E-05
miR-317-3p	642.02616	671.1085699	0.956665119	-0.063914097	8.06E-05
miR-317	699.6530085	740.7405861	0.944531759	-0.082328789	1.04E-07
miR-8-3p	807.4560238	855.8369847	0.94346942	-0.083952337	5.59E-09
miR-3277	737.9884656	783.5428749	0.941860987	-0.086413952	9.56E-09
miR-998-3p	487.2003783	518.6384655	0.939383425	-0.090213956	1.11E-06
miR-279-3p	578.8035714	622.5123127	0.929786543	-0.105028549	5.71E-10
miR-83	545.5382876	587.6441067	0.928348096	-0.107262231	7.84E-10
miR-13b-3p	242.0389467	263.4950658	0.918571078	-0.122536735	2.69E-06
miR-7	1065.169226	1163.543683	0.915452717	-0.127442722	1.25E-24
miR-285	202.157705	222.1021206	0.910201598	-0.135741976	1.90E-06
let-7e	23265.9126	25634.23857	0.907610832	-0.139854268	0
miR-71	5858.770816	6469.096173	0.905655235	-0.142966145	6.90E-161
miR-7b	922.0914069	1024.80163	0.899775508	-0.152362998	2.38E-30
miR-6956-5p	91.44861469	102.0991182	0.895684667	-0.158937186	0.000163397
miR-9b-5p	94.16919552	105.1787951	0.895324913	-0.159516765	0.000123209
let-7	6727.316245	7537.74405	0.892484038	-0.164101728	3.02E-244
miR-71c-5p	5865.324942	6599.068977	0.888810977	-0.170051461	2.57E-229
miR-71-3p	98.00274123	110.8161697	0.884372213	-0.177274399	1.26E-05
miR-2a	103.5675657	117.2887109	0.883013931	-0.179491897	5.44E-06
miR-750-3p	3922.39741	4442.09461	0.883006274	-0.179504406	5.15E-172
miR-61b-3p	240.3385837	272.8906902	0.880713752	-0.183254901	1.52E-12
miR-998	567.4884284	646.8365403	0.877328959	-0.188810205	3.77E-29
miR-965-3p	463.7353686	530.8005792	0.873652718	-0.194868181	1.21E-25
miR-1306	1527.296979	1765.490018	0.865083894	-0.209088047	8.06E-93
miR-279d-3p	283.1877318	328.3770719	0.862385824	-0.213594632	2.28E-19
miR-609	348.945407	405.5777855	0.860366173	-0.216977292	3.20E-24

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-1647	1362.732754	1600.127029	0.851640357	-0.231683778	2.37E-102
miR-279d	402.0894803	474.1658434	0.847993346	-0.23787515	3.76E-33
miR-279a	689.481746	815.2270082	0.845754298	-0.241689491	2.07E-57
miR-61-3p	2777.898521	3299.638884	0.841879557	-0.248314246	2.02E-238
miR-996	655.1034974	781.5593542	0.838200572	-0.25463259	9.85E-61
miR-279	408.1489558	493.8966546	0.826385342	-0.27511343	5.40E-45
miR-305-5p	557.1007562	677.1113299	0.822760943	-0.281454785	1.19E-63
miR-184	57300.10053	70428.19097	0.813596086	-0.297615356	0
miR-2944c-3p	207.4133725	255.5087851	0.81176611	-0.300863984	2.82E-28
miR-7143-5p	10818.42058	13384.74549	0.808264945	-0.307099816	0
miR-750	272227.6864	337099.8652	0.807557981	-0.308362249	0
miR-44-3p	107.3083643	133.0524807	0.806511564	-0.310232876	2.51E-16
miR-283	2650.865945	3451.273822	0.768083346	-0.380665226	0
let-7c	2019.907603	2643.458918	0.764115375	-0.388137605	0
let-7c-5p	2003.491371	2633.802304	0.760684038	-0.394630763	0
miR-184-3p	42880.58932	57254.58603	0.748945932	-0.417066523	0
miR-275	18949.6802	25355.39732	0.747362779	-0.420119381	0
miR-283-5p	2436.774784	3288.833916	0.740923636	-0.432603237	0
miR-34-5p	166.7901542	225.1295996	0.740862839	-0.432721624	3.81E-48
miR-34	170.4072901	230.1927972	0.740280722	-0.433855635	0
miR-275-3p	16409.89433	22664.02072	0.724050447	-0.465837877	0
miR-279b	3461.629948	4900.966465	0.706315779	-0.501614768	0
miR-3389-3p	154.1147208	221.6845373	0.695198333	-0.524503472	6.40E-67
miR-71-5p	623.8168179	903.5980752	0.690369795	-0.53455875	4.94E-276
let-7i	105.4843385	154.2970314	0.68364464	-0.548681491	4.96E-51
let-7j	84.95631953	125.3793875	0.677593991	-0.561507015	1.59E-43
miR-2720-3p	2876.395913	4275.217882	0.672806859	-0.571735682	0
let-7i-5p	97.78633139	145.7887715	0.6707398	-0.576174885	1.19E-52
miR-184b	15758.40797	23555.24789	0.668997756	-0.579926724	0
miR-2b	76.2380946	114.261232	0.667226261	-0.583752022	1.31E-42
miR-279b-3p	2574.318694	3976.541423	0.647376305	-0.627323533	0
miR-279c-3p	1877.046194	2914.78367	0.643974444	-0.634924658	0
miR-80-3p	110.6781746	182.2751129	0.607203984	-0.719746839	1.54E-96
miR-1175-3p	998.7932369	1649.819442	0.605395482	-0.724050186	0
miR-2206-3p	77.04190257	135.2447931	0.569647828	-0.811857815	1.11E-88
miR-1412	58.02875246	103.8216493	0.558927284	-0.839267494	1.77E-72

