



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกลุ่ม response regulator ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน *Halothece* sp. PCC7418

**ชื่อผู้จัดทำ** นางสาวประภาภัทร บุญทองกุล รหัสประจำตัว 6032331723

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2563



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกลุ่ม response regulator ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418  
Gene expression analysis of response regulator under salt stress in a cyanobacterium *Halotheca* sp. PCC7418

**ชื่อนิสิต** ประภาภัทร บุญทองกุล **เลขประจำตัว** 6032331723

**ภาควิชา** จุลชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์  
ชื่อโครงการ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกลุ่ม response regulator ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือใน  
*Halotheca* sp. PCC7418

Gene expression analysis of response regulator under salt stress in a  
cyanobacterium *Halotheca* sp. PCC7418

นิสิตในโครงการ

นางสาวประภาภัทร บุญทองกุล

รหัสประจำตัวนิสิต 6032331723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ์ สิริศรัทธา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกลุ่ม response regulator ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418
นิสิตผู้เสนอโครงการ	นางสาวประภาภัทร บุญทองกุล รหัสประจำตัวนิสิต 6032331723
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรัทธา
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	

### บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสง สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย แม้กระทั่งในสภาพแวดล้อมสุดขั้ว โดยหนึ่งในไซยาโนแบคทีเรียที่น่าสนใจ คือ *Halothece* sp. PCC7418 ที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงได้ โดยกลไกสำคัญที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ คือการมีระบบรับส่งสัญญาณที่เรียกว่า two component system (TCS) มีหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งระบบดังกล่าวจะประกอบด้วยโปรตีน histidine kinase (HK) ทำหน้าที่รับสัญญาณสิ่งแวดล้อม และ response regulator (RR) ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนรูปแบบอื่น คือ hybrid kinases (HyK) จากการสืบค้นข้อมูลจีโนมของ *Halothece* sp. PCC7418 พบว่ามียีนในกลุ่ม RR 44 ยีน โดยเลือกมาศึกษา 17 ยีน ได้แก่ PCC7418\_0084, PCC7418\_0225, PCC7418\_0226, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0612, PCC7418\_0618, PCC7418\_0623, PCC7418\_0892, PCC7418\_1006, PCC7418\_1046, PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1120, PCC7418\_1121, PCC7418\_1355, และ PCC7418\_1501 จากนั้นนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR พบว่า ยีน PCC7418\_0612, PCC7418\_1070, PCC7418\_0892 และ PCC7418\_1355 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน PCC7418\_1116, PCC7418\_1006, PCC7418\_0225 และ PCC7418\_0623 มีระดับการแสดงออกลดลง (down-regulated) อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า RR มีหน้าที่สำคัญต่อการปรับตัวของ *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

**Project title**            Gene expression analysis of response regulator under salt stress in  
a cyanobacterium *Halothece* sp. PCC7418

**Investigator**            Miss Praphapat Bunthongkun    student ID 6032331723

**Project advisor**        Associate Professor Rungaroon Waditee-Sirisattha, Ph.D.

**Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University**

---

### Abstract

Cyanobacteria are phototrophic organisms, which can thrive in a wide range of ecological habitats, a group of marine, freshwater, terrestrial and extreme environments. *Halothece* sp. PCC7418 is extremophilic cyanobacterium, which can grow under high salinity condition. One of mechanisms that enable cells to survive in the harsh condition is signaling system called two-component system (TCS) that consists of two proteins: a histidine kinase (HK) and a response regulator (RR) that function together in a phosphotransfer pathway. From the entire genome analysis of *Halothece* sp. PCC7418, forty-four genes of RR were found. Seventeen genes of RR, PCC7418\_0084, PCC7418\_0225, PCC7418\_0226, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0612, PCC7418\_0618, PCC7418\_0623, PCC7418\_0892, PCC7418\_1006, PCC7418\_1046, PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1120, PCC7418\_1121, PCC7418\_1355, and PCC7418\_1501, were utilized for gene expression analysis under salt stress. Gene expression analysis by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) showed that PCC7418\_0612, PCC7418\_1070, PCC7418\_0892 and PCC7418\_1355 were up-regulated under high salinity condition (2M NaCl). In contrary, from the study showed that PCC7418\_1116, PCC7418\_1006, PCC7418\_0225 and PCC7418\_0623 were down-regulated under high salinity condition (2M NaCl). These experimental results showed that RR is important function for the environmental adaptation of *Halothece* sp. PCC7418 under salt stress.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ทั้งในด้านการวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง และการอภิปรายผลการทดลอง รวมถึงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ในรายวิชาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ตลอดโครงการ

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ฝ่ายงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ ห้องวิจัย 1904/17 ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนถ่ายทอดเทคนิค วิธีการทดลองอันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจในระหว่างดำเนินการวิจัย

และขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่สำหรับความเข้าใจ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบสำเร็จ	6
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	6
2.2 เคมีภัณฑ์	7
2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	8
3.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Response regulator ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	8
3.1.1 ศึกษาโปรตีน two component system ทั้งหมด ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	8
3.1.2 การทำ Domain architectures เพื่อหาฮัยนที่เป็น Response regulator	8
3.2 การออกแบบไพรเมอร์	8
3.3 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ในภาวะปกติ	9
3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418	9
3.3.2 การติดตามการเจริญของ <i>Halothece</i> sp. PCC7418	9
3.4 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment)	9
3.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงใน ภาวะปกติเป็นภาวะเครียดจากเกลือ	9
3.4.2 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	9
3.5 การสกัด total RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA	10
3.5.1 การสกัด total RNA	10
3.5.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	10



## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
3.5.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA	11
3.6 การทำSemi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ในกลุ่ม Response regulator ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	13
4.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Response regulator ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	13
4.2 การออกแบบไพรเมอร์	14
4.3 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ในภาวะปกติ	18
4.4 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment)	18
4.5 การสกัด total RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA	18
4.6 การทำSemi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	20
4.6.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ทั้งหมด 17 ยีน ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก ก.	28
สูตรอาหาร BG-11+turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติ	28
สูตรอาหาร BG-11+turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	29
การเตรียม 10X tris-Acetate-EDTA (TAE)	30
การเตรียม 1.2% agarose gel	30
การเตรียม 0.1% DEPC water	30
ภาคผนวก ข.	31
ลำดับนิวคลีโอไทด์	31
ภาคผนวก ค.	38
ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA	38
ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band จากการทำ RT-PCR	38
ภาคผนวก ง.	42
องค์ประกอบของ domain architectures ของยีนในกลุ่ม RR ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	42

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 การตอบสนองของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม	1
1.2 การควบคุมเชิงบวกและเชิงลบของการแสดงออกของยีน	2
1.3 การทำงานของ two component system (TCR)	4
1.4 องค์ประกอบของการส่งสัญญาณในระบบ (TCS)	5
4.1 <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ใน BG-11+Turk 0.5 M NaCl	18
4.2 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	19
4.3 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	20
4.4 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ใน <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	21
4.5 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์	22

## สารบัญตาราง

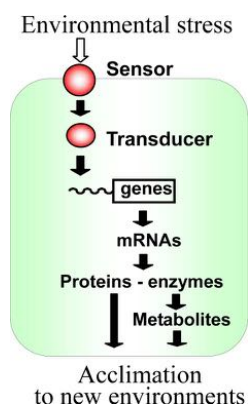
ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการวิเคราะห์ domain architectures ของยีนในกลุ่ม RR ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	13
4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนในกลุ่ม RR ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	15

## บทที่ 1

### บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic organism) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ เซลล์เดี่ยว (unicellular), เส้นสาย (filamentous) และ ทรงกลม (coccoïd) ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายทั้งในน้ำจืด, น้ำทะเล, สภาพแวดล้อมบนบก (Lau และคณะ, 2015) หรือแม้กระทั่งในสภาพแวดล้อมสุดขั้ว (extreme environment) ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อกิจกรรมทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เมื่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมเกินระดับที่กำหนด กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดจะถูกยับยั้งหรือโดนทำลาย การที่จะตอบสนองต่อความเครียดในสิ่งมีชีวิตจะมีการกระตุ้นชุดของยีนที่เฉพาะเจาะจงสำหรับความเครียดแต่ละประเภท โปรตีนที่เฉพาะเจาะจงจะถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยโปรตีนเหล่านี้บางส่วนก็มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์เมแทบอไลต์ที่เฉพาะสำหรับความเครียดแต่ละชนิด (stress-specific metabolites) โปรตีนและสารเมแทบอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้นเหล่านี้จะมีความสำคัญต่อการปรับตัวให้ชินกับสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์กับสภาพแวดล้อมใหม่ ขั้นตอนแรกในการปรับตัวให้ชินกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม คือ การรับรู้ความเครียดและการถ่ายทอดสัญญาณที่เกิดขึ้น เซลล์แต่ละเซลล์มีเซ็นเซอร์และตัวแปลงสัญญาณที่รับรู้และถ่ายทอดสัญญาณจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง โดยส่วนใหญ่จะเฉพาะเจาะจงกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมแต่ละประเภท (Los และคณะ, 2010)

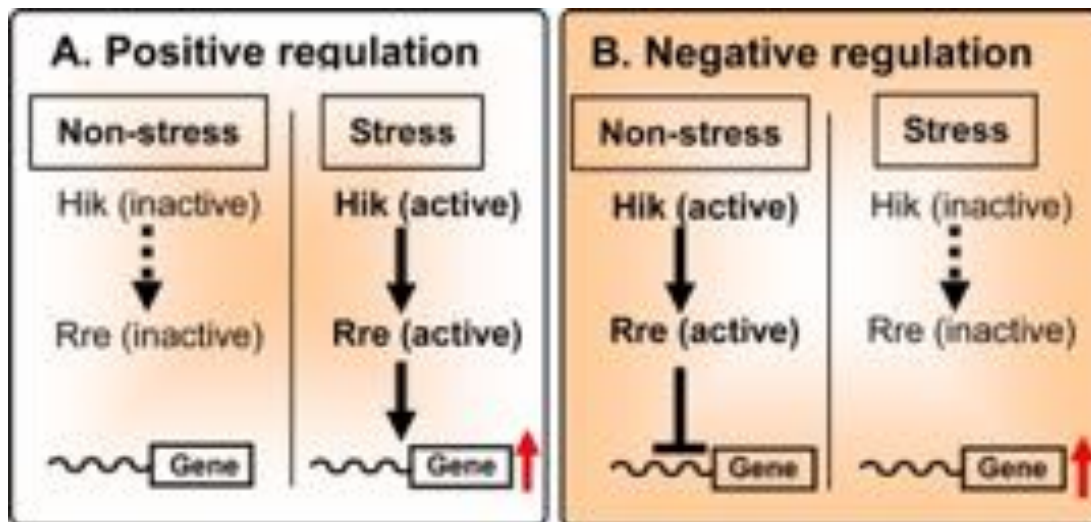
สิ่งสำคัญที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย คือการมีระบบรับส่งสัญญาณที่เรียกว่า two component systems (TCS) ซึ่งมีหน้าที่หลักในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม โดยทั่วไประบบ TCS จะประกอบด้วยโปรตีนสองชนิด คือ histidine kinases (HK) และ response regulators (RR) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนรูปแบบอื่นในระบบ TCS คือ hybrid kinases (HyK) โดยการรับส่งสัญญาณของโปรตีนในระบบนี้จะเกิดผ่านกระบวนการที่เรียกว่า phosphotransfer pathway (Gao และคณะ, 2007)



ภาพที่ 1.1 การตอบสนองของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม

(ที่มา: Los และคณะ, 2010)

สำหรับการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อความเครียดในระบบ TCS จะถูกกำหนดโดย HK และ RR เป็นหลัก ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้สามารถเกิดขึ้นได้สองประเภท คือ การควบคุมเชิงบวก (positive regulation) และการควบคุมเชิงลบ (negative regulation)



ภาพที่ 1.2 การควบคุมเชิงบวกและเชิงลบของการแสดงออกของยีน

(ที่มา: Los และคณะ, 2010)

การควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเชิงบวก (รูปที่ 1.2A) HK จะไม่ทำงานภายใต้ภาวะที่ไม่มี ความเครียดและเป็นผลให้ RR ที่เกี่ยวข้องไม่ทำงาน ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะที่ไม่มี ความเครียด แต่เมื่อเซลล์ได้รับความเครียดพบว่า HK จะถูกกระตุ้นโดย phosphorylation จากนั้นสัญญาณจะ ถูกถ่ายโอนไปยัง RR ส่งผลให้เกิดการทำงานของ RR ซึ่งช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีน ในทางตรงกันข้ามพบว่า การควบคุมการแสดงออกของยีนแบบเชิงลบ (รูปที่ 1.2B) พบว่าในภาวะที่ไม่มี ความเครียด HK จะสามารถ ทำงานได้และส่งสัญญาณไปที่ RR เพื่อให้เกิดการกดการแสดงออกของยีน แต่กลับกันเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะ เครียดพบว่า HK จะไม่ทำงานส่งผลให้ไม่มีการส่งสัญญาณไปที่ RR จึงทำให้มีการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะ เครียด (Los และคณะ, 2010)

