



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ เมแทบอลิซึมของ Acyl-lipid ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน *Synechococcus elongatus* PCC7942

Acyl-lipid metabolism under salt stress condition in *Synechococcus elongatus* PCC7942

ชื่อนิสิต นางสาวศศิธร อุปพันธ์

เลขประจำตัว

5932353023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

เมแทบอลิซึมของ Acyl-lipid ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน
Synechococcus elongatus PCC7942

โดย

นางสาวศศิธร อุปพันธ์ รหัสบัณฑิต 5932353023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา

ปีการศึกษา

2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทรประทีป นатар)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมพูนิกข์ กาญจนพังคะ)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ชื่อโครงการ

เมแทบอลิซึมของ Acyl-lipid ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน *Synechococcus elongatus* PCC7942

Acyl-lipid metabolism under salt stress condition in *Synechococcus elongatus* PCC7942

นิสิตในโครงการ

นางสาวศศิธร อุปพันธ์

รหัสประจำตัวนิสิต 5932353023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ เมแทบอลิซึมของ Acyl-lipid ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือใน
Synechococcus elongatus PCC7942
นิสิตผู้เสนอโครงการ นางสาวศศิธร อุปพันธ์ รหัสประจำตัวนิสิต 5932353023
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

จุลสาหร่าย (Microalgae) เป็นหนึ่งในแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่สำคัญเพื่อใช้ในการผลิต acyl-lipid ซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลอีกด้วย ในกระบวนการสังเคราะห์ acyl-lipid นั้นมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมากมายหลากหลายชนิดโดยหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการดังกล่าวคือ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) โดยในกระบวนการแรกของการสังเคราะห์ acyl-lipid เริ่มในส่วนพลาสติด ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากในส่วนดังกล่าวจะอยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid (FFA)) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ triacylglycerol (TAG) และเก็บสะสมอยู่ในไซโทซอล งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอดจาก Atikij และคณะ (2019) ที่ได้มีการสร้างสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ให้มีการแสดงออกเกิน (overexpression) ของเอนไซม์ MAT เพื่อส่งเสริมกระบวนการสังเคราะห์ acyl-lipid ให้มากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สายพันธุ์ที่แสดงออกเกินของเอนไซม์ MAT มาเลี้ยงในสภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และตรวจสอบเชิงสรีรวิทยา รวมทั้งการแสดงออกของเอนไซม์ MAT พบว่า ในส่วนของการเจริญเติบโต ค่าปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl มีค่าสูงกว่าในเกลือชนิด KCl และที่ความเข้มข้นของเกลือเป็น 0.3 M และทำการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันนั้น สูงกว่าการเลี้ยงที่ 0.35 M เป็นเวลา 7 วัน แต่อย่างไรก็ตามค่าการเจริญและปริมาณสารสีที่ได้ยังคงต่ำกว่า ภายใต้การเลี้ยงที่สภาวะปกติ ต่อมาในส่วนของขนาดความยาวของเซลล์พบว่าภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิด NaCl 0.3 M เป็นเวลา 5 วันให้ค่าของขนาดความยาวที่สูงที่สุดโดยสูงกว่าการเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติประมาณ 2.5 เท่า และในส่วนของแสดงออกของเอนไซม์ MAT นั้นสามารถพบการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือที่ความเข้มข้น 0.3 M โดยพบการแสดงออกในเกลือชนิด NaCl สูงกว่าเกลือชนิด KCl แต่การแสดงออกภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือของเอนไซม์ MAT ดังกล่าวยังคงต่ำกว่าที่สภาวะปกติ จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสภาวะในการเลี้ยงเช่น ชนิดของเกลือ ความเข้มข้นของเกลือ และระยะเวลาในการเลี้ยงที่แตกต่างกันส่งผลต่อสรีรวิทยาและการแสดงออกเอนไซม์ MAT ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ acyl-lipid ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้สภาวะที่ได้ทำการทดลองอาจยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองต่อกระบวนการสังเคราะห์ acyl-lipid จึงควรจะต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

Project titer Acyl-lipid metabolism under salt stress condition in
Synechococcus elongatus PCC7942

Investigator Miss Sasithorn Uppaphan student ID 5932353023

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

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Microalgae are one of important bioresources for production of acyl-lipid in which valuable nutritional ingredients in biotechnological industries and as precursors for biodiesel production. Acyl-lipid production in microalgae involved in many enzymes. One of the important enzymes is malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT). The first step in acyl-lipid biosynthesis occurs in plastid and product from this step is in free fatty acid (FFA) form and then turns to accumulate as triacylglycerols (TAGs) in cytosol. This study further expands from the previous work by Atikij (2019) that generated the strain overexpressing MAT in *Synechococcus elongatus* PCC7942 for promoting acyl-lipid metabolism. Here, we cultured the overexpressed strain under salt-stress conditions, sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) and examined the physiology as well as protein expression level of MAT. The results showed that overexpressed cells had higher growth and retained pigments than control cells under salt-stress condition. In terms of cell length, we found that the overexpressed cells cultured under salt stress (0.3 M NaCl) for 5 days exhibited the highest cell length, up to 2.5 times compared with normal conditions. We could detect the expression of MAT under shocking condition (0.3 M salts). Moreover, MAT expression under NaCl stress was higher than KCl stress; however, it is lower than normal condition. This study revealed that acyl-lipid metabolism in cyanobacteria depends on culture conditions, such as type of salt, salt concentrations and incubation times. These physical parameters affect the physiology and expression of MAT. However, the condition in this study may not suitable for acyl-lipid metabolism. So, the optimization of suitable condition will be required for further study.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้คำแนะนำและคำปรึกษา ทั้งใน ด้านการวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง และการอภิปรายผลการทดลอง รวมถึงแก้ไขข้อบกพร่อง ต่างๆ มาโดยตลอด อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็น อย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ในรายวิชาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ เครื่องมือต่างๆ ตลอดโครงการ

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องวิจัย 1904/17 ได้แก่ พี่มุก พี่บุ้ม พี่คริส พี่อู๋ม พี่เกมส์ และพี่ๆ ห้องวิจัยอื่นๆ ใน ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำ และคำปรึกษา ตลอดจนถ่ายทอดเทคนิค วิธีการทดลองอันเป็น ประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้ง โครงการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 43 ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษา ระหว่างการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ได้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง	9
3.1 การเลี้ยง <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 ภายใต้สภาวะปกติ	9
3.2 การเลี้ยงเซลล์ <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ	10
3.3 การสังเกตรูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	11
3.4 การวิเคราะห์ western blotting	11
3.5 แผนผังการดำเนินการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
4.1 ไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 ภายหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ	15
4.2 การเจริญและปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 ภายหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ	16
4.3 ขนาดความยาวและลักษณะของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	20
4.4 ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) ในไซยาโนแบคทีเรียหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	23
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล	25
เอกสารอ้างอิง	29

ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำ SDS-PAGE	34
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานโปรตีนสำหรับวัดความเข้มข้นของโปรตีนในวิธี แบริดฟอร์ด	36
ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำเวสเทิร์น บลอททิง	38

สารบัญรูปภาพ

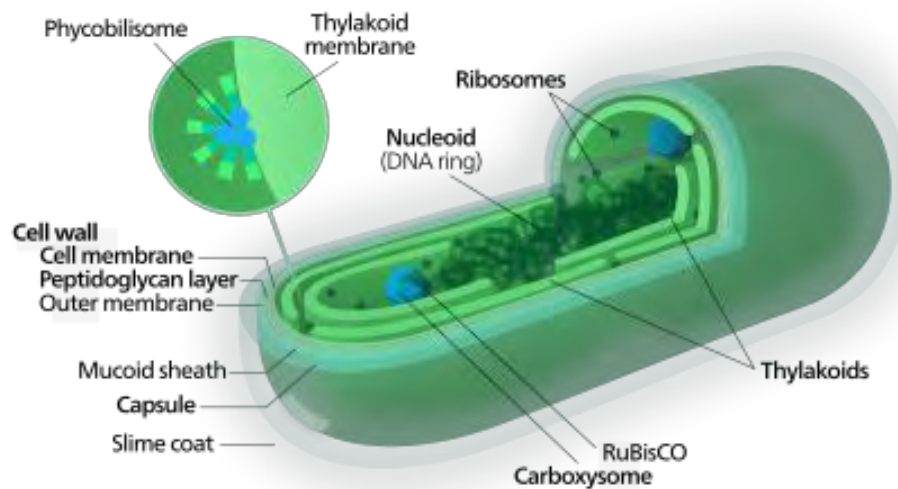
ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย	1
ภาพที่ 1.2 แสดงวิธีการสังเคราะห์ Acyl-lipid ใน microalgal	3
ภาพที่ 1.3 ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	4
ภาพที่ 4.1.1 ไซยาโนแบคทีเรียหลังทำการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	15
ภาพที่ 4.2.1 กราฟแสดงการเจริญและค่าปริมาณสารสีต่างๆของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	17
ภาพที่ 4.3.1 ไซยาโนแบคทีเรีย <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	21
ภาพที่ 4.4.1 ผลจากการทำเวสเทิร์น บลอตติง โดยความเข้มข้นของโปรตีนคือ 20 ไมโครกรัม	23

บทที่ 1

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย ที่มีความหลากหลายสูง และมีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน โดยมีลักษณะเป็น Prokaryotic Cell (Shih และคณะ, 2013) สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ โดยใช้คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี แคโรทีนอยด์ และกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน ประกอบด้วยไฟโคไซยา-นิน อัลโลไฟ โคไซยานิน และไฟโคอิริทริน เป็นรงควัตถุหลักในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Elanskaya และคณะ, 2018) ภาพโครงสร้างโดยสังเขปได้แสดงในภาพที่ 1.1

โดยจากการที่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กชนิดนี้สามารถเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้จึงสามารถสังเคราะห์ สารประกอบอินทรีย์ได้หลากหลายชนิดนอกจากนั้นไซยาโนแบคทีเรียยังมีอัตราการเจริญที่สูงและมีค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงที่ต่ำ รวมถึงสามารถทำการตัดแต่งตัดแปลงทางพันธุกรรมและสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายในห้องปฏิบัติการได้ (Kumar และคณะ, 2018)

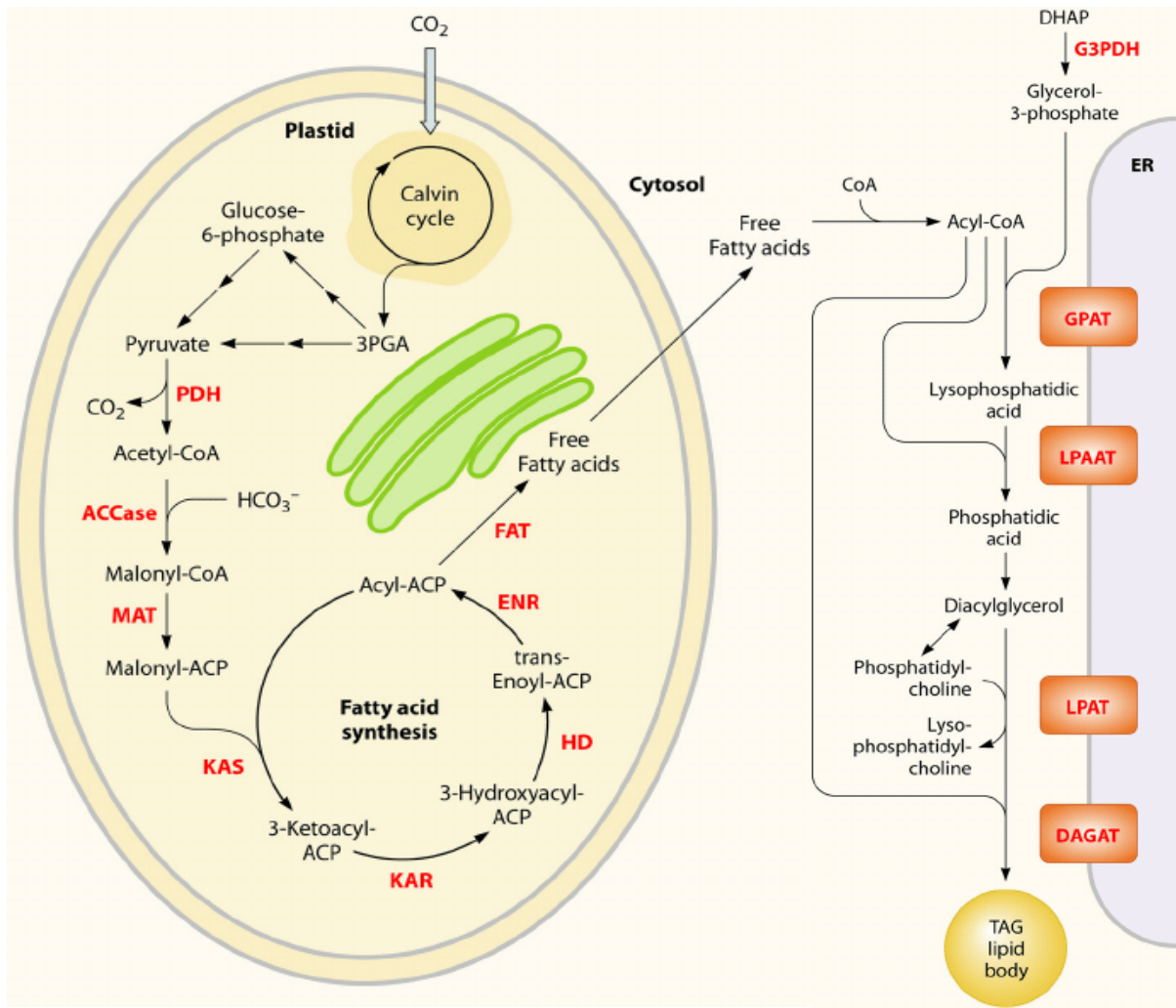


ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

(ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria> เข้าถึงข้อมูลวันที่ 5 พฤษภาคม 2563)

ในปัจจุบันมีการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพจากซากดึกดำบรรพ์ในกิจกรรมต่างๆทางสังคมไม่เพียงแต่ในส่วนของ การคมนาคม และการผลิตกระแสไฟฟ้า แต่ยังรวมไปถึงการใช้เป็นวัตถุดิบในทางด้านอุตสาหกรรมเคมีอีกด้วย ความต้องการในการใช้งานเชื้อเพลิงจากซากดึกดำบรรพ์ดังกล่าวนำมาซึ่งปัญหาโลกร้อนในปัจจุบันและปัญหา มลพิษ และรวมไปถึงการลดลงของเชื้อเพลิงดึกดำบรรพ์จากความต้องการในการใช้งานที่เพิ่มมากขึ้นการหาแหล่ง พลังงานทางเลือกอื่นจึงถือเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยในปัจจุบันไซยาโนแบคทีเรียซึ่งเป็นหนึ่งในจุลสาหร่าย (microalgae) ได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงและวัตถุดิบ จำพวกลิพิดเนื่องจากพบว่าจุลสาหร่ายบางชนิดมีการผลิตและสะสมในส่วนของไขมันในปริมาณสูง (Machida และ คณะ, 2016)

โดยในกระบวนการผลิต acyl-lipid ในจุลสาหร่ายนั้นจะเกิดผ่านกระบวนการ fatty acid biosynthesis (ภาพที่ 1.2) โดยกระบวนการดังกล่าวจะเริ่มจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ pyruvate ผ่านกระบวนการในวัฏจักร Calvin และ วิถี glycolysis ตามลำดับ โดย Acetyl CoA ที่ได้รับมาจาก pyruvate จะถูก นำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์กรดไขมันต่อไปโดยใช้เอนไซม์หลากหลายชนิดเช่น Pyruvate dehydrogenase (PDH) , acetyl-coenzyme A carboxylase (ACCCase) , acetyl-CoA:acyl carrier protein (ACP) transacylase และ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) โดย กระบวนการในการ รวมตัวกันของ Acetyl CoA และ malonyl-CoA นั้นจะเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ MAT หลังจากนั้น สารตัวกลางที่ได้จะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อยด้วยเอนไซม์ 3-ketoacyl-ACP synthase (KAS) ได้เป็น 3-ketoacyl-ACP ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นในการเข้าสู่กระบวนการต่อสายกรดไขมันให้ยาวขึ้นหลังจากเกิด กระบวนการ condensation, reduction, dehydration และ reductionลำดับที่สอง ขึ้นต่อมาคือการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ซึ่งโดยรวมว่า FAS complex ต่อมาเอนไซม์ fatty acyl-ACP thioesterase (FAT) จะสร้างเป็นสายของกรดไขมันอิสระ โดยการ hydrolysis fatty acyl-ACPs ผ่านกระบวนการในวิถี FA biosynthesis และกรดไขมันอิสระที่ผลิตได้ก็จะ ถูกปลดปล่อยออกสู่ cytosol และเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปและ เก็บสะสมให้อยู่ในรูปของ Triacylglycerol ต่อไปโดยกระบวนการ TAG biosynthesis จากที่กล่าวมาเอนไซม์ที่สำคัญในการเกิดกรดไขมัน อิสระหนึ่งนั้นคือ เอนไซม์ MAT จึงนำมาสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียให้มีการแสดงออกที่เพิ่ม มากขึ้นของเอนไซม์ MAT โดยการทำพันธุวิศวกรรมในส่วนของยีน MAT ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นโดยการ ใช้ constitutive promotor ในไซยาโนแบคทีเรีย (Atikij และคณะ, 2019)



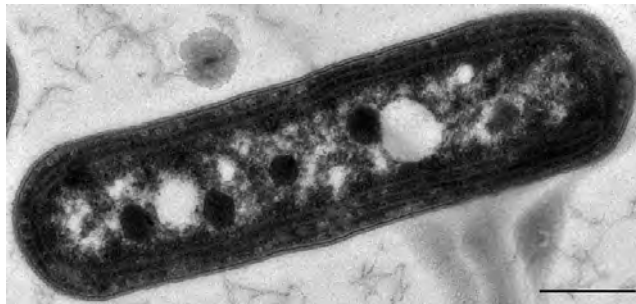
ภาพที่ 1.2 แสดงวิธีการสังเคราะห์ Acyl-lipid ในจุลสาหร่าย

(Radakovits และคณะ, 2010)

ในส่วนของการศึกษาการผลิตลิพิดเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพก่อนหน้านี้พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดที่เหมาะสมเช่น สภาวะเครียดจากความร้อน ความเย็น แสงความเข้มสูง ความเป็นกรดเบส และรวมไปถึงความเค็ม จะช่วยกระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลิพิดเมแทบอลิซึม (lipid metabolism) ได้ (Babele และคณะ, 2019) แต่ทั้งนี้การผลิตจากสาหร่ายเซลล์เดี่ยวเหล่านี้ยังคงประสบปัญหาในส่วนของต้นทุนการผลิตที่ยังคงสูงอยู่เนื่องด้วยการผลิตลิพิดดังกล่าวในสาหร่ายและสาหร่ายเซลล์เดี่ยวจะให้ผลผลิตปริมาณสูงเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาในส่วนของปัจจัยที่จะสามารถนำไปสู่การส่งเสริมการสร้างลิพิดในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวเหล่านี้จึงถือเป็นสิ่งสำคัญที่ควรศึกษาดังในบทความปริทัศน์ของ Li-Beisson และคณะ ที่ได้มีการรวบรวมการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลิพิดเมแทบอลิซึมต่างๆไม่ว่าจะเป็นปัจจัยภายในเช่นเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องในวิธีการสังเคราะห์

ไขมันรวมถึงปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเช่น สารอาหารที่ได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดจากสภาวะการพร่องไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ เป็นต้น รวมถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดจากปัจจัยของความเข้มข้นแสงและอุณหภูมิ ซึ่งพบว่าความเครียดจากปัจจัยต่างๆดังกล่าวนี้ล้วนส่งผลต่อ lipid metabolism (Li-Beisson และคณะ, 2019) การศึกษาพัฒนาในส่วนของการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไขมันจึงถือเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องศึกษาต่อไป

สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ซึ่งเป็นโมเดลไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์น้ำจืด มีลักษณะเป็นทรงกระบอกและได้มีการหาลำดับทั้งหมดของสารพันธุกรรมเรียบร้อยแล้ว (whole genome sequence) (Gonzalez และคณะ, 2018) นอกจากนี้ไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังจัดเป็นหนึ่งในสามของไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบในการตัดแต่งทางพันธุกรรมเพื่อผลิตกรดไขมันอิสระอีกด้วย (Kato และคณะ, 2016)



ภาพที่ 1.3 ไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

(ที่มา:https://en.wikipedia.org/wiki/File:Synechococcus_elongatus_PCC_7942_electron_micrograph_showing_carboxysomes.jpeg เข้าถึงข้อมูลวันที่ 5 พฤษภาคม 2563)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงนำมาสู่การพัฒนาต่อยอดจากงานวิจัยของ Atikij และคณะที่ได้ทำการตัดแต่งพันธุกรรมไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) โดยในงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นการพัฒนาต่อยอดจากการนำไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้ทำการพัฒนาไว้ก่อนหน้ามาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือโดยมุ่งหวังศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการ lipid metabolism โดย ในที่นี้จะมุ่งเน้นเป็นเอนไซม์ MAT และรวมไปถึงการศึกษาผลของสภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือความเข้มข้นสูง ต่อลักษณะทาง

กายภาพของเชื้อและการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะดังกล่าว ซึ่งผลของสภาวะความเครียดที่เกิดจากเกลือต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของไซยาโนแบคทีเรียนั้นยังมีการศึกษาที่ไม่แพร่หลายมากนักทางผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษาภายใต้สภาวะนี้โดยคาดหวังว่าจะได้รับองค์ความรู้ใหม่จากงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาต่อยอดให้ไปสู่การนำมาใช้ประโยชน์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการตอบสนองของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ที่ทำพันธุวิศวกรรมให้มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) ทั้งในแง่ของลักษณะทางกายภาพ การเจริญเติบโต และการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของลิพิด ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องแก้ว บริษัท Pyrex (USA)
2. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) บริษัท Greiner bio-one (Thailand)
3. เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น PG2002-S บริษัท Metler Toledo (Thailand)
4. เครื่องอบฆ่าเชื้อไอน้ำ (Autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท Meditop (Thailand)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited (New Zealand)
6. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) บริษัท Lamton (Thailand)
7. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Rotary shaker) บริษัท Hercuvan Lab-system (USA)
8. เครื่องปั่นแยกสารชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น KUBOTA 6500 บริษัท KUBOTA (Japan)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated microcentrifuge) รุ่น Centrifuge 5418R บริษัท Eppendorf (Germany)
10. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie 2 บริษัท Scientific industries (USA)
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (Spectrophotometer) รุ่น genesis 20 และ Biomate 35 บริษัท Thermo scientific (Thailand)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow) รุ่น Microtech บริษัท Labmicro (Thailand)
13. ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator) บริษัท MITSUBISHI (Japan)
14. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Thermoelectron Corporation (USA)
15. ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท Haier (China)
16. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Deep freezer) บริษัท SANYO (Japan)
17. เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (Sonicator) รุ่น Sonics Vibra cell™ บริษัท Sonics & Materials (USA)
18. ปิเปตอัตโนมัติ (Autonomic pipette) รุ่น Proline Plus บริษัท Sarorius BioHit (Germany)

19. หลอดเซนติฟิวจ์ขนาดเล็ก (Microcentrifuge tube)
20. หลอดเซนติฟิวจ์ขนาดใหญ่ (Centrifuge tube)
21. เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) รุ่น MMS-3000 บริษัท Biosan (Latvia)
22. เต้าอบไมโครเวฟ รุ่น R-250 บริษัท SHARP (Japan)
23. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น Mini-PROTEIN II® Tetra Cell และเครื่องจ่ายไฟ รุ่น PowerPac™ HC บริษัท BIO-RAD Laboratories (USA)
24. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus (Japan)
25. คิวเวทท์ (Cuvette) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy (USA)
26. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น Model UE600 บริษัท Memmert (Germany)
27. เครื่องเขย่าแบบเอียงซ้ายสลับขวา (Rocking platform) รุ่น Mini Rocker บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
28. ทิป (tip) บริษัท Biohit Proline tip (Finland), บริษัท NEPTUNE (Mexico), บริษัท Axygen Scientific (China), บริษัท Rainin (USA)

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมไนเตรท (NaNO₃) บริษัท Emsure (Germany)
2. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Ensure (Germany)
3. ทริส (tris(hydrizymethyl)aminomethane; (HOCH₂)₃CNH₂) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
4. มาร์กเกอร์ (Dyna Marker DNA low D) บริษัท BioDynamics Laboratory (USA)
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
7. ผงวุ้น (Agar) บริษัท HiMedia (India)
8. TEMED (Tetramethylethylenediamine) บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)
9. Antibody raised against 6-histidine บริษัท R&D system (USA)
10. Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated บริษัท New England Biolabs (USA)
11. สคิมมิลค์ บริษัท Himedia (India)

12. ยาปฏิชีวนะสเปคตินอัมัยซิน บริษัท AMRESCO (USA)
13. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท Emsure (Germany)
14. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Emsure (Germany)
15. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
16. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
17. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Emsure (Germany)
18. ไดโซเดียม เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก ไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Amresco (USA)
19. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Emsure (Germany)
20. แอมโมเนียม ไอรอน (III) ซิเตรต (Ammonium iron (III) citrate) บริษัท Ajax Finechem (New Zealand)
21. กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Emsure (Germany)
22. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
23. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
24. แอมโมเนียมโมลิบเดต เตตระไฮเดรต ($(\text{Na}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)
25. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Emsure (Germany)