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
let-7f-5p	182.2170842	335.4237902	0.543244366	-0.880326788	2.68E-249
miR-8101	90.89213225	186.0855605	0.488442693	-1.033738789	3.03E-182
let-7f	143.2014818	347.3771123	0.412236376	-1.278456281	0
miR-8071	72.37363319	190.4179873	0.380077713	-1.395633663	1.07E-301
miR-995-3p	157.1135429	528.3994752	0.297338567	-1.74982149	0
let-7g-5p	36.94425103	133.8876473	0.275934724	-1.857601075	0
miR-26a-5p	34.00726036	183.7366544	0.185086968	-2.433724773	0
miR-26c	30.82294417	172.1487177	0.179048352	-2.481578857	0
miR-26-5p	40.25223	225.7037766	0.178340968	-2.487289942	0
miR-965	101.5889614	581.0671696	0.174831701	-2.515961296	0
miR-989-3p	61.80046679	446.7097411	0.138345913	-2.853648075	0
miR-7425-3p	87.80056312	692.1965268	0.126843403	-2.978879605	0
miR-10c	3.462557419	140.4645844	0.02465075	-5.342224621	0
miR-128b	2.936990668	141.6651364	0.020731923	-5.592002265	0
miR-128-3p	5.22475182	265.0610032	0.019711507	-5.664818111	0
miR-128	2.349592534	145.2667924	0.016174327	-5.950150548	0
miR-1c-3p	5.904897027	400.2535983	0.014752889	-6.082858661	0
miR-5399-5p	1.607615945	236.7175363	0.006791284	-7.202099985	0
miR-200b	0.401903986	106.0661596	0.003789182	-8.043897836	0
miR-989a	1.700363018	462.0037296	0.00368041	-8.085917901	0
miR-1957b	11.90254113	5184.140144	0.002295953	-8.766691295	0
miR-43a-3p	0.432819677	218.1872771	0.001983707	-8.977585173	0
miR-4090-3p	0.092747074	119.3766275	0.000776928	-10.32993102	0
miR-309a-5p	0.092747074	294.7616158	0.000314651	-11.63395928	0
miR-994-5p	0.030915691	111.7035342	0.000276766	-11.81904795	0
miR-1258	0.01	111.0249614	9.00698E-05	-13.43859645	0
miR-6392-3p	0.01	116.8711276	8.55643E-05	-13.51263094	0
miR-9337	0.01	120.3683878	8.30783E-05	-13.55516893	0
miR-924	0.01	124.9618042	8.00245E-05	-13.60919957	0
miR-510-3p	0.01	130.8079705	7.64479E-05	-13.67516283	0
miR-1618-5p	0.01	136.6541367	7.31774E-05	-13.73824151	0
miR-4514	0.01	143.700855	6.9589E-05	-13.81078103	0
miR-1715-3p	0.01	154.505823	6.47225E-05	-13.91537359	0
miR-35c-3p	0.01	164.1102391	6.09347E-05	-14.00237763	0
miR-9771e	0.01	170.9481657	5.84973E-05	-14.06127132	0
miR-2046-5p	0.01	182.2229149	5.48778E-05	-14.15341677	0