โดยทั่วไปแล้ว RR เป็นโปรตีนหลายโดเมน (multidomain proteins) ซึ่งประกอบด้วย N-terminal regulatory domain (receiver) และ C-terminal effector domain (output) แบบแปรผันตามการ ตอบสนอง (Gao และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแบ่ง RR ออกเป็น 4 ประเภทโดยจะแบ่งจากชนิด ของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโดเมน ได้แก่

## RR class I (RRI) ประกอบด้วย

**Subclass I (RRI)-CheY domain** RR ในกลุ่มย่อยนี้จะพบโปรตีน CheY ที่ทำงานร่วมกับ RR โดเมน ซึ่งจะเป็น polypeptide ที่มีความยาวกรดอะมิโนน้อยกว่า 200 เรซิดิวซ์ โดยในกลุ่มย่อยนี้จะมีโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่ทราบหน้าที่การทำงาน ตัวอย่างเช่น PilH ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ของ *Synechocystis* sp. PCC 6803

**Subclass II (RRI)-Pat A domain** RR ในกลุ่มย่อยนี้จะประกอบด้วย polypeptide ที่มีความยาวกรดอะมิโนประมาณ 400 เรซิดิวซ์ โดยโปรตีนที่น่าสนใจที่ค้นพบในกลุ่มย่อยนี้คือ Crr36 เป็นส่วนหนึ่งของวิถีที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้และส่งสัญญาณเมื่ออุณหภูมิต่ำ และใช้สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีน *desB* ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803

**Subclass III RR-other** ในกลุ่มย่อยนี้ยังคงประกอบด้วย โดเมน RR เดียว กับ polypeptide ที่มีความยาวกรดอะมิโนมากกว่า 200 เรซิดิวซ์ โปรตีนในกลุ่มย่อยนี้ส่วนใหญ่ยังคงไม่มีการกำหนดหน้าที่การทำงานที่แน่ชัด และพบว่าโปรตีนในกลุ่มย่อยนี้พบเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสง

**RR class II (RRII)** RR ในกลุ่มนี้พบว่าเป็น Two component DNA binding RR ที่ประกอบด้วย N-terminal RR domain รวมกับ DNA binding domain ไม่ว่าจะเป็น OmpR, NarL หรือ AraC ดังนั้นในกลุ่มนี้อาจมีหน้าที่เกี่ยวกับ transcriptional regulator

**Subclass I OmpR-type subclass (T\_reg output domain)** โปรตีนที่น่าสนใจในกลุ่มย่อยนี้ได้แก่ Crr31 และ Crr26 ที่ค้นพบใน *Synechocystis* sp. โดยจะทำหน้าที่เป็น long term regulation ของการกระจายพลังงานใน phycobilisome ทั้งยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ hyperosmotic stress นอกเหนือจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีน Crr16 ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสมดุลของแมงกานีส โดยทำงานร่วมกันกับ HK class I

**Subclass II NarL subclass (Lux output domain)** RR ประเภทนี้มีโปรตีนเพียงไม่กี่ชนิดที่มีการกำหนดหน้าที่การทำงาน ตัวอย่างเช่น Crr1 ใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 ทำงานร่วมกันกับ Hik2 และ Hik34 ในการตอบสนองต่อ hyperosmotic stress และนอกจากนี้ยังพบโปรตีนในกลุ่มย่อยนี้ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ osmotic stress ใน *Anabaena* sp. อีกด้วย

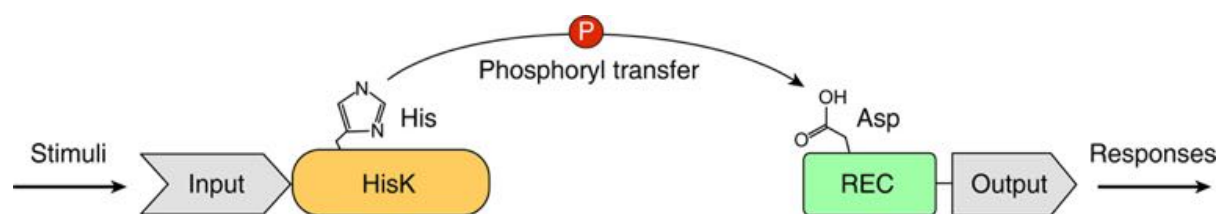
**Subclass III AraC subclass (AraC output domain)** ในกลุ่มย่อยนี้เป็นกลุ่มย่อยสุดท้ายใน RRII โดยจะประกอบด้วย RR domain รวมกับ HTH-AraC ซึ่งเป็น DNA binding domain ใน AraC family ที่ทำหน้าที่เป็น RR

**RR class III (RRII)** RR ของไซยาโนแบคทีเรียในคลาสนี้จะประกอบด้วยโดเมน RR จำนวน 2-3 โดเมนอยู่ร่วมกันกับ Treg และ Hpt โดยมีหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของ phosphotransfer relays ตัวอย่างของโปรตีนในกลุ่มนี้ เช่น RcaC ใน *Fremyella dispoliphon* ทำหน้าที่เกี่ยวกับ chromatic adaptation นอกจากนี้ยังพบว่า N-terminal RR และ Hpt มีความสำคัญต่อการควบคุมแสงในการแสดงออกของ phycocyanin

**RR class IV (RRIV)** โปรตีนส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้จะไม่มีการมี DNA binding domain แต่ส่วนใหญ่จะมี output โดเมน ที่เกี่ยวกับ putative catalytic activity มากกว่า 40% ของ polypeptide เหล่านี้จะมี GGDEF โดเมน

โดยจะเรียกว่า DUF1 โดเมน ซึ่งโดเมนชนิดนี้ค้นพบครั้งแรกใน *Caulobacter crescentus* เรียกว่า PleD ทำหน้าที่เป็น RR ควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และพบโดเมนชนิดนี้ที่ทำงานร่วมกับโดเมนชนิดอื่นๆ โดยจะทำหน้าที่ในการแสดง signal transduction ในแบคทีเรีย และจะแปลงสัญญาณที่แตกต่างกันพวกนี้เพื่อนำไปสู่การผลิตสารทุติยภูมิที่เรียกว่า cyclic diguanylic acid นอกเหนือจากนั้น GGDEF สามารถทำงานร่วมกับ EAL โดเมน หรือเรียกว่า DUF2 เพื่อทำหน้าที่เป็น diguanylate phosphodiesterase อีกด้วย (Mark และคณะ, 2006)

สำหรับกลไกการทำงานของโดเมนควบคุม (regulatory domain) ใน RR พบว่าจะมีหน้าที่เร่งการถ่ายโอน phosphoryl group จาก phosphoHis ของ HK ไปยัง aspartic acid residue และส่งต่อไปยัง effector โดเมน โดยระดับการแสดงออกของ RR ฟอสโฟรีเลชั่นจะเป็นตัวกำหนดการตอบสนองของ output โดเมน ของระบบ TCS (Gao และคณะ, 2007)

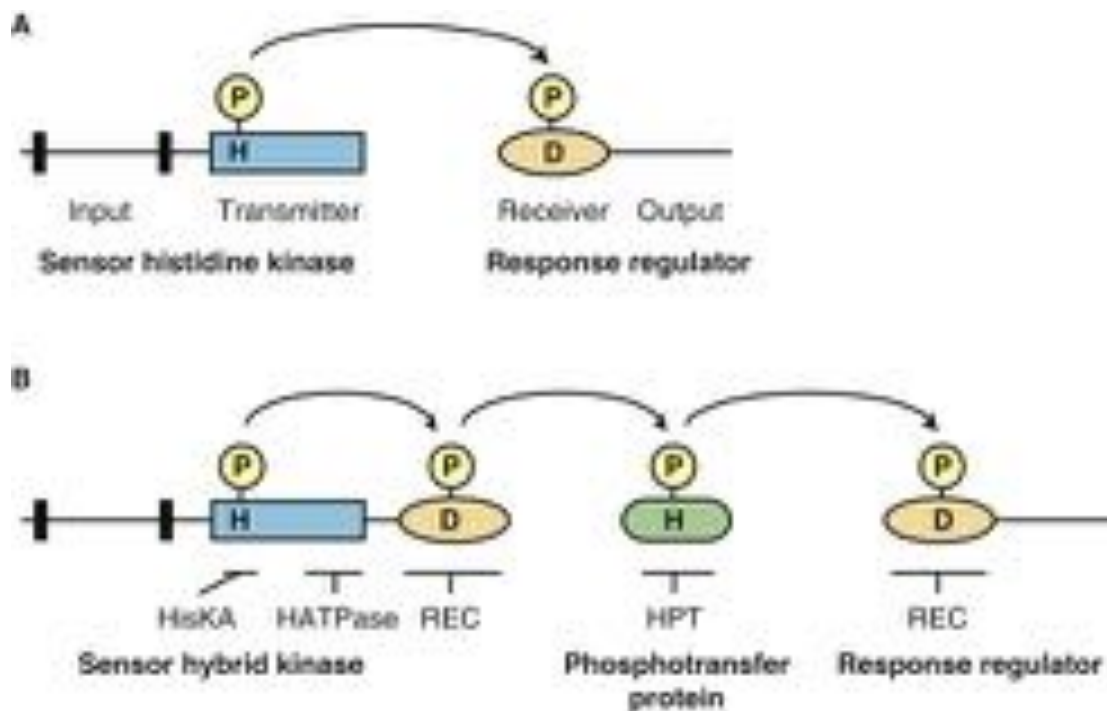


ภาพที่ 1.3 การทำงานของ two component systems (TCS)

(ที่มา: Gao และคณะ, 2007)

นอกจากนี้ยังพบว่าระบบ TCS สามารถเกิดฟอสโฟรีเลชั่นแบบหลายขั้นตอนได้โดยเป็นผลมาจากการทำงานของ HyK (รูปที่ 1.4) โดยระบบเหล่านี้ประกอบด้วยโดเมน HisKA, HATPase\_c, HPT, และ RR (Schaller และคณะ, 2011) จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่าระบบ TCS สามารถตอบสนองต่อความเครียดที่หลากหลายและจะมีการตอบสนองแบบจำเพาะที่แตกต่างกันออกไปผ่านกระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น และพบว่า output โดเมนใน RR จะเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการตอบสนองต่าง ๆ

ความเค็ม (salinity) หมายถึง ความเข้มข้นของไอออนอนินทรีย์ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อม โดยเป็นหนึ่งในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่ส่งผลต่อไซยาโนแบคทีเรีย หลายๆงานวิจัยนิยมใช้ *Synechocystis sp.* เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ ซึ่งพบว่ากระบวนการตอบสนองต่อความเครียดนี้จะเป็น dynamic process และการตอบสนองสามารถเกิดขึ้นได้หลายระดับ รวมถึงการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการ gene transcription (Rachedi และคณะ, 2020)



ภาพที่ 1.4 องค์ประกอบของการส่งสัญญาณในระบบ TCS

(ที่มา: Schaller และคณะ, 2011)

(A) ระบบ TCS อย่างง่ายที่ใช้ HK และ RR

(B) ฟอสโฟรีเลย์แบบหลายขั้นตอนที่ใช้ HyK ที่มีทั้ง HK และโดเมนตัวรับโปรตีนฟอสโฟทรานเฟอร์ที่มี HK และ RR

สำหรับไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยคัดแยกได้จากทะเลเดดซี (Dead Sea) ประเทศอิสราเอล (Waditee-sirisattha และคณะ, 2014) ซึ่งทะเลเดดซีเป็นทะเลที่เค็มที่สุดแห่งหนึ่งของโลก โดยมีความเค็มกว่าทะเลอื่นถึง 4 เท่า โดยภาวะดังกล่าวจะทำให้เซลล์เกิดความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (salt stress) ดังนั้นจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ทำหน้าที่เป็น salt sensor เพื่อตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ

#### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ



## บทที่ 2

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบสำเร็จ

#### 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. โกร่งและที่บด (pestle and mortar)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) บริษัท Olympus (Japan)
3. ขวดแก้วใสสารเคมี (Duran) บริษัท Schott (Germany)
4. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)
5. หลอด PCR (PCR tube)
6. เครื่องชั่ง (balance) รุ่น PG2002-5 บริษัท Mettler Toledo (Thailand)
7. เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (heat block) บริษัท Bioer technology (China)
8. เครื่องนาโนดรอป (nano-drop) รุ่น NanoDrop 2000 บริษัท Thermo scientific (USA)
9. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (rotary shaker) บริษัท Hercuvan Lab System (USA)
10. เครื่องปั่นตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated microcentrifuge) รุ่น KUBOTA6500 บริษัท Kubota (Japan)
11. เครื่องปั่นตกตะกอนขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น Centrifuge 5418-R บริษัท Eppendorf (Germany)
12. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (thermal cycler) รุ่น T-100™ บริษัท BIO RAD (USA)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น genesis-20 และ Biomate-35 บริษัท Thermo Scientific (Thailand)
14. เครื่องให้กระแสไฟฟ้าสำหรับการรันเจล (power supply) บริษัท BIO RAD (USA)
15. เครื่องอ่านเจล (imager) รุ่น Gel Doc™ EZ บริษัท BIO RAD (USA)
16. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท Meditop (Thailand)
17. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Sanyo (Japan)
18. ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Haier (China)
19. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Thermo Electron Corporation (USA)
20. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited (New Zealand)
21. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น Microtech บริษัท LabMicro (Thailand)
22. ทิป (tip)
23. ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)

## 2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
3. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
4. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
5. โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
6. ไดโซเดียม เอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก ไดไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
7. กรดซิตริก (Citric acid)
8. แอมโมเนียม ไอรอน (III) ซิเตรต (Ammonium iron(III) citrate)
9. กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
10. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
11. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
12. แอมโมเนียม โมลิบเดต เตตระไฮเดรต ( $(\text{Na}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
13. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
14. โคบอลต์ (II) ไนเตรต เฮกซะไฮเดรต ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
15. โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )
16. โพแทสเซียมคลอไรด์ ( $\text{KCl}$ )
17. แมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
18. ไทรซอลรีเอเจนต์ (Trizol<sup>®</sup> reagent)
19. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
20. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
21. เอทานอล (Ethanol)
22. ทริส (tris(hydrizymethyl)aminomethane;  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ )
23. ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate; DEPC)
24. ผงอะกาโรส (Agarose)
25. ดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์ (DNA primer)
26. มาร์กเกอร์ (VC 1 kb DNA ladder)
27. สีย้อมเจล (SYBRO Safe DNA Gel Stain)
28. Taq DNA polymerase

## 2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดสำเร็จ Superscript<sup>®</sup> III First-strand

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการทดลอง

#### 3.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Response regulator (RR) ใน *Halotheca* sp. PCC7418

ไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษามีข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล โดย เลือกใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>), UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), String (<https://string-db.org>), Pfam (<http://pfam.xfam.org>) และNCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เป็นฐานข้อมูลหลักทำการสืบค้นและเลือกยีนที่เป็น Response regulator ทั้งหมด 17 ยีน ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ได้แก่ PCC7418\_0084, PCC7418\_0225, PCC7418\_0226, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0612, PCC7418\_0618, PCC7418\_0623, PCC7418\_0892, PCC7418\_1006, PCC7418\_1046, PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1120, PCC7418\_1121, PCC7418\_1355, PCC7418\_1501 เพื่อนำมาศึกษา

##### 3.1.1 ศึกษาโปรตีน two component system ทั้งหมดใน *Halotheca* sp. PCC7418

หายีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับ TCS ใน *Halotheca* sp. PCC7418 โดยใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>) จากนั้นใช้ String (<https://string-db.org>) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) เมื่อได้ยีนที่เกี่ยวข้องกับ TCS ใน *Halotheca* sp. PCC7418 แล้วนำไปวิเคราะห์หา domain architectures ต่อไป

##### 3.1.2 การทำ Domain architecture เพื่อหายีนที่เป็น RR

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1.1 มาทำการวิเคราะห์ domain architecture โดยเลือกใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>) , UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) และ Pfam (<http://pfam.xfam.org>)

#### 3.2 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เลือกจากฐานข้อมูล KEGG มาออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Perl Primer (<http://www.perlprimer.sourceforge.net>) โดยกำหนดความยาว 15 คู่เบส กำหนดอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) เท่ากับ 50-60 องศาเซลเซียส และ amplicon size ความยาวประมาณ 300 คู่เบส โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เข้าจับยีนตำแหน่งที่ไม่อยู่ปลายด้านใดด้านหนึ่งมากเกินไป และมีค่า Tm ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อใช้สังเคราะห์ไพรเมอร์และใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.3 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในภาวะปกติ

#### 3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418

ในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 จะเลี้ยงในอาหาร Blue Green medium (BG-11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงขาวตลอดเวลา บนเครื่อง เขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418

#### 3.3.2 การติดตามการเจริญของ *Halotheca* sp. PCC7418

แบ่งสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใส่ในคิวเวตต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD730) ซึ่งเป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ โดยใช้อาหาร BG-11 + Turk solution เป็น blank เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.5-0.8 จึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ต่อไป

### 3.4 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment)

#### 3.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงในภาวะปกติ เป็นภาวะเครียดจากเกลือ

เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยแบ่งเซลล์ตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ (ชุดควบคุม) และส่วนที่สองจะเลี้ยงในภาวะเครียดจากเกลือ โดยเก็บเซลล์ให้น้ำหนักเปียกประมาณ 30-50 มิลลิกรัมทุกชุดการทดลอง สำหรับตัวอย่างที่เลี้ยงในภาวะปกติ หลังจากปั่นเหวี่ยงเซลล์แยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ แล้วเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ  $-80$  องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างที่สองที่จะได้รับความเครียดจากเกลือจะถูกเลี้ยงในอาหาร BG-11+Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์

#### 3.4.2 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment)

นำเซลล์จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.4.1 มาเลี้ยงในอาหาร BG-11+Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง ทุก 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ปั่น

เหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ให้หมด แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัด RNA, เปลี่ยนเป็น cDNA และทำ semiquantitative RT-PCR ในขั้นตอนถัดไป

### 3.5 การสกัด total RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA

#### 3.5.1 การสกัด total RNA

นำเซลล์ที่เก็บได้จากภาวะที่ใช้ทดลอง ในขั้นตอนที่ 3.4.1 และ 3.4.2 มาสกัด total RNA ด้วย TRIzol<sup>®</sup> reagent โดยมีวิธีการทดลองคือ เริ่มจากเติม TRIzol<sup>®</sup> reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่มีน้ำหนักเปียก 30-50 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงในโกร่งที่เย็นจัดและบดเซลล์ให้เซลล์แตก จะสังเกตได้จากเซลล์จะมีลักษณะเป็นผง รอให้เซลล์ละลาย แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสออก จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูด 70% เอทานอล ออกให้ได้มากที่สุด แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยการคว่ำหลอดไว้ประมาณ 20 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase หรือน้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แบ่งสารละลาย RNA ที่ได้บางส่วนไปตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอป และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส และเก็บ RNA ที่เหลือสำหรับเปลี่ยนเป็น cDNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 3.5.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส (electrophoresis)

ใช้ agarose gel 1.2% (w/v) ที่มีการ precast ด้วยสี SYBR safe และใช้ marker VC 1 kb เทียบขนาดของ RNA โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel doc<sup>TM</sup> EZ และอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Lab

### 3.5.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA

ขั้นตอนในการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ใช้ชุดสำเร็จเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA ตามวิธีการที่ชุดสำเร็จแนะนำ โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript<sup>®</sup> III First-strand สำหรับชุดสำเร็จ SuperScript<sup>®</sup> III First-strand จะใช้ RNA ตั้งต้น 2,500 นาโนกรัม ซึ่งจะมีองค์ประกอบหลักในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ Random hexamer, 10mM dNTP, น้ำปราศจาก RNase (treated DEPC water), 10X RT-buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M DTT, RNase OUT, Super Script<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase และ RNase H หลังจากนั้นนำไปทำ semiquantitative RT-PCR ในขั้นตอนถัดไปเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

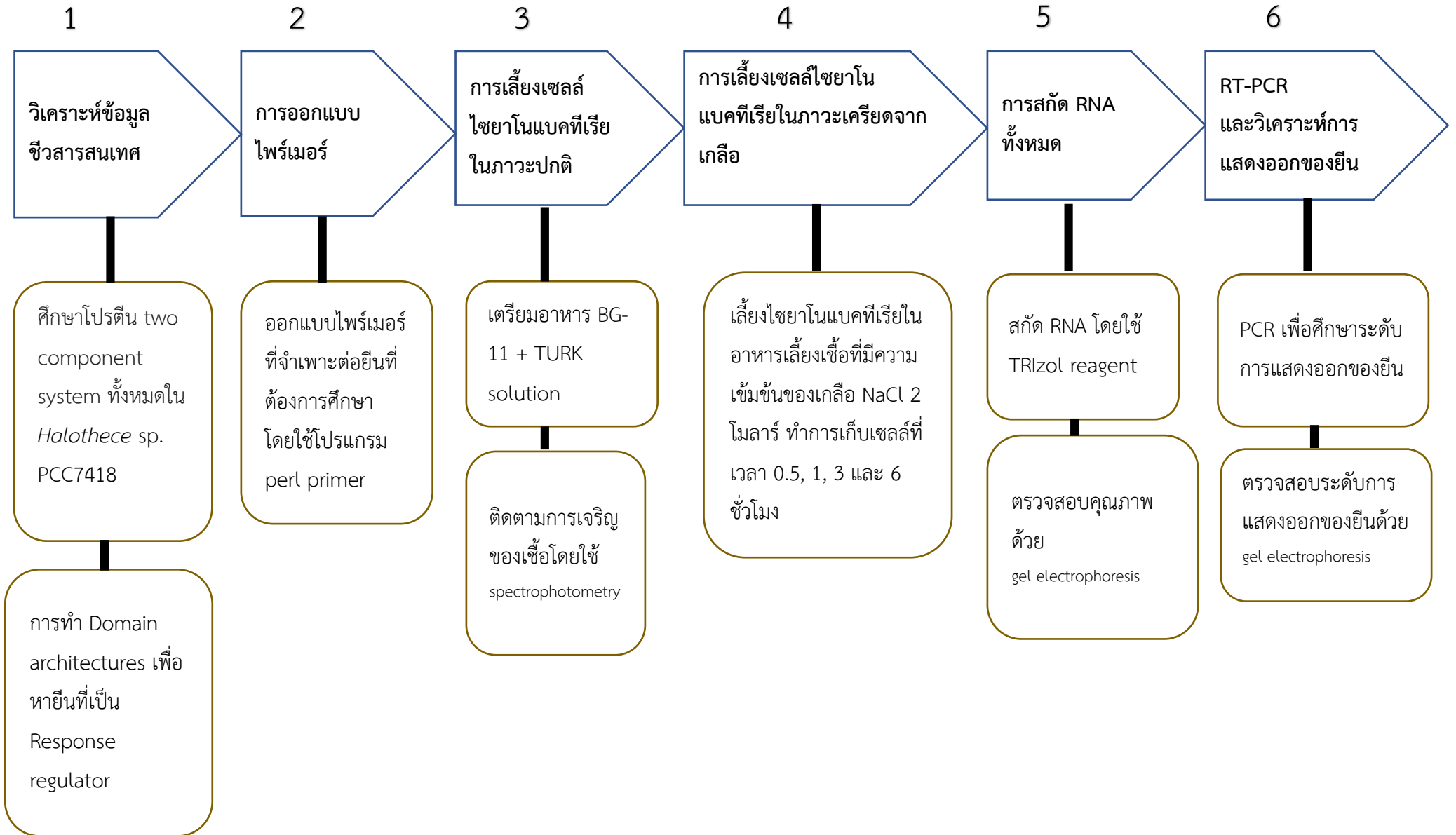
### 3.6 การทำ Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418

นำ cDNA มาเพิ่มจำนวนด้วยการทำ PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

- initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- annealing ให้ primer จับกับ DNA แม่แบบ โดยอุณหภูมิจะขึ้นอยู่กับ primer ที่เลือกใช้ โดยอยู่ระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- elongation ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ระยะเวลาจะขึ้นอยู่กับ amplicon size) ทำซ้ำขั้นตอน denaturation, annealing และ elongation เป็นจำนวน 25 รอบ หลังจากนั้น termination ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้สำหรับการทดลองนี้ใช้ *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน

จากนั้นนำผลที่ได้จากการทำ PCR มารันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ agarose gel 1.2% (w/v) ผสมกับบัฟเฟอร์ 1X TAE และสีย้อมเจล SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain และใช้ marker VC 1 kb เพื่อเทียบขนาดของ DNA โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามีค่าคงที่เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Gel docTM EZ อ่านผลและเปรียบเทียบความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab และ คำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS V22