2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดคอนจูเกตโปรตีน Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate kit บริษัท Bio-Rad Laboratories (USA)

2.4 เมมเบรน

1. PVDF (Polyvinylidene difluoride) บริษัท Millipore Cooperation (USA)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การเลี้ยง *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายใต้สภาวะปกติ

3.1.1 อาหารและสภาวะในการเลี้ยง *Synechococcus elongatus* PCC7942

ทำการเลี้ยง *Synechococcus elongatus* PCC7942 ที่นำพาเวกเตอร์เปล่า (*pSyn_6 vector*) และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*SynMAT/pSyn_6*) ซึ่งได้รับมาจากศึกษาก่อนหน้า (Atikij และคณะ 2019) โดยทำการเลี้ยงในอาหาร Blue Green medium (BG11) ที่มี spectinomycin (10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร) โดยรายละเอียดการเตรียมอาหารแสดงในภาคผนวก ก. ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 lux จากหลอดฟลูออเรสเซนต์เป็นการให้แสงตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองต่อไปที่มีการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทุกครั้งจะมีการเติม spectinomycin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น (10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)

3.1.2 การติดตามการเจริญของ *Synechococcus elongatus* PCC7942

ติดตามการเจริญของเซลล์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ที่นำพาเวกเตอร์เปล่า (*pSyn_6 vector*) และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*SynMAT/pSyn_6*) โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) โดยแบ่งสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปใส่ในคิวเวตต์ ปริมาตร 1-1.5 มิลลิลิตรและ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ซึ่งเป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ โดยใช้อาหาร BG11 เป็น blank เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.0 จึงทำการปั่นเก็บเซลล์เพื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียด ที่เกิดจากเกลือต่อไป

3.1.3 การปั่นเก็บเซลล์ก่อนการเตรียมเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือ

เก็บเซลล์ที่เลี้ยงจากข้อ 3.1.2 โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากนั้นแบ่งเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์ออกเป็นสายพันธุ์ละสามส่วนโดยมีรายละเอียดดังนี้

สำหรับเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก

ส่วนที่ 1 ชุดควบคุม เลี้ยงโดยใช้อาหาร BG11

ส่วนที่ 2 ชุดทดลองเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.35 โมลาร์

ส่วนที่ 3 ชุดทดลองเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.35 โมลาร์

และสำหรับการเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สองนั้นทำการแบ่งเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ออกเป็นสายพันธุ์ละสามส่วนเช่นเดียวกันกับสภาวะแรกโดยมีรายละเอียดดังนี้

สำหรับเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สอง

ส่วนที่ 1 ชุดควบคุม เลี้ยงโดยใช้อาหาร BG11

ส่วนที่ 2 ชุดทดลองเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.3 โมลาร์

ส่วนที่ 3 ชุดทดลองเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.3 โมลาร์

โดยรายละเอียดการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นแสดงในภาคผนวก ก.

3.2 การเลี้ยงเซลล์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ

3.2.1 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์และสภาวะในการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

โดยจะทำการเลี้ยง *Synechococcus elongatus* PCC7942 ทั้งสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ในอาหารดังนี้

ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11

ชุดที่ 2 ชุดทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.35 โมลาร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11 + NaCl 0.35 โมลาร์

ชุดที่ 3 ชุดทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.35 โมลาร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11 + KCl 0.35 โมลาร์

ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สอง

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11

ชุดที่ 2 ชุดทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.3 โมลาร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11 + NaCl 0.3 โมลาร์

ชุดที่ 3 ชุดทดสอบภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.3 โมลาร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อคือ BG11 + KCl 0.3 โมลาร์

โดยหลังการย้ายเซลล์มาเลี้ยงในสภาวะเครียดแล้วนั้นกำหนดให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ตั้งต้นของแต่ละชุดทดลองมีค่าประมาณ 0.8 และเลี้ยงภายใต้สภาวะมีแสงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 7 วันสำหรับสภาวะแรก และ 5 วันสำหรับสภาวะที่สอง

3.2.2 การติดตามการเจริญของเซลล์ *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายใต้สภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ

วัดค่า OD₇₃₀ ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี เพื่อติดตามการเจริญของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และ *SynMAT/pSyn_6* เป็นเวลา 7 วันสำหรับภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือในสภาวะแรกและ 5 วันสำหรับภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือในสภาวะที่สองและวัดค่าสารสีต่างๆ ได้แก่คลอโรฟิลล์ เอ (C) (ติดตามจากค่า OD₆₆₅) ไฟโคไซยานิน (PC) (ติดตาม จากค่า OD₆₂₀) อัลโลไฟโคไซยานิน (AP) (ติดตามจากค่า OD₅₆₅) และ ไฟโคอีริทริน (PE) (ติดตามจากค่า OD₆₅₀) ที่วันที่ 7 ของสภาวะแรก และวันที่ 5 ของ

สภาวะที่สองของการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดตามลำดับและนำค่าข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์แนวโน้มในการเจริญและปริมาณสารสีของเซลล์หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โดยการคำนวณสารสีจากสูตรของ de Marsac และ Houmard (1988) ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll a } (\mu\text{g ml}^{-1}) &= \text{OD}_{665\text{nm}} \times 13.9 \\ \text{Phycocyanin (PC) (mg ml}^{-1}) &= (\text{OD}_{620\text{ nm}} - 0.7 \times \text{OD}_{650\text{nm}}) / 7.38 \\ \text{Allophycocyanin (AP) (mg ml}^{-1}) &= (\text{OD}_{650\text{nm}} - 0.19 \times \text{OD}_{620\text{nm}}) / 5.65 \\ \text{Phycoerythrin (PE) (mg ml}^{-1}) &= (\text{OD}_{565\text{nm}} - 2.8 [\text{PC}] - 1.34 [\text{AP}]) / 7.38 \end{aligned}$$

3.3 การตรวจสอบสัญญาณวิทยาภายหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

หลังจากทำการเลี้ยงเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดคือสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และ *SynMAT/pSyn_6* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลา 7 วันและ 5 วันสำหรับภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรกและสองตามลำดับ จะทำการเก็บตัวอย่างเซลล์โดยดูดเซลล์จากขวดทดลองมา 10 μl จากแต่ละชนิดในทุกๆสภาวะเพื่อดูลักษณะและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าเพื่อสังเกตลักษณะและขนาดที่เปลี่ยนแปลงของเซลล์ในแต่ละสภาวะเครียดจากเกลือแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ หลังจากนั้นทำการบันทึกภาพเซลล์ที่ได้และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม imageJ (ที่มา: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> g-เข้าถึงข้อมูลวันที่ 10 พฤษภาคม 2563) และ microbeJ (ที่มา: <https://www.microbej.com/download-2/>เข้าถึงข้อมูลวันที่ 10 พฤษภาคม 2563)

3.4 การวิเคราะห์ western blotting

3.4.1 การปั่นเก็บเซลล์

นำเซลล์ทั้งสองชนิดคือสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และ *SynMAT/pSyn_6* ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองสภาวะและเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ (ชุดควบคุม) มาทำการปั่นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ได้ในหลอด ไมโครเซนทริฟิวจ์ หรือ Eppendorf และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ใน ขั้นตอนของการสกัดโปรตีนต่อไป

3.4.2 การสกัดโปรตีนจากเซลล์

นำเซลล์ที่ได้ทำการเก็บในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์มาเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.2 หลอดละประมาณ 200 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นแยกส่วนใสที่เป็นน้ำ (supernatant) ทิ้งไป จากนั้นทำการเติม Tris-HCl pH 8.2 หลอดละประมาณ 2 ไมโครลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในแต่ละหลอด หลังจากนั้นนำไปสกัดโปรตีนด้วยเครื่อง สั่นสะเทือนคลื่นอัลตราโซนิค

(Sonicator MODEL) ด้วยค่าแอมพลิจูด 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาทีต่อหลอด จากนั้นทำการแยกเซลล์ที่ได้จากการสกัดโปรตีนแล้วออกเป็นสองส่วนจากแต่ละตัวอย่างโดยจะทำการดูดเซลล์ที่สกัดโปรตีนแล้วใส่ในหลอด Eppendorf ใหม่หลอดละ 100 ไมโครลิตร โดยส่วนหนึ่งจะใช้สำหรับตรวจสอบโปรตีนจากส่วนที่สกัดได้ (Crude Protein) และอีกส่วนจะใช้สำหรับตรวจสอบโปรตีนที่ละลายในส่วนใส (Soluble Protein) หลังจากนั้นนำหลอด Eppendorf ของแต่ละเซลล์แต่ละสถานะ สำหรับ Soluble Protein มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำการเก็บเฉพาะ ส่วน supernatant หลังจากได้ Crude Protein และ Soluble Protein ของเซลล์ทุกชนิดในทุกๆสถานะแล้วจะทำการเก็บหลอด Eppendorf แต่ละหลอดดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อ เตรียมทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตติง (Western blotting) ต่อไป

3.4.3 การวัดความเข้มข้นของโปรตีนหยาบโดยวิธีแบรดฟอร์ด

นำโปรตีนหยาบที่สกัดได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ โดยใช้ชุดคิท Bio-Rad protein assay (dye reagent concentrate) (Bio-Rad Laboratories, USA) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนหยาบตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานของโบวันซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) (ภาคผนวก ค.) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 2-20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

3.4.4 การวิเคราะห์โปรตีนโดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

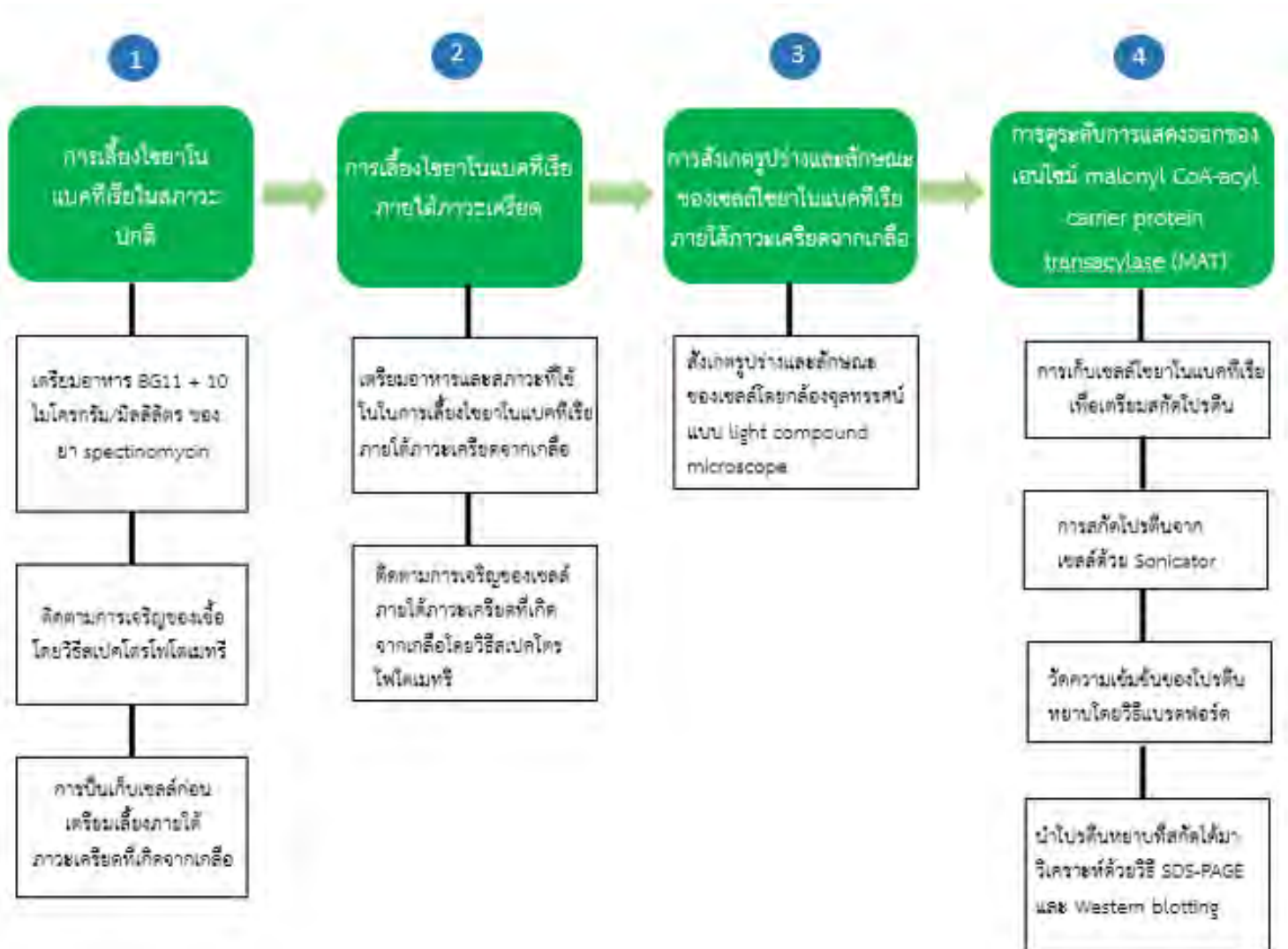
(SDS-PAGE)

นำโปรตีนหยาบที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยเตรียมเจลสำหรับทำ SDS-PAGE ซึ่งเตรียมจากวิธีมาตรฐาน (Laemmli, 1970) เจลสำหรับการทำ SDS-PAGE จะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือสารละลายเซพาเรตติงเจล (Separating gel) ที่มีความเข้มข้น 10 % และสารละลายสแต็กกิงเจล (Stacking gel) ที่มีความเข้มข้น 5 % โดยเตรียมเจลในชุดคิท SDS-PAGE: Model MiniPROTEIN II® Tetra cell (Bio-Rad Laboratories, USA) แล้วนำเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดคิทอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเติมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (Running buffer) ลงในชุดคิทอิเล็กโทรโฟรีซิสจนเต็ม แล้วนำโปรตีนหยาบที่สกัดได้จากข้อ 3.4.2 มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 20 ไมโครกรัมจากนั้นหยอดโปรตีนหยาบตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในหลุมเจล กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามี ค่าคงที่เท่ากับ 75 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาทีรายละเอียดการเตรียมสารเคมีทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ข.