ตาราง 9 (ต่อ)

miR_name	PIC-RPM	NaCl-RPM	FC (PIC/NaCl)	Log ₂ FC	P-value
miR-4099-3p	0.01	183.4234669	5.45187E-05	-14.16289061	0
miR-6512-5p	0.01	187.5993	5.33051E-05	-14.19536682	0
miR-1586	0.01	214.3246316	4.66582E-05	-14.38751004	0
miR-9-2-5p	0.01	229.2532347	4.36199E-05	-14.48465447	0
miR-1273c	0.01	239.9538069	4.16747E-05	-14.55046908	0
miR-4266	0.01	441.3855539	2.26559E-05	-15.42975179	0
miR-318-3p	0.01	503.6576644	1.98548E-05	-15.62015585	0
miR-1502d-3p	0.01	662.60031	1.50921E-05	-16.01585126	0
miR-6078	0.01	933.6640732	1.07105E-05	-16.51061595	0
miR-2786	0.01	2454.345878	4.07441E-06	-17.90497905	0
miR-7358-3p	0.01	3090.534044	3.23569E-06	-18.23749663	0

ตาราง 10 แสดงการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกเปลี่ยนแปลงไป เมื่อกึ่งได้รับการฉีด
กระตุ้นด้วย LPS

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-3689f	6147.018259	0.01	614701.8259	19.22952724	0
miR-375b-3p	41365.79839	0.104395826	396239.9631	18.59601487	0
miR-2970-5p	669.7724872	0.01	66977.24872	16.03138349	0
miR-9856-3p	392.6227733	0.01	39262.27733	15.26085624	0
miR-1842	330.7545069	0.01	33075.45069	15.01347319	0
miR-7911c-5p	304.3113918	0.01	30431.13918	14.89326072	0
miR-1420e-5p	277.7964205	0.01	27779.64205	14.76174039	0
miR-4970-5p	253.0060001	0.01	25300.60001	14.62688398	0
miR-4634	217.4371362	0.01	21743.71362	14.40831074	0
miR-7965-3p	215.4970163	0.01	21549.70163	14.39538027	0
miR-2117	206.0838422	0.01	20608.38422	14.33094378	0
miR-7149-5p	192.3592907	0.01	19235.92907	14.23151589	0
miR-3187-3p	184.1676735	0.01	18416.76735	14.16873223	0
miR-460b-3p	173.9640802	0.01	17396.40802	14.08650183	0
miR-511-5p	167.3533014	0.01	16735.33014	14.03060939	0
miR-8491	162.8263551	0.01	16282.63551	13.99104661	0
miR-4666a-5p	155.5688697	0.01	15556.88697	13.92526578	0
miR-2852	144.5030009	0.01	14450.30009	13.81881183	0

