



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสฮิสทีดีน ไคเนส
ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418

ชื่อนิสิต นางสาวพรณิชา แสนพินิจ รหัสประจำตัว 6032333023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสฮิสติดีน ไคเนส
ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418
Gene expression analysis of histidine kinase under salt stress
in *Halotheca* sp. PCC7418

ชื่อนิสิต นางสาวพรณิชา แสนพินิจ เลขประจำตัว 6032333023

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสฮิสติดีน ไคเนส

ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418

โดย

นางสาวพรณิชา แสนพินิจ

รหัสประจำตัวนิสิต 6032333023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถิ สิริศรีธธา

ปีการศึกษา

2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่ง ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดิถิ สิริศรีธธา)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน เจริญพรวัฒนา)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสฮิสติดีน ไคเนส
ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418

Gene expression analysis of histidine kinase under salt stress
in *Halotheca* sp. PCC7418

นิสิตในโครงการ

นางสาวพรณิชา แสนพินิจ

รหัสประจำตัวนิสิต 6032333023

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดีถิ์ สิริศรัทธา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสฮิสติดีน ไคเนส
ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือใน *Halotheca* sp. PCC7418

นิสิตผู้เสนอโครงการ นางสาวพรณิชา แสนพินิจ รหัสประจำตัวนิสิต 6032333023

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในธรรมชาติไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เนื่องจากความสามารถในการปรับตัวพฤติกรรมของเซลล์โดยควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างถูกต้องและทันเวลาเพื่อปรับให้เข้ากับการรบกวนของสิ่งแวดล้อมต่างๆ หนึ่งในนั้นคือ ไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 ที่จัดเป็นเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง โดยใช้กลไกหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เซลล์อยู่รอดในภาวะดังกล่าวคือ ระบบการถ่ายทอดสัญญาณสององค์ประกอบ (two-component system; TCS) ซึ่งประกอบด้วย ฮิสติดีนไคเนส (histidine kinase; HK) เป็นเซ็นเซอร์ตัวส่งสัญญาณและตัวควบคุมการตอบสนอง (response regulator; RR) เป็นตัวรับสัญญาณ ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนของไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดจากเกลือ จากการสืบค้นข้อมูลจีโนมของ *Halotheca* sp. PCC7418 พบว่ามียีนกำหนดรหัส HK ทั้งหมด 17 ยีน ได้แก่ PCC7418_0715, PCC7418_0766 , PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3282, PCC7418_3344, PCC7418_3363 และ PCC7418_3509 โดยในการศึกษานี้ได้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR ภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ พบว่า การแสดงออกของยีน PCC7418_0715, PCC7418_0766 , PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7418_2832, , PCC7418_3344 และ PCC7418_3363 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น และการแสดงออกของยีน PCC7418_3282 และ PCC7418_3509 มีการแสดงออกลดลง ซึ่งผลจากทดลองในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า HK มีส่วนเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของ *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

Project title Gene expression analysis of histidine kinase under salt stress
in *Halothece* sp. PCC7418

Investigator Miss Pornnicha Sanpinit student ID 6032333023

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

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

In nature, cyanobacteria can be found in a wide variety of environments. Because of their ability to modulate cellular behavior by regulating gene expression accurately, and in time to adapt to various environmental interference. One of them is cyanobacterium *Halothece* sp. PCC7418 is classified as an extremophilic cyanobacterium, which can grow under high salinity environments. One of the key mechanisms for cell survival in these conditions is a two-component system; TCS, which is usually composed of histidine kinase (HK) acting as a sensor, and cognate response regulator (RR) acting as a receiver. TCS regulates the expression of cyanobacterial genes in response to salt stress. From the entire genome analysis of *Halothece* sp. PCC7418, 17 putative genes encoding HK were found, including PCC7418_0715, PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2200., PCC7418_3344, PCC7418_3363 and PCC7418_3509. In this study, the expression of genes encoding HK by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) under high salinity condition (2M NaCl) showed that PCC7418_0715, PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7432_1831, PCC7418_2831, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7432_1832_1831 were up-regulated under high-salinity condition and the expression of the PCC7418_3282 and PCC7418_3509 were down-regulated under high salinity condition. The experimental results in this study showed that HK was involved in the adaptation of *Halothece* sp. PCC7418 under salt stress.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดีถิ์ สิริศรัทธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้คำแนะนำและคำปรึกษา ทั้งในด้านการวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง และการอภิปรายผลการทดลอง รวมถึงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด รวมถึงช่วยเหลือและวางแผนการทำงานในระหว่างสถานการณ์การแพร่ระบาดของไวรัสโรค COVID-19 ซึ่งเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ในรายวิชาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และให้การแนะนำต่างๆตลอดการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุน

ขอขอบคุณรุ่นพี่ในห้องวิจัยทั้งในห้องวิจัย 1904/17 และห้องอื่นๆ ในภาควิชา ขอขอบคุณรุ่นพี่ในห้องวิจัยทั้งในห้องวิจัย 1904/17 และห้องอื่นๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนถ่ายทอดเทคนิค วิธีการทดลองอันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆนิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 44 ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาระหว่างการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ได้ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบสำเร็จ	
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง	8
2.2 เคมีภัณฑ์	9
2.3 ชุดทดลองสำเร็จ	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	
3.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Histidine kinase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	11
3.1.1 วิเคราะห์ Architecture domain ของ Histidine kinase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	11
3.1.2 การหา Gene Ontology (GO) function ของ Histidine kinase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	11
3.1.3 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส Histidine kinase	11
3.2 การออกแบบไพรเมอร์	12

เรื่อง	หน้า
3.3 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ในภาวะปกติ	
3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418	12
3.3.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในภาวะเครียด	12
3.3.3 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress)	13
3.4 การสกัด total RNA	13
3.4.1 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส (electrophoresis)	14
3.5 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA	14
3.6 Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Histidine kinase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	52
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก ก	
สูตรอาหาร BG-11 + turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติ	57
สูตรอาหาร BG-11 + turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือ	58
การเตรียม 10X tris-Acetate-EDTA (TAE)	59
การเตรียม 1.2% agarose gel	59
การเตรียม 0.1% DEPC water	59

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส Histidine kinase ใน *Halothece* sp. PCC7418 60

ภาคผนวก ค

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA 75

ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band ที่ได้จากการทำ PCR 75

ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ทางสถิติด้วยโปรแกรม

SPSS v22 82

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1.1 แสดงโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย	1
ภาพที่ 1.2 แสดงระบบสององค์ประกอบของ His-Asp ที่รวมไปถึงเซ็นเซอร์และฮิสทีดีนไคเนส และระบบควบคุมการตอบสนอง	6
ภาพที่ 1.3 แสดง His-Asp-His-Asp phosphorelay รวมทั้งฮิสทีดีนไฮบริดตัวเชื่อมที่มีโดเมน Hpt และตัวควบคุมการตอบสนอง	6
ภาพที่ 3.1 : แผนผังการดำเนินการทดลอง	16
ภาพที่ 4.1 : การตอบสนองต่อการควบคุมไปยังตัวควบคุมที่สองของในระบบรีเลย์แบบ His-Asp-His	17
ภาพที่ 4.2 : เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ	40
ภาพที่ 4.3 : เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Halotheca</i> sp. PCC7418 เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียด	41
ภาพที่ 4.4 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น	44
ภาพที่ 4.5 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น	45
ภาพที่ 4.6 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น	46
ภาพที่ 4.7 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น	47
ภาพที่ 4.8 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลง	49

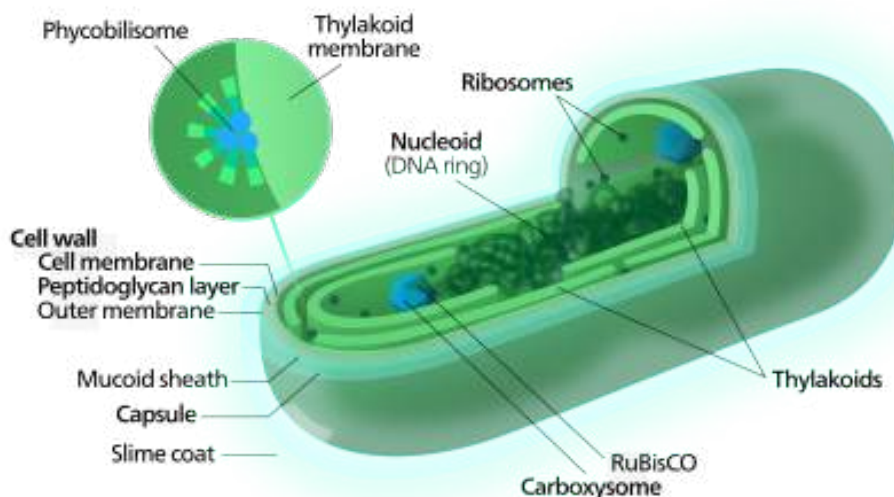
สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 4.1 : การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ HK และผลวิเคราะห์ GO function ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	19
ตารางที่ 4.2 : แสดงแผนภาพรูปแบบโดเมนของยีนกำหนดรหัส HK ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	23
ตารางที่ 4.3 : ไพรมเมอร์สำหรับวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	38

บทที่ 1

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบสังเคราะห์แสงที่มีขนาดใหญ่และมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา (Ashby, 2006) มีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนานและมีความสำคัญต่อระบบนิเวศ โดยมีลักษณะเป็นเซลล์โพรคาริโอต กล่าวคือ ไม่มีเยื่อนิวเคลียส, มีสารพันธุกรรมเป็น circular DNA ลอยอยู่ในไซโทพลาสซึม และมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) รวมทั้งสามารถสังเคราะห์แสงได้ แต่ไม่มีโครงสร้างของคลอโรพลาสต์ แต่สังเคราะห์แสงได้โดยใช้คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี, แคโรทีนอยด์, แซนโทฟิลล์, ไฟโคอิริทริน, ไฟโคบิลิน และไฟโคไซยานิน ซึ่งจะกระจายตัวอยู่ในไซโทพลาสซึมจึงทำให้มองเห็นเป็นเซลล์สีเขียวแกมน้ำเงิน มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแบ่งตัวแบบไบนารีฟิชชันจากหนึ่งเป็นสอง



ภาพที่ 1.1 : แสดงโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

(ที่มา: Kelvevinsong via Wikipedia.org under licensed of Wikimedia commons)

ในธรรมชาติไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันตั้งแต่บริเวณที่มีความเยือกเย็น, ความร้อนจัด, ความเป็นด่างและกรด, มหาสมุทรน้ำเค็มและน้ำจืด, สภาพแวดล้อมบนบกและทางชีวภาพ (Ashby และ Houmard, 2006) อาจเนื่องมาจากความสามารถในการปรับตัวกรรมของเซลล์โดยควบคุมการแสดงออกของยีน อย่างถูกต้องและทันเวลาเพื่อปรับให้เข้ากับการรบกวนของสิ่งแวดล้อมต่างๆ การตอบสนองของเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียต่อปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress), ความเครียดออสโมติก (osmotic stress), ความเครียดจากเกลือ (salt stress), ความเครียดจากฟอสเฟต (phosphate stress),

ความเครียดจากไอออนของโลหะหนัก (heavy metal ion stress), ความเครียดจากกรด (acid stress), ความขาดแคลนไนโตรเจน (nitrogen starvation), ความเครียดจากความเย็น (cold stress), ภาวะช็อกจากความร้อน (heat shock) และความเครียดจากแสงสูง (high light stress) (Lei และ Weiwen, 2020) ดังนั้นการทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกที่ไซยาโนแบคทีเรียใช้ในการรับรู้และปรับตัวให้เข้ากับ ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันจึงเป็นสิ่งสำคัญ

หนึ่งในระบบการถ่ายโอนสัญญาณ (signal transduction systems) ที่สำคัญในจุลินทรีย์ คือ ระบบการถ่ายทอดสัญญาณสององค์ประกอบ (two-component system จากนั้นไปจะเรียกว่า TCS) ซึ่งประกอบด้วยฮิสติดีนไคเนส (histidine kinase จากนั้นไปจะเรียกว่า HK) เป็นเซ็นเซอร์ตัวส่งสัญญาณและตัวควบคุมการตอบสนอง (response regulator จากนั้นไปจะเรียกว่า RR) เป็นตัวรับสัญญาณ ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนของจุลินทรีย์เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (Ashby และ Houmard, 2006) HK ตอบสนองต่อสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม จากนั้นเรซิดิวฮิสติดีนที่อนุรักษ์ (conserved histidine residue) จะเกิดการอโต้ฟอสโฟรีเลต จากนั้นจะช่วยให้ HK สามารถจับและถ่ายทอดกลุ่ม phosphoryl เฉพาะของมันไปยังเรซิดิวแอสพาเทตที่อนุรักษ์ (conserved aspartate residue) บน RR ต่อจากนั้น RR จะถูกฟอสโฟรีเลตบนโดเมนตัวรับ โดยปกติจะส่งผลให้เกิดการเปิดใช้งานโดเมนเอาต์พุตที่สามารถสลับกิจกรรมการแสดงออกในยีนต่างๆที่ช่วยให้จุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับสัญญาณภายนอกได้

HK หรือ RR ล้วนเป็นโปรตีนที่มีหลายโดเมน (multidomain protein) ซึ่งโดเมนที่สามารถพบบ่อยที่สุดใน HK คือ GAF, PAS และ PAC ส่วนใน RR จะพบ DNA-binding domain (Treg และ NarL หรือ LuxR) และมีโดเมนบางอย่างที่พบน้อย เช่น CBS, CheB, CheR, CheW ยกเว้น GerR และ LytTR ชนิดที่ไม่พบในโดเมนของแบคทีเรีย ก็จะสามารถพบได้ในโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรีย

HK มีลักษณะเฉพาะด้วยการมีโดเมน HK และโดเมนการรับรู้สัญญาณ แม้ว่าจะมีการค้นพบโดเมนการทำงานทั่วไปจำนวนมากในโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน แต่โดเมนการรับรู้สัญญาณ เช่น GAF และ PAS มักจะมีความหลากหลายมากกว่าโดเมนอื่น ๆ โดเมนเหล่านี้สามารถรับรู้สัญญาณไซโตพลาสซึมโดยตรงหรือสัญญาณถ่ายทอดจากโดเมนประสาทสัมผัสเพอริพลาสซึมไปยังโดเมน DHp และ CA (Wu และคณะ, 2019)

โครงสร้างโปรตีน HK เป็นไดเมอร์โปรตีนและถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาของตัวรับ – ลิแกนด์ (receptor-ligand interaction) (Singh และคณะ, 2015) โปรตีน HK ประกอบด้วยโดเมนที่ได้รับการอนุรักษ์อย่างสูงนั่นคือโดเมน dimerization และ histidine phosphotransfer (DHP) ซึ่งมีฮิสติดีนที่อนุรักษ์ไว้และโดเมน catalytic และ ATP binding (CA) นอกเหนือจากโดเมนการทำงานอื่น ๆ โปรตีน HK ยังมีโดเมนประสาทสัมผัส เช่น HAMP (Histidine Kinase, adenyl cyclase, methyl accepting protein, และ phosphatase), GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenyl cyclase และ FhlA), PAS (Per Arnt Sim), และโดเมนไฟโตโครม สำหรับการตรวจจับสัญญาณแวดล้อมที่หลากหลาย โดยที่หลังจากเซ็นเซอร์ตรวจพบสิ่งกระตุ้นแล้ว สัญญาณจะแพร่กระจายผ่าน TM และโดเมนอื่น ๆ ผ่านการเคลื่อนที่ที่หลากหลายหรืออธิบายว่าเป็นการเคลื่อนที่แบบ piston-like motion, scissoring หรือ helical rotation ไปยัง DHP เฮลิคซ์ จากนั้นโดเมน CA เร่งการถ่ายโอนกลุ่มฟอสโฟริลจากสารตั้งต้นที่เชื่อมกับ ATP ไปยังฟอสโฟแอคเซปเตอร์ฮิสติดีน (phosphoacceptor histidine) ที่อยู่บนเกลียว DHP แรก ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ซึ่งประกอบด้วยสองขั้นตอนของ การตรวจหาสิ่งกระตุ้นและการเพิ่มการทำงานของกิจกรรมอโต้ฟอสโฟริเลชันว่า “การกระตุ้น” สำหรับ RR โดเมนตัวรับที่ได้รับการอนุรักษ์ไว้เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟทรานสเฟอร์ จาก cognate HK ซึ่งการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนกับโปรตีนหรือปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน - ดีเอ็นเอซึ่งเป็นสื่อกลางโดยโดเมน C-terminal effector (หรือเอาท์พุท) ของ RR จึงทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ที่เหมาะสม โดยที่โปรตีน HK มีส่วนที่อนุรักษ์ไว้ ได้แก่ H, N, D, F และ G-box ซึ่งสามารถระบุได้ว่า H box มีฮิสติดีนที่ได้รับฟอสโฟริล ในขณะที่ box N, D, F และ G อยู่ที่ไซต์ที่เชื่อมกับ ATP