3.4.5 การวิเคราะห์โปรตีนโดยเวสเทิร์น บลอตติง (Western blotting)

เวสเทิร์น บลอตติง ใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจากยีน *MAT* ที่ติดฉลากด้วย 6X Histidine tag ตามวิธีมาตรฐาน (Timmons and Dunbar, 1990) ซึ่งหลังจากการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ปรับสภาพด้วยสารละลายเมทานอล 90%(V/V) เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์เวสเทิร์น บลอตติง (Western blotting buffer) และทำการบลอตโปรตีนโดยใช้ Semi-dry transfer cell (Model Trans-Blot® SD Cell, Bio-Rad Laboratories, USA) ที่ 0.12 แอมแปร์ เป็นเวลา 50 นาที ป้องกันการเกิดโปรตีนอื่นๆที่ไม่จำเพาะเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่สารละลายที่ใช้ในการบล็อกโปรตีน (Blocking solution) ต่อมานำแผ่นเมมเบรนไปบ่มกับแอนติบอดีปฐุมภูมิ (Antibody raised against 6-histidine, R&D system, USA) ซ้ำมคิน และล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) 3 ครั้ง ในระยะเวลา 20 นาที, 10 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ 1X PBS โดยมีขั้นตอนการล้างเหมือนตอนล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) จากนั้นบ่มด้วย แอนติบอดีทุติยภูมิ (Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated) (New England Biolabs, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย Skim milk 5% (W/V) และ บัฟเฟอร์ 1X PBS เหมือนขั้นตอนที่กล่าวก่อนหน้านี้ตรวจสอบผลโดยแช่แผ่นเมมเบรนลงในสารละลายที่จำเพาะต่อเอนไซม์ ฮอสมเรดิชเพอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) โดยใช้ชุดคิท Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate (Bio-Rad Laboratories, USA) ซึ่งจะเกิดการพัฒนาของสี โดยจะเกิดแถบที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมาย รายละเอียดการเตรียมสารเคมีทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ง.

3.5 แผนผังการดำเนินการทดลอง

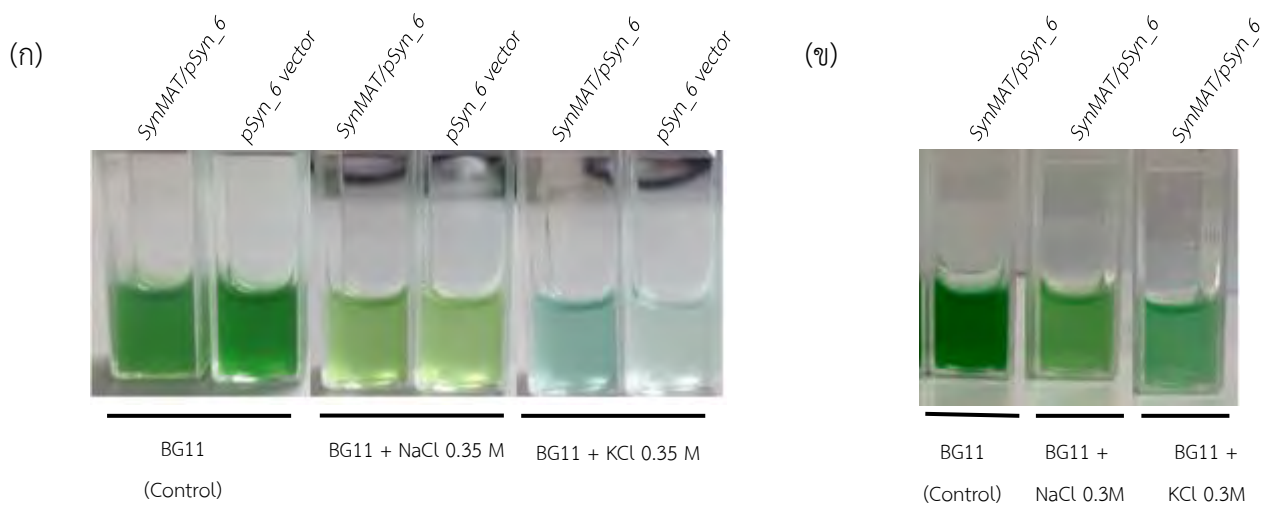


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายหลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ

จากการเลี้ยงไชยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ทั้งสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*pSyn_6* vector) และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*SynMAT/pSyn_6*) ภายใต้อาหารภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือโดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันสำหรับการเลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือที่สภาวะแรกซึ่งมีค่าความเข้มข้นของเกลือในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์คือ NaCl มีความเข้มข้น 0.35 โมลาร์ และ KCl 0.35 โมลาร์ และสำหรับในสภาวะที่สองของการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือมีค่าความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการเลี้ยงคือ NaCl ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และ KCl 0.3 โมลาร์ ซึ่งสำหรับสภาวะที่สองจะทำการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (รูปภาพที่.4.1.1.)



ภาพที่ 4.1.1 ไชยาโนแบคทีเรียหลังทำการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

- (ก) ไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*pSyn_6* vector) และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*SynMAT/pSyn_6*) หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl 0.35 M และ KCl 0.35 M (สภาวะแรก) เป็นเวลา 7 วัน
- (ข) ไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*pSyn_6* vector) และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของเอนไซม์ MAT (*SynMAT/pSyn_6*) หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl 0.3 M และ KCl 0.3 M (สภาวะที่สอง) เป็นเวลา 5 วัน

หลังจากการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือที่สภาวะแรกพบว่าหลังจากผ่านไปเป็นเวลา 7 วันพบการฟอกจางสี (bleaching) ของเซลล์ที่เลี้ยงโดยอาหารที่มี KCl 0.35 M โดยพบการฟอกจางสีเซลล์ในสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* มากกว่า *SynMAT/pSyn_6* และสำหรับในอาหารที่มี NaCl 0.35M นั้นไม่พบการ bleaching ของเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์ แต่มีความเข้มของสีที่น้อยกว่าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ

และสำหรับสภาวะที่สองของการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือซึ่งมีการปรับลดความเข้มข้นของเกลือลงโดยใช้อาหารที่มี NaCl 0.3M และ KCl 0.3 M โดยพบว่ามีความเข้มเช่นเดียวกับสภาวะแรกคือมีการจางลงของสีในเกลือชนิด KCl มากกว่าเกลือชนิด NaCl แต่ไม่พบการ bleaching ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่สภาวะนี้ และเนื่องด้วยเกิดความผิดพลาดระหว่างการทำการทดลองในส่วนของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* ของตัวผู้ปฏิบัติงานเองจึงทำให้ไม่มีผลการทดลองในส่วนของ *pSyn_6 vector*

4.2 การเจริญและปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายหลังจากการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือ

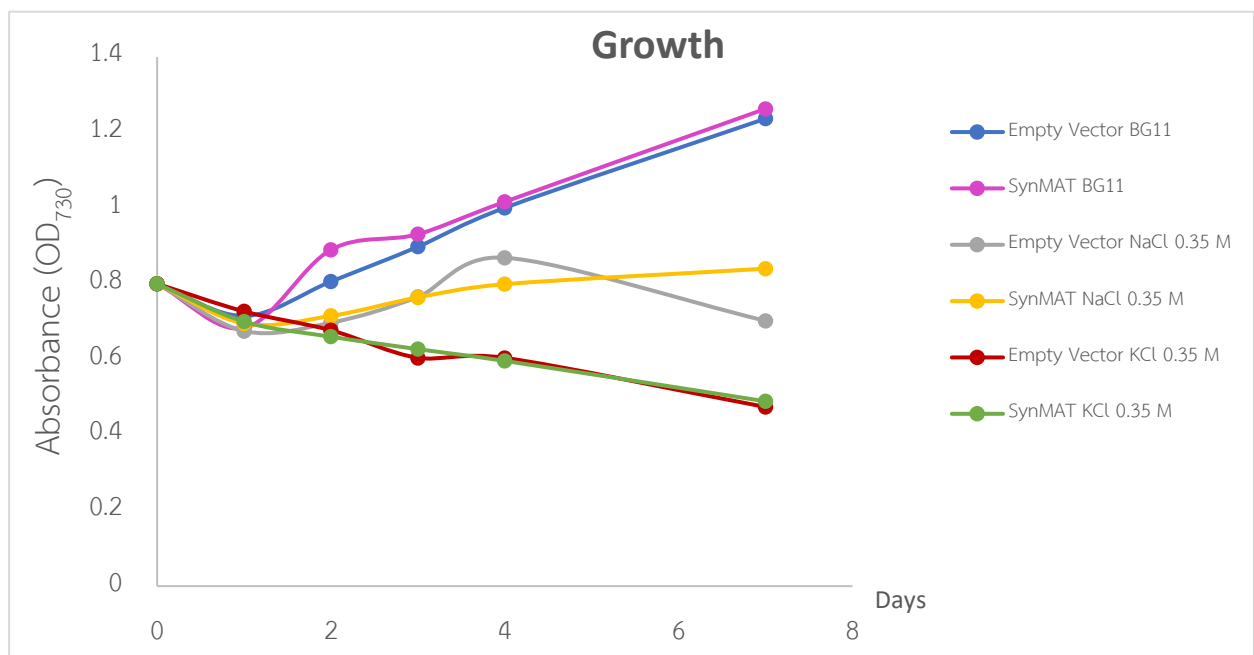
ทำการติดตามการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีซึ่งสำหรับการติดตามการเจริญทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร และสำหรับการวัดค่าของสารสีต่างๆนั้นทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับคลอโรฟิลล์ เอ (ติดตามจากค่า OD₆₆₅) ไฟโคไซยานิน (ติดตามจากค่า OD₆₂₀) อัลโลไฟโคไซยานิน (ติดตามจากค่า OD₅₆₅) และ ไฟโคอีริทริน (ติดตามจากค่า OD₆₅₀) ซึ่งสำหรับการคำนวณค่าปริมาณสารสีต่างๆหลังจากทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วจะนำมาคำนวณตามสมการของ de Marsac และ Houmard (1988)

สำหรับในสภาวะแรกที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของเกลือชนิด NaCl และ KCl 0.35 M หลังทำการติดตามการเจริญเป็นเวลา 7 วันพบว่าการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 ดีที่สุดและรองลงมาคือในอาหาร BG11 ที่มี NaCl 0.35 M และ KCl 0.35 M ตามลำดับและพบว่าที่ทุกสภาวะของการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* มีการเจริญที่สูงกว่าสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* ภายใต้อาหารชนิดเดียวกัน (รูปภาพที่ 4.2.1 ก) สำหรับสภาวะที่สองของการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือซึ่งใช้อาหารในการเลี้ยงที่มีการปรับลดความเข้มข้นของเกลือ NaCl และ KCl ลงเหลือ 0.3 M รวมถึงปรับลดเวลาในการเลี้ยงลงเหลือ 5 วันพบว่าในส่วนของผลการเจริญนั้นมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสภาวะแรกซึ่งมีการเจริญในอาหาร BG11 ดีที่สุดและรองลงมาคือในอาหาร BG11 ที่มี NaCl 0.3 M และ KCl 0.3 M ตามลำดับ (รูปภาพที่ 4.2.1 ข) และในสภาวะที่สองเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* กับสภาวะแรกพบว่า การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือที่สภาวะที่สองมีการเจริญที่สูงกว่าในสภาวะแรกเมื่อทำการเปรียบเทียบภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิดเดียวกัน

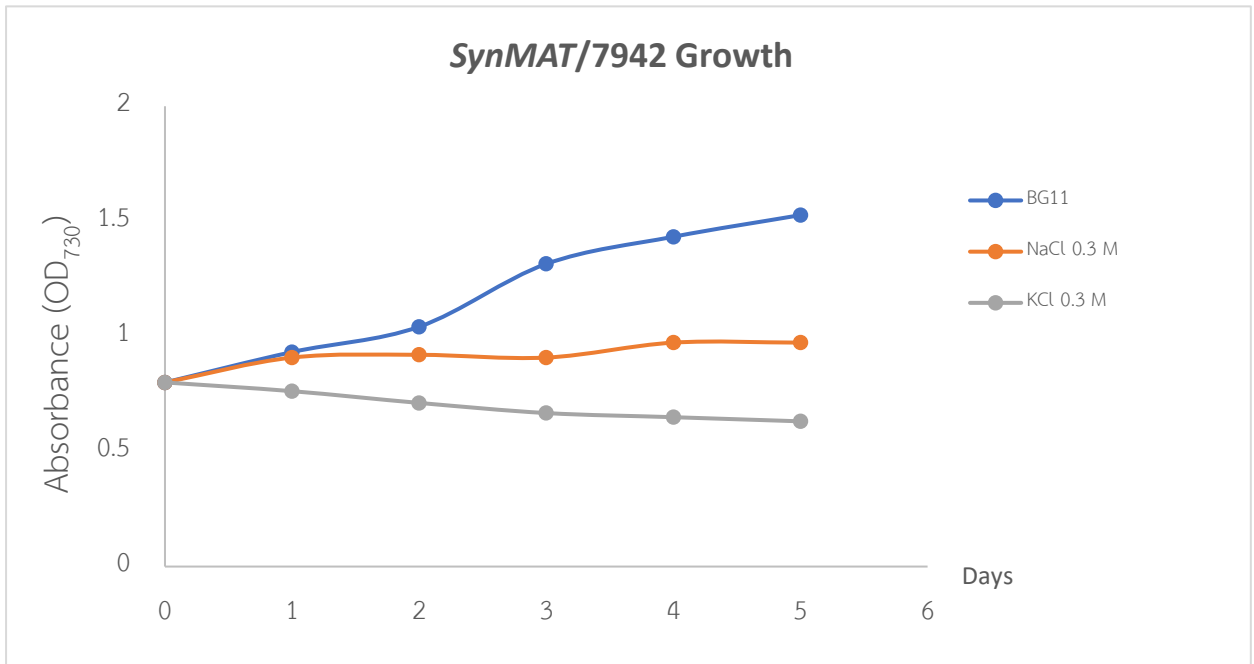
นอกจากนี้มีการวัดค่าปริมาณสารสีต่างๆของไซยาโนแบคทีเรียร่วมด้วยเพื่อสนับสนุนผลการเจริญและการตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะเครียดสำหรับค่าปริมาณสารสีคลอโรฟิลล์ เอ ไฟโคไซยานิน อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอีริทริน ที่สภาวะแรกพบว่าแนวโน้มของค่าปริมาณสารสีที่วัดได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มี NaCl 0.35 M สูงกว่าในอาหารที่มี KCl 0.35 M แต่ต่ำกว่าที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดด้วย

เกลือ และเมื่อทำการเปรียบเทียบภายในเกลือชนิดเดียวกันพบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* จะให้ค่าของปริมาณสารสีที่สูงกว่าสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (รูปภาพ 4.2.1 ค) และสำหรับค่าสารสีที่สภาวะที่สองจากการเกิดความผิดพลาดของผู้ทำการทดลองทำให้ในส่วนนี้มีเพียงผลการทดลองของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* เท่านั้นโดยพบว่าหลังจากการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลา 5 วัน ค่าปริมาณสารสีที่ได้มีแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกับกับสภาวะแรกโดยปริมาณสารสีที่วัดได้ไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มี NaCl 0.3 M สูงกว่าในอาหารที่มี KCl 0.3 M แต่ต่ำกว่าที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดด้วยเกลือ (รูปภาพ 4.2.1 ง) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าปริมาณสารสีชนิดเดียวกันภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิดเดียวกันที่วัดได้ในสภาวะแรกและสภาวะที่สองของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* พบว่าในสภาวะที่สองมีค่าสูงกว่าที่วัดได้ในสภาวะแรก รวมไปถึงค่าปริมาณสารสีที่วัดได้นั้นมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกับค่าการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

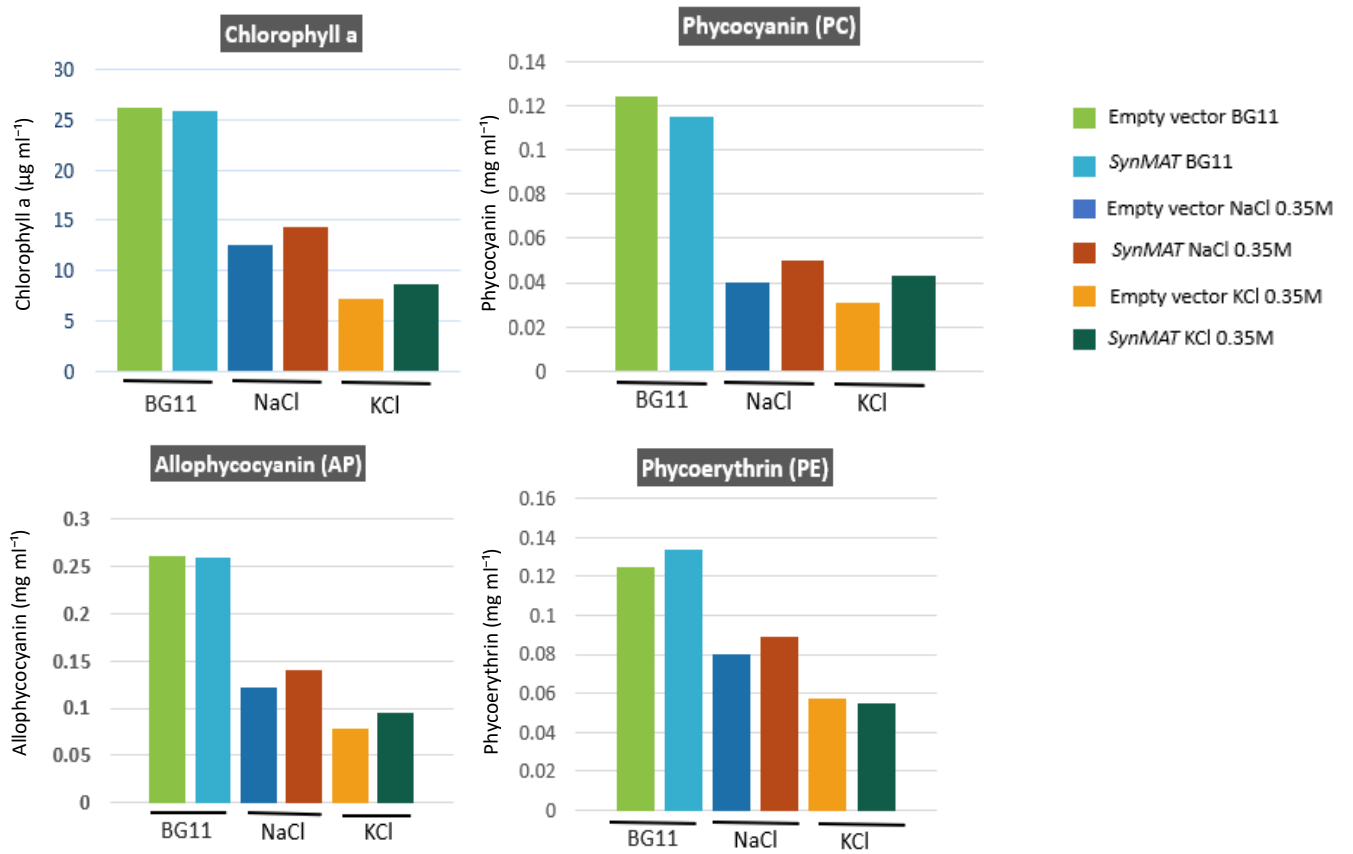
(ก)



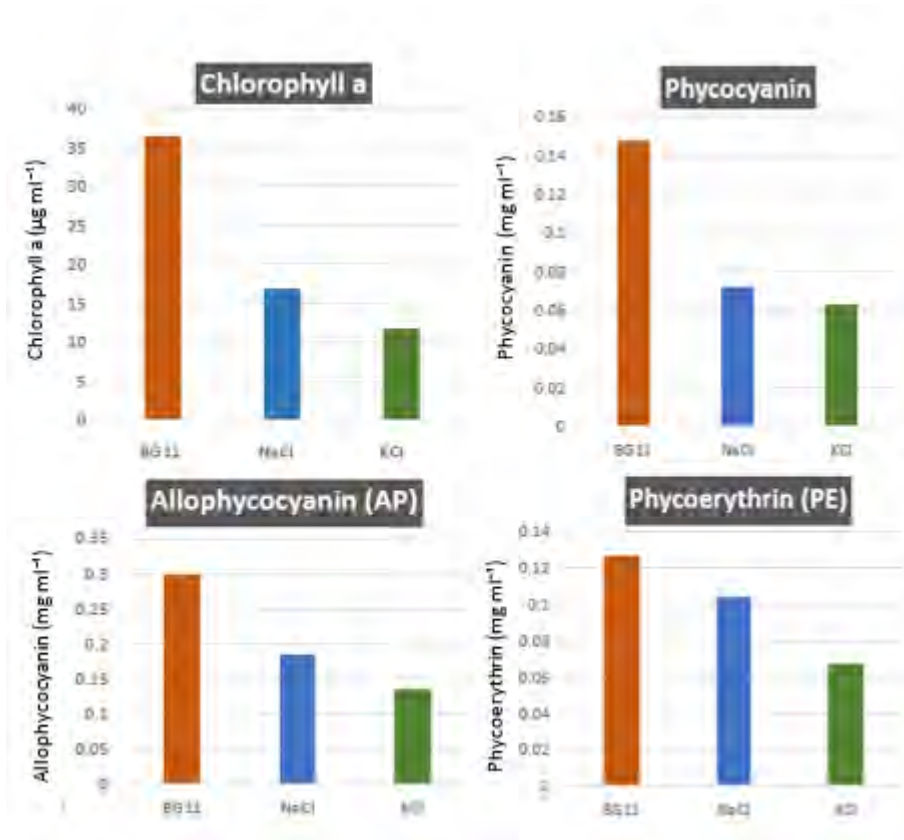
(7)



(8)



(ง)



ภาพที่ 4.2.1 กราฟแสดงการเจริญและค่าปริมาณสารสีต่างๆของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus sp.*

PCC7942 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

- (ก) กราฟแสดงการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6* vector (Empty vector) และ *SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*) ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก เป็นเวลา 7 วัน
- (ข) กราฟแสดงการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*) ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สอง เป็นเวลา 5 วัน
- (ค) กราฟแสดงค่าปริมาณมาตรฐานสารสีของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6* vector (Empty vector) และ *SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*) ภายหลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก เป็นเวลา 7 วัน
- (ง) กราฟแสดงค่าปริมาณมาตรฐานสารสีของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*) ภายหลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก เป็นเวลา 5 วัน

4.3 ขนาดความยาวและลักษณะของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

จากการสังเกตลักษณะของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายหลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดที่เกิดจากเกลือสภาวะแรกซึ่งเลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของเกลือชนิด NaCl และ KCl 0.35 M เป็นเวลา 7 วันสำหรับสภาวะแรก และสภาวะที่สองซึ่งเลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของเกลือชนิด NaCl และ KCl 0.3 M เป็นเวลา 5 วัน โดยพบว่าเมื่อทำการวัดขนาดของเซลล์โดยใช้โปรแกรม imageJ และ microbe ร่วมด้วย ในการวัดค่าขนาดความยาวของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* (Empty vector) และ *SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*) ให้ค่าดังแสดงในตารางที่ 1 และสำหรับลักษณะของเซลล์ที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า นั้นพบว่าภายใต้สภาวะปกติไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์และสองสภาวะนั้นสามารถเห็นตัวเซลล์มีสีเขียว แต่เมื่อทำการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือที่สภาวะแรกพบว่าภายใต้เกลือชนิด NaCl นั้นเซลล์บางเซลล์มีความเข้มของสีเขียวที่ลดลงและพบการยืดยาวขึ้นอย่างชัดเจน และสำหรับเซลล์ภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิด KCl นั้นพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการพองกางของสีอย่างเห็นได้ชัด และเซลล์มีขนาดเล็ก (รูปภาพ 4.3.1) สำหรับลักษณะของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สองซึ่งในส่วนของผลการทดลองจะมีเพียงแค่ผลของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT* เท่านั้น โดยพบว่าภายใต้ภาวะภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl เซลล์บางเซลล์มีการยืดยาวออกอย่างชัดเจนและยังคงมีสีเขียวอยู่ และสำหรับลักษณะของเซลล์ภายใต้เกลือชนิด KCl นั้นพบว่าเซลล์มีการยืดยาวออกเช่นเดียวแต่น้อยกว่าที่สภาวะเกลือชนิด NaCl และยังคงเห็นเซลล์เป็นสีเขียวอยู่