แผนผังการดำเนินการทดลอง










## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง





#### 4.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Response regulator (RR) ใน *Halotheca* sp. PCC7418

ไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษามีข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>) โดยจากการศึกษาพบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องใน TCS ทั้งหมด 72 ยีน ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นยีนในกลุ่ม RR ทั้งหมด 44 ยีน และเลือกมาศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือทั้งหมด 17 ยีนดังนี้ PCC7418\_0084, PCC7418\_0225, PCC7418\_0226, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0612, PCC7418\_0618, PCC7418\_0623, PCC7418\_0892, PCC7418\_1006, PCC7418\_1046, PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1120, PCC7418\_1121, PCC7418\_1355, PCC7418\_1501 หลังจากนั้นนำยีนทั้งหมด 17 ยีนไปวิเคราะห์ domain architecture โดยใช้ฐานข้อมูล KEGG และ Pfam (<http://pfam.xfam.org>) โดยให้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ domain architecture ของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418

ที่	ชื่อยีน	คำนิยาม	domain architectures
1	PCC7418_0084	two-component system, OmpR family, response regulator RpaA	
2	PCC7418_0225	twitching motility two-component system, response regulator PilG	
3	PCC7418_0226	twitching motility two-component system, response regulator PilH	
4	PCC7418_0392	two-component system, OmpR family, manganese sensing response regulator	
5	PCC7418_0469	two-component system, chemotaxis family, response regulator PixG	
6	PCC7418_0612	two component transcriptional regulator, LuxR family	
7	PCC7418_0618	two-component system, chemotaxis family, response regulator PixG	



ที่	ชื่อยีน	คำนิยาม	domain architectures
8	PCC7418_0623	hypothetical protein, two-component system, chemo taxis family, response regulator PixG	ไม่ปรากฏในฐานข้อมูล Pfam ( <a href="http://pfam.xfam.org">http://pfam.xfam.org</a> )
9	PCC7418_0892	response regulator, receiver protein	
10	PCC7418_1006	two-component system, chemotaxis family, response regulator PixG	
11	PCC7418_1046	two component transcriptional regulator, winged helix family	
12	PCC7418_1070	KaiA family protein, circadian clock protein KaiA	
13	PCC7418_1116	two-component system, OmpR family, response regulator RpaB	
14	PCC7418_1120	twitching motility two-component system, response regulator PilG	
15	PCC7418_1121	twitching motility two-component system, response regulator PilH	
16	PCC7418_1355	two component transcriptional regulator, LuxR family	
17	PCC7418_1501	two-component system, chemotaxis family, response regulator PixG	

หมายเหตุ : สีเขียว แสดงถึง N-terminal regulatory domain, สีแดง แสดงถึง C-terminal effector domain, สีฟ้า แสดงถึง low complexity region สำหรับรายละเอียดเพิ่มเติมจะแสดงในภาคผนวก ง.

#### 4.2 การออกแบบไพรเมอร์

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม RR ทั้ง 17 ยีน ที่เลือกจากฐานข้อมูล KEGG มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Perl Primer สำหรับนำไปใช้ต่อการทดลองขั้นถัดไปได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halothece* sp. PCC7418

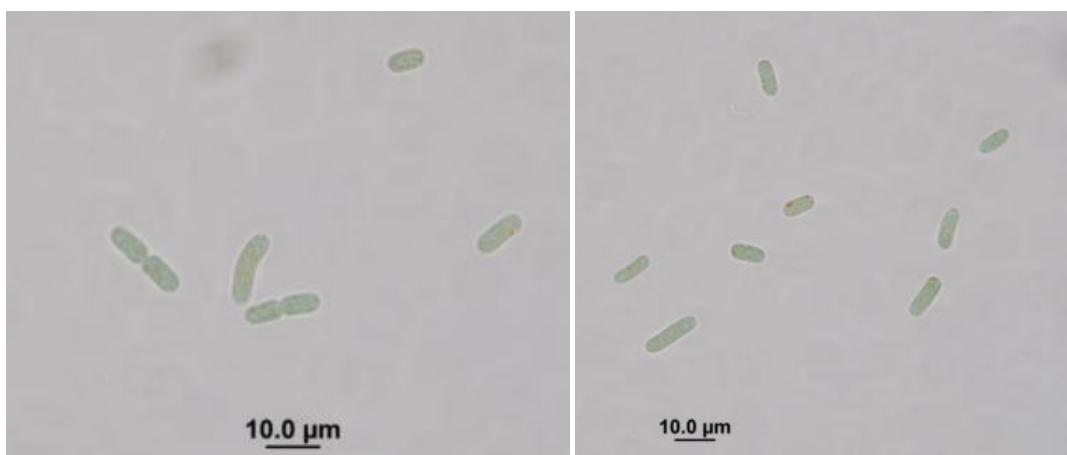
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาดแอมพลิคอน (bp)
PCC7418_0084-Forward	5'- ACTGCTGACATTCCG - 3'	15	52.70	300
PCC7418_0084-Reverse	5'- GGCGTTGCAATAAGC - 3'	15	53.11	300
PCC7418_0225-Forward	5'- CACTGTTGTCGAGCC - 3'	15	54.08	300
PCC7418_0225-Reverse	5'- AAGCATTTGCAGCCA - 3'	15	53.60	300
PCC7418_0226-Forward	5'- TGATTTCCGATTTGC - 3'	15	47.89	300
PCC7418_0226-Reverse	5'- GTACCAATGAGTTCG - 3'	15	47.32	300
PCC7418_0392-Forward	5'- ATGGTTGATGCCAG - 3'	15	50.04	300
PCC7418_0392-Reverse	5'- TCAATGGTTCGTCCA - 3'	15	51.06	300
PCC7418_0469-Forward	5'- TACCAGCAAGGAAGC - 3'	15	52.09	300
PCC7418_0469-Reverse	5'- TAACGTCCGATCACC - 3'	15	51.60	300
PCC7418_0612-Forward	5'- GAAGTTCGATCGCGC - 3'	15	55.34	300
PCC7418_0612-Reverse	5'- AAGACTCTGGTGGCG - 3'	15	55.02	300
PCC7418_0618-Forward	5'- GCCAGAGAAGTAGCT - 3'	15	50.93	300
PCC7418_0618-Reverse	5'- GATCCTGAAGCTCCT - 3'	15	50.42	300

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาดแอมพลิคอน (bp)
PCC7418_0623-Forward	5'- GAACAAGTAGCAGCC - 3'	15	50.81	300
PCC7418_0623-Reverse	5'- GGGCTTGATTTGGAG - 3'	15	50.63	300
PCC7418_0892-Forward	5'- ATCAGAATGCGAGTC - 3'	15	49.21	300
PCC7418_0892-Reverse	5'- TCACCAGTTGTTCT - 3'	15	50.33	300
PCC7418_1006-Forward	5'- GGCAGTTTAGTTCCC - 3'	15	50.18	300
PCC7418_1006-Reverse	5'- GAGCAACAATCGGAC - 3'	15	51.39	300
PCC7418_1046-Forward	5'- ACCGTTACTGTTGCT - 3'	15	51.52	300
PCC7418_1046-Reverse	5'- GTTGTTTCAGGGACTG - 3'	15	50.15	300
PCC7418_1070-Forward	5'- TTTGCGGGATAAACC - 3'	15	50.13	300
PCC7418_1070-Reverse	5'- GGGAGTGAGTTGGAG - 3'	15	51.00	300
PCC7418_1116-Forward	5'- GCTGACCGCTTTAGG - 3'	15	53.74	300
PCC7418_1116-Reverse	5'- GCGGGAAATGGACTC - 3'	15	53.69	300
PCC7418_1120-Forward	5'- GTTTCGGCTTCCGTG - 3'	15	54.95	300
PCC7418_1120-Reverse	5'- TTTGTTTCGGCGTAGG - 3'	15	53.16	300

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาดแอมพลิคอน (bp)
PCC7418_1121-Forward	5'- TCGTTGAAGATGGTC - 3'	15	48.99	300
PCC7418_1121-Reverse	5'- TTTGTCAGATAGGCA - 3'	15	47.24	300
PCC7418_1355-Forward	5'- ATTGGTGAAGCAGGT - 3'	15	51.31	300
PCC7418_1355-Reverse	5'- AGCAACAAACTGGAC - 3'	15	50.36	300
PCC7418_1501-Forward	5'- AGCAACAGAACTCGC - 3'	15	53.54	300
PCC7418_1501-Reverse	5'- CTCTGAGGTTTGGGC - 3'	15	53.02	300

### 4.3 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในภาวะปกติ

ในขั้นตอนนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Blue Green medium (BG-11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงขาว ตลอดเวลา บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD730) โดยเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.5-0.8 ซึ่งจากการทดลองพบว่า *Halotheca* sp. PCC7418 ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์สำหรับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสำหรับการนำไปทำการทดลองต่อ



ภาพที่ 4.1 *Halotheca* sp. PCC7418

ใน BG-11 + Turk 0.5 M NaCl

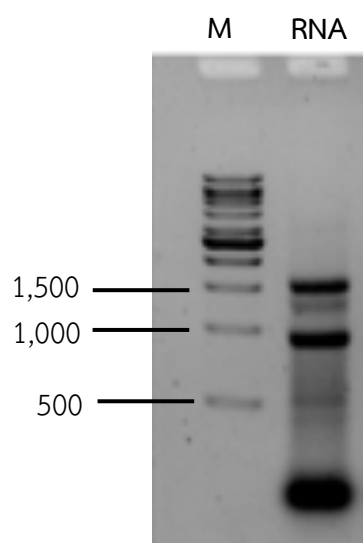
### 4.4 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment)

หลังจากเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 เจริญเติบโตเต็มที่โดยมีค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.5-0.8 จะถูกนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์เพื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงในภาวะเครียดจากเกลือ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Blue Green medium (BG-11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ซึ่งในการทดลองนี้จะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและจะเก็บตัวอย่างที่ 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง นอกจากนี้จะใช้ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blue Green medium (BG-11) + Turk Solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นชุดควบคุม

### 4.5 การสกัด total RNA จากไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418

เมื่อนำเซลล์ที่ใช้ทดลองทุกชุดการทดลองมาสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRIzol<sup>®</sup> reagent แล้ว RNA ที่สกัดได้จะถูกนำไปตรวจสอบความเข้มข้น รวมทั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

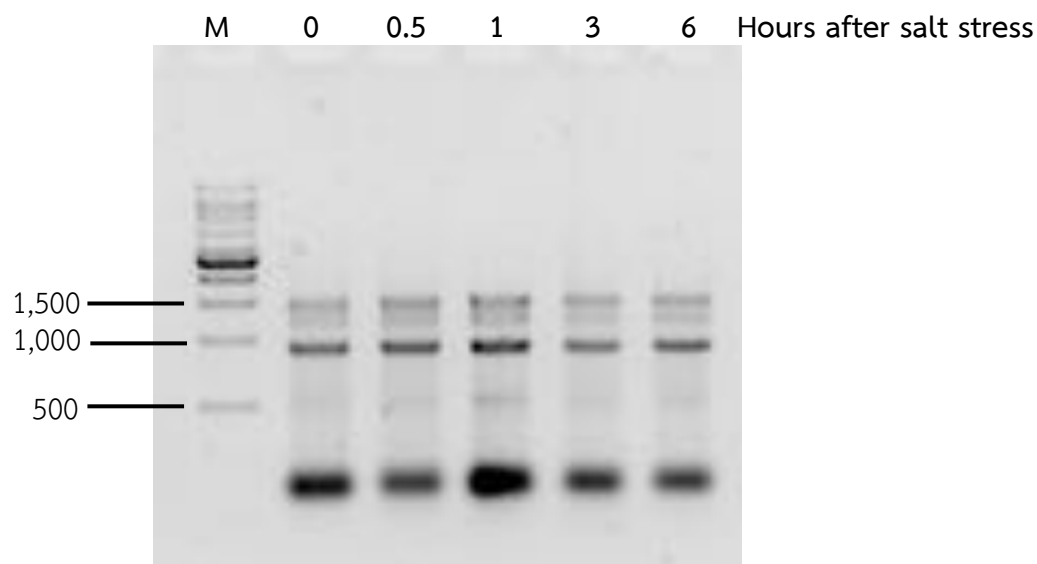
( $A_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $A_{280}$ ) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA โดยหาค่าอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260} / A_{280}$  โดยอัตราส่วนนี้จะแสดงถึงการปนเปื้อนของโปรตีนใน RNA นอกจากนี้จะตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดโดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งจะใช้ปริมาณ RNA 2500 นาโนกรัม ซึ่งพบว่า band หลักๆที่ตรวจวัดได้มีทั้งหมด 3 ส่วน ประกอบด้วย 23S rRNA มีขนาดประมาณ 1,500-1,800 คู่เบส, ส่วนของ 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และส่วนของ RNA ขนาดเล็ก (small RNAs) ซึ่งเป็นแถบเข้มปรากฏด้านล่างสุด โดยจะแสดงในรูป 4.2 ซึ่งเป็นรูป RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418 ที่เลี้ยงในภาวะปกติและตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 4.2 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M แทน marker VC 1 kb และ RNA คือ RNA ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในภาวะปกติ

สำหรับการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment) ประกอบด้วยชุดการทดลองที่เลี้ยงในภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเซลล์ตามระยะเวลาที่กำหนดและเก็บเซลล์จากนั้นนำมาสกัด RNA และตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งจากรูปเจลจะแสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment) มีความเข้มข้นสูงและมีความบริสุทธิ์ โดยผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมีความคมชัดของ band และประกอบด้วย 3 band หลัก ได้แก่ 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs ส่วนผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จะแสดงไว้ในภาคผนวก ค.