โดเมน PAS ถูกระบุในโปรตีนของแบคทีเรีย, แบคทีเรียโบราณ (Archaea) และยูคาริโอต ในแบคทีเรียและแบคทีเรียโบราณมีเพียง HK เท่านั้นที่มีโดเมน PAS มีการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มีโดเมน PAS มากกว่า 200 ชนิดเป็นปัจจัยการถอดรหัส, ตัวแปลงสัญญาณหรือตัวรับ โดเมน PAS มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงหรือโดยอ้อมในการถ่ายทอดสัญญาณโดยมีหน้าที่หลักในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในสภาพแวดล้อมนอกเซลล์หรือภายในเซลล์ โปรตีนบางชนิดมีโดเมน PAS หลายโดเมน การมีโดเมน PAS ที่คล้ายคลึงกันหลายโดเมนในโปรตีนตัวเดียวแสดงให้เห็นว่าโปรตีนสามารถรับสัญญาณที่หลากหลายได้ โดเมน PAS สามารถทำงานร่วมกับองค์ประกอบตัวควบคุมประเภทอื่น ๆ ในโปรตีนเพื่อควบคุมการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณภายนอกเซลล์และสัญญาณภายในเซลล์ (Wu และคณะ, 2019)

โดเมน GAF (cGMP-phosphodiesterase / adenylate cyclase) เป็นโดเมนที่จับกับ cGMP ที่ไม่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ได้รับการอนุรักษ์และเดิมพบใน cyclic nucleotide phosphodiesterases และปัจจุบันพบว่า

โปรตีนสัญญาณอื่น ๆ อีกหลายรายการจากสามโดเมนของสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรีย, แบคทีเรียโบราณ และยูคาริโอต) มีโดเมน GAF และการตรวจสอบโครงสร้างและการทำงานพบว่าโดเมน GAF มีความจำเพาะต่อ cGMP สูงกว่า cAMP บริเวณที่ใช้จับของโดเมน phosphodiesterase GAF ประกอบด้วยเรซิดิวอาร์จินีน, แอสพาราจिन, แอสพาเทต และไลซีนที่อนุรักษ์ แม้ว่า จะมีความคล้ายคลึงกันที่ลำดับกรดอะมิโนต่ำ แต่โครงสร้างของโดเมน GAF ก็มีความคล้ายคลึงกับโดเมน PAS เป็นอย่างมาก ซึ่งบ่งบอกว่ามาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (Wu และคณะ, 2019)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีระบบสัมผัสเพื่อตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและเปิดใช้งานวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง ตัวรับเป็นจุดเริ่มต้นแรกของระบบสัมผัสที่ถ่ายทอดสัญญาณสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยปกติแล้วโปรตีนเคโมรีเซปเตอร์จะจับคู่กับ CheA โคนเสผ่านทาง scaffold หรือ coupler protein CheW เป็นแกนกลางของระบบประสาทสัมผัสเหล่านี้ ในกลไกทางเคมีของแบคทีเรียการประกอบกันของโปรตีนสามชนิดประกอบด้วยตัวรับบนทรานส์เมมเบรน, CheA HK และโปรตีนอะแดปเตอร์ CheW หน้าที่ของคอมเพล็กซ์โปรตีนสามตัวคือการควบคุมการเคลื่อนไหวเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้า

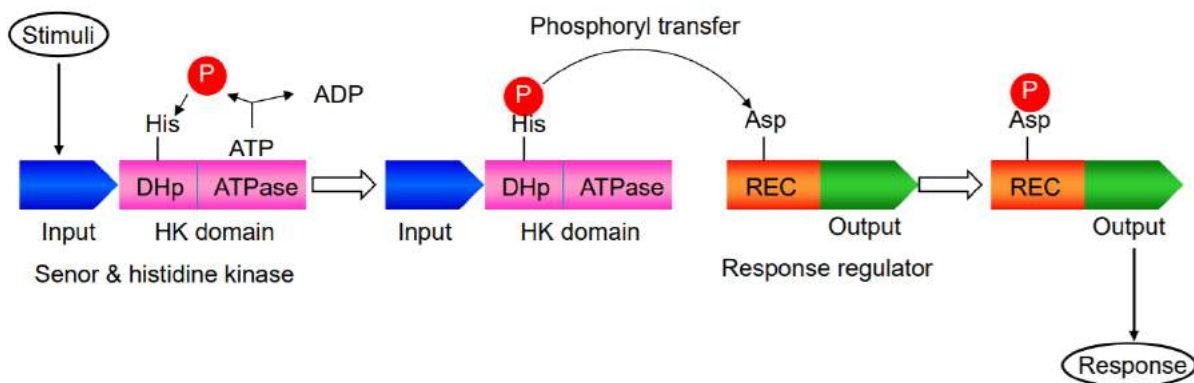
โดเมน CBS มักพบในโปรตีนที่มีโดเมนอื่น ๆ โดเมนเหล่านี้มักเป็นเอนไซม์ตัวขนส่งเมมเบรนหรือโดเมนที่จับกับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามมักพบโปรตีนที่มีเฉพาะโดเมน CBS โดยเฉพาะในโพรคาริโอต โปรตีนโดเมน CBS แบบสแตนด์อโลนเหล่านี้อาจสร้างคอมเพล็กซ์เมื่อจับกับโปรตีนอื่น ๆ เช่น โคนเส ที่ทำปฏิกิริยาและควบคุม

HK โดยส่วนใหญ่คล้ายกับโปรตีนส่งสัญญาณ HK มักจะมีแกนเร่งปฏิกิริยาที่อนุรักษ์ไว้ซึ่งมีโดเมนอินพุทที่หลากหลายและเนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีหลายโดเมนจึงทำให้มีรูปแบบที่มีความหลากหลาย คลาสของ HK แบ่งออกเป็น 6 คลาส (Ashby และ Houmard, 2006) ดังนี้

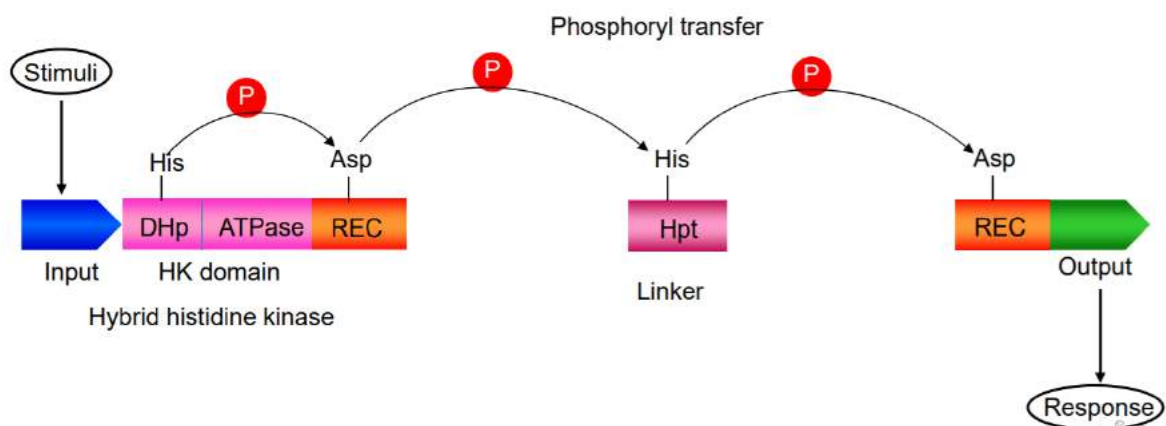
1. **Incomplete HK** เป็นคลาสที่มีเฉพาะโดเมน HisKA เท่านั้น
2. **HK class I kinases (HKIs)** เป็นคลาสที่มีเฉพาะโดเมน HisKA และโดเมน HATP เท่านั้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นโปรตีนพื้นฐาน เช่น ทำหน้าที่เป็นหน่วยการสร้างสำหรับการจัดเรียงโดเมนที่ซับซ้อนมากที่มีอยู่ในไซยาโนแบคทีเรีย
3. **HK class II (HKII)** เป็นคลาสที่มีการเชื่อมต่อกับโดเมน GAF และ / หรือโดเมน PAS หรือโดเมน PAC อย่างใดอย่างหนึ่งหรือมากกว่าเท่านั้น ซึ่งโดเมนเหล่านี้พบเป็นจำนวนมากในแบคทีเรียและยูคาริโอตโดยโดเมน PAS นั้นพบได้บ่อยกว่าโดเมน GAF

4. **HK class III (HKIII)** เป็นคลาสที่มีนอกเหนือจากโดเมน HisKA และโดเมน HATPase คือ โดเมน HAMP (หรือ "linker") โดยทั่วไปจะพบในส่วน downstream จากส่วน TM segment ของโปรตีน
5. **HK class IV (HKIV)** เป็นคลาสที่มีโดเมน N-terminal S / T kinase และโดเมน HK ปลายด้าน C (C-terminal) โดยมีโดเมน GAF อยู่ระหว่าง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ค่อนข้างน่าสนใจเนื่องจากสามารถจับคู่กับ Ser/Thr ไคเนส แอกติวิตี และวิถีทรานสดักชันที่เกี่ยวข้องกับ TCS ได้โดยตรง
6. **HK class V (HKV)** เป็นคลาสที่มีการรวมกันของโดเมนประเภทต่างๆที่เชื่อมกับ HK

ระบบสององค์ประกอบ (TCS) เป็นระบบการถ่ายทอดสัญญาณที่สำคัญซึ่งเป็นสื่อกลางของสัญญาณที่เกิดจากสิ่งเร้าภายในหรือภายนอกเซลล์ในแบคทีเรีย ระบบดังกล่าวไม่เพียงแต่พบในโพรคาริโอตทั้งหมดเท่านั้น แต่ยังพบในยูคาริโอต เช่น พืช ยีสต์และเชื้อรา โดยทั่วไประบบสององค์ประกอบประกอบด้วยสององค์ประกอบที่อาจถูกเข้ารหัสโดยยีนที่อยู่ติดกันคู่หนึ่ง: โปรตีนตัวรับ (HK) ที่ตรวจจับสัญญาณอินพุตและโปรตีนเอฟเฟกต์ (RR) ที่แปลงสัญญาณ ไปสู่กระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่แตกต่างกัน ทั้ง HK และ RR มักมีหลายโดเมน โดยทั่วไป HK จะมีโดเมนส่งสัญญาณที่ปลายด้าน C และโดเมนประสาทสัมผัสอย่างน้อยหนึ่งโดเมนที่ปลายด้าน N โดยที่โดเมนส่งสัญญาณจะประกอบด้วยสองโดเมนย่อย ได้แก่ HisKA / Hpt และ HATPase และโดเมนประสาทสัมผัสตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณสิ่งแวดล้อม ส่วน RR มักมีโดเมนตัวรับที่ปลายด้าน N และโดเมนเอฟเฟกต์ที่หลากหลายที่ปลายด้าน C การรับรู้สิ่งกระตุ้นโดยโดเมนประสาทสัมผัสของ HK จะเปิดใช้งานโดเมนส่งสัญญาณซึ่งสิ่งที่ได้รับการอนุรักษ์เรซิดิวซ์ของ HK เกิดออโต้ฟอสโฟรีเลชัน (autophosphorylation) ฟอสโฟรีเลชัน ช่วยให้ HK สามารถโต้ตอบกับ cognate RR ของระบบผ่านการโต้ตอบระหว่างโดเมนส่งสัญญาณและโดเมนตัวรับ ต่อจากนั้น กลุ่มฟอสโฟรีลเฉพาะจากโดเมนส่งสัญญาณของ HK จะถูกถ่ายโอนไปยังเรซิดิวซ์แอสพาเทตที่ได้รับการอนุรักษ์ไว้ภายในโดเมนตัวรับของ RR Asp ฟอสโฟรีเลชันส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม effector โดยปกติแล้ว จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโดเมนตัวรับและโดเมนเอาต์พุตของ RR (ภาพที่ 1.2) นอกจากนี้ HK และ RR แล้วไคเนสลูกผสมที่มีทั้งโดเมนตัวส่งและโดเมนตัวรับสามารถเกิดขึ้นได้จากการรวมยีน ในไคเนสดังกล่าว กลุ่มฟอสโฟรีลจะถูกถ่ายโอนจากโดเมนส่งสัญญาณไปยังโดเมนตัวรับของโปรตีนเดียวกัน ไคเนสเหล่านี้มักจะเกี่ยวข้องกับฟอสโฟรีเลชันที่ซับซ้อน (His-Asp-His-Asp) ผ่านการทำงานร่วมกันกับโดเมน Hpt บนไคเนสเดียวกันหรือต่างกัน (ภาพที่1.3) สรุปได้ว่าระบบสององค์ประกอบเป็นวิธีการที่หลากหลายและมีประสิทธิภาพในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์การแสดงออกของยีนและสรีรวิทยาของเซลล์เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภายในเซลล์หรือนอกเซลล์



ภาพที่ 1.2 : แสดงระบบสององค์ประกอบของ His-Asp ที่รวมไปถึงเซ็นเซอร์และฮิสทีดีนไคเนสและระบบควบคุมการตอบสนอง (ที่มา: Wu และคณะ, 2019)



ภาพที่ 1.3 : แสดง His-Asp-His-Asp phosphorelay รวมทั้งฮิสทีดีนไฮบริดตัวเชื่อมที่มักจะมีโดเมน Hpt และตัวควบคุมการตอบสนอง (ที่มา: Wu และคณะ, 2019)

ยีนกำหนดรหัส HK และ RR ใน *Halothece* sp. PCC7418 จะกระจายอยู่บนโครโมโซม จีโนม ประกอบด้วยยีนกำหนดรหัสโปรตีน 3708 ยีน (KEGG database: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:T02379) ในบรรดา ยีนเหล่านี้มี 17 ตัวกำหนดรหัส HK ในขณะที่ 41 ตัวกำหนดรหัส RR ซึ่งในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาเกี่ยวกับ HK

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า ระบบสององค์ประกอบ (TCS) โดยเฉพาะ HK มีความสำคัญอย่างมากต่อปรับตัวให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่สุขขี้ของไซยาโนแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสที่ตอบสนองต่อความเครียดจากเกลือ จึงเป็นแนวทางการศึกษาที่น่าสนใจ โดยงานวิจัยนี้มีความสนใจที่ศึกษาการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ภายใต้การตอบสนองต่อความเครียดในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 โดยเลือกใช้ความเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นที่สูงขึ้น (โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์) โดยวิเคราะห์จากการแสดงออกที่ระดับการถอดรหัส ด้วยวิธี Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) หลังจากนั้นเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส HK ระหว่างเซลล์ภายใต้สภาวะปกติและเซลล์ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือด้วยวิธีทางสถิติ