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความยาวเฉลี่ยของ *Synechococcus sp.* PCC7942

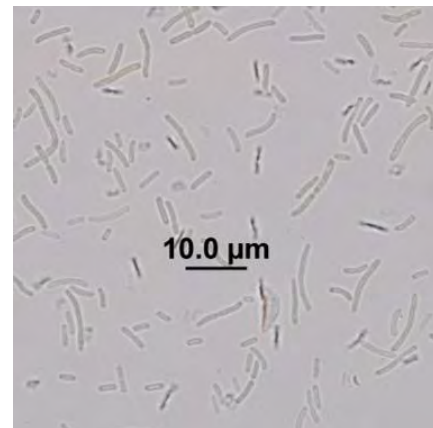
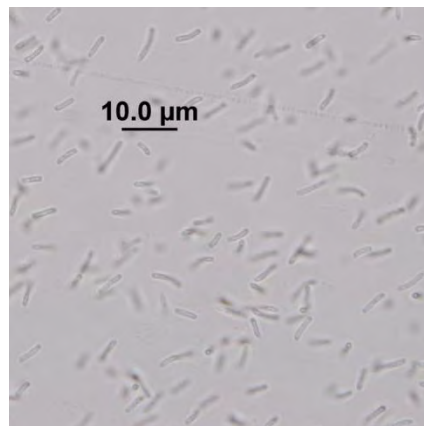
(N = 20)

ภาวะเครียดจากเกลือ		<i>pSyn_6 vector</i> (Empty vector) (μm)	<i>SynMAT/pSyn_6</i> (<i>SynMAT</i>) (μm)
สภาวะแรก (ความเข้มข้นเกลือ 0.35M)	BG11	4.83 \pm 0.68	3.31 \pm 0.7
	NaCl	6.29 \pm 3.12	6.118 \pm 2.67
	KCl	2.94 \pm 0.8	2.21 \pm 0.36
สภาวะที่สอง (ความเข้มข้นเกลือ 0.3M)	BG11	-	3.91 \pm 1.07
	NaCl	-	9.47 \pm 3.53
	KCl	-	5.45 \pm 1.31

(n)

pSyn_6 vector (Empty vector)*SynMAT/pSyn_6* (*SynMAT*)

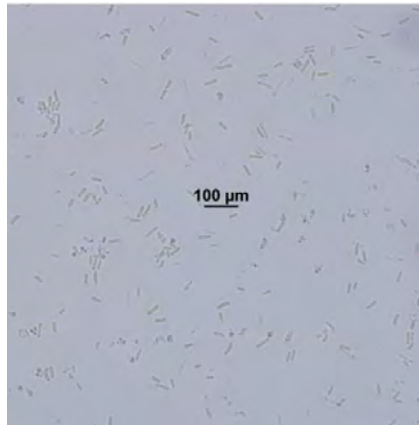
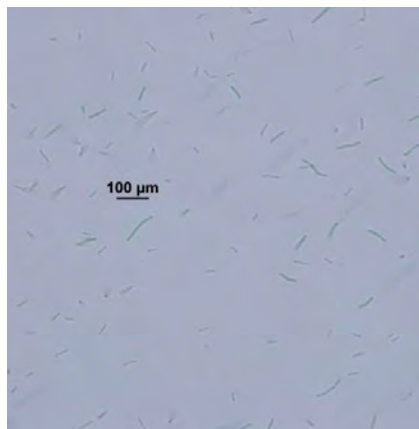
BG11

BG11 +
NaCl 0.35MBG11 +
KCl 0.35M

ข)

SynMAT/pSyn₆ (SynMAT)

BG11

BG11 +
NaCl 0.3MBG11 +
KCl 0.3M

ภาพที่ 4.3.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus sp.* PCC7942 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย

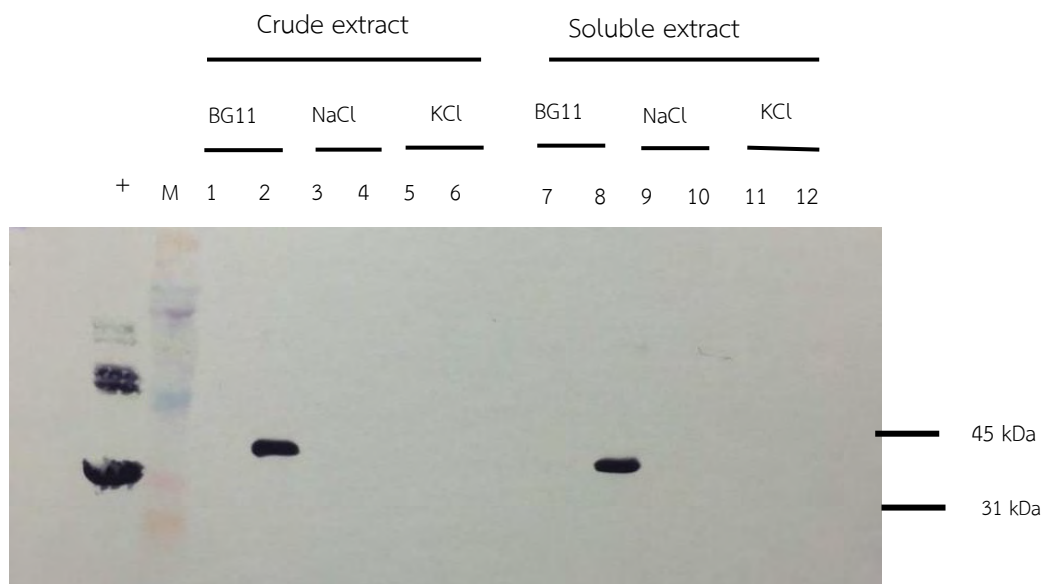
1,000เท่า

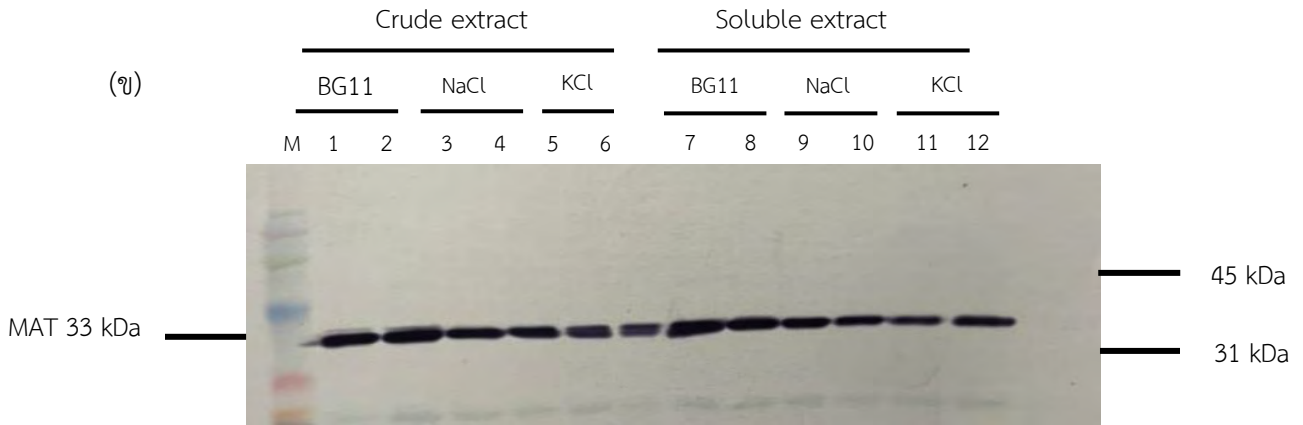
- (ก) ไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn₆ vector* (Empty vector) และ *SynMAT/pSyn₆ (SynMAT)* หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรก
- (ข) ไชยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn₆ (SynMAT)* หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สอง

4.4 ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (MAT) ใน ไซยาโนแบคทีเรียหลังการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

ในการติดตามการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ภายหลังจากการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรกซึ่งเลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของเกลือชนิด NaCl และ KCl 0.35 M เป็นเวลา 7 วันสำหรับสภาวะแรก และสภาวะที่สองซึ่งเลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของเกลือชนิด NaCl และ KCl 0.3 M เป็นเวลา 5 วัน โดยการนำส่วนของโปรตีนมาตรวจจับสัญญาณการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตทิง โดยนำโปรตีนไปบลอตทักกับ แอนติบอดีปฐมภูมิ (Antibody raised against 6-histidine, R&D system, USA) และแอนติบอดีทุติยภูมิ (Antibody raised against mouse-IgG HRP conjugated) (New England Biolabs, USA) จากนั้นตรวจสอบผลโดยแผ่นเมมเบรนลงในสารละลายที่จำเพาะต่อเอนไซม์ฮอสมเรดิชเปอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase) โดยใช้ชุดคิท Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate (Bio-Rad Laboratories, USA) ซึ่งจะเกิดการพัฒนาของสี โดยพบว่าที่สภาวะแรก (รูปภาพ 4.4.1 ก) ไม่สามารถตรวจจับสัญญาณของโปรตีนเป้าหมายที่ 33 KD ได้ทั้งในเกลือชนิด NaCl และ KCl แต่ภายใต้สภาวะที่สอง (รูปภาพ 4.4.1 ข) นั้นสามารถตรวจจับสัญญาณของโปรตีนเป้าหมายที่ราว 33 KD ได้ทั้งในส่วนของ Crude extract และ Soluble extract ภายใต้อาหารเครียดจากเกลือชนิด NaCl และ KCl โดยพบว่าแถบโปรตีนที่สนใจจากสภาวะเกลือชนิด NaCl นั้นมีความเข้มของแถบโปรตีนที่มากกว่าแถบโปรตีนจากเกลือชนิด KCl แต่อย่างไรก็ตามสัญญาณที่ได้ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองชนิดยังคงมีการแสดงออกที่น้อยกว่าแถบสัญญาณจากสภาวะปกติ

(ก)





ภาพที่ 4.4.1 ผลจากการทำเวสเทิร์น บลอตหึ่ง โดยความเข้มข้นของโปรตีนคือ 20 ไมโครกรัม

(ก) ผลจากการทำเวสเทิร์น บลอตหึ่งจากสภาวะแรก

M: โปรตีนมาร์กเกอร์ DynaMarker® Protein Multicolor III

+: positive control (MAT enzyme)

1: *pSyn_6* vector จากส่วนCrude extractของสภาวะปกติ

2: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะปกติ

3: *pSyn_6* vector จากส่วนCrude extract ของสภาวะ NaCl 0.35M

4: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะ NaCl 0.35M

5: *pSyn_6* vector จากส่วนCrude extract ของสภาวะ KCl 0.35M

6: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะ KCl 0.35M

7: *pSyn_6* vector จากส่วน Soluble extract ของสภาวะปกติ

8: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะปกติ

9: *pSyn_6* vector จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ NaCl 0.35M

10: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ NaCl 0.35M

11: *pSyn_6* vector จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ KCl 0.35M

12: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ KCl 0.35M

(ข) ผลจากการทำเวสเทิร์น บลอตหึ่งจากสภาวะที่สอง

M: โปรตีนมาร์กเกอร์ DynaMarker® Protein Multicolor III

1-2: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะปกติ

3-4: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะ NaCl 0.3M

5-6: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วนCrude extract ของสภาวะ KCl 0.3M