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-9380-5p	144.1437195	0.01	14414.37195	13.81522036	0
miR-6789-3p	138.2515036	0.01	13825.15036	13.75500755	0
miR-6989-3p	133.5089884	0.01	13350.89884	13.70464925	0
miR-6596-5p	125.6766527	0.01	12567.66527	13.61742904	0
miR-8052	116.119766	0.01	11611.9766	13.50332595	0
miR-4008a-5p	115.2574906	0.01	11525.74906	13.49257289	0
miR-750-5p	112.5269515	0.01	11252.69515	13.45798296	0
miR-342	244.814383	0.104395826	2345.059103	11.19540857	0
miR-3656	109.2215621	0.521979132	209.2450741	7.70904985	0
miR-7063-5p	149.1018035	2.035718614	73.24283548	6.194615739	0
miR-9852-3p	139.9041983	1.983520701	70.53326856	6.140231992	0
miR-2287	705.2694949	23.22807137	30.36280902	4.924233363	0
miR-7174-5p	292.5988164	10.2829889	28.45464673	4.830592363	0
miR-57-5p	166.6347385	12.00552003	13.87984344	3.79491939	0
miR-1c-3p	4858.347538	400.2535983	12.13817329	3.601479418	0
miR-216a-3p	275.3533066	78.03588022	3.528547456	1.819074413	0
miR-1661	873.4850718	292.5171055	2.986099121	1.578262055	0
miR-8457-5p	675.5928467	258.6928578	2.611563584	1.384913829	0
miR-184-5p	171.0179723	80.43698423	2.12611119	1.088217048	2.29E-121
miR-128b	270.1796537	141.6651364	1.907171097	0.931434278	1.88E-147
miR-2059-3p	239.4970175	127.3629082	1.880429875	0.911062506	3.48E-126
miR-9269	19824.50394	11173.4331	1.774253604	0.827212237	0
miR-8059	348.2874418	214.8466107	1.621098144	0.696971437	2.19E-115
miR-8530-5p	136.9580904	86.02216094	1.592125667	0.670954213	1.40E-43
miR-1369	159.8083909	102.203514	1.563629122	0.64489836	3.15E-47
miR-30d	104.0479092	67.07431845	1.551233193	0.633415579	2.91E-29
miR-7094-3p	360.431155	232.698297	1.548920468	0.631263068	2.38E-100
miR-30d-5p	100.8862324	65.19519357	1.547448928	0.629891795	2.91E-29
miR-510-5p	149.0299473	96.61833731	1.542460276	0.625233335	7.13E-42
miR-2b-5p	361.7964245	235.2037968	1.538225273	0.621266801	6.20E-98
miR-128	222.0359388	145.2667924	1.528470032	0.612088266	2.84E-59
miR-143	136.3832401	89.36282738	1.526174183	0.609919627	7.25E-37
let-7g-5p	203.2095906	133.8876473	1.517762054	0.601945631	7.66E-53
miR-143-3p	137.5329407	91.13755643	1.509069873	0.593659607	1.77E-35
miR-4965-5p	177.628751	117.7584922	1.508415638	0.593034012	3.13E-45
miR-4557	572.3353568	380.1574018	1.505522066	0.590263853	2.10E-140

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-4175-3p	5205.628992	3463.018353	1.503205719	0.58804246	0
miR-26a-5p	274.9940251	183.7366544	1.496674825	0.581760809	9.71E-67
miR-128-3p	396.503013	265.0610032	1.495893429	0.581007398	3.57E-95
let-7j	185.7485119	125.3793875	1.48149162	0.567050466	1.12E-43
miR-26c	254.3712697	172.1487177	1.47762512	0.563280298	1.84E-58
let-7i	226.8503103	154.2970314	1.470218242	0.556030328	3.71E-51
miR-206	110.0119813	74.95620334	1.467683479	0.55354087	1.70E-25
miR-256	227.784442	155.5497813	1.464382914	0.550292846	1.96E-50
miR-26-5p	329.7485188	225.7037766	1.460979181	0.54693562	2.06E-71
let-7b-5p	127.1137785	87.37930668	1.45473549	0.540756857	4.70E-28
let-7i-5p	211.7604892	145.7887715	1.452515766	0.538553823	2.86E-45
miR-7561	920.98208	638.3282804	1.442803191	0.528874519	2.02E-184
miR-994-5p	159.592822	111.7035342	1.428717749	0.514720933	6.13E-32
miR-4206-3p	389.9640905	273.4126693	1.426283908	0.512261185	7.71E-75
let-7f	487.7605024	347.3771123	1.404123891	0.489670235	6.97E-86
miR-989a	648.2874562	462.0037296	1.403208274	0.48872916	4.08E-113
miR-318-3p	704.7665008	503.6576644	1.399296686	0.484701883	5.68E-121
let-7b	134.9461142	96.5661394	1.397447543	0.482794129	2.01E-24
let-7f-5p	468.4311602	335.4237902	1.39653529	0.481852031	3.35E-80
miR-2373-5p	240.2155804	172.0443219	1.39624242	0.481549449	5.76E-42
miR-4583	363.9521132	261.8769305	1.389783027	0.474859667	4.13E-61
miR-7359-5p	726.3233881	524.0670484	1.385935999	0.470860637	3.10E-118
miR-61-5p	158.0838399	115.9315652	1.363596184	0.447416467	7.91E-25
miR-7940b-5p	161.1736604	118.437065	1.360838014	0.444495348	5.37E-25
miR-989	549.7006251	405.2124001	1.356574046	0.439967797	1.45E-79
miR-3871-5p	222.8982143	164.9454057	1.351345394	0.434396464	1.39E-32
miR-989-3p	603.4491307	446.7097411	1.350875245	0.433894446	5.48E-85
miR-1670	693.8443446	516.6549448	1.342955006	0.42541097	5.47E-94
miR-320d	166.8503074	124.2832313	1.342500558	0.424922688	7.05E-24
miR-7962-5p	405.6287619	303.9484485	1.334531444	0.416333299	1.34E-53
miR-316-3p	197.4610873	151.1129587	1.306711807	0.385940992	1.25E-23
miR-9b-5p	136.3113838	105.1787951	1.295996818	0.374062176	6.21E-16
miR-7409-5p	140.6946175	108.9370448	1.291522253	0.369072501	5.01E-16
miR-9308	175.9042	136.8107305	1.285748563	0.362608541	4.68E-19
miR-4427	122.0119819	95.00020201	1.284333921	0.361020345	1.37E-13
miR-301b	123.0898263	95.88756653	1.283689124	0.360295861	1.19E-13