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบสำเร็จ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. โกร่งและที่บด (pestle and mortar)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) บริษัท Olympus (Japan)
3. หลอดทดลอง (glass test tube) บริษัท Pyrex (USA)
4. ขวดแก้วใสสารเคมี (Duran) บริษัท Schott (Germany)
5. ขวดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge bottle)
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. เครื่องปั่นเชื้อแบบเขย่า (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-100TM บริษัท Scientific Industries (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 DocTM 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 Haler (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) บริษัท Biohit Proline tip (Finland), บริษัท NEPTURN (Mexico),
บริษัท Axygen Scientific (China), บริษัท Rainin (USA)
23. ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette) รุ่น Proline Plus บริษัท Sartorius Biohit (Germany)
24. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) บริษัท Sarstedt (Germany)
25. หลอด PCR (PCR tube) บริษัท BIO RAD (USA)

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท Ensure (Germany)
2. โดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Ensure (Germany)
3. แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ensure (Germany)
4. แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ensure (Germany)
5. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Ensure (Germany)
6. ไดโซเดียม เอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก ไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Amresco (USA)
7. กรดซิตริก (Citric acid) บริษัท Ensure (Germany)
8. แอมโมเนียม ไอรอน (III) ซิเตรต (Ammonium iron(III) citrate)
บริษัท Ajax Finechem (New Zealand)
9. กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท Ensure (Germany)
10. แมงกานีส (II) คลอไรด์ เตตระไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
11. ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (New Zealand)
12. แอมโมเนียม โมลิบเดต เตตระไฮเดรต ($(\text{Na}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ensure (Germany)
13. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ensure (Germany)
14. โคบอลต์ (II) ไนเตรต เฮกซะไฮเดรต ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (Germany)
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
16. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
17. แมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Univar (Germany)

18. ไทรซอลรีเอเจนต์ (Trizol[®] reagent) บริษัท Ambion (USA)
19. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท RCL labscan (Thailand)
20. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Ensure (Germany)
21. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Ensure (Germany)
22. ทริส (tris(hydrizymethyl)aminomethane; (HOCH₂)₃CNH₂)
บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
23. ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate; DEPC) บริษัท Amresco (USA)
24. ผงอะกาโรส (Agarose) บริษัท QP product (USA)
25. ดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์ (DNA primer) บริษัท Macrogen (Korea)
26. มาร์กเกอร์ (VC 1 kb DNA ladder) บริษัท Vivantis 9 (Malaysia)
27. มาร์กเกอร์ (wide range DNA ladder)
28. สีย้อมเจล (SYBR[®] Safe DNA Gel Stain) บริษัท Invergen (USA)
29. สีย้อมดีเอ็นเอ (DNA dye) บริษัท BioDynamics Laboratory (Japan)
30. Taq DNA polymerase บริษัท Vivantis 9 (Malaysia)

2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดสำเร็จ SuperScript[®]III บริษัท Invitrogen (USA)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ

3.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Histidine kinase (HK) ใน *Halothece* sp. PCC7418

ไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 มีข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>) และ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เป็นฐานข้อมูลหลัก พบว่าใน *Halothece* sp. PCC7418 มียีนกำหนดรหัส HK ทั้งหมด 17 ยีน ได้แก่ PCC7418_0715, PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3282, PCC7418_3344, PCC7418_3363 และ PCC7418_3509 จึงเลือกยีนดังกล่าวมาศึกษาในงานวิจัยนี้

3.1.1 วิเคราะห์ Domain Architecture ของ HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

วิเคราะห์ Domain Architecture ของ HK ใน *Halothece* sp. PCC7418 โดยใช้โปรแกรม pfam 33.1 (<http://pfam.xfam.org/>) เพื่อศึกษาลักษณะรูปแบบของยีนกำหนดรหัส HK จากนั้นวิเคราะห์และจัดกลุ่มยีนกำหนดรหัส HK

3.1.2 การหา Gene Ontology (GO) function ของ HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

หา GO function ของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC 7418 โดยสืบค้นจาก Uniport (<http://www.uniprot.org/>) เพื่อทำนายการทำงานของ HK ทั้ง 17 ยีน

3.1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส HK

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418 จากฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes; KEGG เพื่อสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีน จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้โปรแกรม Perlprimer v1.1.21 (<http://perlprimer.sourceforge.net/download.html>) โดยกำหนดให้ความยาวของไพรเมอร์มีขนาด 15 คู่เบส อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) เท่ากับ 40-60 องศาเซลเซียส และผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มีความยาวเท่ากับ 300 คู่เบส โดยพิจารณาเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เข้าจับยีนตำแหน่งที่ไม่อยู่ปลายด้านใดด้านหนึ่งมากเกินไป และมีค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด เพื่อใช้สังเคราะห์ไพรเมอร์ในขั้นตอนต่อไป

3.3 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในภาวะปกติ

3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418

เลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution แสดงในภาคผนวก ก ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (~30 องศาเซลเซียส) มีการเขย่า (120 rpm) และให้แสงฟลูออเรสเซนต์ (~1900 lux) ตลอดเวลา หลังจากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้อาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution เป็น blank เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.6-0.8 แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในภาวะเครียด

เก็บเซลล์โดยแบ่งเชื้อใส่ขวดเซนทริฟิวจ์ 25 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด (ขวดที่หนึ่งเป็นเซลล์ส่วนที่ไม่ได้รับความเครียดหรือเป็นชุดควบคุม ส่วนขวดที่ 2-5 เป็นส่วนที่ได้รับความเครียดเป็นเวลา 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงเซลล์แล้วแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์ แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ โดยแบ่งให้ได้น้ำหนักเปียกประมาณ 30-50 มิลลิกรัม แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์ แล้วเก็บตะกอนเซลล์จากขวดที่หนึ่งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่างเซลล์ที่ต้องได้รับความเครียด (ตัวอย่างเซลล์จากขวดที่ 2-5) จะถูกเลี้ยงในอาหารที่สร้างภาวะความเครียดให้กับเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress)

นำตัวอย่างเซลล์จากขวดที่ 2-5 ที่อยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ในข้อ 3.3.2 มาเลี้ยงในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution แสดงในภาคผนวก ก ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (~30 องศาเซลเซียส) มีการเขย่า (120 rpm) และให้แสงฟลูออเรสเซนต์ (~1900 lux) ตลอดเวลา เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ แบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ โดยแบ่งให้ได้น้ำหนักเปียกประมาณ 30-50 มิลลิกรัม แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์ แล้วเก็บตะกอนเซลล์จากขวดที่หนึ่งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัด RNA ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การสกัด total RNA

นำเซลล์ที่เก็บได้จากภาวะที่ใช้ทดลอง ในขั้นตอน 3.3.2-3.3.3 มาสกัด total RNA ด้วยสารละลาย Trizol® reagent ตามวิธีแนะนำจากผู้ผลิต โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากเติม Trizol® reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่มีน้ำหนักเปียก 30-50 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงในโกร่งที่เย็นจัด (แช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 1 คืน) และบดเซลล์เพื่อให้เซลล์แตก จนสังเกตได้จากเซลล์มีลักษณะเป็นผง รอให้เซลล์ละลายแล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มที่เย็น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตัวกลางที่ใช้ในการสกัด จากนั้นดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสออก จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูด 70% เอทานอล ออกให้ได้มากที่สุด แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยการคว่ำหลอดไว้ประมาณ 20 นาที แต่ต้องไม่แห้งมากจนเกินไป จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase หรือน้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

แบ่งสารละลาย RNA ที่ได้บางส่วนไปตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนดรอป 200 และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปลี่ยน RNA ที่เหลือเป็น cDNA ในขั้นตอนต่อไป

3.4.1 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ agarose gel 1.2% (w/v) ที่มีการ precast ด้วยสี SYBR safe และโหลด marker VC 1 kb เพื่อเทียบขนาดของ RNA โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ให้กระแสไฟฟ้ามีค่าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel doc™ EZ และอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Lab (<http://www.bio-red.com/en-th/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>)

3.5 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA

เจือจาง RNA ที่สกัดได้ด้วยน้ำ DEPC ให้มีความเข้มข้น 2,500 ng/μl เท่ากันทุกชุดการทดลอง จากนั้นใช้ชุดสำเร็จเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA ตามวิธีการที่ชุดสำเร็จแนะนำ โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript®III

สำหรับชุดสำเร็จ SuperScript®III จะใช้ RNA ตั้งต้นปฏิกิริยา 2,500 นาโนกรัม ซึ่งชุดสำเร็จมีองค์ประกอบหลักในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ Random hexamer, 10mM dNTP, น้ำปราศจาก RNase (treated DEPC water), 10X RT buffer, 25mM MgCl₂, 0.1M DTP, RNase OUT, SuperScript®III Reverse Transcriptase และ RNase H จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Histidine kinase ใน *Halothece* sp. PCC7418

นำ cDNA มาเพิ่มจำนวนโดยการ PCR มีขั้นตอน ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยการ annealing ให้ primer จับกับ DNA แม่แบบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และการ extension เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำ 3 ขั้นตอนนี้ซ้ำ เป็นจำนวนประมาณ 25 รอบ และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยจำนวนรอบและ annealing temperature ในการทำอาจแตกต่างกันในแต่ละยีน ตามความเหมาะสมและผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ สำหรับการทดลองนี้ใช้ *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน

จากนั้น ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มารันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ agarose gel 1.2% (w/v) และย้อมสีด้วยสี SYBR safe และโหลด wide range DNA ladder เพื่อเทียบขนาดของ DNA โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ให้กระแสไฟฟ้ามีค่าเท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel doc™ EZ และอ่านผลด้วยโปรแกรม Image Lab (<http://www.bio-red.com/en-th/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>) และคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS V22 (<http://www.it.chula.ac.th/th/th/spss-v22>)

ภาพที่ 3.1 : แผนผังการดำเนินการทดลอง

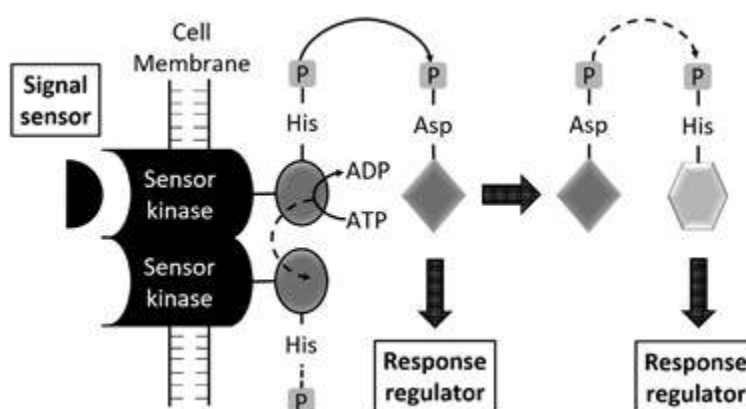


บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลสารสนเทศของ HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

เพื่อรับรู้และตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมและสภาวะความเครียด ในไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ TCS เป็นกลไกการส่งสัญญาณที่สำคัญ โดย TCS ประกอบด้วยเซนเซอร์ HK และ RR การส่งสัญญาณโดยใช้หลักการของ TCS นั้นเกิดขึ้นโดยการเปิดใช้งานโดเมนโคเนสขององค์ประกอบในเซนเซอร์ ซึ่งเกิดขึ้นโดยทั่วไปในการตอบสนองต่อลิแกนด์ที่จับกับโดเมนตัวรับ และจากนั้นโดเมนตัวรับสัญญาณกระตุ้นการถ่ายโอนฟอสเฟตจาก ATP ไปยังไซต์ที่ตอบสนองต่อการทำงาน ฟอสเฟตนี้ถูกถ่ายโอนจากตัวรับไปยัง Asp ในโปรตีน effector เพื่อกระตุ้นการตอบสนองต่อการควบคุม (ภาพที่ 4.1) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการควบคุมการถอดรหัส



ภาพที่ 4.1 : การตอบสนองต่อการควบคุมไปยังตัวควบคุมที่สองของในระบบบริเลย์แบบ His-Asp-His

TCS สำหรับออดีฟอสโฟรีเลชันของ HK เซนเซอร์รับรู้การกระตุ้นภายนอกเซลล์ สารตั้งต้นสำหรับโคเนสคือสารควบคุมการตอบสนองซึ่งกลายเป็นฟอสโฟรีเลชันบนเรซิดิวส์แอสพาเทตที่เฉพาะเจาะจง ในไซยาโนแบคทีเรียตัวควบคุมการตอบสนองโดยทั่วไปจะมีโดเมนร่วมกันที่มีเรซิดิวส์แอสพาเทตและไลซีนอย่างน้อยสองตัว ตัวรับ HK เป็นโปรตีนแบบโฮโมโเทเมอร์และมีฟอสโฟรีเลชันทั้งแบบทรานส์ และ ซิส

จากการสืบค้นฐานข้อมูล KEGG และ NCBI พบว่า ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งมีจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล KEGG พบยีนกำหนดรหัส HK ที่เกี่ยวข้องกับ TCS ทั้งหมด 17 ยีน ได้แก่ PCC7418_0715, PCC7418_0766 , PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3282, PCC7418_3344, PCC7418_3363 และ PCC7418_3509 ซึ่งทั้ง 17 ยีนนี้มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ และจำนวนกรดอะมิโนแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1) นอกจากนั้น เมื่อศึกษารูปแบบของค้ำประกอบ และการจัดเรียงของโดเมนยังพบว่ามีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2) และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีนจากฐานข้อมูล KEGG จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในภาคผนวก ข.

ยีนที่กำหนดรหัส HK ที่กล่าวถึงในงานวิจัยนี้ สามารถจัดแยกได้ ดังนี้ ยีน PCC7418_3509 จัดอยู่ในคลาส Incomplete HK, ยีน PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_2611 และ PCC7418_2615 จัดอยู่ในคลาส HK class I kinases (HKI), ยีน PCC7418_2200, PCC7418_2265 และ PCC7418_3363 จัดอยู่ในคลาส HK class II (HKII), ยีน PCC7418_2050 จัดอยู่ในคลาส HK class III (HKIII), ยีน PCC7418_0715, PCC7418_1838, PCC7418_2178, PCC7418_2222, PCC7418_2832 และ PCC7418_3344 จัดอยู่ในคลาส HK class V (HKV) และมียีน 2 ยีน คือ PCC7418_2831 และ PCC7418_3282 ที่ไม่สามารถแยกคลาสได้จากการศึกษารูปแบบของโดเมนเบื้องต้นนี้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 : การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ HK และผลวิเคราะห์ GO function ใน *Halotheca* sp. PCC7418

หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล KEGG	PCC7418_0715	PCC7418_0766	PCC7418_1721	PCC7418_1838
หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล Uniprot	K9Y940	K9Y991	K9YBX0	K9YAM0
หมายเลข EC	2.7.13.3	2.7.13.3	-	2.7.13.3
วิธึเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้อง	Two-component system	-	-	Two-component system
ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (Molecular function)	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity
Environmental Information Processing	Signal transduction	-	-	Signal transduction
Protein families	signaling and cellular processes	-	-	signaling and cellular processes
Protein kinases	Histidine kinases ● OmpR family	-	-	Histidine kinases ● CheA family
ชนิดการเร่งปฏิกิริยา	Transferases	Transferase	Transferase	Transferase
จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	1101	1866	1347	2910
จำนวนกรดอะมิโน (residue)	366	621	448	969

ตารางที่ 4.1 : การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ HK และผลวิเคราะห์ GO function ใน *Halotheca* sp. PCC7418 (ต่อ)

หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล KEGG	PCC7418_2050	PCC7418_2178	PCC7418_2200	PCC7418_2222
หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล Uniprot	K9YDS5	K9YCY1	K9YD84	K9YBN8
หมายเลข EC	2.7.13.3	-	2.7.13.3	2.7.13.3
วิธึเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้อง	Two-component system	-	Two-component system	Two-component system
ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (Molecular function)	phosphorelay sensor kinase	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity
Environmental Information Processing	Signal transduction	-	Signal transduction	-
Protein families	signaling and cellular processes	-	signaling and cellular processes	signaling and cellular processes
Protein kinases	Histidine kinases ● OmpR family	-	Histidine kinases ● Spo family	Histidine kinases Other
ชนิดการเร่งปฏิกิริยา	Transferases	Transferase	Transferases	Transferases
จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	1995	1122	1173	1113
จำนวนกรดอะมิโน (residue)	664	373	390	379






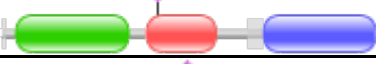









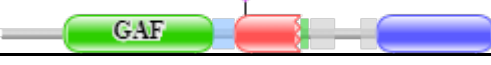

ตารางที่ 4.1 : การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ HK และผลวิเคราะห์ GO function ใน *Halotheca* sp. PCC7418 (ต่อ)

หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล KEGG	PCC7418_2265	PCC7418_2611	PCC7418_2615	PCC7418_2831
หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล Uniprot	K9YD62	K9YFA2	K9YE52	K9YFT3
หมายเลข EC	2.7.13.3	2.7.13.3	2.7.13.3	-
วิถีมะแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้อง	-	-	Two-component system	-
ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (Molecular function)	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	kinase activity
Environmental Information Processing	-	-	Signal transduction	-
Protein families	-	-	signaling and cellular processes	-
Protein kinases	-	-	Histidine kinases ● OmpR family	-
ชนิดการเร่งปฏิกิริยา	Transferase	Transferase	Transferases	Transferase
จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	1953	1446	1314	879
จำนวนกรดอะมิโน (residue)	650	481	437	293

ตารางที่ 4.1 : การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ HK และผลวิเคราะห์ GO function ใน *Halotheca* sp. PCC7418 (ต่อ)

หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล KEGG	PCC7418_2832	PCC7418_3282	PCC7418_3344	PCC7418_3363	PCC7418_3509
หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล Uniport	K9YDL9	K9YH16	K9YF23	K9YH91	K9YGU5
หมายเลข EC	-	-	2.7.13.3	-	-
วิธึเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้อง	Two-component system	-	Two-component system	-	-
ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (Molecular function)	phosphorelay sensor kinase activity	kinase activity	protein histidine kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity	phosphorelay sensor kinase activity
Environmental Information Processing	Signal transduction	-	Signal transduction	-	-
Protein families	signaling and cellular processes	-	signaling and cellular processes	-	-
Protein kinases	Histidine kinases ● CheA family	-	Histidine kinases ● CheA family	-	-
ชนิดการเร่งปฏิกิริยา	Transferase	Transferase	Transferase	Transferase	Transferase
จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	2295	921	2868	1473	1347
จำนวนกรดอะมิโน (residue)	764	306	955	490	448

ตารางที่ 4.2 : แสดงแผนภาพรูปแบบโดเมนของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

ยีน	รูปแบบโดเมน	ประเภทยีน
PCC7418_0715		HK class V
PCC7418_0766		HK class I
PCC7418_1721		HK class I
PCC7418_1838		HK class V
PCC7418_2050		HK class III
PCC7418_2178		HK class V
PCC7418_2200		HK class II
PCC7418_2222		HK class V
PCC7418_2265		HK class V
PCC7418_2611		HK class I
PCC7418_2615		HK class I
PCC7418_2831		ไม่สามารถ จำแนกได้
PCC7418_2832		HK class V
PCC7418_3282		ไม่สามารถ จำแนกได้
PCC7418_3344		HK class V
PCC7418_3363		HK class II
PCC7418_3509		Incomplete HK

ยื่นกำหนดรหัส HK ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ที่สืบค้นจากฐานข้อมูล KEGG มีรายละเอียดของโดเมนดังต่อไปนี้

1. PCC7418_0715

ชื่อโปรตีน : Adaptive-response sensory-kinase SasA

ชื่อยีน : sasA

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV) เกี่ยวข้องกับ TCS อยู่ในตระกูล OmpR อาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ มีส่วนร่วมใน KaiABC clock protein complex ซึ่งถือเป็นตัวควบคุมหลัก เซอร์คาเดียนในไซยาโนแบคทีเรียผ่านการทำงานร่วมกับ KaiC จำเป็นสำหรับความทนทานของนาฬิกาชีวภาพการแสดงออกของยีนเซอร์คาเดียนและเกี่ยวข้องกับเอาต์พุทของสัญญาณนาฬิกา



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน KaiB (สีเขียว): โปรตีนนาฬิกาของไซยาโนแบคทีเรีย KaiA และ KaiB เป็นตัวควบคุมนาฬิกาชีวภาพในไซยาโนแบคทีเรีย มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าการกลายพันธุ์ของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือยกเลิกความเป็นนาฬิกาชีวภาพ KaiB มีรูปแบบการคดเคี้ยวแบบอัลฟา-เบต้าและพบว่าฟอร์มตัวเป็นไดเมอร์

โดเมน HisKA (สีแดง): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีม่วง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

2. PCC7418_0766

ชื่อโปรตีน : GAF sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_0766

คำนิยาม : HK ประเภท HK class I (HKI)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HisKA (สีเขียว): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

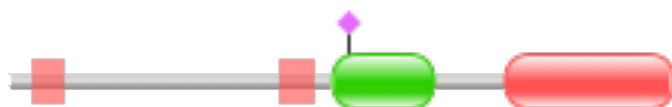
โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

3. PCC7418_1721

ชื่อโปรตีน : Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_1721

คำนิยาม : HK ประเภท HK class I (HKI)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HisKA (สีเขียว): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

4. PCC7418_1838

ชื่อโปรตีน : CheA signal transduction Histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_1838

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HPT (สีเขียว): ประกอบด้วยเรซิดิวฮิสติดีนที่ทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสโฟทรานเฟอร์ โดเมนตรวจพบเฉพาะในยูแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับ TCS ช่วยให้แบคทีเรียสามารถรับรู้, ตอบสนองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมความเครียดและสภาวะการเจริญเติบโตที่หลากหลาย

โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

โดเมน CheW (สีน้ำเงิน): เป็นเรซิดิวโดเมนที่พบในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ TCS ที่ควบคุมการเคโมแทกซิสของแบคทีเรีย CheW สร้างขึ้นจากโดเมนที่คล้าย CheW เท่านั้น ซึ่งโดเมนที่คล้าย CheW เป็นสื่อกลางในการโต้ตอบระหว่าง CheA และโปรตีนอะแดปเตอร์ CheW

โดเมน REC (สีเหลือง): เป็นโดเมนผู้รับ cheY-homologous โดยโดเมนนี้มีฟอสโฟเซปเตอร์ไซต์ที่ฟอสฟอรีเลตโดย histidine kinase homologues

5. PCC7418_2050

ชื่อโปรตีน : multi-sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2050

คำนิยาม : HK ประเภท HK class III (HKIII)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HAMP (สีเขียว): โดเมน HAMP มีอยู่ใน HK, อะดีนิลไซเคส, โปรตีนรับเมธิลและฟอสฟาเทส พบได้ในเซ็นเซอร์ตรวจจับแบคทีเรีย, โปรตีนเคโมเทคซิสและ HK ในยูคาริโอต โปรตีนของแบคทีเรียมักเป็นโปรตีนเมมเบรนที่สำคัญและเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการถ่ายทอดสัญญาณสององค์ประกอบ โดเมน HAMP สามารถพบได้โดยเชื่อมโยงกับโดเมนอื่น ๆ เช่น โดเมนฮิสทีดีนไคเนส, โดเมนตัวแปลงสัญญาณเคโมเทคซิสของแบคทีเรีย, โดเมน PAS, โดเมน EAL, โดเมน GGDEF, โดเมนที่คล้ายโปรตีนฟอสฟาเทส 2C, โดเมน guanylate cyclase หรือโดเมน RR ซึ่งมีการระบุว่ามีบทบาทในการควบคุมฟอสริเลชันหรือเมทิลเลชันของตัวรับ homodimeric โดยการส่งการเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบในโดเมนที่จับกับลิแกนด์ periplasmic ไปยังโดเมนไคนเนสสัญญาณไซโตพลาสซึมและโดเมน methyl-acceptor

โดเมน PAS (สีแดง): โดเมน PAS เกี่ยวข้องกับโปรตีนการส่งสัญญาณหลายชนิดซึ่งใช้เป็นโดเมนเซ็นเซอร์สัญญาณ โดเมน PAS ปรากฏในอาร์เคีย, แบคทีเรียและยูคาริโอต โปรตีน PAS-domain หลายตัวเป็นตัวตรวจจับสัญญาณ โดยอาศัยปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้อง โดเมน PAS มักเกี่ยวข้องกับโดเมน PAC โดยที่โดเมนเหล่านี้จะเชื่อมโยงโดยตรงและรวมกันเป็นสามมิติ การแบ่งระหว่างโดเมน PAS และ PAC เกิดจากความแตกต่างที่สำคัญในลำดับในแถบที่เชื่อมต่อกับรูปแบบทั้งสองนี้ใน PAS

โดเมน HisKA (สีน้ำเงิน): เป็นโดเมนโดเมโรโรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีเหลือง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

6. PCC7418_2178

ชื่อโปรตีน : Response regulator receiver sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2178

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน REC (สีเขียว): เป็นโดเมนผู้รับ cheY-homologous โดยโดเมนนี้มีฟอสโฟเซบเตอร์ไซต์ที่ฟอสฟอริเลตโดย histidine kinase homologues

โดเมน HisKA (สีแดง): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

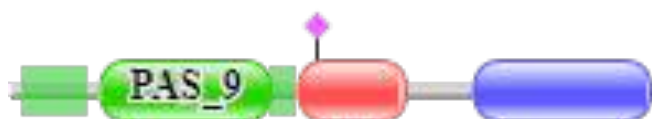
โดเมน HATPase_c (สีน้ำเงิน): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

7. PCC7418_2200

ชื่อโปรตีน : PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2200

คำนิยาม : HK ประเภท HK class II (HKII)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน PAS (สีเขียว): โดเมน PAS เกี่ยวข้องกับโปรตีนการส่งสัญญาณหลายชนิดซึ่งใช้เป็นโดเมนเซ็นเซอร์สัญญาณ โดเมน PAS ปรากฏในอาร์เคีย, แบคทีเรียและยูคาริโอต โปรตีน PAS-domain หลายตัวเป็นตัวตรวจจับสัญญาณ โดยอาศัยปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้อง โดเมน PAS มักเกี่ยวข้องกับโดเมน PAC โดยที่โดเมนเหล่านี้จะเชื่อมโยงโดยตรงและรวมกันเป็นสามมิติ การแบ่งระหว่างโดเมน PAS และ PAC เกิดจากความแตกต่างที่สำคัญในลำดับในแถบที่เชื่อมต่อกับรูปแบบทั้งสองนี้ใน PAS

โดเมน HisKA (สีแดง): เป็นโดเมนไดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีน้ำเงิน): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

8. PCC7418_2222

ชื่อโปรตีน : Response regulator receiver sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2222

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน REC (สีเขียว): เป็นโดเมนผู้รับ cheY-homologous โดยโดเมนนี้มีฟอสโฟเซบเตอร์ไซต์ที่ฟอสฟอริเลตโดย histidine kinase homologue

โดเมน HisKA (สีแดง): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีน้ำเงิน): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

9. PCC7418_2265

ชื่อโปรตีน : GAF sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2265

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน DICT (สีเขียว): พบโดเมนนี้ที่เกี่ยวข้องกับโดเมนตัวเร่งปฏิกิริยาของ Diguanylate Cyclase และ ฟอสโฟไดเอสเทอร์ส และ TCS (HK) ดังนั้นจึงถูกเรียกว่าโดเมน DICT โครงสร้างทุติยภูมิของโดเมนนี้ที่เป็นการพับ

แบบอัลฟา + เบต้าด้วยแผ่นเบต้าแบบเกลียว 4 แผ่น ซึ่งจากรูปแบบดังกล่าวนี้โดเมนนี้จึงได้รับการคาดการณ์ว่าเกี่ยวข้องกับการทำงานของประสาทสัมผัส ซึ่งรวมถึงบทบาทในการตอบสนองต่อแสงเนื่องจากพบในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและฮาโลฟิลิกอาร์เคีย

โดเมน CHASE6_C (สีแดง): เป็นโดเมนเซ็นเซอร์สองส่วนนอกเซลล์ (periplasmic) ที่พบใน HK และ HD-GYP-type c-di-GMP-specific phosphodiesterases โดยมีส่วนปลายด้าน N คือโดเมน DICT และส่วนปลายด้าน C คือโดเมนเซ็นเซอร์ในการส่งสัญญาณของแบคทีเรีย ซึ่งรวมถึงกลไกการรับรู้ความรู้สึกในแบคทีเรีย, ลักษณะโมเลกุลของการรับรู้สัญญาณ ซึ่งส่วนใหญ่โดเมนนี้พบในไซยาโนแบคทีเรีย

โดเมน GAF (สีน้ำเงิน): โดเมน GAF ตั้งชื่อตามโปรตีนบางชนิดที่พบใน ได้แก่ cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase และ FhlA. นอกจากนี้ยังพบใน guanylyl cyclase และไฟโตโครม โครงสร้างของโดเมน GAF นั้นมีส่วนแบ่งที่คล้ายกันกับโดเมน PAS Adenylyl และ guanylyl cyclase เร่งปฏิกิริยา ATP และ GTP ไปยัง messenger cAMP และ cGMP ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะควบคุมกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาโดยการจับกับโดเมน GAF ในทางตรงกันข้ามปฏิกิริยาไฮโดรลิซิซจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยที่ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ขึ้นอยู่กับ cGMP 3', 5'-cyclic phosphodiesterase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน guanosine 3', 5'-cyclic phosphate เป็น guanosine 5'-phosphate โดยมี cGMP ควบคุมการเร่งปฏิกิริยาโดยการจับกับโดเมน GAF

โดเมน HisKA (สีเหลือง): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีม่วง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPase

10. PCC7418_2611

ชื่อโปรตีน : integral membrane sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2611

คำนิยาม : HK ประเภท HK class I (HKI)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HisKA (สีเขียว): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

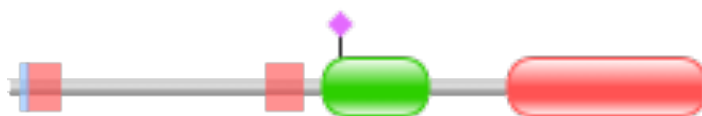
โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

11. PCC7418_2615

ชื่อโปรตีน : integral membrane sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2615

คำนิยาม : HK ประเภท HK class I (HKI)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HisKA (สีเขียว): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

12. PCC7418_2831

ชื่อโปรตีน : Putative CheA signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2831

คำนิยาม : -



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HPT (สีเขียว): ประกอบด้วยเรซิดิวฮิสติดีนที่ทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสโฟทรานเฟอร์ โดเมนตรวจพบเฉพาะในยูแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับ TCS ช่วยให้แบคทีเรียสามารถรับรู้, ตอบสนองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมความเครียดและสภาวะการเจริญเติบโตที่หลากหลาย

13. PCC7418_2832

ชื่อโปรตีน : Putative CheA signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_2832

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน H-kinase_dim (สีเขียว): โดเมนบันเดิลแบบขดลวดนี้เป็นส่วนต่อประสานโฮโมดิเมอร์ของตระกูลฮิสติดีนไคเนสที่ใช้ในการส่งสัญญาณ ซึ่งการถ่ายทอดสัญญาณฮิสติดีนไคเนสนั้นเป็นองค์ประกอบหลักใน TCS ซึ่งมีบทบาทควบคุมกระบวนการที่ซับซ้อน เช่น การเริ่มต้นของการพัฒนาในจุลินทรีย์ ตัวอย่างของ HK ได้แก่ EnvZ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดูดซึม และ CheA ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบเคโมแทกซิส HK มักจะมี ligand-binding domain บริเวณส่วนปลายด้าน N และโดเมนไคเนส บริเวณส่วนปลายด้าน C และอาจมีโดเมนอื่น ๆ อยู่ร่วมด้วย