ภาพที่ 4.3 เจลอิเล็กโตรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

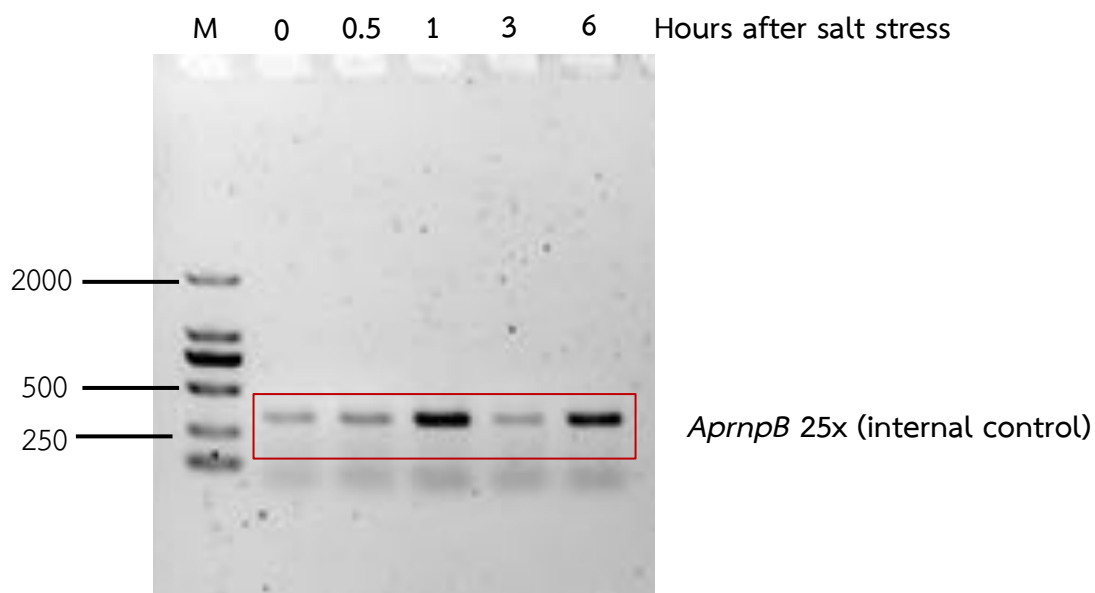
โดยกำหนดให้ M แทน marker VC 1 kb และ 0.5, 1, 3 และ 6 คือ RNA ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในภาวะเครียดจากเกลือความเข้มข้น 2 โมลาร์ ส่วน 0 คือชุดควบคุมโดยเลี้ยงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียในภาวะปกติ

จากการสกัด total RNA ด้วยการใช้สารละลาย TRIzol<sup>®</sup> reagent เมื่อนำไปตรวจวัดคุณภาพของ RNA โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิสพบว่า ทุกชุดการทดลองมีรูปแบบของ band ที่ตรวจพบเป็นไปตามที่คาดหวัง นั่นคือ 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs และ band ที่พบค่อนข้างมีความสมบูรณ์ (intact) แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดีโดยมีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ  $690 \text{ ng}/\mu$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การสกัด total RNA โดยใช้สารละลาย TRIzol<sup>®</sup> reagent ซึ่งเป็น reagent สำเร็จรูปสามารถคงสภาพ RNA ได้ จึงทำให้การสกัด RNA มีปริมาณมากและมีคุณภาพ ส่วนค่า  $A_{260} / A_{280}$  คือค่าที่แสดงความบริสุทธิ์ของ RNA โดยสามารถบ่งบอกถึงการปนเปื้อนโปรตีนใน RNA ที่สกัด โดยจากการทดลองพบว่าอัตราส่วนดังกล่าวมีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่า RNA ที่สกัดได้ทุกชุดการทดลองมีการปนเปื้อนโปรตีนต่ำ (Song และคณะ, 2013)

#### 4.6 การทำ Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418

หลังจากตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดจาก *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress treatment) แล้ว RNA ที่สกัดได้ในทุกชุดการทดลองจะถูกเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript<sup>®</sup> III First-strand ซึ่งจะใช้ปริมาณ RNA ตั้งต้น 2,500 นาโนกรัม โดยในขั้นแรกจะดูระดับการแสดงออกของ *AmpB* ในทุกชุดการทดลอง (0, 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง) ด้วยการทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส ซึ่งเจลที่ใช้มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ใช้ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดความ

เข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab ดังรูปที่ 4.4 หลังจากการรันเจลและวัดความเข้มของ band พบว่า cDNA ที่ 0, 0.5 และ 3 ชั่วโมง มีความเข้มของ band ใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงเลือกใช้เวลาดังกล่าวสำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือต่อไป



ภาพที่ 4.4 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โดยกำหนดให้ M แทน wide range DNA ladders และ 0.5, 1, 3 และ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR จากไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในภาวะเครียดจากเกลือความเข้มข้น 2 โมลาร์ ส่วน 0 คือชุดควบคุมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียในภาวะปกติ โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 300 คู่เบสและใช้ *AprmpB* เป็นยีนควบคุมภายใน

#### 4.6.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ทั้งหมด 17 ยีนใน *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์

จากผลการทดลองพบว่า ยีน PCC7418\_1070 และ ยีน PCC7418\_0612 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียด 0 ชั่วโมง) หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ  $1.34 \pm 0.01$  และ  $3.32 \pm 0.49$  ตามลำดับ ในขณะที่ยีน PCC7418\_0892 และ ยีน PCC7418\_1355 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียด 0 ชั่วโมง) หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงโดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ  $1.73 \pm 0.01$  และ  $1.61 \pm 0.02$  ตามลำดับ



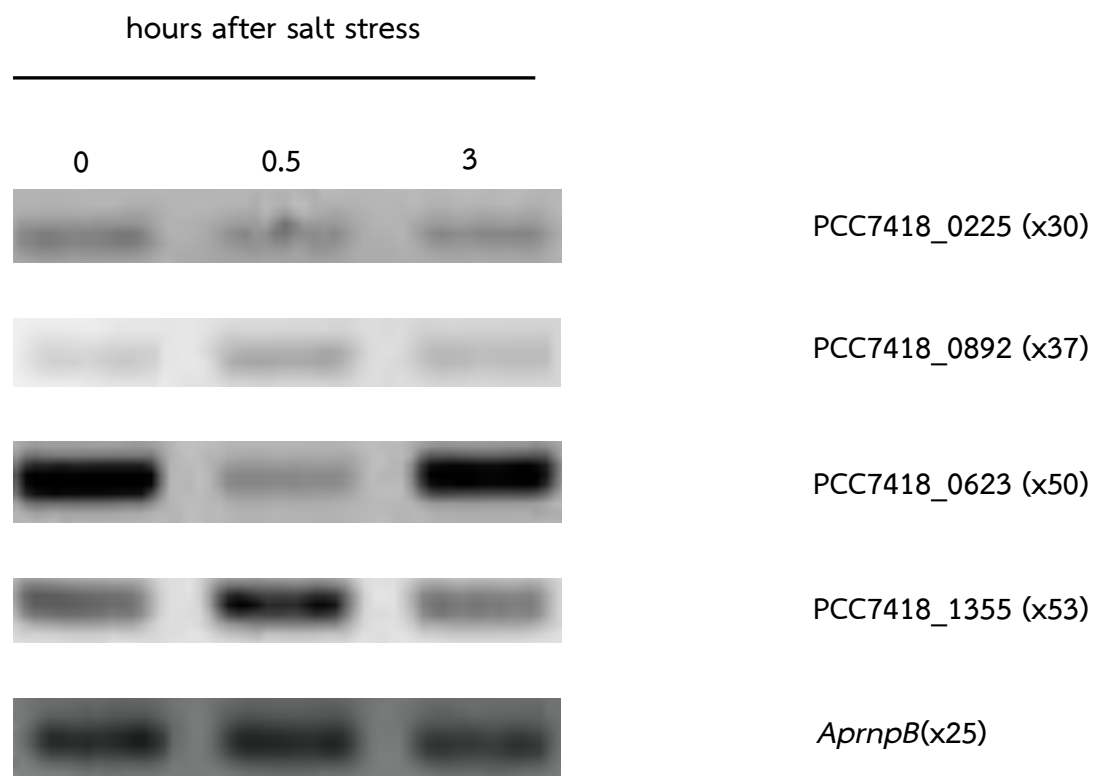
นอกจากนี้ยังพบว่ายีน PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1006, PCC7418\_0612, PCC7418\_0225 และ PCC7418\_0623 มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียด 0 ชั่วโมง) หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง โดยมีการแสดงออกลดลงประมาณ  $0.73 \pm 0.01$ ,  $0.57 \pm 0.01$ ,  $0.05 \pm 0.01$ ,  $0.29 \pm 0.08$ ,  $0.74 \pm 0.03$  และ  $0.13 \pm 0.04$  ตามลำดับ

มากไปกว่านั้นยังพบอีกว่ายีน PCC7418\_1116, PCC7418\_1006, PCC7418\_0225 และ PCC7418\_1355 มีการแสดงออกลดลง (down-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียด 0 ชั่วโมง) หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกลดลงประมาณ  $0.62 \pm 0.01$ ,  $0.11 \pm 0.01$ ,  $0.86 \pm 0.02$  และ  $0.86 \pm 0.01$

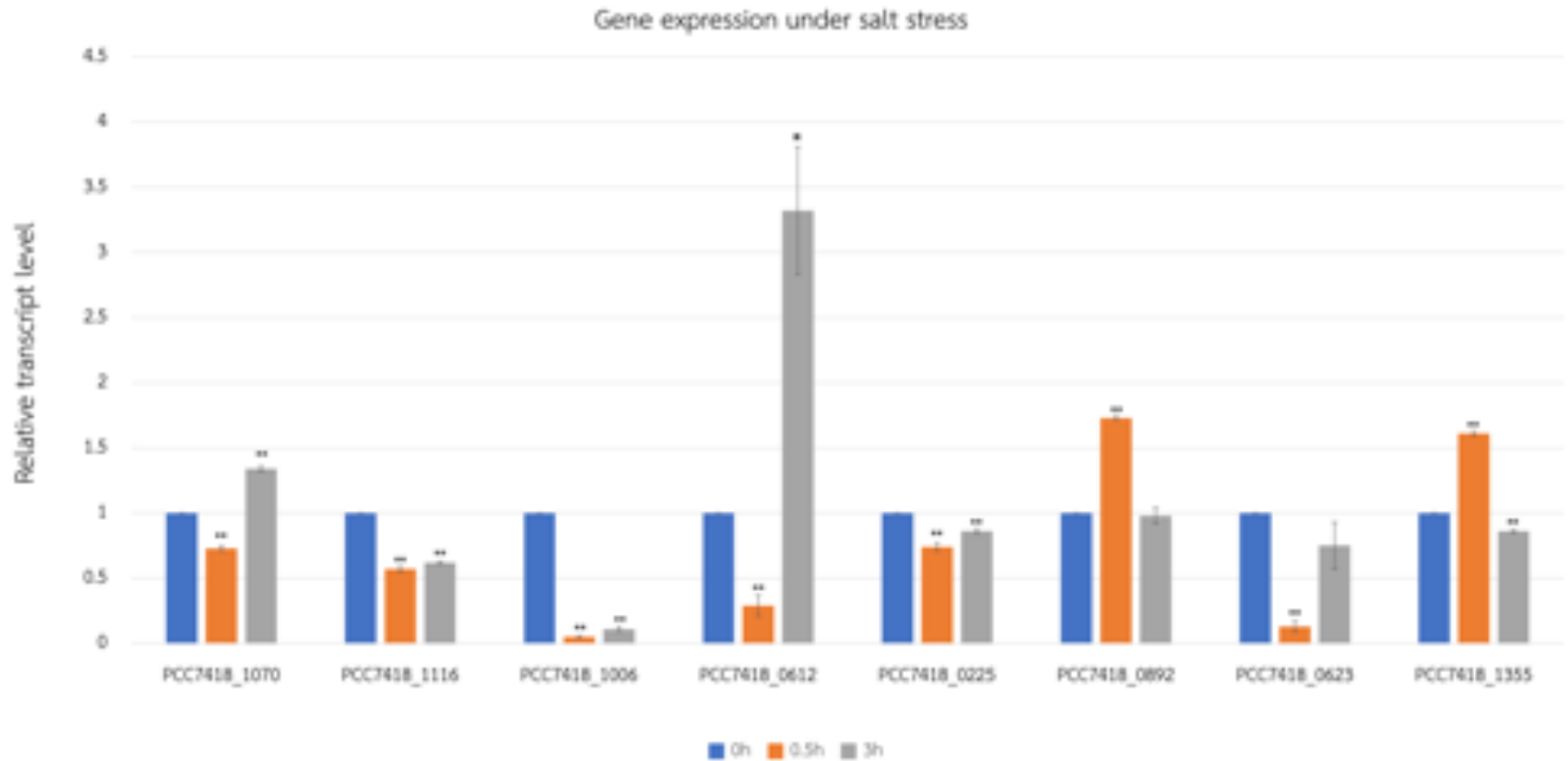
แต่ถึงอย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า มียีนอีกทั้งหมด 9 ยีนที่ไม่พบการแสดงออกของยีนโดยการทำให้ RT-PCR ได้แก่ยีน PCC7418\_0084, PCC7418\_0226, PCC7418\_1046, PCC7418\_1501, PCC7418\_1121, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0618 และ PCC7418\_1120 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากยีนทั้ง 9 ยีนนี้อาจไม่มีการแสดงออกหรือมีการแสดงออกที่น้อยมากภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