7-8: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะปกติ

9-10: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ NaCl 0.3M

11-12: *SynMAT/pSyn_6* จากส่วน Soluble extract ของสภาวะ KCl 0.3M

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ทั้งสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ซึ่งมีการทำพันธุวิศวกรรมให้มีการแสดงออกเกิน (Overexpression) ของ เอนไซม์ MAT ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl และ KCl โดยพบว่าภายใต้สภาวะแรกที่มีความเข้มข้นของเกลือทั้งสองชนิดเป็น 0.35 M และทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันนั้นพบการฟอกจากสี (bleaching) ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิด KCl แต่ไม่พบการ bleaching ของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิด NaCl แต่อย่างไรก็ตามในเกลือชนิด NaCl นั้นพบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีสีเขียวจางกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นที่ 0.35M และการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันนั้นอาจเป็นสภาวะที่รุนแรงเกินไปในการเลี้ยงจึงพบการจางลงของสีและการ bleaching หลังจากลองปรับความเข้มข้นของเกลือลงเป็น 0.3 M รวมถึงการลดจำนวนวันในการเลี้ยงลงเป็น 5 วันสำหรับการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือภาวะที่สองซึ่งจากความผิดพลาดของผู้ทดลองทำให้มีเพียงผลของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* เท่านั้น พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ภายใต้การเลี้ยงไม่พบการ bleaching ของเซลล์เกิดขึ้นในเกลือทั้งสองชนิด โดยไซยาโนแบคทีเรียยังคงมีสีเขียวอยู่และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเกลือชนิด NaCl และ KCl ของสภาวะนี้พบว่าที่เกลือชนิด KCl นั้นส่งผลให้สีของไซยาโนแบคทีเรียจางลงมากกว่าสภาวะที่มีเกลือชนิด NaCl ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Janchot และคณะ ที่กล่าวว่าเกลือชนิด NaCl นั้นมีความเป็นพิษต่อจุลสาหร่ายมากกว่าเกลือชนิด KCl จากการที่เกลือชนิด NaCl และ KCl สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว (ROS) ในสิ่งมีชีวิตดังกล่าวได้ 81% และ 50% ตามลำดับ รวมไปถึงในงานวิจัยนี้กล่าวว่า แคทไอออนของโพแทสเซียม จาก KCl ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของคาร์บอนเมแทบอลิซึมปฐมภูมิได้ แต่ไม่พบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงคาร์บอนเมแทบอลิซึมปฐมภูมิดังกล่าวในเกลือชนิด NaCl (Janchot และคณะ, 2019) จากการส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วนของคาร์บอนเมแทบอลิซึมปฐมภูมิดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากในงานวิจัยของ Janchot และคณะ ที่ได้มีการใช้จุลสาหร่ายในการศึกษาคือ *Chlorococcum* sp. strain TISTR 9500 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการใช้จุลสาหร่ายคือ *Synechococcus elongatus* PCC7942 จากความแตกต่างในส่วนของคุณสมบัติของจุลสาหร่ายดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ผลการทดลองในครั้งนี้แตกต่างจากในงานวิจัยของ Janchot และคณะ เนื่องจากเมแทบอลิซึมในจุลสาหร่ายต่างชนิดกันอาจมีความแตกต่างกันและส่งผลให้เกิดการตอบสนองภายใต้เกลือชนิดเดียวกันแตกต่างกันได้ จากการสังเกตเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถยืนยันการอยู่รอดของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียได้จึงได้มีการติดตามวัดค่าการเจริญและค่าปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีร่วมด้วย

โดยจากการวัดค่าการเจริญและสารสีด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรีพบว่าภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองสภาวะของการเลี้ยงนั้นค่าการเจริญและปริมาณสารสียังคงน้อยกว่าที่วัดได้ในสภาวะปกติ และในสภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl พบว่าให้ผลของการเจริญและค่าปริมาณสารสีที่สูงกว่าในเกลือชนิด KCl ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการเจริญรวมถึงค่าปริมาณสารสีภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิดเดียวกันของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.3 M ของสภาวะที่สองให้ค่าสูงกว่าที่ 0.35 M ของสภาวะแรกทำให้สามารถกล่าวได้ว่าความเข้มข้นและชนิดของเกลือรวมถึงจำนวนวันในการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย แต่ทั้งนี้สภาวะความเข้มข้นของเกลือที่ 0.3 M และการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันนั้นยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงที่สุดอาจจำเป็นต้องมีการทดลองหาสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมต่อไปในอนาคต ส่วนสำหรับค่าการเจริญและค่าปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ในสภาวะแรกที่สูงกว่าในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* ในทุกอาหารที่ใช้เลี้ยงนั้นอาจเนื่องมาจากรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสงของไซยาโนแบคทีเรียที่ประกอบด้วยลิพิดและกรดไขมันต่างๆเป็นองค์ประกอบซึ่งเมื่อมีการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้ภาวะเครียดจะส่งผลให้เกิดการทำลายรงควัตถุดังกล่าวเกิดขึ้น (Aizouq และคณะ, 2020) แต่จากการที่ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* นั้นมีการ Overexpression ของเอนไซม์ MAT เอนไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการสังเคราะห์ลิพิดและกรดไขมันต่างๆ ซึ่งอาจทำให้มีส่วนในการสังเคราะห์ลิพิดและกรดไขมันขึ้นทดแทนในส่วนที่ถูกทำลายได้จึงส่งผลให้ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ยังคงมีค่าสารสีที่สูงกว่าในสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และจากการที่มีสารสีต่างๆที่สูงกว่าจึงอาจนำไปสู่การเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่เพิ่มมากขึ้นและนำไปสู่การเจริญที่สูงขึ้นด้วย

สำหรับในส่วนของการวัดความยาวและลักษณะของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus elongatus* PCC7942 ทั้งสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* และสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* พบว่าที่สภาวะแรกไซยาโนแบคทีเรียภายใต้การเลี้ยงในอาหารที่มี NaCl 0.35 M นั้นส่งผลให้เซลล์มีความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสภาวะปกติทั้งสองสายพันธุ์ รวมถึงยังคงสังเกตเห็นเซลล์ที่มีสีเขียวได้อยู่ แต่สำหรับไซยาโนแบคทีเรียภายใต้การเลี้ยงในอาหารที่มี KCl 0.35 M นั้นพบว่าเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีความยาวเฉลี่ยที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติและพบการฟอกจากสีของเซลล์อย่างเห็นได้ชัดจากการไม่พบเซลล์เป็นสีเขียว และสำหรับการเปรียบเทียบภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิดเดียวกันที่สภาวะแรกนี้พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* มีค่าความยาวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* สำหรับสภาวะที่มีเกลือชนิด NaCl โดยพบว่ามีความยาวที่เพิ่มขึ้นประมาณเกือบสองเท่าที่สภาวะนี้ และที่สภาวะเกลือชนิด KCl พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* มีค่าความยาวเฉลี่ยน้อยกว่าสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* สำหรับในส่วนของการวัดค่าการเจริญและค่าปริมาณสารสีของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.3 M นั้นมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ

2.5 เท่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ และภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.3 M พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันแต่น้อยกว่าภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือชนิด NaCl 0.3 M นอกจากนี้เซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้เกลือทั้งสองชนิดที่สภาวะที่สองยังสามารถสังเกตเห็นเซลล์เป็นสีเขียวได้อย่างชัดเจน แต่จากข้อผิดพลาดในการทดลองจึงทำให้ไม่มีผลในส่วนของไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* จึงไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างไฮยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่สภาวะนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเกลือและความเข้มข้นของเกลือส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของความยาวเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียได้โดยที่สภาวะที่สองภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือ NaCl 0.3 M เป็นเวลา 5 วันส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของขนาดความยาวเซลล์ได้มากที่สุด ซึ่งขนาดของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงนี้อาจส่งผลต่อการสังเคราะห์ลิพิดและไขมันที่อาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ ทั้งนี้อาจมีการศึกษาและวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของการสังเคราะห์ไขมันที่ผลิตได้ต่อไป

ในส่วนของการติดตามการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ Acyl-lipid เมแทบอลิซึม ด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตติง จากการที่ก่อนหน้านี้มีงานวิจัยกล่าวว่ายีนบางยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต Acyl-lipid จะมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียด (Babele และคณะ, 2019) โดยพบว่าจากการทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรกซึ่งความเข้มข้นของเกลือทั้งสองชนิดคือ 0.35 M และทำการเลี้ยงเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นเวลา 7 วันก่อนการสกัดโปรตีนมาตรวจติดตามด้วยวิธีการดังกล่าว ภายหลังจากการทำเวสเทิร์น บลอตติง พบว่าไม่พบสัญญาณของโปรตีนที่สนใจภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองชนิด ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของเกลือและจำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือที่มากเกินไป ทำให้สภาวะดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MAT และสำหรับผลการติดตามการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ด้วยวิธีเวสเทิร์น บลอตติง ที่สภาวะที่สองซึ่งเป็นสภาวะที่ได้มีการปรับลดค่าความเข้มข้นของเกลือและจำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียลงเป็น 0.3 M เป็นเวลา 5 วันนั้นพบว่าสามารถตรวจจับสัญญาณของแถบโปรตีนที่สนใจได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 33 KD ได้ทั้งในส่วน of crude extract และ soluble extract รวมไปถึงทั้งจากสภาวะเกลือชนิด NaCl และ KCl โดยพบว่าที่สภาวะเครียดจากเกลือ NaCl 0.3 M นั้นให้สัญญาณของแถบโปรตีนที่สนใจเข้มกว่าที่สภาวะเครียดจากเกลือชนิด KCl 0.3 M แต่อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่สนใจดังกล่าวจากสภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองชนิดยังคงให้แถบสัญญาณที่น้อยกว่าที่สภาวะปกติ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าเกลือชนิด NaCl นั้นส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ได้ดีกว่า เกลือชนิด KCl แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.3 M นั้นอาจยังไม่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ซึ่งจำเป็นต้องมีศึกษาและปรับในส่วนของความเข้มข้นของเกลือหรือจำนวนวันที่ใช้ในการเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียต่อไปในอนาคต

ทั้งนี้สำหรับแผนงานในอนาคตเพิ่มเติมที่อาจช่วยให้สามารถมีความรู้ความเข้าใจในส่วนของการผลิตได้จากไฮยาโนแบคทีเรียภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองชนิดนั้นอาจสามารถทำได้โดย

อ้างอิงวิธีการศึกษาลิพิดในไซยาโนแบคทีเรียจากงานวิจัยของ Aizouq และคณะ ที่ได้มีการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของลิพิดที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียด้วย Q-TOF mass spectrometer และ Thin layer chromatography (TLC) ซึ่งจะช่วยให้อาจสามารถจำแนกชนิดของลิพิดและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรีย

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรค Covid-19 ที่เกิดขึ้นทำให้ทางผู้วิจัยไม่สามารถปฏิบัติการทดลองได้ตามปกติ จึงทำให้ขาดผลการทดลองในส่วนของการแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดจากการเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *pSyn_6 vector* ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สอง โดยหากได้มีการแก้ไขในส่วนดังกล่าวและได้มีการทดสอบทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของเอนไซม์ MAT ที่สภาวะนี้ได้สำเร็จ ผลที่คาดว่าจะได้รับคือ ในส่วนของการเจริญและปริมาณสารสีน้ำตาลในสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* เมื่อเปรียบเทียบภายใต้การเลี้ยงด้วยเกลือชนิดเดียวกัน ต่อมาในส่วนผลค่าความยาวของเซลล์นั้นคาดว่าจะมีค่าความยาวที่เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือทั้งสองชนิดแต่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *SynMAT/pSyn_6* ภายใต้เกลือชนิดเดียวกัน และในส่วนของเวสเทิร์น บลอตทิง นั้นไม่สามารถตรวจจับสัญญาณได้เช่นเดียวกับที่สภาวะแรก โดยผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับนี้อ้างอิงจากผลที่ได้ในสภาวะแรก

เอกสารอ้างอิง

1. Aizouq, M., Peisker, H., Gutbrod, K., Melzer, M., Holzl, G., Dormann, P. (2020). "Triacylglycerol and phytyl ester synthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **117**(11): 6216-6222.
2. Atikij, T., Syaputri, Y., Iwahashi, H., Praneenararat, T., Sirisattha, S., Kageyama, H. and Waditee-Sirisattha, R. (2019). "[.]" Marine Drugs **17**(8).
3. Babel, P. K., Kumar, J. and Chaturvedi, V. (2019). "Proteomic De-Regulation in Cyanobacteria in Response to Abiotic Stresses." **10**(1315).
4. de Marsac, N. T. and Houmard, J. (1988). "[34] Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra." Methods in Enzymology, Academic Press. 167: 318-328
5. Elanskaya, I. V., Zlenko D. V., Lukashev E. P., Suzina N. E., Kononova I. A. and Stadnichuk I. N. (2018). "Phycobilisomes from the mutant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 missing chromophore domain of ApcE." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1859**(4): 280-291.
6. Gonzalez, M., Figueredo, F., Figuerola, E., Saavedra, A., Erijman, L., Corton, E. (2018). Genetic Approaches for Improving Performance of Microbial Fuel Cells: Part A: 243-285.
7. Janchot, K., Rauytanapanit, M., Honda, M., Hibino, T., Sirisattha, S., Praneenararat, T., Kageyama, H. and Waditee-Sirisattha, R. (2019). "Effects of Potassium Chloride-Induced Stress on the Carotenoids Canthaxanthin, Astaxanthin, and Lipid Accumulations in the Green Chlorococcal Microalga Strain TISTR 9500." Journal of Eukaryot Microbiol **66**(5): 778-787.