โดเมนโคเนสมีหน้าที่ในการสร้างอโต้ฟอสฟอรีเลชันของฮิสทีดินด้วย ATP ฟอสโฟทรานเฟอร์จากโคเนสไปยัง แอสพาเทตของตัวควบคุมการตอบสนองและฟอสโฟทรานเฟอร์จากแอสพาร์ทิลฟอสเฟตกลับไปยัง ADP หรือสู่น้ำ

โดเมน HATPase_c (สีเขียว): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

โดเมน CheW (สีน้ำเงิน): เป็นเรซิดิวโดเมนที่พบในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ TCS ที่ควบคุมการเคโมแทกซิสของแบคทีเรีย CheW สร้างขึ้นจากโดเมนที่คล้าย CheW เท่านั้น ซึ่งโดเมนที่คล้าย CheW เป็นสื่อกลางในการโต้ตอบระหว่าง CheA และโปรตีนอะแดปเตอร์ CheW

โดเมน REC (สีเหลือง): เป็นโดเมนผู้รับ cheY-homologous โดยโดเมนนี้มีฟอสโฟเซบเตอร์ไซต์ที่ฟอสฟอรีเลตโดย histidine kinase homologues

14. PCC7418_3282

ชื่อโปรตีน : Putative CheA signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_3282

คำนิยาม : -



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HPT (สีเขียว): ประกอบด้วยเรซิดิวฮิสทีดินที่ทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสโฟทรานเฟอร์ โดเมนตรวจพบเฉพาะในยูแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับ TCS ช่วยให้แบคทีเรียสามารถรับรู้, ตอบสนองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมความเครียดและสภาวะการเจริญเติบโตที่หลากหลาย

15. PCC7418_3344

ชื่อโปรตีน : CheA signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_3344

คำนิยาม : HK ประเภท HK class V (HKV)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HPT (สีเขียว): ประกอบด้วยเรซิดิวฮิสติดีนที่ทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสโฟทรานเฟอร์ โดเมนตรวจพบเฉพาะในยูแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับ TCS ช่วยให้แบคทีเรียสามารถรับรู้, ตอบสนองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมความเครียดและสภาวะการเจริญเติบโตที่หลากหลาย

โดเมน HATPase_c (สีแดง): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

โดเมน CheW (สีน้ำเงิน): เป็นเรซิดิวโดเมนที่พบในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ TCS ที่ควบคุมการเคโมแทกซิสของแบคทีเรีย CheW สร้างขึ้นจากโดเมนที่คล้าย CheW เท่านั้น ซึ่งโดเมนที่คล้าย CheW เป็นสื่อกลางในการโต้ตอบระหว่าง CheA และโปรตีนอะแดปเตอร์ CheW

โดเมน REC (สีเหลือง): เป็นโดเมนผู้รับ cheY-homologous โดยโดเมนนี้มีฟอสโฟเซบเตอร์ไซต์ที่ฟอสฟอรีเลตโดย histidine kinase homologue

16. PCC7418_3363

ชื่อโปรตีน : GAF sensor signal transduction histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_3363

คำนิยาม : HK ประเภท HK class II (HKII)



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน GAF (สีเขียว): โดเมน GAF ตั้งชื่อตามโปรตีนบางชนิดที่พบใน ได้แก่ cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase และ FhIA. นอกจากนี้ยังพบใน guanylyl cyclase และไฟโตโครม โครงสร้างของโดเมน GAF นั้นมีส่วนแบ่งที่คล้ายกันกับโดเมน PAS Adenylyl และ guanylyl cyclase เร่งปฏิกิริยา ATP และ GTP ไปยัง messenger cAMP และ cGMP ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะควบคุมกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาโดยการจับกับโดเมน GAF ในทางตรงกันข้ามปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยที่ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ขึ้นอยู่กับ cGMP 3', 5'-cyclic phosphodiesterase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน guanosine 3', 5'-cyclic phosphate เป็น guanosine 5'-phosphate โดยมี cGMP ควบคุมการเร่งปฏิกิริยาโดยการจับกับโดเมน GAF

โดเมน HisKA (สีแดง): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟอะเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

โดเมน HATPase_c (สีน้ำเงิน): โดเมนนี้พบในโปรตีนที่จับกับ ATP หลายชนิด ได้แก่ HK, DNA gyrase B-, phytochrome-like ATPases

17. PCC7418_3509

ชื่อโปรตีน : histidine kinase

ชื่อยีน : PCC7418_3509

คำนิยาม : HK ประเภท Incomplete HK



องค์ประกอบของโดเมน

โดเมน HisKA (สีฟ้า): เป็นโดเมนโดเมอไรเซชันและโดเมนฟอสโฟเซบเตอร์ของ HK ซึ่งการแปลงสัญญาณ HK เป็นองค์ประกอบหลักในการถ่ายทอดสัญญาณของ TCS

4.2 ออกแบบไพรเมอร์

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีน ที่เลือกจากฐานข้อมูล KEGG มาออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม PerlPrimer โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ไปสังเคราะห์สำหรับใช้ในการทดลองขั้นถัดไป ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.3 และระบายด้วยแทบสีในภาคผนวก ข.

ตารางที่ 4.3 : โพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

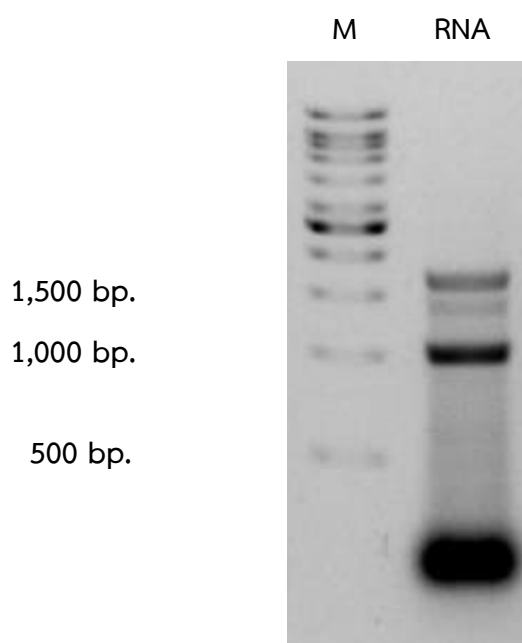
โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm(°C)	ความยาว (bp)	ขนาดแอมพลิคอน(bp)
PCC7418_0715-Forward	5' – CTGCTTCCATTGCCGA – 3'	53.58	15	300
PCC7418_0715-Reverse	5' – GCATGAGCATCAGGA – 3'	52.32		
PCC7418_0766-Forward	5' –ATGTTGCGCTATGCT– 3'	52.73	15	300
PCC7418_0766-Reverse	5' –CCATCTGTGACTCGG– 3'	52.47		
PCC7418_1721-Forward	5' –TGAATTAAGGACTCC– 3'	44.47	15	300
PCC7418_1721-Reverse	5' –AGTAACCTGTATCTG– 3'	43.74		
PCC7418_1838-Forward	5' –GTCAGCGTCAACAGC– 3'	54.97	15	300
PCC7418_1838-Reverse	5' –TCCACCATGGGAGGA– 3'	55.01		
PCC7418_2050-Forward	5' –CATTGCTGATGGTGC– 3'	52.14	15	300
PCC7418_2050-Reverse	5' –TAAGACGCGAGTGAG– 3'	51.72		
PCC7418_2178-Forward	5' –ATCCGCCAAGAAGAG– 3'	51.83	15	300
PCC7418_2178-Reverse	5' –ATTCTCCTAACGCCC– 3'	51.40		
PCC7418_2200-Forward	5' –TTGAATTGCCTCCGC– 3'	53.93	15	300
PCC7418_2200-Reverse	5' –TCTGTCTCCACTGCT– 3'	52.62		
PCC7418_2222-Forward	5' –TTATTATGGTCACTG– 3'	41.76	15	300
PCC7418_2222-Reverse	5' –ACACTAATTTGTTCC– 3'	43.32		
PCC7418_2265-Forward	5' –ACGAAATTTGGCCCG– 3'	54.33	15	300
PCC7418_2265-Reverse	5' –TCGGCTTGGGTAAGG– 3'	54.57		

ตารางที่ 4.3 : ไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm(°C)	ความยาว (bp)	ขนาดแอมพลิคอน(bp)
PCC7418_2615-Forward	5' -TTGCGGGAATTAGCT- 3'	51.63	15	300
PCC7418_2615-Reverse	5' -AACGCATCCAAAGGA- 3'	51.94		
PCC7418_2831-Forward	5' -GACGCAGAAGCAGCC- 3'	57.77	15	300
PCC7418_2831-Reverse	5' -CGATCGCGCTGTTGG- 3'	58.36		
PCC7418_2832 -Forward	5' -GCATAGAAGCCACCG- 3'	53.83	15	300
PCC7418_2832-Reverse	5' -ATTTGATCGCGCACC- 3'	54.60		
PCC7418_3282-Forward	5' -ACCCGTTTGAATCG- 3'	53.07	15	300
PCC7418_3282-Reverse	5' -GATCGCAGGTGTTCC- 3'	53.74		
PCC7418_3344-Forward	5' -CGACGGGTGATTCGA- 3'	55.34	15	300
PCC7418_3344-Reverse	5' -TTTCCTGCAAACGCG- 3'	55.19		
PCC7418_3363-Forward	5' -CGTCAACAAGCCCAG- 3'	54.41	15	300
PCC7418_3363-Reverse	5' -GCTGGAGACGTTTCC- 3'	53.70		
PCC7418_3509-Forward	5' -GAAGAAACAGCCCAC- 3'	51.03	15	300
PCC7418_3509-Reverse	5' -AATCGCTGACCAGAC- 3'	52.32		

4.3 การสกัด total RNA จากไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418

จากการสกัด total RNA โดยใช้สารละลาย Trizol[®] reagent เมื่อนำสารสกัด RNA ที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนทรอป รวมทั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}), 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA โดยหาค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ซึ่งใช้บ่งบอกได้ว่ามีโปรตีนปนเปื้อนมาด้วยในปริมาณมากหรือไม่ นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ RNA ปริมาณ 2,500 นาโนกรัม พบว่า band ที่ถูกตรวจวัดได้ จะมีประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก นั่นคือ ส่วนของ 23S rRNA ที่มีขนาด 1,500-1,800 คู่เบส, ส่วนของ 16S rRNA ที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และส่วนของ RNA ขนาดเล็ก (small RNAs) ที่มีขนาดน้อยกว่า 500 คู่เบส ซึ่งจะเป็นแถบเข้มหนายู่ด้านล่างของ 2 band แรก ดังแสดงรายละเอียดในภาพที่ 4.2 ซึ่งเป็นภาพผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ total RNA

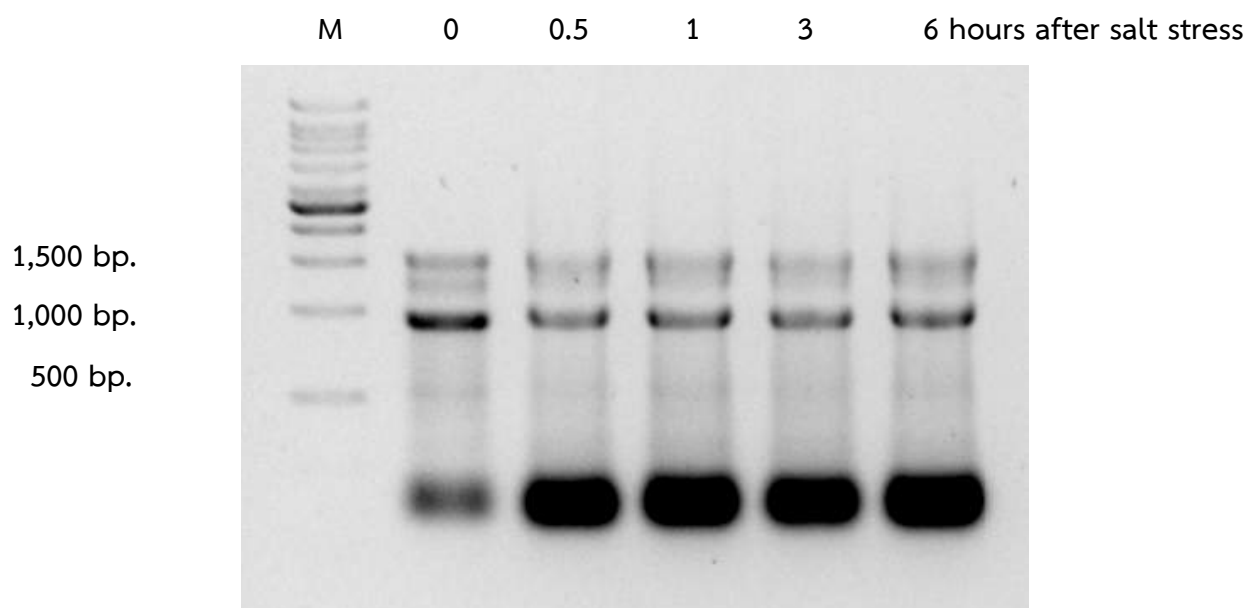


ภาพที่ 4.2 : เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker และ RNA หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ

สำหรับการตรวจสอบผลการสกัด RNA จากไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ที่เลี้ยงในภาวะปกติ และที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ตามเวลาที่ได้กล่าวในข้างต้น (0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ) ซึ่งหากผลการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลที่มีรูปแบบดังแสดงในภาพที่ 4.3 และมีความคมชัดของ band แสดงว่าการสกัด RNA ในครั้งนั้นได้ผลิตภัณฑ์ RNA ที่สมบูรณ์และมีคุณภาพดี โดยในการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแต่ละครั้งจะรันบนเจลที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ที่พรีแคส (precasted) ด้วยสี SYBR®

ผลการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในภาพที่ 4.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า RNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง มีความบริสุทธิ์ และผลการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีรูปแบบที่เห็นทั้งส่วนของ 23S rRNA, 16S rRNA และส่วนของ RNA ขนาดเล็ก (small RNAs) อย่างชัดเจนและมีความคมชัดของ band ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าส่วนของ RNA ขนาดเล็ก (small RNAs) ของเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะความเครียดจากเกลือมีปริมาณมาก เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ส่วนผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป แสดงไว้ในภาคผนวก ค.