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-301a-3p	131.7125812	102.6210973	1.283484435	0.360065801	1.75E-14
let-7d	396.000019	312.091323	1.268859433	0.343532253	4.73E-37
miR-1-3p	12903.59343	10196.13157	1.265538145	0.339750993	0
miR-7311-5p	138.7544977	109.7200135	1.26462341	0.338707831	1.09E-13
miR-263a-5p	120.0000057	94.89580618	1.264544879	0.33861824	4.92E-12
miR-5890b-5p	370.2036105	295.1270012	1.254387464	0.326983047	8.35E-32
miR-2a-3p	150.6107857	121.8821273	1.235708541	0.305338503	2.28E-12
miR-2a	143.6407254	117.2887109	1.224676478	0.292400684	4.84E-11
miR-283-5p	4027.113965	3288.833916	1.224480794	0.292170145	4.80E-265
miR-4034-5p	337.5808545	276.3357524	1.221632929	0.288810855	2.26E-23
miR-10a-5p	124.2395269	101.8381286	1.219970639	0.286846427	1.91E-09
miR-283	4206.107986	3451.273822	1.218711758	0.285356949	1.17E-264
miR-10	152.6227618	125.7969708	1.213246717	0.278872956	9.22E-11
miR-10-5p	159.5209657	131.5387412	1.212729909	0.278258279	3.85E-11
miR-10a	133.4371321	110.3985864	1.208685152	0.273438488	2.75E-09
miR-7	1400.910247	1163.543683	1.204003139	0.267839154	1.63E-79
miR-7b	1223.425208	1024.80163	1.193816611	0.255581233	7.34E-64
miR-2035-5p	341.7485194	286.5665434	1.192562521	0.254064902	7.50E-19
miR-1579	303.0898349	254.360431	1.191576196	0.252871209	9.31E-17
miR-8-5p	1712.335411	1445.25582	1.184797451	0.244640441	1.19E-81
miR-2316	345.2694776	291.9429285	1.182660869	0.242036437	1.77E-17
miR-2383	601.4371546	508.720862	1.182253765	0.241539737	3.83E-29
miR-100b	152.8383307	129.9206059	1.176397921	0.234376139	4.03E-08
miR-6520	143.7125817	122.1953148	1.176089132	0.233997402	1.07E-07
miR-317-3p	788.7665049	671.1085699	1.175318779	0.233052109	2.66E-35
miR-6956-5p	119.4251554	102.0991182	1.169698206	0.226136348	2.75E-06
miR-375	8400.503396	7187.600448	1.168749356	0.22496557	0
miR-1451-3p	524.6227796	448.9020534	1.168679839	0.224879757	1.50E-22
miR-9e-5p	226.8503103	194.1762371	1.168270195	0.224373976	1.43E-10
miR-317	859.2575262	740.7405861	1.159997903	0.214122197	8.59E-33
miR-99a	559.8323621	484.8664156	1.154611547	0.207407558	1.00E-20
miR-8908d	302.7305534	263.7560553	1.147767216	0.198830072	4.36E-11
miR-99a-5p	501.4131977	441.1767623	1.13653583	0.184643167	2.90E-15
miR-305-3p	489.1257719	432.4075129	1.131168533	0.177813893	5.56E-14
miR-306a-5p	564.6467336	499.690623	1.129992655	0.176313395	1.14E-15
miR-6126	182.1556973	161.5003434	1.127896656	0.173634887	7.30E-06