8. Kato, A., Use, K., Takatani, N., Ikeda, K., Matsuura, M., Kojima, K., Aichi, M., Maeda, I. S., Omata, T. (2016). "Modulation of the balance of fatty acid production and secretion is crucial for enhancement of growth and productivity of the engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*." Biotechnology for Biofuels 9(1): 91
9. Kumar, J., Singh, D., Tyagi, B. M., Kumar, A. (2018). Cyanobacteria: Applications in Biotechnology: 327-346.
10. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
11. Li-Beisson, Y., et al. (2019). "The lipid biochemistry of eukaryotic algae." Progress in Lipid Research 74: 31-68.
12. Machida, S., Shiraiwa, Y. and Suzuki, I. (2016). "Construction of a cyanobacterium synthesizing cyclopropane fatty acids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1861(9, Part A): 980-987.
13. Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Darzins, A. and Posewitz, M. C. (2010). "Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production." Eukaryotic Cell. 9(4): 486.
14. Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K.W., Han, C. S., Rubin, E. M., Eisen, J. A., Woyke, T., Gugger, M. and Kerfeld, C. A. (2013). "Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing." Proceedings of the National Academy of Sciences 110(3): 1053.
15. Timmons, T.M., Dunbar B.S. (1990). "Protein blotting and immunodetection." Method in Enzymology. 182: 679-688

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 +10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของยา Spectinomycin ปริมาตร 1 ลิตร สำหรับเลี้ยง
Synechococcus elongatus PCC7942 ภายใต้ภาวะปกติ

สารละลาย BG11

NaNO ₃	1.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.04	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.036	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.02	กรัม
EDTA.2Na	0.01	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.006	กรัม

สารละลายแร่ธาตุ

H ₃ BO ₃	2.83	กรัม
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81	กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22	กรัม
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.39	กรัม
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.049	กรัม

ยาปฏิชีวนะ

Spectinomycin	10.00	ไมโครลิตร
---------------	-------	-----------

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยง *Synechococcus elongatus* PCC7942 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

ปริมาณ 1 ลิตร

ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl 0.35 โมลาร์

สารละลาย BG11	ตามสูตรในสภาวะปกติ
สารละลายแร่ธาตุ	ตามสูตรในสภาวะปกติ
NaCl	20.45 กรัม
ยาปฏิชีวนะ Spectinomycin	10.00 ไมโครลิตร

ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl 0.3 โมลาร์

สารละลาย BG11	ตามสูตรในสภาวะปกติ
สารละลายแร่ธาตุ	ตามสูตรในสภาวะปกติ
NaCl	17.53 กรัม
ยาปฏิชีวนะ Spectinomycin	10.00 ไมโครลิตร

ภาวะเครียดจากเกลือ KCl 0.35 โมลาร์

สารละลาย BG11	ตามสูตรในสภาวะปกติ
สารละลายแร่ธาตุ	ตามสูตรในสภาวะปกติ
KCl	26.09 กรัม
ยาปฏิชีวนะ Spectinomycin	10.00 ไมโครลิตร

ภาวะเครียดจากเกลือ KCl 0.3 โมลาร์

สารละลาย BG11	ตามสูตรในสภาวะปกติ
สารละลายแร่ธาตุ	ตามสูตรในสภาวะปกติ
KCl	22.37 กรัม
ยาปฏิชีวนะ Spectinomycin	10.00 ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน หากต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เติมนงอะกาโรส 12 กรัม แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อภายในตูบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการใส่ยาปฏิชีวนะ ต้องใส่ขณะที่อาหารมีอุณหภูมิอุ่น ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะคือ 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำโซเดียมซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

1. 30% อะคริลาไมด์ และ 0.8 บิสอะคริลาไมด์ (bis acrylamide)

อะคริลาไมด์	29.2	กรัม
-------------	------	------

N, N' เมทิลีน บิส อะคริลาไมด์	0.8	กรัม
-------------------------------	-----	------

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปราศจากไอออนให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	18.17	กรัม
---------------------------------	-------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	6.06	กรัม
---------------------------------	------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายบัฟเฟอร์ ทริส ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0

Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.21	กรัม
---------------------------------	------	------

ละลาย Trisma base ในน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ของสารละลายให้เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 %

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	15	กรัม
----------------------------	----	------

น้ำปราศจากไอออน	150	มิลลิลิตร
-----------------	-----	-----------

6. สารละลายเซพาราติงเจล (Separating gel) ความเข้มข้น 10%

น้ำปราศจากไอออน	7.12	มิลลิลิตร
-----------------	------	-----------

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	4.5	มิลลิลิตร
---	-----	-----------

10% SDS	180	ไมโครลิตร
---------	-----	-----------

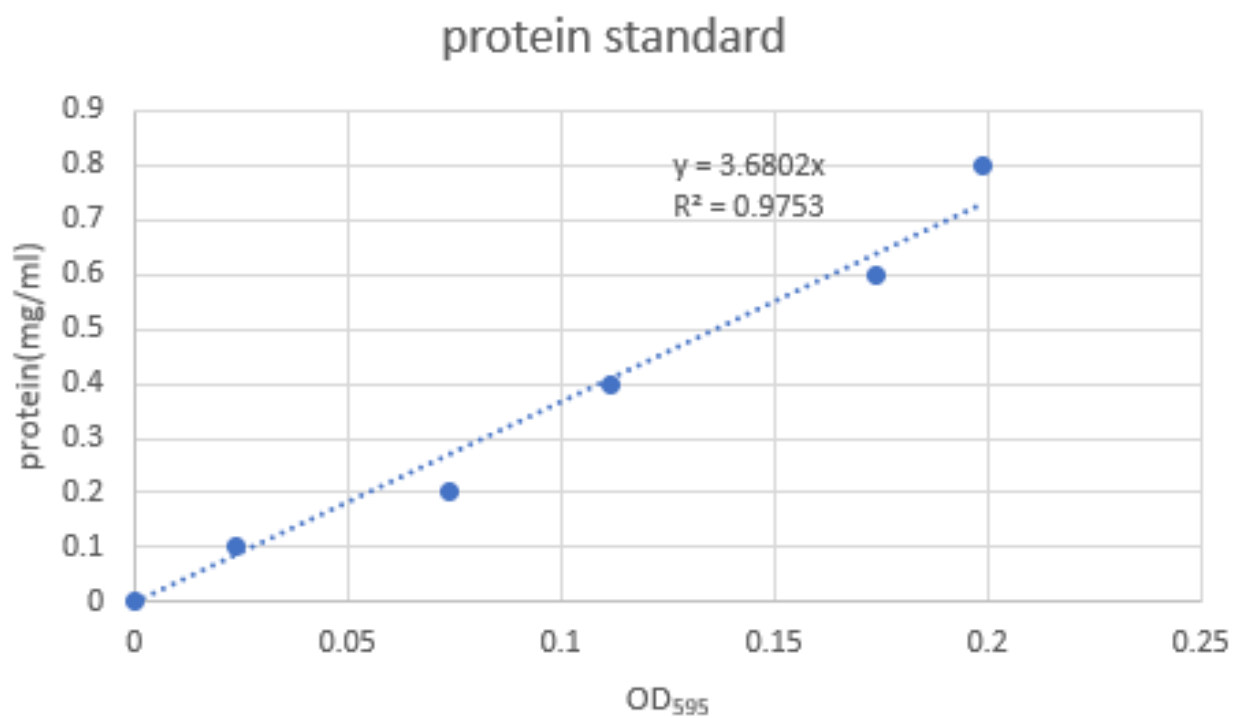
30% อะคริลาไมด์	6	มิลลิลิตร
TEMED	15	ไมโครลิตร
APS (Ammonium persulphate)	50	ไมโครลิตร
7. สารละลายสแต็กกิงเจล (Stacking gel) ความเข้มข้น 5%		
น้ำปราศจากไอออน	2.8	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	1.25	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
30% อะคริลาไมด์	0.83	มิลลิลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร
APS (Ammonium persulphate)	50	ไมโครลิตร
8. สารละลายบัฟเฟอร์โปรตีนตัวอย่าง 4X (4X protein loading buffer)		
สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 6.8	0.6	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	2	มิลลิลิตร
1% บรอมฟีโนลบลู	1	มิลลิลิตร
50% กลีเซอรอล	5	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	0.9	มิลลิลิตร
9. สารละลายรันนิ่งบัฟเฟอร์ 10X (10X Running buffer)		
Trisma base ($C_4H_{11}NO_3$)	30.2	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม
โซเดียมลอริลซัลเฟต (Sodium lauryl sulfate)	10	กรัม
ผสมสารแต่ละชนิดให้เข้ากันด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำสารละลายไปใช้ ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ		

ภาคผนวก ค.

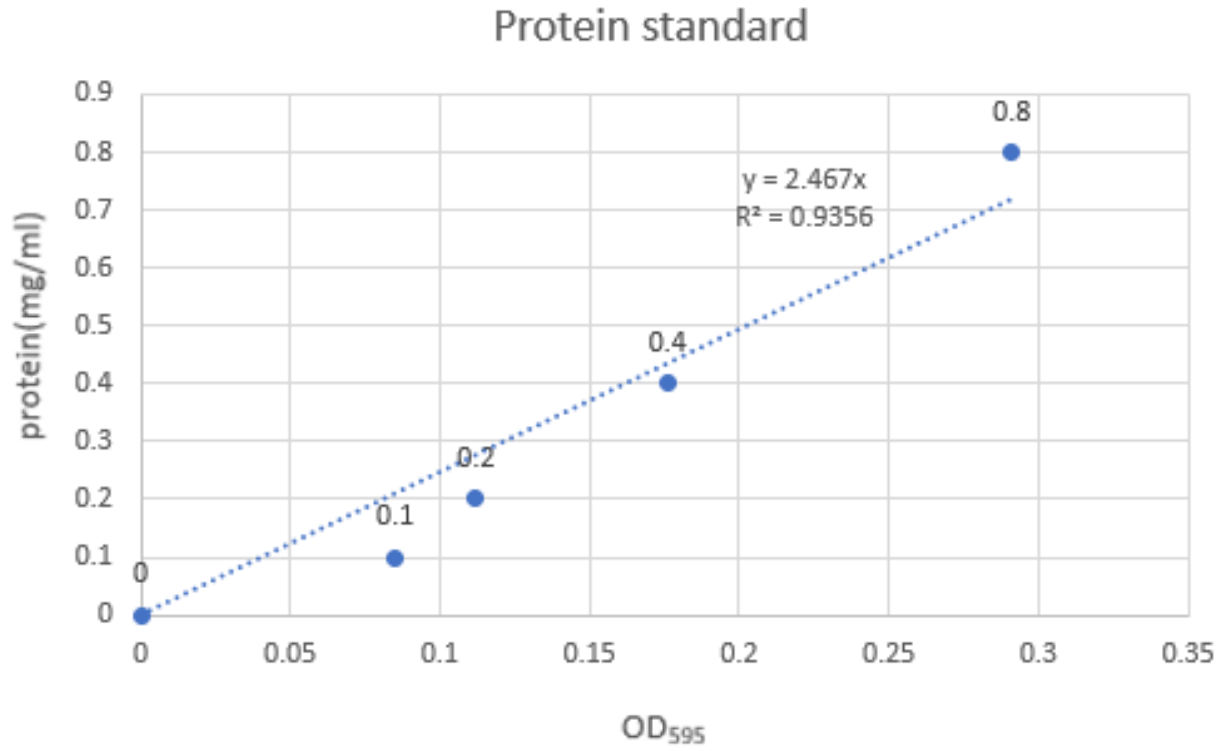
กราฟมาตรฐานโปรตีน

สำหรับวัดความเข้มข้นของโปรตีนในวิธี แบริดฟอร์ด

1. ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะแรกที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.35 โมลาร์



2. ภาวะเครียดจากเกลือสภาวะที่สองที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.3 โมลาร์



ภาคผนวก ง.

วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับทำเวสเทิร์น บลอททิง

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X (Phosphate buffer saline: PBS) pH 7.4

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปลอดประจุ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl หรือ NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. สารละลาย 0.1% Tween 20 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X

Tween 20	1	มิลลิลิตร
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X	1	ลิตร

3. Blocking solution

ผง Skim milk	5	กรัม
สารละลาย 0.1% Tween 20 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 1X	100	มิลลิลิตร

4. สารละลายบัฟเฟอร์เวสเทิร์นบลอททิง

Tris base	3	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมธานอล	200	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน	800	มิลลิลิตร