ภาพที่ 4.3 : เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halothece* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker ส่วน 0 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ และ 0.5, 1, 3 และ 6 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 0.5, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการสกัด total RNA ด้วยสารละลาย Trizol[®] reagent และการตรวจวัดคุณภาพของ RNA โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าทุกชุดการทดลองมีรูปแบบของ band ที่ตรวจพบมีความสมบูรณ์ (intact) แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้มีปริมาณมากและมีคุณภาพดี และผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนดรอป จะเห็นว่าทุกชุดทดลองมีความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ค่อนข้างสูง ส่วนค่า A260/A280 ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์ของ RNA ในด้านปริมาณโปรตีนปนเปื้อน พบว่าทุกชุดการทดลอง มีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่า RNA ที่สกัดได้จากทุกชุดทดลองมีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนต่ำ ดังนั้นจึงสามารถนำ total RNA ที่สกัดได้นี้ไปทำการทดลองในขั้นถัดไป โดยนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA และตรวจสอบ cDNA โดยการยืนยันโดยใช้ housekeeping gene *AprmpB* ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ตามปกติ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า cDNA ที่ได้นี้พร้อมสำหรับการทดลองในขั้นตอนการทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบผลการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัส HK ในขั้นตอนถัดไป

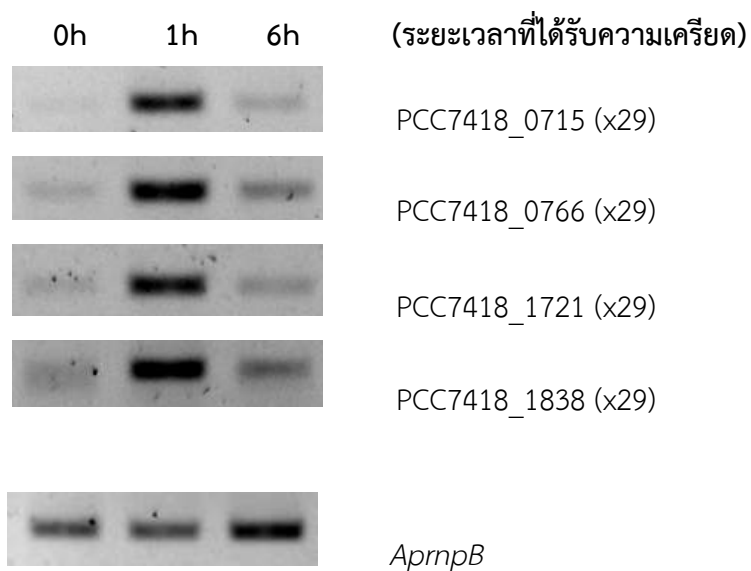
4.4 การทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418

หลังจากการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript III[®] สำหรับชุดทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โดยนำ cDNA ที่ได้มาทำ semiquantitative RT-PCR แล้วนำ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเจลที่ใช้มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ใช้ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab โดยทำ PCR, รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ภาวะเครียดที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วย ภาวะเครียดจากเกลือ มี 5 ชุดทดลองย่อย คือการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าวเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 1 และ 6 ชั่วโมง ซึ่งสามารถแบ่งยีนที่มีการแสดงออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulate) และ (2) กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulate)

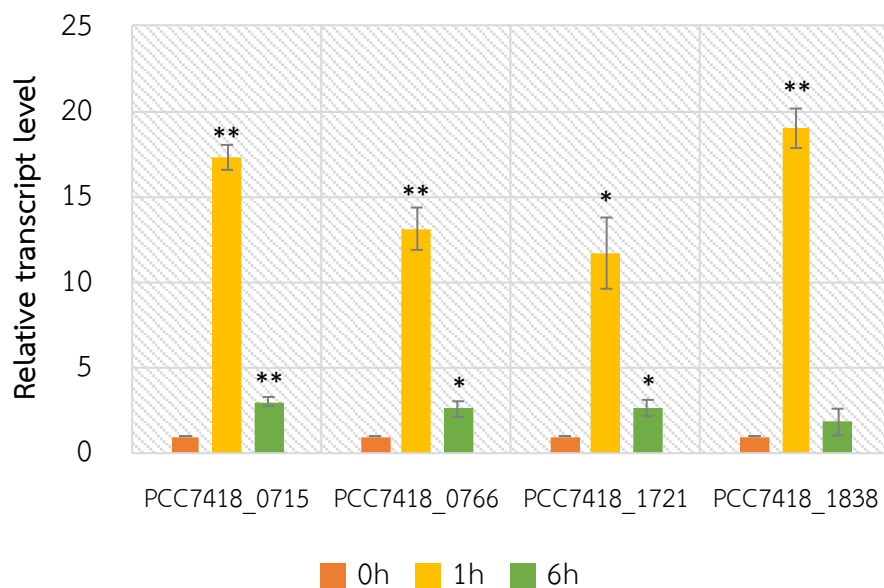
4.4.1 กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulate) ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่ามียีนจำนวน 14 ยีน ได้แก่ ยีน PCC7418_0715, PCC7418_0766 , PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3344 และ PCC7418_3363 เมื่อเทียบกับกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด (0h) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ประมาณ 17.28 ± 0.7 , 13.11 ± 1.2 , 11.69 ± 2.1 , 18.98 ± 1.2 , 4.82 ± 1.3 , 3.80 ± 0.9 , 5.45 ± 1.6 , 2.65 ± 0.4 , 6.81 ± 2.0 , 7.28 ± 1.1 , 5.61 ± 1.7 , 6.90 ± 2.0 , 6.83 ± 2.2 และ 7.32 ± 0.5 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป (6h) ยีนเหล่านี้มีการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีน ณ เวลาที่ 1 ชั่วโมง และ ยีน PCC7418_2615 เมื่อเทียบกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด (0h) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ประมาณ 1.59 ± 0.3 เท่า โดยแสดงดังภาพที่ 4.4, 4.5, 4.6 และ 4.7

(ก)

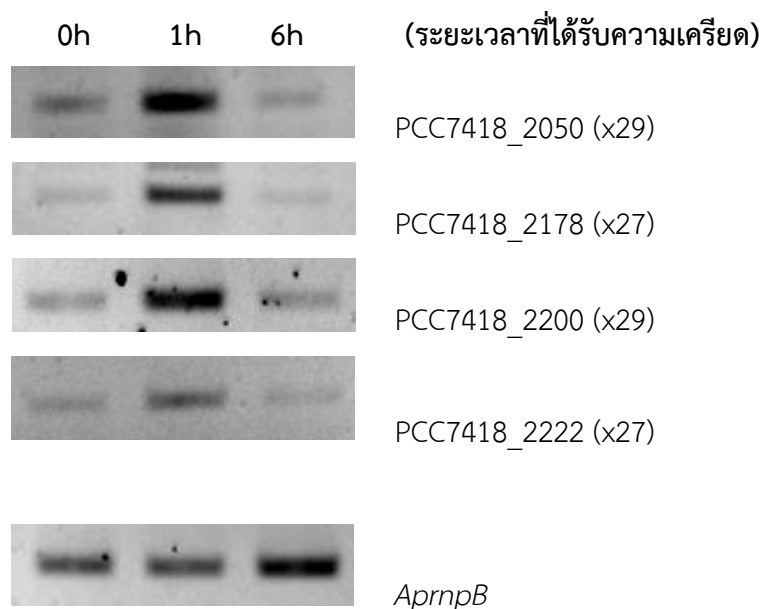


(ข)

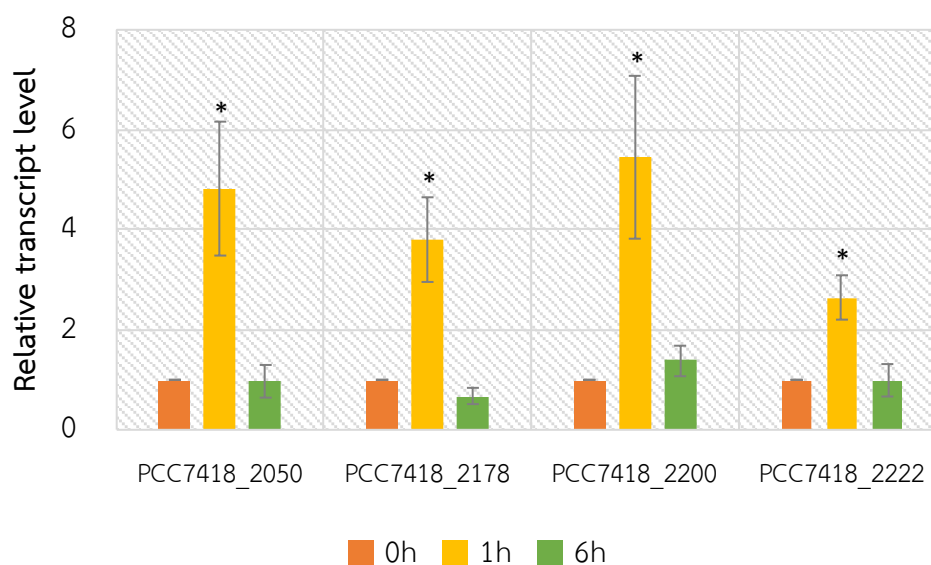


ภาพที่ 4.4 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยมียีน *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน (ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ (ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และ *, ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย T-test ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.01$ ตามลำดับ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

(ก)

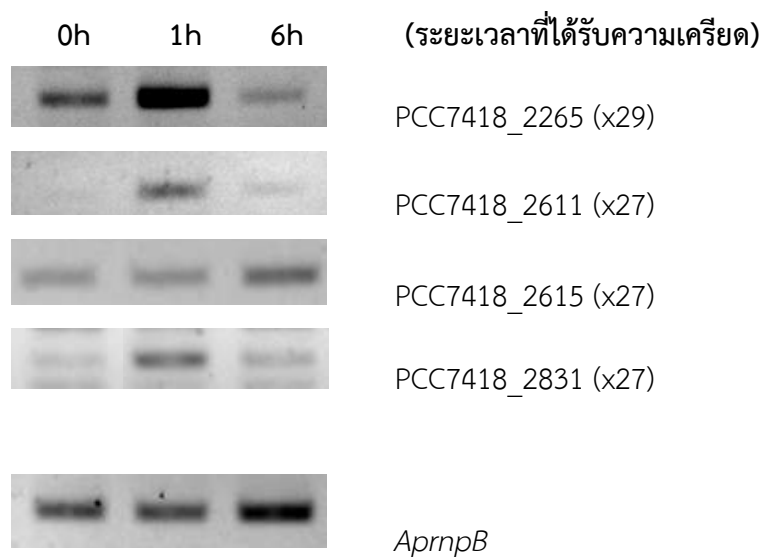


(ข)

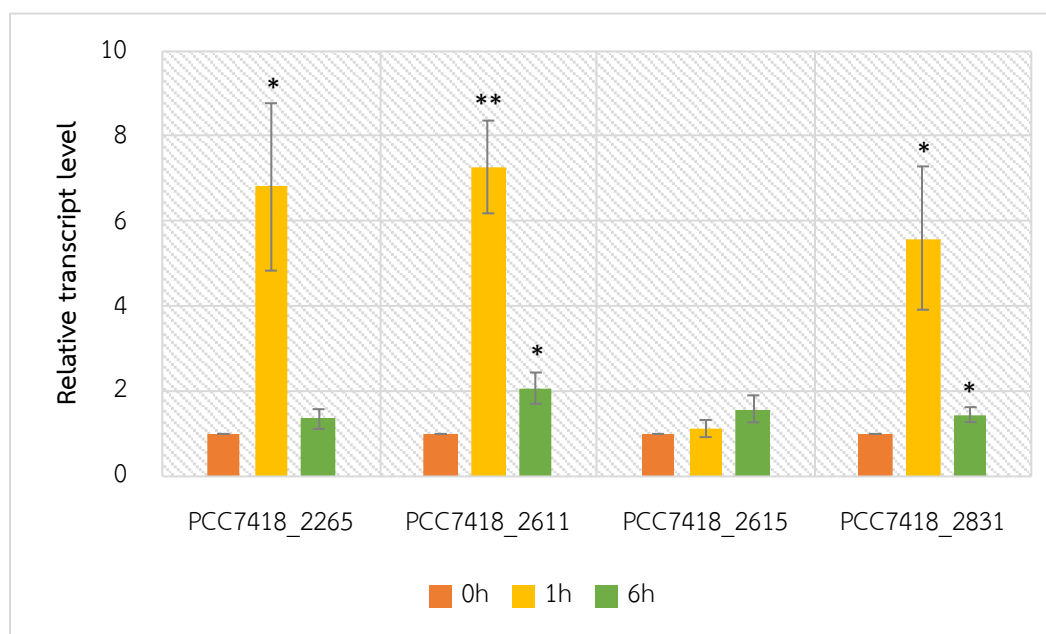


ภาพที่ 4.5 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยมียีน *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน (ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ (ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย T-test ที่ $p \leq 0.05$ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

(ก)

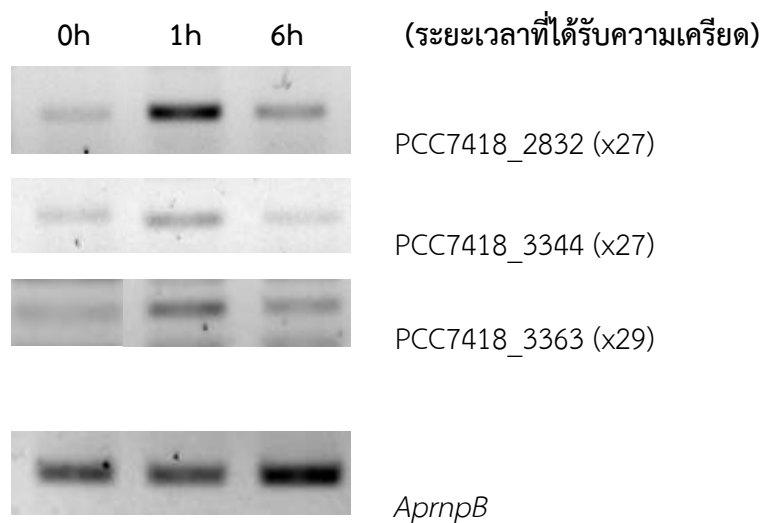


(ข)

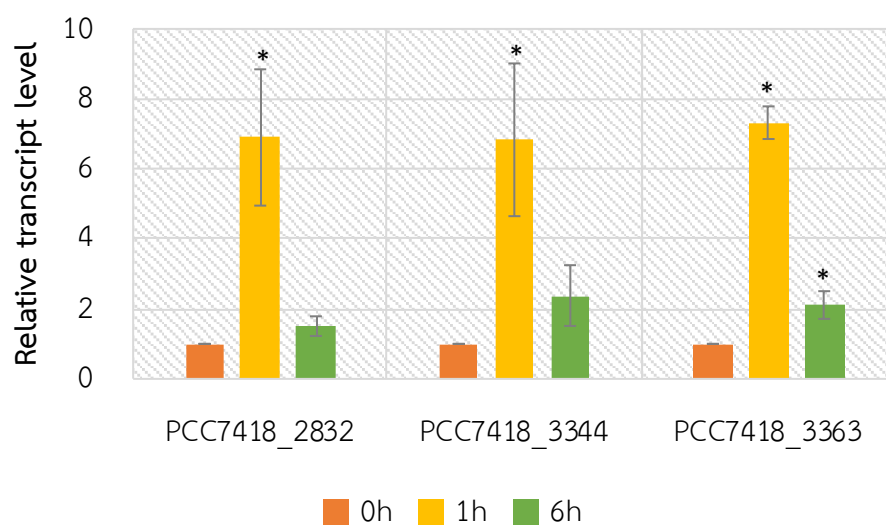


ภาพที่ 4.6 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยมียีน *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน (ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ (ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และ *, ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย T-test ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.01$ ตามลำดับ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

(ก)



(ข)

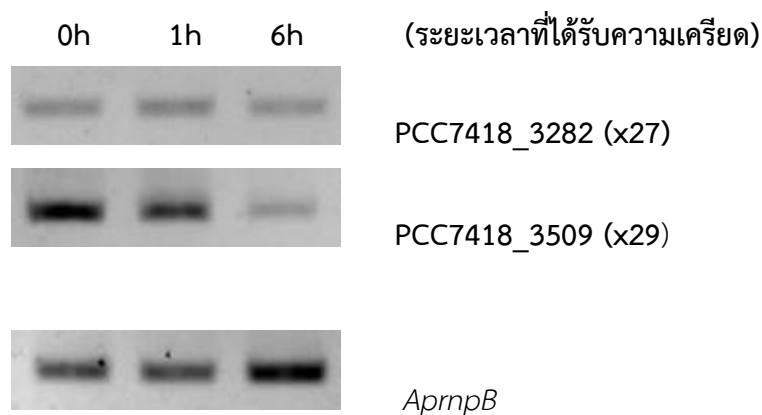


ภาพที่ 4.7 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยมียีน *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน (ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ (ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย T-test ที่ $p < 0.05$ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