(ก)

hours after salt stress			
0	0.5	3	
			PCC7418_1070 (x35)
			PCC7418_1116 (x35)
			PCC7418_1006 (x35)
			PCC7418_0612 (x35)
			<i>AprnpB</i> (x25)



(ข)



ภาพที่ 4.5 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์

โดยมี *AprnpB* เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)

(ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

(ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image lab โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) และ \*,\*\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $\text{sig} \leq 0.05$  และ  $\text{sig} \leq 0.01$  ตามลำดับ

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ response regulator ใน *Halotheca* sp. PCC7418 พบว่า มียีนที่อยู่ในกลุ่มของ RR ทั้งหมด 44 ยีน โดยแบ่งมาศึกษาการแสดงออกทั้งหมด 17 ยีน ได้แก่ PCC7418\_0084, PCC7418\_0225, PCC7418\_0226, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0612, PCC7418\_0618, PCC7418\_0623, PCC7418\_0892, PCC7418\_1006, PCC7418\_1046, PCC7418\_1070, PCC7418\_1116, PCC7418\_1120, PCC7418\_1121, PCC7418\_1355, PCC7418\_1501 ซึ่งเมื่อนำไปศึกษา domain architecture พบว่า แต่ละยีนจะประกอบด้วยโดเมนหลักสองชนิด คือ receiver domain และ output domain แต่ทั้งนี้พบว่าแต่ละยีนจะมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโดเมนที่แตกต่างกัน

จากการทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่ม RR ทั้งหมด 17 ยีน ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์พบว่า ยีน PCC7418\_0612 มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 3 ชั่วโมง โดยมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ  $3.32 \pm 0.46$  เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวมีบทบาทมากที่สุดในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากเกลือ แต่ถึงอย่างไรก็ตามพบว่า ยีน PCC7418\_0612 มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ายีน PCC7418\_1070 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 3 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนที่ลดลง (down-regulated) เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาครึ่งชั่วโมงเช่นเดียวกัน

สำหรับยีน PCC7418\_0892 และ PCC7418\_1355 พบว่ามีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แต่เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าที่ 3 ชั่วโมงยีน PCC7418\_1355 มีระดับการแสดงออกที่ลดลง (down-regulated) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

นอกจากนี้พบว่ายีน PCC7418\_1116, PCC7418\_1006 และ PCC7418\_0225 มีระดับการแสดงออกที่ลดลง (down-regulated) อย่างมีนัยสำคัญที่เวลาครึ่งชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง ส่วนยีน PCC7418\_0623 มีระดับการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลาครึ่งชั่วโมง

อย่างไรก็ตามพบว่ามียีนอีก 9 ที่ไม่พบการแสดงออกของยีนโดยการทำ RT-PCR ได้แก่ยีน PCC7418\_0084, PCC7418\_0226, PCC7418\_1046, PCC7418\_1501, PCC7418\_1121, PCC7418\_0392, PCC7418\_0469, PCC7418\_0618 และ PCC7418\_1120 ซึ่งอาจเป็นเพราะยีนดังกล่าวไม่มีการแสดงออก หรือมีการแสดงออกที่น้อยมากภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

## เอกสารอ้างอิง

1. Gao, R., Mack, T. R., & Stock, A. M. (2007). "Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains." *Trends in biochemical sciences*. 32(5): 225-234.
2. Janssen, J., & Soule, T. (2016). "Gene expression of a two-component regulatory system associated with sunscreen biosynthesis in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC29133." *FEMS Microbiology Letter*. 363(2).
3. Lau, N. S., Matsui, M., & Abdullah, A. A. A. (2015). "Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products." *Biomedical research international*. 2015.
4. Lee, H., Noh, Y. & et al. (2021). "Photosynthetic pigment production and metabolic and lipidomic alterations in the marine cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC7338 under various salinity conditions." *Journal of Applied Phycology*. 33(1): 197-209.
5. Los, D. A., Zorina, A., Sinetova, M., Kryazhov, S., Mironov, K., & Zinchenko, V. V. (2010). "Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria." *Sensors*. 10: 2386-2415.
6. Mark, K. A., & Jean, H. (2006). "Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution." *Microbiology and molecular biology reviews*. 70(2): 427-509.

7. Rachedi, R., Foglino, M., & Latifi, A. (2020). "Stress Signaling in Cyanobacteria: A Mechanistic Overview." *Life*. 10: 312.
8. Schaller, E., Shiu, S. H., & Armitage, J. P. (2011). "Two-Component Systems and Their Co-Option for Eukaryotic Signal Transduction." *Current Biology*. 21(9): 320-330.
9. Song, Y., Fahs, A., Feldman, C., Shah, S., Gu, Y. & et al. (2013). "A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards." *Springer Plus*. 2:616.
10. Swapnil, P., & Ashwani, K. R. (2018). "Physiological responses to salt stress of salt-adapted and directly salt (NaCl and NaCl+Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mixture)-stressed cyanobacterium *Anabaena fertilissima*." *Protoplasma*. 255:963-976.
11. Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2014). "Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of Mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanotech halophytica*." *Applied and Environmental Microbiology*. 80(5): 1763-1769.
12. Wiltbank, L. B., & Kehoe, D. M. (2019). "Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors." *Nature Reviews Microbiology*. 17(1):37-50.

ภาคผนวก ก.  
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

สูตรอาหาร BG-11 ที่มีการเติม Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418  
ภายใต้ภาวะปกติ (0.5 โมลาร์ NaCl) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

NaNO <sub>3</sub>	1.500	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.004	กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075	กรัม
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036	กรัม
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.020	กรัม
EDTA disodium salt	0.001	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม

Trace element A5+Co

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.830	กรัม
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.810	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.220	กรัม
NaMoO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.390	กรัม
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079	กรัม
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.049	กรัม

Turk solution

NaCl	28.17	กรัม
KCl	0.67	กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6.92	กรัม
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5.50	กรัม
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.47	กรัม

สูตรอาหาร BG-11 ที่มีการเติม Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418  
ภายใต้ภาวะปกติ (2 โมลาร์ NaCl) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

NaNO <sub>3</sub>	0.750 กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.002 กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0375 กรัม
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.018 กรัม
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.010 กรัม
EDTA disodium salt	0.0005 กรัม
Citric acid	0.003 กรัม
Ferric ammonium citrate	0.003 กรัม

Trace element A5+Co

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.415 กรัม
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.905 กรัม
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.110 กรัม
NaMoO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.195 กรัม
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0395 กรัม
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0245 กรัม

Turk solution

NaCl	58.45 กรัม
KCl	0.335 กรัม
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.46 กรัม
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.75 กรัม
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.735 กรัม



## 10X Tris-Acetate-EDTA (TBE) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Tris base	48.4	กรัม
EDTA	3.72	กรัม
Acetic acid	11.4	กรัม

## 1.2% agarose gel

ผงอะกาโรส	0.48	กรัม
1X TAE buffer	40	มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสโดยอุ่นร้อน ที่ไว้ให้สารละลายเย็นลง แล้วเติมสี SYBR® Safe DNA gel stain ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน

## 0.1% DEPC water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

## ภาคผนวก ข.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halotheca* sp. PCC7418

## 1. PCC7418\_0084 (753 นิวคลีโอไทด์)

atgatgcctcgaatccttgattgatgatgatcccgccatttcggaattagttacgattaatccttgaatggcaggtacaccgtagaacct  
gcaaatgatggtattaagggtcaagccctcgagtagaactgcaacccgattaatcatgcttgacctgatgctacctcgctcgatggtct  
cactgatgccaacgcttacggcgtgatgatgcactgctgacattccgatcttgatggtgacggctttgggtcaaaactcaagacaaagtag  
aagggttaatgctggtgagatgactatctaccaaaacccttgaagtggaagaaatgtagcgcgagtcgccccttctccgtgcact  
gatcgtattcccaaagcagcaaacacagcgaaattctcaattacggcccctgaccctgttcccgaacggttcgaggcgatctggttg  
gtcaaacctggaagctgacctttagagttgaactcctgactgcttattgcaacgccatggacaaacggtatctcccagtgaatcctg  
aaggaggtggtggttatgatcccgatgatattgaaaccattcgggtgcatattcgccatctccgactaaactggaaccagaaccccg  
tcatcccatgtacatcaaacggttatggggctgggtactgttagagttaccagtggaaggagcatcaggaactgaaaactcagcagcct  
tagaagaacagacgtaa

## 2. PCC7418\_0225 (1212 นิวคลีโอไทด์)

atgtatgtagcctgcacgaactggatctccgtagttgtagagttgcttgaacgtagccaagctacaggacaactcctaattcaagctgct  
ctgcctttccccttctgatctgggtcgtcgcctcagaagatcattcctttggctactctcttgagtaacggtcaaatcacttatgctgtt  
gatggcaacctgagacagtagcaacgactacaagactatctccgtcgtatcagtgaggagacagtagtggaacgtttacaaaaaccgac  
aggggttccttacctcgcaattttccaagctacggcaagatccttaccgaaataactattatgggttctcctcgaacatcatgtttga  
cagccactcaaggaaagcaaatcttgaacatattgttcatgaaaccatgttgactattgagcctgcaacaagggttcttaggttcaga  
gtaacactgttgcagcctcaactaaccactcttgagattagtcacttttaacgcaggtgatgagggaactcaacagtggaagcaactt  
tctcttacgttacctctcagaacagtgccgttctcagaaaaatcatgaaactgaaacaagccctaacgcatcagcctatcggagtc  
tcgctgttcttcaaggtgaacttcttacgacgaattgctcgttatttgaacaaagatttactgacgattagccaagccctctaccgta  
cattcaacggggtggctgcaaatgcttgggaagaagaagcccttccctcctcaatcgattcagggagcttctgctaccactaagatggtt  
acattggtcaagaaaatgaagtcaaggatcagatagaatataattttaaagccaagggtatctcccagatcattgatgatccattgat  
gactgagtagattgctgcatcgagccgagcctagtgttctgctgcttagaactatccactggtctggggaacaactcagctacagctt  
gagaaacctcccacttaagccaagctccgatcattctgtcacgcaaaaaatcctgatccgatccgcttaactcgtgctcagcttttag  
gagtcactgagatttagtggcccgattcaagactcagattgcttcatcttaagaactcatctgaaccccaagatcaacaacatcaa  
ttccttga

### 3. PCC7418\_0226 (372 นิวคลีโอไทด์)

atgagtacgggttttagtggtagaatgacgtgacccagagacaaatgatttccgatttgcctcaagagagtggttaaacgcatcagtgatt  
 agtgtgggtgatggcgtggaggcttagagcaaatcaaacgcaacccccgatatcgtgttttagatattgtgatgcctcgcatgaatggtt  
 atgaagttgccgtcaaattaagactgatcccaacaccgaaaatgtcccagtaaatcatgtgttcttctaaaggagaagaatttgataaat  
 tgggggatgaaacaaggagcagatgcttatattgctaagcctttgaacctaccgaactcattggtacaattaagcaattgctgaggggata  
 g