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-12-5p	148.3113844	131.695335	1.126170372	0.171425101	6.41E-05
miR-2981	116.4790475	104.1870347	1.117980254	0.160894707	0.000864498
miR-412-5p	612.5030234	548.0780885	1.117547	0.160335507	2.79E-14
miR-7-5p	272.8383364	244.6516191	1.115211652	0.157317541	6.18E-07
miR-1491	198.6826442	178.2036756	1.11491889	0.156938758	2.19E-05
miR-276-3p	7294.850649	6547.340845	1.114169985	0.155969356	4.97E-144
miR-276a-3p	6266.946408	5625.055917	1.114112731	0.155895218	6.64E-124
miR-12a-5p	166.2036008	149.2338338	1.113712598	0.155376982	0.00012037
miR-99b	160.814379	145.4233861	1.105835748	0.145137115	0.000400971
miR-1306	1930.347398	1765.490018	1.09337769	0.128791844	1.11E-27
miR-927-3p	206.5868362	189.0608416	1.092700289	0.127897746	0.000392769
miR-365-5p	287.2814509	263.9126491	1.088547487	0.122404345	6.24E-05
miR-100-5p	188374.6438	173519.5393	1.085610557	0.118506656	0
miR-1002-3p	148.5269532	137.0195221	1.08398388	0.116343302	0.006136767
miR-1b	1955.712669	1811.998358	1.079312605	0.110112778	4.85E-21
miR-1c	1938.036021	1799.784047	1.076815868	0.106771575	9.87E-20
miR-6577-3p	114.0359336	106.7969304	1.067782877	0.094618319	0.049874115
miR-965-3p	566.0838595	530.8005792	1.066471819	0.092845844	1.84E-05
miR-100a-5p	156490.7859	147679.4844	1.059665035	0.083608294	0
miR-5399-5p	250.49103	236.7175363	1.058185354	0.081592355	0.01208161
miR-375-3p	2084.694711	1995.735013	1.044574905	0.062915949	2.19E-08
miR-4486	204.5748601	198.1432785	1.032459247	0.046084837	0.19707667
miR-998-3p	529.9401451	518.6384655	1.021791056	0.031100212	0.160510419
miR-34-5p	226.3473162	225.1295996	1.005408958	0.007782449	0.816082858
miR-4448	303.5209726	302.4869069	1.003418547	0.00492351	0.864382861
miR-34	229.9401308	230.1927972	0.998902371	-0.001584414	0.964236712
miR-9c-5p	27575.7139	27817.10311	0.991322274	-0.012573949	3.83E-05
miR-9-5p	25563.88146	25925.92051	0.986035634	-0.020288311	1.51E-10
miR-83	577.9401474	587.6441067	0.983486673	-0.024022592	0.25451781
miR-9a-5p	26464.09708	27019.4146	0.979447463	-0.029959986	5.49E-22
miR-615	910.4910616	930.793188	0.978188359	-0.031815798	0.057705712
miR-1957b	5047.042158	5184.140144	0.973554344	-0.038666582	5.33E-08
miR-4138-5p	101.9640767	105.4919826	0.966557593	-0.049072396	0.327463309
miR-998	624.0000299	646.8365403	0.964695083	-0.051855082	0.010186323
miR-995-3p	509.389246	528.3994752	0.964022997	-0.052860532	0.017950997
miR-1182	121.8682693	126.6843353	0.961983729	-0.055915602	0.221530069