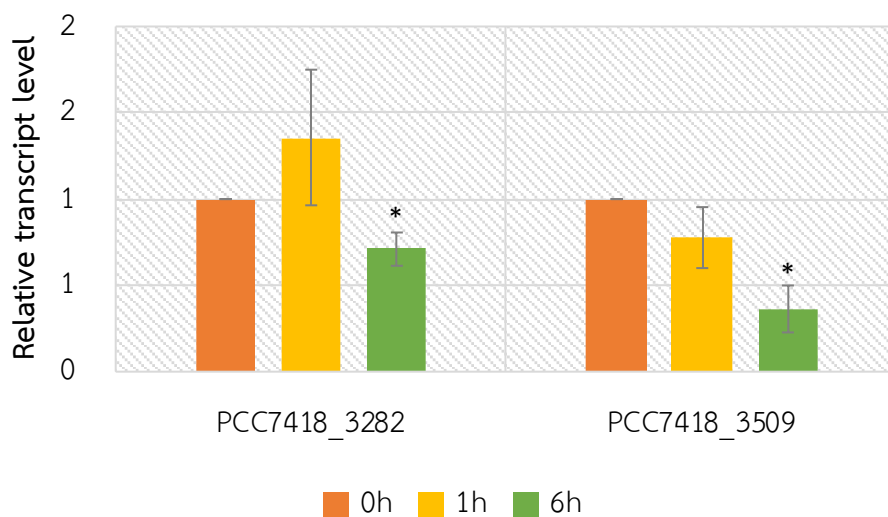
4.4.2 กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลง (down-regulate) ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ

กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่ามียีนจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน PCC7418_3282 และ PCC7418_3509 เมื่อเทียบกับกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด (0h) มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.0 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ประมาณ 0.71 ± 0.1 และ 0.36 ± 0.1 เท่า ตามลำดับ โดยแสดงดังภาพที่ 4.8

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.8 : Semi-quantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกลดลง โดยมียีน *AprnpB* เป็นยีนควบคุมภายใน (ก) ผลจากการรบกวนเซลล์โทรโพริซิส และ (ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม ImageJ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย T-test ที่ $p \leq 0.05$ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

จากผลการทดลองศึกษาการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีน โดยวิธี RT-PCR สรุปได้ว่า ยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีนนี้มีการแสดงออกในภาวะความเครียดจากเกลือ โดยยีนแต่ละยีนมีรูปแบบการแสดงออกตอบสนองแต่ละสภาวะเครียดแตกต่างกัน

ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ยีน PCC7418_0715, PCC7418_0766 , PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3344 และ PCC7418_3363 มีรูปแบบการแสดงออกในช่วงแรกที่เซลล์อยู่ในภาวะเครียด (1 ชั่วโมง) โดยยีนเหล่านี้จะมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือเวลานานขึ้น (6 ชั่วโมง) เซลล์มีการปรับตัวและเปลี่ยนรูปแบบการแสดงออก โดยลดการแสดงออกของยีนลงต่ำกว่าเมื่อเทียบการแสดงออกของยีนในช่วงแรกที่เซลล์อยู่ในภาวะเครียด (1 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถเรียงยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นสูงสุดจากมากไปน้อยได้ ดังนี้ ยีน PCC7418_1838, PCC7418_0715 , PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_3363, PCC7418_2611, PCC7418_2832, PCC7418_3344, PCC7418_2265, PCC7418_2831, PCC7418_2200, PCC7418_2050, PCC7418_2178 และ PCC7418_2222 ส่วนยีน PCC7418_2615 มีรูปแบบการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังเลี้ยงเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือเวลานานขึ้น (6 ชั่วโมง) ส่วนการแสดงออกของยีน PCC7418_3282 มีรูปแบบการแสดงออกในช่วงแรกที่เซลล์อยู่ในภาวะเครียด (1 ชั่วโมง) ยีนนี้จะมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือเวลานานขึ้น (6 ชั่วโมง) เซลล์มีการปรับตัวและเปลี่ยนรูปแบบการแสดงออก มีระดับการแสดงออกลดลงจนต่ำกว่าภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนเหล่านี้มีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากเกลือ และยีนที่มีการแสดงลดลงหลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลานาน ซึ่งอาจเป็นเพราะเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดในช่วงแรก จะมีการเหนี่ยวนำกลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดทำงานในปริมาณมากกว่าปกติ และมีความรวดเร็วแตกต่างกันในแต่ละยีน แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลานาน เซลล์อาจมีการปรับเปลี่ยนวิธิเมทาบอลิซึมต่างๆ เพื่อปรับตัวให้เซลล์สามารถอยู่ในภาวะเครียดจากเกลือได้ (Laloknam, 2011) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่กลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดของเซลล์อย่าง HK จะเพิ่มการแสดงออกของยีนอย่างรวดเร็วและลดการแสดงออกลงเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเวลานานขึ้น เพราะ HK เป็นเซ็นเซอร์ตัวส่งสัญญาณ เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมโดยรอบ (Ashby และ Houmard, 2006) ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ปรับตัวให้อยู่รอดจากสัญญาณภายนอกได้ในที่นี้ นั่นก็คือ ความเครียดจากเกลือ

ส่วนยีน PCC7418_3509 หลังเลี้ยงเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือนาน (6 ชั่วโมง) มีระดับการแสดงออก ลดลงจนต่ำกว่าภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากประเภทของยีน โดยยีน PCC7418_3509 นี้เป็นเพียงยีนเดียวที่จัดจำแนกอยู่ในคลาส Incomplete HK ซึ่งเป็นคลาสที่มีเฉพาะโดเมน HisKA เท่านั้น ส่วนยีนข้างต้นทั้ง 16 ยีนนั้นจัดอยู่ในคลาส ของ HK class I kinases (HKIs), HK class II (HKII), HK class III (HKIII) และ class V (HKV) โดยที่ส่วนใหญ่ ยีนที่จัดอยู่ในคลาสของ class V (HKV) จะมีระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นสูงสุด รองลงมาคือยีนที่จัดอยู่ในคลาส ของ HK class I kinases (HKI), HK class II (HKII) และ HK class III (HKIII) ตามลำดับ จึงอาจเป็นไปได้ที่จากการมีอยู่ของโดเมนที่แตกต่างกันของแต่ละคลาสของ HK ส่งผลให้ผลการตอบสนอง การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีนในที่นี้มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไป หรืออาจมีปัจจัย จากกลไกอื่นที่เกี่ยวข้อง แล้วส่งผลให้ผลการตอบสนองการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ที่ถึงแม้จะจัดอยู่ใน คลาสเดียวกัน แต่กลับมีผลการแสดงออกหรือระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้ เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐาน และเพื่อเป็นการให้ทราบรายละเอียดเชิงลึกมากขึ้น ควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศของจีโนมสมบูรณในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 พบว่ามียีนที่กำหนดรหัส HK ทั้งหมด 17 ยีน ได้แก่ PCC7418_0715, PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2615, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3282, PCC7418_3344, PCC7418_3363 และ PCC7418_3509 ซึ่งยีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับระบบ TCS โดยที่ HK เป็นเซ็นเซอร์ตัวส่งสัญญาณ มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดสัญญาณในไซยาโนแบคทีเรียสำหรับการปรับตัวของเซลล์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและความเครียดที่ได้รับ โดย HK ตอบสนองต่อสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม จากนั้นเรซิดิวซ์ของฮิสทีดีนที่อนุรักษ์ (conserved histidine residue) จะเกิดการออโต้ฟอสโฟรีเลต จากนั้นจะช่วยให้ HK สามารถจับและถ่ายทอดกลุ่ม phosphoryl เฉพาะของมันไปยังเรซิดิวซ์ที่อนุรักษ์ (conserved aspartate residue) บน RR ต่อจากนั้น RR จะถูกฟอสโฟรีเลตบนโดเมนตัวรับ โดยปกติจะส่งผลให้เกิดการเปิดใช้งานโดเมนเอาต์พุตที่สามารถสลับกิจกรรมการแสดงออกในยีนต่างๆที่ช่วยให้จุลินทรีย์ปรับตัวเข้ากับสัญญาณภายนอกได้ และเมื่อทำนาย GO function พบว่า HK มีฟังก์ชันระดับโมเลกุลส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับฟอสโฟรีเลชัน เซ็นเซอร์โคเนส แอคทีวิตี และมีเพียงยีน PCC7418_2831 และ PCC7418_3282 มีฟังก์ชันระดับโมเลกุลส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับ โคเนส แอคทีวิตี เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของโดเมนสามารถจัดจำแนกคลาสของยีนกำหนดรหัส HK ได้ดังนี้ ยีน PCC7418_3509 จัดอยู่ในคลาส Incomplete HK, ยีน PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_2611 และ PCC7418_2615 จัดอยู่ในคลาส HK class I kinases (HKI), ยีน PCC7418_2200, PCC7418_2265 และ PCC7418_3363 จัดอยู่ในคลาส HK class II (HKII), ยีน PCC7418_2050 จัดอยู่ในคลาส HK class III (HKIII), ยีน PCC7418_0715, PCC7418_1838, PCC7418_2178, PCC7418_2222, PCC7418_2832 และ PCC7418_3344 จัดอยู่ในคลาส HK class V (HKV) และมียีน 2 ยีน คือ PCC7418_2831 และ PCC7418_3282 ที่ไม่สามารถแยกคลาสได้จากการศึกษารูปแบบของโดเมนเบื้องต้นนี้

การทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ใน *Halothece* sp. PCC7418 ภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือ พบว่า ยีน PCC7418_0715, PCC7418_0766, PCC7418_1721, PCC7418_1838, PCC7418_2050, PCC7418_2178, PCC7418_2200, PCC7418_2222, PCC7418_2265, PCC7418_2611, PCC7418_2831, PCC7418_2832, PCC7418_3344 และ

PCC7418_3363 เมื่อเทียบกับกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานขึ้น ยีนเหล่านี้ มีการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีน ณ เวลาที่ 1 ชั่วโมง และ ยีน PCC7418_2615 เมื่อเทียบกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และ ยีน PCC7418_3282 และ PCC7418_3509 เมื่อเทียบกับภาวะที่ก่อนได้รับความเครียด มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแต่ละยีนมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไปทั้งให้แง่ของปริมาณการแสดงออกของยีนและความเร็วในการแสดงออกของยีน ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการที่ยีนเหล่านี้มีคุณสมบัติในการเป็นเซ็นเซอร์ตัวส่งสัญญาณ ดังนั้นยีนเหล่านี้จึงมีการแสดงออกที่รวดเร็วมาก ส่วนปริมาณการแสดงออกของยีนเมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกร่วมกับรูปแบบของโดเมน พบว่า ยีนในคลาส Incomplete HK มีระดับการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ส่วนยีนที่จัดอยู่ในคลาสของ class V (HKV) จะมีระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นสูงสุด รองลงมาคือยีนที่จัดอยู่ในคลาส ของ HK class I kinases (HKIs), HK class II (HKII) และ HK class III (HKIII) ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างรูปแบบการจัดเรียงครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่า HK จะประกอบด้วยโดเมนที่คล้ายกัน แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างหลากหลาย ซึ่งการแสดงออกที่มีความแตกต่างเหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงการแปลรหัสที่เฉพาะต่อหน้าที่และกลไกการควบคุมในเซลล์ที่แตกต่างกัน สำหรับใช้ในการปรับตัวของเซลล์ให้เข้ากับสภาพแวดล้อมโดยรอบและความเครียดที่เซลล์ได้รับ จากผลดังกล่าวนี้ จึงอาจเป็นไปได้ที่ว่า นอกจากการที่โดเมนมีรูปแบบและองค์ประกอบของโดเมนที่แตกต่างกันในแต่ละคลาสของ HK ที่ส่งผลให้เกิดการตอบสนองการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ทั้ง 17 ยีน ให้มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไปแล้ว อาจมีปัจจัยจากกลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็นปัจจัยภายนอกและภายในเซลล์ ที่ส่งผลทำให้เกิดการตอบสนองการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK แตกต่างกันได้ แม้ยีนดังกล่าวสามารถจัดจำแนกอยู่ในคลาสเดียวกัน แต่กลับมีผลการแสดงออกหรือระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้ด้วยวิธี semiquantitative เป็นวิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนเบื้องต้น แต่ก็ถือได้ว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ซึ่งนำไปสู่การศึกษาในด้านต่างๆ ทั้งวิเคราะห์ลักษณะเชิงสมบัติและบทบาทหน้าที่ของโปรตีน โดยใช้เทคนิคอื่นที่แตกต่างออกไป รวมถึงการแสดงออกของยีนในระดับอื่นๆที่ควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Ann M. Stock, et al (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 69:183–215
- Ashby, M.K, and Houmard, J. (2006). Cyanobacterial Two-Component Proteins: Structure, Diversity, Distribution, and Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(2):472–509.
- Barakat, M., Ortet, P., and Whitworth, D.E. (2011). P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res*. 39:D771–D776.
- Dikiya, et al. (2019). Insights into histidine kinase activation mechanisms from the monomeric blue light sensor EL346. *PNAS*. 116(11):4963–4972
- Eugene, G. et al. (2017). Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. 133:215–223.
- Haitao, et al. (2017). Translating Divergent Environmental Stresses into a Common Proteome Response through the Histidine Kinase 33 (Hik33) in a Model Cyanobacterium. *Mol Cell Proteomics*. 16(7):1258–1274.
- Ibrahim, M.S., Puthiyaveetil, S., and Allen, J.F. (2016). A Two-Component Regulatory System in Transcriptional Control of Photosystem Stoichiometry: Redox-Dependent and Sodium Ion-Dependent Phosphoryl Transfer from Cyanobacterial Histidine Kinase Hik2 to Response Regulators Rre1 and RppA. *Front. Plant Sci*. 7:137.

- Ibrahim, M.I, Wang, L., Puthiyaveetil, S., Krau, N., Nield, J., and Allen, J.F. (2018). Oligomeric states in sodium ion-dependent regulation of cyanobacterial histidine kinase-2. *Protoplasma*. 255:937–952.
- Kanesaki, Y., Yamamoto, H., Paithoonrangsarid, K., Shumskaya, M., Suzuki, I., Hayashi, I., and Murata, N. (2006). Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Plant Journal*. 49(2):313-324
- Kotajima, T., Shiraiwa, Y. and Suzuki, I. (2014). Functional analysis of the N-terminal region of an essential histidine kinase, Hik2, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*. 351(1):88–94.
- Krell, T. et al. (2010). Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals. *Annual Review of Microbiology*. 64:539-559.
- Los, L.D., Zorina, A., Sinetova, M., Kryazhov, S., Mironov, K. and Zinchenko, V. (2010). Stress Sensors and Signal Transducers in Cyanobacteria. *Sensors*, 10:2386-2415.
- Marin, K. et al. (2003). Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(15):9061-6.
- Murata, N. and Suzuki, I. (2006). Exploitation of genomic sequences in a systematic analysis to access how cyanobacteria sense environmental stress. *Journal of Experimental Botany*. 57(2):235–247.