### 4. PCC7418\_0392 (702 นิวคลีโอไทด์)

atgcaaatcttactggcgtgatgaaacgggagttaacaacgcctctgtctcgggtttgacacaagaagggtatcaggttgatgtggcaaat  
 aatggagtcgttgggaagaattggcaacaacaataattatcattattgatttggattggtgatccagaaaaatcagggttagagttat  
 gccgatcgtcgcgatcgcggaatcaactccagtttttttaacagctaaagatacggtagatgatcagtgaggcgggttagatgtg  
 gtgcagatgactacattgtcaagcccttgagttaagagaatttctcgcagagtcgcgctttaatgcgacgttccgcttgaactccctgt  
 cagttctcgtcctcaagtttctgattagaatttgaccctgataatcaactggcttatcgcaatggacgaaccattgaactctcagaaaaaga  
 gggaaaaacttttaagatattttatgcaatttcccagcaactgtaaacctcaacaaattatcaacatctgtggggagaagagagtag  
 ccagcagtaatttttagcagcttagtgctttattacgacgtaaaatcgaagttcctggtgaaattaccttgattcatcaggttatggaaa  
 aggctaccgcttcggagaaagatcagatccacaagagggaaaccaattaa

### 5. PCC7418\_0469 (1362 นิวคลีโอไทด์)

atgatgacaaaagatcaattaaatgggcaacagcaacaaaagactgtggacaaaactcagaaatcgagagaaaacttttttagagtta  
 gaggaactcctagaagaaattgatcttctagtcaacaacaatttacgggtcgtctgaccctaaaaacccagacagacagcaatggcaa  
 ctttattttgggatgggtcattgctgtgggcaagtgggggagaacatccccgtcgtcgtggcgcagacagttggctcatgtttgtgagcagg  
 atggtttaaaaggacattattcagaaggacatttgcgagaaggagatcattatgagtggtggatttccattgttattagccctgcacaaacg  
 taaaatttgagttcgaacaagtgagaaaagtattggtgggatgattactgagattctgtttgatctcaatcatcagggaaattgccctgtg  
 accagcaaggaagcctatcctgatgaaccgaaccactgtggcaacaagtcttactcgaactggaaagcaggggttcgtccttctcaag  
 aatggttgcctccttagttgggggtcgaacgcaagcctgtttggacaaagctcagaaaagttgggtcagtgccgagaaatggggtta  
 actcatgtttctcccaatcaagccccgagcttctcaatttaaaggaattggctgctcaaaactcagaaaaagttatgggaatttagtcaa  
 actggtgacgggtgatcggacgttagagatttatcgggtgatgaaaatgagtcctctgaaactggcgcgatcgtgcaaccttacattcg  
 ccaagatctgattaccttagcagcgtatgattaccaccgccccccagaaaaaccgttaaaaaacaacaattacaacggcgtg  
 ctgaagatcaatcggcaacaactcatctcaattcccagtcagaaaaagagggcctcaactcaacgtcctctgttctttgtggacgat  
 agtgagcaaaagtcgtaataataatgaataatgtggtcacaaaaggggtctacactttattggcatcggcactcggtagaggcaattacgat  
 ttactggaaaaacaaccgagttattttctagacttaattgatgcccaatgtcaacggttacgaactctgtagccaaattcggaaaattc  
 tgtgtgaaagatgttctgtggtcattgtgactgggaatgatgggattgtggatcggatcgcagctaaaggtgtcgggtgcaacaactttatct  
 cgaaccaattgatgtccgaagttctaaccttagcattgagtagacacacaatcggcttcagcaaaaataa

#### 6. PCC7418\_0612 (702นิวคลีโอไทด์)

atgaaaaaataactggttagatgatgatctggtacttagaaaagcactaacgctttatctactaaacgcaactattagtcaagaagc  
 tggatcaggacaagaaggttaaacaatacagagagtttcgccagatctgattttctgatggtgatccagatatggatgggttagc  
 ttctgtcgtgaagttcgcagcgcagtgacggcaactcttgccctttatcttaaccgtcagaacccatctaacgatcaagaaaaagtt  
 caggcggttggtgctgacgactatctactaaaccgatcaaacctgaagaactcaatctcaagattcaacttcagttggaacgagcagagc  
 gcattaatgctgagatcgtccgtcttttacaactaggaacacaggctcagacttgactccgaggaggtgaacccccaaaacttaactc  
 cagtgccttacccttgactcgccaccagagctttacctctcactccctcagaagaaagagtttctggaagtgattcaaggactgaca  
 ataaagaaattagccagcatctgcatcttagccccgaacggttcaaacctatttgagcaatatttgagcaagttgaacctaaagaatcg  
 gactcaactcagttatttgcctatcaaaagggtatcaacctcacagtcagatcaattccagcttaaaagtaa

#### 7. PCC7418\_0618(1260นิวคลีโอไทด์)

atggaacatcaattcttaagtagcatcatggcgtatgctcaccgagaccagacgggatgtagaaattcaaaattgagcatcaacaac  
 agtcttggttctttatcttctgtaggaggtttttggcagggaggtgaacaggaacagcgaagaattaccgacaactggttaagca  
 aatgcctcaagatgagtgaaactgctacaactacgagaagaggtcaattggaatgctgaatcagcactatgattttattggttatctt  
 ccaacaagaaaaataagcctagagcagctgattgccatcaaaaatgacatcatcctcgaagtgcgtttgatctttgcaagtggatgag  
 caacaaatcaacagaaccatacctatggtcaaacagcagctttattggcaatggcatgaaaattatgcccgaaaaactatgcccc  
 attgcccagagaagtagctaaatcttctgaagaattagtggaacggcaaaacaaattggcagcgttgcaaaatgcaaacctaaattctt  
 gctctccaatcaagcccctgcatgattgatcctgaaaaattcgagcaagcactgctgcaaaaccttcaaaactgacgaggtgg  
 gactgaaaacgatcgtcgcgagaaattgccatttctaccaagtgcgatctgtccccgtcaccaaagcccttgggaatactatcagcaa  
 ggggtggtgcaatggcaggagcttcaggatctgactgggaaagcatcgtccgaaaaggaagcctcagttgccaaccgaagaaactcag  
 ggaaagagaagtatttgattgctgtgtgatgacagtgtaacagtcacgaaaccttaaaagcaattgtccaagaaaaaggacattcttt  
 atgggcattaatgatccgttacgggcaactgcaacttggctcaaagccaaccagatttaatttttagatttaacatgccaataccaat  
 ggctatgaaattgtacgcaactgcgtcgcgtttctagcttaagaaattccaatcgttattttaacgggaaaagacggcttgattgatcgg  
 tgcgggcaaaaatggctggtgcaactcaatacgtgagcaagccagtcaggggtcaaatcattctcgaagtaaggaataacctgcca  
 tgttttgagcaatcaagaatccgaggctgttttgcctcttctgttcatcctcgggtcaagtcgta

#### 8. PCC7418\_0623 (1353 นิวคลีโอไทด์)

atgcacgaacgatttgaaaaacgtctaactttaaccgatttttcgccatctaatttttatcaatcacaataattacaggaaaaatataa  
 gtttcagcttacaagaagaagcatggagcttttttttattaggaatttaactgaggcaagtgccggtcttatcccttacggcagtgccg  
 gagacaattttatgagcaacctggaaattaccaatttgattatttagataggaatgcagaatggtgggactgtactgagttgagaacgct  
 tagtgagaataacagctgaaaatcgaacaagtagcagccattgtcaatggtatctcaaagaggtttatttgatggtgtacagcctttgaa  
 gccccgatttacgaatatctgggttacctcaaagttgattcactctcagttaacgggaattggggatagctgaaagttagaagtgcaag  
 aagggttaccctgatccttattaccgtttaccttatagcctgctcccaaatattataagtttacaagaacaacttatcaaacctggaca

aaatggattaaattggggtatctcaaatttctccaaatcaagccccttttactcgaacctaacaacttcaaaaacgagtatctcggaa  
 agtttatcaaaatggaagaaaggcttgaaggaacacctcttgagagatttagccttcaagttcaaaaaaatagtgacttttttagcat  
 tgcttctgccatttctcttattatcaagaagggttaacttttaatacaaatcaagattatccggttacaattctgataaacagaaatatt  
 cgaccttaaccgatcagaaaaaccacaagcagagctgtatttttgcgattgattccagtcgtaaaaatcaatctttattcagcgcgatc  
 ggcacaacaaggatatcaattgaagcaatgagtgatggtctgaatgcgcttcagaaaattggtcataatcccttgactcatccaaaat  
 catcttggcagttatgagatggcaattattaagccagaagaattttgtcagattggtcgccttgaattactcaaacctgtaccgattata  
 tttatagtaaagctctcttctcatcaagagattcaagaagttcttgatgctggtgtaaccaattaatgaatcaaacgatttgacaccg  
 agttctgtaattcaattctgaaaaataaccagcaatccaatcaaatggaagaaatcagatcagaaatgaaagtaaagcaaccttggaa  
 acaagcaattctcccacttcccatgatgaataaaacattttataagtga

#### 9. PCC7418\_0892 (555 นิวคลีโอไทด์)

atgcaaaaaatactggtcattgatgacagcagaatgatcagaatgagctcagagatatggtccttctggcaatgttcaaattattgaagc  
 ccgagatggaagaaaggcttgaacttaattcactcggaaacgaccgagttgattatcttagattttctggtcctaaaaaagtggtggga  
 agtgatcaagatatacaaaatactcccgatttacaagcattccttgggttaatgtcaggacgaaaaggggaagtcactgaaaaaattt  
 ccgaacccttgaacattttgcttttgggaaaaccggttgaacaggaacaactggtgaaagcgattaaagaagcaaggggaaggcaac  
 tcgtaaagcgaaggcaactgctcccgaagaagcagctgcatctagccaagggggagaagatggtgctagcctgaaagcagaagtggtc  
 agttgaaagaacaagtgcaaacatgcaaggtcaaattgatcaattgcgtaacaatgaatcaattagtttaacttattaagaagaagtg  
 tggctaa

#### 10. PCC7418\_1006 (1143 นิวคลีโอไทด์)

atggtcactatcaccacctatcctcttgagacacttcgaacaaaatcaatgaatattctcaagaaaaagcaactggcaatctcacaatc  
 cgcaaccatgaaatttactcggcaaaaggttttctacacggtcgttactttacataaaagacgaattgcccagtgctgctttagc  
 cgagtttgcgccaactggtatattaattggcccagagaactaaattgctctccagaccaaccttgggaatatcaattactctatcaagg  
 cattagtaaaaagcgtctcaatggtggacaagcgaactcgcattacgaatggtgctgaagaatttctttgatttagtcagtcagaaga  
 aataattacagaatgggaaacacgagggagaaggcagctggttctgtagggttagctttatcggttttagaaattgaaggtctgattga  
 aaccgtttctgaaaaacaacagcttgggttgataataatttagcggaaatgaatggcagtttagtcccaccttagcggcaaacgcacaac  
 tcaaaaataatagtggtcttggcaaatatctcaatgggaagtttacgcttgggatctgtctattgctctcaataaatcttctcgtatgtgac  
 aaaagcattgattaattcaaagaaaagcagtaattgaatttcgagaagtgcgacttagcagttcctagttttatttctattgctcaagat  
 ccgaatcaagcgaacgattcctcaaagcagaaaaagattaattgcttattgatgatagtcaggattggtctcatagatgaaaaaact  
 gcttctcctttagggtatgatattattacaattactgagccaatgcacggttttccgacttagttgatcaacaacctgatctcatttcttag  
 acttaatgatccgaaatgtaaaggttacagcgtctgcaagttttgcgggaaacagagtcgtttcaagagaccccgattattatcttgaccg  
 ctcaaagtgagcaatcgtatcgccacgggcaaaaatggcaggagcaacggacttttaggaaaaccgccaacccggaagagtgatt  
 gaagtagtacaacaatataccaatcatagttaa

### 11. PCC7418\_1046 (684 นิวคลีโอไทด์)

atgtctatgtctcagccgtcagtgtagtcattgccaatgacccagagttgtcgcaaacctcaatctagatttaaccaacgagggttatacc  
 gttactgttctagcaataaccgaccaagctaaaccacagtttgaagaattacaacccgcgttagtggtcattgatcaagcccattgggaga  
 agaagggttaacggtatcgcgtcagttacggggacataataaccccgttctgattgtgctattatgaaggaagatactctagaagatcgaa  
 ccgcttgttagaagctggggcggatgactatatgctacttctaccagcgcgatcggtttttagagttagttcaactgtatctcaacccgc  
 tacaacagtcctgaacaactccaatttagcgatttagtctgattatcccatcgcgtgctaaccgtaatgggcgcaaaattgagttaa  
 ccgtcaaagagtttgaacttctcaaatattgatgtctcaccaggggaagtgtgactcgcgagcaaatccttgataatgtctgggaagat  
 aatcatgggggagaatcaaacgtgattgaagttatattcgtatctacgcctcaaaatcgaacagggggatataaacgactgattcaaa  
 ccgtcgcggtgtgggttatgtcttacgggaatcatga