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-184-3p	55021.65533	57254.58603	0.960999968	-0.057391712	1.45E-157
miR-285	207.8083932	222.1021206	0.935643445	-0.095969243	0.005726209
miR-236	778.1317738	834.1226528	0.932874525	-0.100245048	2.23E-08
miR-279-3p	573.62877	622.5123127	0.921473774	-0.117984989	1.44E-08
miR-2944c-3p	233.6766579	255.5087851	0.914554299	-0.128859266	7.60E-05
miR-71	5900.120043	6469.096173	0.912047044	-0.132819853	1.44E-93
miR-71c-5p	5993.605078	6599.068977	0.908250103	-0.138838471	7.52E-104
let-7-5p	29394.10919	32588.51435	0.901977576	-0.148836527	0
miR-99b-5p	19388.2644	21581.80139	0.898361729	-0.154631626	0
let-7e	22999.25859	25634.23857	0.897208572	-0.156484691	0
miR-275	22714.63582	25355.39732	0.895850123	-0.158670707	0
miR-305-5p	605.9641009	677.1113299	0.89492536	-0.160160733	1.67E-15
miR-4008b-5p	378.1078025	423.5860655	0.89263513	-0.16385751	1.20E-10
miR-2772a	163.9041995	184.2586336	0.889533349	-0.1688794	1.24E-05
miR-750	299147.655	337099.8652	0.887415529	-0.172318296	0
miR-8-3p	757.7245872	855.8369847	0.885360882	-0.175662464	1.21E-22
miR-13b-3p	231.8083943	263.4950658	0.879744726	-0.184843135	1.15E-08
miR-275-3p	19864.5279	22664.02072	0.876478545	-0.190209319	0
miR-1654	120.0000057	139.1074387	0.862642623	-0.213165094	1.98E-06
miR-2b	96.86228009	114.261232	0.847726551	-0.238329122	1.62E-06
bantam	3655.473229	4326.110847	0.844979095	-0.243012446	6.34E-199
miR-100	2561.964195	3044.025704	0.841636847	-0.248730228	7.19E-147
miR-7425-3p	582.1078123	692.1965268	0.84095743	-0.249895323	4.28E-35
miR-279a	678.3952421	815.2270082	0.832155014	-0.265075797	1.06E-45
miR-996	648.3593125	781.5593542	0.829571432	-0.269561882	2.97E-45
miR-184	58001.82314	70428.19097	0.823559747	-0.280054777	0
let-7	6204.072153	7537.74405	0.8230675	-0.280917343	0
miR-2720-3p	3508.59897	4275.217882	0.820683078	-0.285102889	9.66E-266
miR-279b	3997.724742	4900.966465	0.815701305	-0.293887134	3.35964639172048 e-322
miR-279b-3p	3225.197759	3976.541423	0.811055995	-0.302126574	8.92E-276
miR-71-3p	89.82036358	110.8161697	0.810534815	-0.30305394	2.92E-09
miR-7143-5p	10644.86279	13384.74549	0.795298109	-0.330432354	0
miR-279	390.2515157	493.8966546	0.790148125	-0.339804961	2.50E-44
miR-315	284.9820496	361.7837363	0.787713822	-0.344256504	1.06E-33
miR-9b	1424.119829	1825.674212	0.780051457	-0.358358799	2.80E-175