### 12. PCC7418\_1070 (828 นิวคลีโอไทด์)

ttgtctgctcaactatttattgtttattcaccatcagccctgatctcgccaaatctgtcaaagagattttgcgggataaaccttatcatttgcg  
 tgttttgactcatcagaagccgttatcggttatattctggagcaaacctgagcagatcgattgttactgttgcacagggcaggggatagaa  
 gaagtgctcattgtttacgcaatgaaggtaaacttttacctcgggtcattttaaccacagagggcggacaatcaagacttagttatcacct  
 gccaaacctatcttccacggaaacactggctaaaattccgaccgtaattgagggcgcgatcgcgatttctccaactactcccga  
 gctaaaccgcaatttgagattgaacagattaatgaattttaacaattaagcaacatcgtttaacagaaaaattacaagagcgcgactgggat  
 acaaaggagtgactataaacgaaatccgcaagatttttctgttacctcacctctgaggaaaaaaggaaatctcagaattaacgga  
 agaataaccgctcattcttttagactattttcaggtgcaacagaagcaattccaaaattgatcagtttctaccgctgctttttctgac  
 ctttctgtctcacaatcatggaaattcacatggatttaattgatcaattttctcaacaattaaaactagaaggtcgcagtgatgaaattttgt  
 tagattatcgctcagtttaattgatattattgctcatctgtgcgaaatgatcgcggttcgattccgacaaaagttcggaaataa

### 13. PCC7418\_1116 (738 นิวคลีโอไทด์)

gtggaaaaccatacagaaaaattcttgggtcagatgatgaagcagccgttcgtcattttacaacccgattgtcaatggtgggctatga  
 agttgtgattgctgctgatggagaacaggctttaaaggtatttctgcggaacagcctgacttgggttttagatgtcatgatgccaatggtg  
 atggttacttcacctgcaaaaggttaagaaaagagtcgaatgttccattattatgctgaccgcttaggtgatgttgcgatcgaattactgg  
 gttacaaattggggccgatgactatttagtgaagcccttctacccaaagaattagaagcaagaattcataggttaagacggctgaag  
 aaaaacagcagggcagatgattcccgttctgggggatgcaagtgggaaaattacaaatcgacaccaataaacgacgagtttatatgggg  
 aatgagttagtcctttaaaccggtcgcgagtataattttagagttgcttaccattctggggagtccatttccgcaccgaaatcctga  
 agcggatttggggatccaccgagcgtcatggcatttgcgctagtggtgattcatgtgtcgcggttgcgaggcaaaatcgaagcagat  
 ccgaaaaatccagaattaattattaccgaacgagggacgggtatttattcaacgggcaagagtcgtgaataatgctcagcgtgttga

#### 14. PCC7418\_1120 (1155 นิวคลีโอไทด์)

atggtagaacctttcttctgttttagacgcaaccacctcagtggtcaaggcgtgaaagaaatcgaaaaaagaactatctggacaac  
 tcaccatccgttttttaattctcattctacaggttgccgagtgatatcggacgcggaaaagttcattacgccagtagtttagtggttaacca  
 agagcgaattaattttattgtctcattatctctgatctcaaccgtcatccgatgcaagatcaggaacaggaatatgattatctttgtcct  
 ttggcggctggaaaaaattctctgcaagacctagacaagtcactataccctaaccaagaagcattaattcattgtttgctcacc  
 ctgtgcaattggaattgagagagcgtggggctagatccgatttggttcggcttccgtgaagaagattgcttattcggctcgcgaagtt  
 ttgggggtggatgaagctacgagaagggattcatctccttggcgcgtgggaacagagcaattaaatggatttacaacgcgatcgcgca  
 aaacagttatctcaacagagcaatattaattctctctggtcagttaaaaccctagcacaagctctaactgcatttccgaatctttacgc  
 tctggctcaggaatttaaggtgatgttctcactctgcccaagagttgcaaccctacgcccgaacaaaacaactgcaaatcaagccttac  
 gaagaacaaaaagcaccaaacgggagaaacaccagtggttgcattgatgatagtcatacagtgcaacggaatggaagtaacccta  
 gaaaccgcaggttacgaagtgatttcttaactgaaccaggtcgcgccctgacagccctgctcgaagaaaccgttctaatttaatgga  
 tattaccatgcccgatatgaatggctatgatctctccgaatgttacgaaaatccgcaccttagcgggaagttccattgtcatgctaacggg  
 ggcgcatgggggttggtgatcgattacgggcgcaatgggtgggagccaatgattacattaccaaaccttcaatcctcaccaactgattcaac  
 tggttcaagcattaaccgtcaacctcaactgtggagcaataa

#### 15. PCC7418\_1121(372 นิวคลีโอไทด์)

atgacaactgttttaatcgttgaagatggtcacgccgatcaaaaattaatggtttccctgctagaacaatcaggatggaagtcgttgcgaa  
 aaattcagtggaagaagcagaaagctggttactcaagaaaaacatgatcctgatttaattggtcgcgatattggtgatcctggttctagcgg  
 tttagaattatgctgcgaaattagagcaaatgagacattaaaaaatattccgattgtttctgttcttaaaaaataagaatttgaccaattt  
 tgggcgctgcgtcaggggggaaatgcctatctgacaaaaccttttccctaagaattttgaatactgctgctgaacaattagcgtcctga

#### 16. PCC7418\_1355. (663 นิวคลีโอไทด์)

Atgaaagataaccagtcgataacgaaacaaaaaattacttctcgttgatgatcccaatttgatcctattagtagacaagactatttga  
 atttcaagggtatcaagtcacaactgctgataacggacgagatgactggaaatcttagaacatgaagttccagatctcattattgcgata  
 ttatgatgccagaaatggatggctatgaattggggaagcaggttcgccaagatagccgaattagttggattcccgttctgttttatctgctaa  
 aggacaaacgacggatcgcgctcaaaggctaaatactgggctgatgtttatttgggtaaaccttttgaaccagaagagtttagctcagc  
 tggaaatcttccctcaagcaagcccaacgggtgatcgataaaaagtggggtagtggatggggcgcaacaaggtgaaaaatccatgtccc  
 tgcggatgtagcgtgactcggacggaacaaaagttgtccagttgttctcaaggattagccaatcgcgagattgcggaaaaactcaatg  
 ttatgtagcgcacgggttagtctcatgtttccaatatgttgaataaaaactcgtcttataatcggacagaattagctcgttgggagattcaaa  
 accgtctagcgcattag





## ภาคผนวก ค.

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA ใน  
*Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

ชุดทดลอง	ความเข้มข้นของ RNA (ng/ $\mu$ l)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
0 hour	779.8	19.494	1.88
0.5 hour	556.7	13.918	1.92
1 hour	751.4	18.786	1.96
3 hour	690.8	17.271	2.14
6 hour	716.0	17.900	1.91

ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band ที่ได้จากการทำ RT-PCR ใน  
*Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

*AprnpB* (internal control)

Treatment	0 hr.	0.5 hr.	3 hr.
Run 1	1.00	1.48	1.03
Run 2	1.00	1.3	0.89
Run 3	1.00	0.93	0.82
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>1.24</b>	<b>0.91</b>
<b>SEM</b>	<b>0</b>	<b>0.28</b>	<b>0.11</b>

## 1070

Treatment	0 hr.	0.5 hr.	3 hr.
Run 1	1.00	0.73	1.33
Run 2	1.00	0.72	1.34
Run 3	1.00	0.75	1.36
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.73</b>	<b>1.34</b>
<b>SEM</b>	<b>0</b>	<b>0.015</b>	<b>0.015</b>

1116

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	0.58	0.64
Run 2	1	0.59	0.62
Run 3	1	0.57	0.62
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.57</b>	<b>0.62</b>
SEM	0	0.01	0.012

1006

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	0.05	0.11
Run 2	1	0.05	0.09
Run 3	1	0.06	0.12
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.053</b>	<b>0.11</b>
SEM	0	0.006	0.015

0612

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	0.2	2.86
Run 2	1	0.31	3.26
Run 3	1	0.36	3.84
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.29</b>	<b>3.32</b>
SEM	0	0.082	0.49

0225

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	0.72	0.87
Run 2	1	0.72	0.84
Run 3	1	0.77	0.88
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.74</b>	<b>0.86333333</b>
SEM	0	0.029	0.021

*0892*

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	1.73	0.96
Run 2	1	1.75	1.05
Run 3	1	1.72	0.94
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>1.73</b>	<b>0.98</b>
<b>SEM</b>	<b>0</b>	<b>0.015</b>	<b>0.058</b>

*0623*

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	0.08	0.54
Run 2	1	0.15	0.84
Run 3	1	0.16	0.86
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>0.13</b>	<b>0.75</b>
<b>SEM</b>	<b>0</b>	<b>0.043</b>	<b>0.18</b>

*1355*

Treatment	0 h.	0.5 h.	3 h.
Run 1	1	1.62	0.86
Run 2	1	1.62	0.87
Run 3	1	1.58	0.86
<b>Average</b>	<b>1</b>	<b>1.61</b>	<b>0.86</b>
<b>SEM</b>	<b>0</b>	<b>0.023</b>	<b>0.006</b>

*0084*

No specific bands detected

*0226*

No specific bands detected

*1046*

No specific bands detected

**1501**

No specific bands detected

**1121**

No specific bands detected

**0392**

No specific bands detected

**0469**

No specific bands detected

**0618**

No specific bands detected

**1120**

No specific bands detected

## ภาคผนวก ง.

องค์ประกอบของ domain architectures ของยีนในกลุ่ม RR ใน *Halothece* sp. PCC7418

## 1. PCC7418\_0084



มีความยาวของกรดอะมิโน 250 เรซิดิวส์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver โดเมน

สีแดง แสดงถึง c-terminal transcriptional regulatory protein

## 2. PCC7418\_0225



มีความยาวของกรดอะมิโน 403 เรซิดิวส์ โดย

สีเขียว แสดงถึง Domain of unknown function (DUF4388)

## 3. PCC7418\_0226



มีความยาวของกรดอะมิโน 123 เรซิดิวส์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

## 4. PCC7418\_0392



มีความยาวของกรดอะมิโน 233 เรซิดิวส์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

สีแดง แสดงถึง c-terminal transcriptional regulatory protein

## 5. PCC7418\_0469



มีความยาวของกรดอะมิโน 453 เรซิดิวซ์ โดย  
 สีฟ้า แสดงถึง low complexity region  
 สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

## 6. PCC7418\_0612



มีความยาวของกรดอะมิโน 453 เรซิดิวซ์ โดย  
 สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain  
 สีฟ้า แสดงถึง low complexity region  
 สีแดง แสดงถึง bacterial regulatory protein, luxR family  
 สีเทา แสดงถึง low complexity region

## 7. PCC7418\_0618



มีความยาวของกรดอะมิโน 419 เรซิดิวซ์ โดย  
 สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain  
 สีฟ้า แสดงถึง low complexity region

## 8. PCC7418\_0623

มีความยาวของกรดอะมิโน 450 เรซิดิวซ์  
 แต่ไม่ปรากฏ domain architectures ใน Pfam (<http://pfam.xfam.org>)

## 9. PCC7418\_0892



มีความยาวของกรดอะมิโน 184 เรซิดิวซ์  
 สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain  
 สีฟ้า แสดงถึง low complexity region

## 10. PCC7418\_1006



มีความยาวของกรดอะมิโน 380 เรซิดิวซ์

สีฟ้า แสดงถึง low complexity region

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

## 11. PCC7418\_1046



มีความยาวของกรดอะมิโน 227 เรซิดิวซ์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

สีแดง แสดงถึง c-terminal transcriptional regulatory protein

## 12. PCC7418\_1070



มีความยาวของกรดอะมิโน 275 เรซิดิวซ์ โดย

สีส้ม แสดงถึง sig\_p

สีเขียว แสดงถึง KaiA c-terminal domain

## 13. PCC7418\_1116



มีความยาวของกรดอะมิโน 245 เรซิดิวซ์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

สีแดง แสดงถึง c-terminal transcriptional regulatory protein

## 14. PCC7418\_1120



มีความยาวของกรดอะมิโน 384 เรซิดิวซ์

สีฟ้า แสดงถึง low complexity region

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

## 15. PCC7418\_1121



มีความยาวของกรดอะมิโน 123 เรซิดิวซ์

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

## 16. PCC7418\_1355



มีความยาวของกรดอะมิโน 220 เรซิดิวซ์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain

สีแดง แสดงถึง bacterial regulatory protein, luxR family

## 17. PCC7418\_1501



มีความยาวของกรดอะมิโน 430 เรซิดิวซ์ โดย

สีเขียว แสดงถึง response regulator receiver domain