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-1175-3p	1272.646768	1649.819442	0.771385483	-0.374476099	5.46E-172
miR-61-3p	2533.509103	3299.638884	0.767814052	-0.38117113	0
miR-7282-3p	234.7545023	306.2451567	0.766557437	-0.383534201	7.67E-35
miR-71-5p	679.8323679	903.5980752	0.752361461	-0.410502145	2.06E-112
miR-279c-3p	2172.646811	2914.78367	0.7453887	-0.423935147	0
miR-315a	199.3293509	267.7230968	0.744535504	-0.425587447	7.87E-37
miR-184b	17376.00083	23555.24789	0.737670048	-0.438952437	0
miR-383-3p	940.239566	1300.92859	0.722744948	-0.468441476	1.13E-204
miR-3178	76.45509348	108.7282532	0.703175957	-0.508042352	2.15E-21
let-7c	1809.556973	2643.458918	0.684541364	-0.546790375	0
let-7c-5p	1800.431224	2633.802304	0.68358632	-0.548804569	0
miR-750-3p	3012.215713	4442.09461	0.678107059	-0.560415031	0
miR-61b-3p	184.7425238	272.8906902	0.676983607	-0.562807195	3.15E-61
miR-279d-3p	209.3173753	328.3770719	0.637429934	-0.649661324	4.32E-94
miR-279d	301.9401342	474.1658434	0.636781705	-0.651129208	1.54E-135
miR-3389-3p	115.113778	221.6845373	0.519268413	-0.945447625	2.93E-120
miR-2206-3p	60.28742804	135.2447931	0.445765243	-1.165643963	3.12E-103
miR-80-3p	74.15569218	182.2751129	0.406833884	-1.297488252	3.16E-163
miR-2786	917.8204032	2454.345878	0.373957237	-1.419054791	2.72E-180
miR-9830-5p	33.98802558	121.7255336	0.279218539	-1.840533363	2.72E-180
miR-8071	45.19760696	190.4179873	0.237359966	-2.074851471	0
miR-965	104.263478	581.0671696	0.179434467	-2.478471053	0
miR-200b-5p	104.982041	1454.077268	0.072198392	-3.791889479	0
miR-202-3p	9.91616814	220.4317874	0.0449852	-4.474405739	0
miR-44-3p	0.7904192	133.0524807	0.005940657	-7.395161703	0
miR-6092	2.227545017	473.5394685	0.004704032	-7.731886278	0
miR-43a-3p	0.718562909	218.1872771	0.003293331	-8.246236796	0
miR-200b	0.215568873	106.0661596	0.0020324	-8.94259985	0
miR-1673	0.01	103.8216493	9.6319E-05	-13.34181969	0
miR-1412	0.01	103.8216493	9.6319E-05	-13.34181969	0
miR-1292-3p	0.01	103.9260452	9.62223E-05	-13.34326964	0
miR-1258	0.01	111.0249614	9.00698E-05	-13.43859645	0
miR-6392-3p	0.01	116.8711276	8.55643E-05	-13.51263094	0
miR-4090-3p	0.01	119.3766275	8.37685E-05	-13.54323278	0
miR-9337	0.01	120.3683878	8.30783E-05	-13.55516893	0
miR-924	0.01	124.9618042	8.00245E-05	-13.60919957	0

ตาราง 10 (ต่อ)

miR_name	LPS-RPM	NaCl-RPM	FC L/N	Log ₂ FC	P-values
miR-7357-5p	0.01	128.667856	7.77195E-05	-13.65136406	0
miR-510-3p	0.01	130.8079705	7.64479E-05	-13.67516283	0
miR-8875	0.01	131.06896	7.62957E-05	-13.67803844	0
miR-1618-5p	0.01	136.6541367	7.31774E-05	-13.73824151	0
miR-4514	0.01	143.700855	6.9589E-05	-13.81078103	0
miR-1715-3p	0.01	154.505823	6.47225E-05	-13.91537359	0
miR-35c-3p	0.01	164.1102391	6.09347E-05	-14.00237763	0
miR-9771e	0.01	170.9481657	5.84973E-05	-14.06127132	0
miR-2046-5p	0.01	182.2229149	5.48778E-05	-14.15341677	0
miR-4099-3p	0.01	183.4234669	5.45187E-05	-14.16289061	0
miR-8101	0.01	186.0855605	5.37387E-05	-14.18367849	0
miR-6512-5p	0.01	187.5993	5.33051E-05	-14.19536682	0
miR-4466	0.01	200.805372	4.97995E-05	-14.29351025	0
miR-1586	0.01	214.3246316	4.66582E-05	-14.38751004	0
miR-9-2-5p	0.01	229.2532347	4.36199E-05	-14.48465447	0
miR-6569-3p	0.01	239.5884215	4.17382E-05	-14.54827057	0
miR-1273c	0.01	239.9538069	4.16747E-05	-14.55046908	0
miR-309a-5p	0.01	294.7616158	3.39257E-05	-14.84726105	0
miR-4984-3p	0.01	322.5309056	3.10048E-05	-14.97714979	0
miR-609	0.01	405.5777855	2.46562E-05	-15.30769101	0
miR-4266	0.01	441.3855539	2.26559E-05	-15.42975179	0
miR-1502d-3p	0.01	662.60031	1.50921E-05	-16.01585126	0
miR-3277	0.01	783.5428749	1.27625E-05	-16.2577246	0
miR-6078	0.01	933.6640732	1.07105E-05	-16.51061595	0
miR-1647	0.01	1600.127029	6.2495E-06	-17.28782691	0
miR-7358-3p	0.01	3090.534044	3.23569E-06	-18.23749663	0

ข้อมูลการวิเคราะห์การระบุเป้าหมายและหากลไกที่เกี่ยวข้องของ miRNA ผู้วิจัยแนบ
ข้อมูลมาในแผ่น CD