- Patipong T, et al. (2020). The evolutionarily conserved HtrA is associated with stress tolerance and protein homeostasis in the halotolerant cyanobacterium *Halotheca* sp. PCC7418. *springer*. 24:377–389
- Shi1, M., Chen, L, and Zhang, W. (2020). Regulatory Diversity and Functional Analysis of Two-Component Systems in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by GC-MS Based Metabolomics. *Front. Microbiol.* 11:403.
- Shoumskaya, M.A., Paithoonrangarid, K., Kanesaki, Y., Los, D.A., Zinchenko, V.V., Tanticharoen, M., Suzuki, I., and Murata, N. (2005). Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J Biol Chem.* 280(22):21531-8.
- Singh, et al. (2015). Tissue specific and abiotic stress regulated transcription of histidine kinases in plants is also influenced by diurnal rhythm. *Front. Plant Sci.* 6:711
- Singh, J.S., Kumar, A., Rai, A.N. and Singh, D.P. (2016). Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Front. Microbiol.* 7:529.
- Wiltbank, L.B., and Kehoe, D.M. (2018). Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors. *Nature Reviews Microbiology.* 17:37-50.
- Wolanin, et al. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology.*3: 3013.1–3013.8
- Wu Xu, et al. (2019). Sequences, Domain Architectures, and Biological Functions of the Serine/Threonine and Histidine Kinases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl Biochem Biotechnol.* 188(4):1022-1065.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

ประกอบด้วย

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.040	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
EDTA disodium salt	0.001	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citate	0.006	กรัม
Trace element A5+Co		
H ₃ BO ₃	2.830	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.810	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.220	กรัม
NaMoO ₄ ·5H ₂ O	0.390	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079	กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.049	กรัม
Turk solution		
NaCl	28.17	กรัม
KCl	0.67	กรัม

MgSO ₄ .7H ₂ O	6.92	กรัม
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.50	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.47	กรัม

สูตรอาหาร BG 11 ที่มีการเติม Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะปกติ
(โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.040	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.036	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.020	กรัม
EDTA disodium salt	0.001	กรัม
Citric acid	0.006	กรัม
Ferric ammonium citate	0.006	กรัม

Trace element A5+Co

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

Turk solution

NaCl	116.900	กรัม
KCl	0.670	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.920	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5.500	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.470	กรัม

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

ประกอบด้วย

Tris base	48.2	กรัม
EDTA	3.72	กรัม
Acetic acid	11.40	มิลลิลิตร

1.2% agarose gel

ผงอะกาโรส	048	กรัม
1X TAE buffer	40	มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสด้วย 1X TAE buffer โดยอุ่นร้อน จากนั้นทิ้งสารละลายเย็นลง แล้วเติมสี SYBR[®] Safe DNA Gel Stain ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน

0.1% DEPC water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส Histidine kinase ใน *Halothece* sp. PCC7418

Name	Forward Primer	Position	Length	Tm	Reverse Primer	Position	Length	Tm
PCC7418_0715	CTGCTTCCATTGCGA	466	15	53.58	GCATGAGCATCAGGA	766	15	52.32
PCC7418_0766	ATGTTGCGCTATGCT	600	15	52.73	CCATCTGTGACTCGG	900	15	52.47
PCC7418_1721	TGAATTAAGGACTCC	677	15	44.47	AGTAACCTGTATCTG	977	15	43.74
PCC7418_1838	GTCAGCGTCAACAGC	1207	15	54.97	TCCACCATGGGAGGA	1507	15	55.01
PCC7418_2050	CATTGCTGATGGTGC	839	15	52.14	TAAGACGCGAGTGAG	1139	15	51.72
PCC7418_2178	ATCCGCCAAGAAGAG	231	15	51.83	ATTCTCCTAACGCCC	531	15	51.40
PCC7418_2200	TTGAATTGCTCCGC	607	15	53.93	TCTGTCTCCACTGCT	907	15	52.62
PCC7418_2222	TTATTATGGTCACTG	241	15	41.76	ACACTAATTTGTTCC	541	15	43.32
PCC7418_2265	ACGAAATTTGGCCCG	880	15	54.33	TCGGCTTGGGTAAGG	1180	15	54.57
PCC7418_2611	CTTCCTCTCCAGCGC	618	15	56.15	CTGCCTCGGAAGTCG	918	15	56.19
PCC7418_2615	TTGCGGGAATTAGCT	526	15	51.63	AACGCATCCAAAGGA	826	15	51.94
PCC7418_2831	GACGCAGAAGCAGCC	339	15	57.77	CGATCGCGCTGTTGG	639	15	58.36
PCC7418_2832	GCATAGAAGCCACCG	1036	15	53.83	ATTTGATCGCGCACC	1336	15	54.60
PCC7418_3282	ACCCGTTTGAATCG	306	15	53.07	GATCGCAGGTGTTCC	606	15	53.74
PCC7418_3344	CGACGGGTGATTCGA	1482	15	55.34	TTTCCTGCAAACGCG	1782	15	55.19
PCC7418_3363	CGTCAACAAGCCCAG	558	15	54.41	GCTGGAGACGTTTAC	858	15	53.70
PCC7418_3509	GAAGAAACAGCCCAC	273	15	51.03	AATCGCTGACCAGAC	573	15	52.32

agagcaagaattattgagttgggtgagtacagaagtcagcacgacaattgtccataataaaactctacaacgggtgagtcctctggtgatgagc
 ggactgcacaattgcaacggagtttagatgtacaagcaaaactttatgaaaccagtcgcaatcaagtcgaacagttacaagaattaaatcaa
 ctcaaagatgaatttttagccacaattagccatgagttgaatacgccttttagcaacgatgaaaatggcgattcggatgtacataatgaagcact
 gccccagagcgcaacaaaagtatctgggattttagaacaagaatggaatcgagaacataacctgattaaagatctattgacc
 ttacaaaaagtcgagatgaaggaacatctctacaagtcaaaccagttaatgttaacaattattaagagaaatcgctgatgaatttcagtgga
 aatggcaagagaaacagctagattgaccttgcgttttagcaccaccgagcattctgatgaacggtttaccattgagagtgatgaagaaagtg
 cgacggattgttttagagttattgagtaatgcgggaaagtattctcgggcaaagacaacagtcgaaatcatgctttcgaaacaatccacaactg
 gatttgcatgagtgcaaaaatattgggtatgggattgctccgagtgaaacaaagtatatattttgatcggttcggcgcgaaaaggcgcaactca
 aaaagcaattcctggcactggattaggattagcattagttcagtcctctggtgcaacatcttcgtggcaaaaattgatctcaacagcgagtataatcc
 tgatggagttgggaaacgacatttcatgtcacttctcctgctcttttagatgaagtattagaacataa

- **PCC7418_1721 CDS T02379 : integral membrane sensor signal transduction histidine kinase ; 1347 nt**

atgtataataacaaattatttacggaaccagatggcgattagcgaggtggtatcggggagtttaagttaatttttaggagatcggcattagggg
 tttatgaagcgatcgcgcacgccatcgattagtattaatcaagaattagaaactgttgcctggacaattcatgacagcttagaacggatttta
 gaacaacctggacaattaaataaaagagtcacaaatctgatccaaattgtgtatagaacaacaagctgtgctaaccataaccgccaattg
 gtaggagcgtgcaacaagatcattattttacaattctatgatttatctggggagttagtcgccttagcaggcatacaaccagaagtttgc
 atcaattataaccaacaacaatggaaaaatctgaggatattaatggcattcgttatcggcaatttatctggaattacacaccaagataatc
 aacctggggctatcttcaaactcgaagaaacctagaggcttttgataattatgttgcgaatgtcaaatggatttttattaggattaccaattct
 cattgtttctgatgtttgcgagttggtggtggcgggaaaagcaatggtccaattaccaatcctaccaacacattcaacaatttacggctgat
 gcagccatgaattaaggactccttagctgcatcgcgaaccattgaatcttcttaatgttgccaacttaaccgaaaaagatagccgaga
 aacgtccacaccctgaaacgacaaaatcaacgcctttcttcttagttgccgatttattaatgctttgctggatggagcgacaattaacaacta
 atcattattgtctgaaaaccagtaattatcaatgatttaattgctgatattgctgaggaattgctgcttagcctacagagaagaaattgtcta
 attgctcagatacaggttactcaacccttaaagtaatgggagaggaagaacaattgtatcgttttagtcaccaatttagtaattaatgccattca
 acataccttaaaggaggaaggttaactttagtttaaagcaagagaatcatcaggcttaattgaagtgattgatacaggaattggcattccag
 aagatgaacaaaaactcattttgatcgctttatcgcgtcaataaagcccgtcaagggatagaggcggttcgggttggggttagccattgcc
 gcgcatcgcgctaacatatcaagggaatatcaacgtcaaaagtcacttaaacaaggagatattttacagtttcttaccgattttaaagca
 aaagaataa

- PCC7418_1838 CDS T02379 : CheA signal transduction histidine kinase ; 2910 nt

atgacagatacaataatgttgactatcatttttaacagaagcgggagaattactacagacgatagaagaacactgattaatttagacga
 aaaaacagttgatcgcgttcattctctcatgcaagtgctcatacctaaagggagtgctgcttatttagaattagaaccattgaaacgatcg
 cgcacgaattagaaccgttttgaatccctttatcctgaagaattagaactgaccccgaattaaacgcgctttactcgatgcatatgaatgtt
 tacgaacgccgttaaatgccatcttatccgaaagtactatgatgaggaacaagttaaaagctatgcagaacagcttttctcaactgaaaga
 aaaactaggagattactataataaccctgcgccccctcctcgtctgaagagttaggctttgatgttttagggtcaatcattgaaaatgtttacc
 gcaagatttagaaaaattgaaaaagcaattcaaatagtgtatacaaaaatgctagagagttatgtcaaagtcaagcagaattttattagaa
 tttagcgacaagttacgaactttcggggttagaaaaattgcccgtgcccgttctaccgccctaaattatatcccgatcagaccttagacattgct
 caagctgcattaactaactttcaggaagcaaaaaacgccattgcaaacgcgcatcgcgcggaaggaggaacactcaaccacaactccaac
 aatggactcaagaacaggaaaaaactcaagaaagtcaattatcctgtctgaaacatctgttgaaccgcctccgatttcttagacttttatgaa
 agcgatctccgccagcaacggtttctgcagtagcaacccattgatcaaattctagaatcgatctggtcaggagatgcagaacagaacttca
 aacaagcagatacagcctcagaaagcaccaccctcctcaaaagcgaaccaccgatcaagaccaaactacgattcgcgtcgcct
 taaccggttaaacgtctcaattatgccattggggaactcgcgatcgcgcaaaatcagcaaaagttacaaagcgatcgcgcccataaactctc
 tcgacaatcgcgacagcaactcgcagattcgcgaacaactcgcgatatccgatgaagtcgatgtcagttctcgtcagcgtcaacagca
 agcgcgaaaacatcgtcaaaccacccttctcctcgttaccatccagctttgatgaactagagatggatagctacagcagctcctcatcg
 atgctgcaatcattaggggaacaaatcaacgacttagaagacaatctcgatgacttagacaactttctcgacaatctcggattaagattcggc
 aagaaaaacaactcctcagcaccgcccaagatgaactcctacaagcgcgaatggtcccttagaaacggtgtaaatcgtttcctcccatgg
 tggacaacttgtaagacgtacaacaaccggtgacttaaatattacgggaaaagacgtgctggtgataaagccattttagaaactcta
 tgatcccctactgcatttagttcgtaatccttcgccatgggattgaatcttcggaagtcgcacaagaaaaaggaagccccctacaggaag
 attacccttccgcgatcgtcaaggaaccgtaccttggtgaaatcgcgatgatggaaggaatcgactgggagaagattcgagaaccg
 cagcgaaaaaacaattcttctcagactcagacgagacttatcagaattactcttaccctggctttctacctcgaacaagcgaatgaactc
 tcggggagaggaaccggttagatgtgtacgtaatcagattcatggtgtgggggaaccgtaagtttaacctcacagcgcgatcgcggaacca
 ctttaccttacaacttctcttaatatgccaccgccagacttttaactgtgaagcaggaggacgttttattccctcctcgcgcaaaaagtc
 atcggatgttacttccaaacccgaacaagtagagaatcagctttacagtgaggaggaaggcggagaaccgcaactgttcccatttccccct
 caatcaagtatacatcaggaagagactttcttcccgcaaaaacaacatccccttaacccatttcttgaacccaaaaacaccgtaat
 cccttactcttaattcaaacatagaggggaactgctatgtttacaagtgatcggatttttagtgaacaagaattagtcattaaaactttacctcgg
 gtccccgcctcccgattatgtacaaggttacaccgtcttagccgatggaagtctatcgctggtgctgatcccgaagcattatgacagagaca
 gtagaagcgcgaaccgttactcacgcaccggttaacaactttctcccgtcaccgcagaaccacagagacaccgccagccaaagagacaa

aacattcaaccgtgttagtgcgttgaagattccattgtacaacggcggagtagtgggaaaccttagaaactgggggttatcccgtttacaagcag
 gagatggcaaaagcgcgatcgcgtgttacataaacatcccgaagtgaacctcatcctctgtgatattgaaatgccccaaatgaatggcttga
 gtttctcggctactgtcggcaacgcgaggaattatcccaaattcctgttattatgctcacctctcgcagtggggaaaaacaccgtaatctcgcgtc
 acaactcggagcaaaagcctatttaactaaacctgcagcgcgatcgcgccttactagaacagtagcaaatatgaatcctaa

- PCC7418_2050 CDS T02379 : multi-sensor signal transduction histidine kinase ; 1995
 nt

ttgaatacaatccgagaaattctgcccgttgggtggtcagaattcacgctgcaaactcgtttaatggctgtaggaacactcgtcgtttcgttagtga
 tgagtggcttaacgttttgggcagttaacaccattcaacaagatgcacggatgaacgatacccgtttggacgggacttaggactccttctcgcgtg
 caaatatgcccctctgtcgcagaagataacctcactgaagttgctcttctcaggacgattttacagcagtagctccagtgctccgctacattc
 tctacgctgaaccgatggcaaaattcgtttgggattccctttccgaagctgaaggagataaacacctcaccatccaaagacgaatccaact
 ccccgacagttactatcccgactcagaaaacctctcgtcgtcaacattcgcacccgaatggagaaagtactgatgtttttgtcctctgaatt
 acgataatgaatatctcgtgttcttctgttggcattaatccaaccccacagttgctcgttcttctaacttaaccctgatgtcaccattgctgt
 gtttatctcgatttggcgatggtgattttagggcggtctttaatgctttaaactacacccattaaagaattattagtggtgtgagaata
 ttgctgccgggaatttcaagcaacgcacatcgaactcccttttagggagaggttaggggaactgatttcgagtttaactacatggcggaaacgcctg
 gcgcgatatgaagaacaaaatattgaagaactgacggcgagaaagcaaaactgaaacactggtttcgaccattgctgatggtggttctca
 ttgataactaattaaatgtgatgttggtaacccaccgccaacggatgtttggtgggaaggcgagaataacaggacaaaatgttctccatc
 atcttcccacgaagtcaacatggaaattagtgaaccgttgcaagaagtattgcaaaagccacaacagaaggagaacaaaagatcatgtt
 gaggaagctataggagggcgagagtttcgattaccctcagtagccctcatgaacgaaccgtagaatcttactcactcgcgtcttagacc
 aatatcgagaacgattaaaggctagcattaccgtccaagatattacgcgggaagtggagttaaacaaggcgaaaagtcaatttatcagca
 atgtttcccacgaattgagaacaccgttatttaatatcaaatcctttattgaaactctcgtgaatatggcgaggattgacgcaagaggaaaca
 aaagagttttacaacgacgaatagtgaacggatcgtctgacgcgttggatgatgttctcattatcccgttttagagtcctcaaaagtc
 tatcagatgagtcggttgattgagtcagcccattgaacaaacctacggagttatcatctcaacgcgaaagataaagaattgaaactcttgca
 agaggtacaacccgattaccgcccgaatgggaaactatgattactgctacaaggtttgcaacttagtcggaaatgctttgaaatttagtaa
 accaggcgaaaagtgatgattcggcgctacttactcgtcctgaagatcatccctatcatccagtcacaagtcgggtagaagtcgctgat
 acagggtgggattgataatgaggatcaagaagccatgtttgatcgttttccgtcgtcgaatcaggtacatactttagaaggacaggctta
 ggattatctattgtccgcaatatttggaacacatcacagtagtggcgttttagtgagtgagttagggtgggacaacttctggttgacttact
 cgtccatgaatcgggttagataaaaatgaggatggacaagcaacctcaaatgaacaattaatagtgaaattctgaatcgaattag

- PCC7418_2178 CDS T02379 : response regulator receiver sensor signal transduction histidine kinase ; 1122 nt

atgagtcattccctaatacggcaaaagcaaaacccgatacctcttagttggtgatgattctccagataatgtgttctggtccagagcattttg
gaggaagaggctatcacattgaagtggcggaagaaggcgaaagcgcatcaagaaagtcttagcaactcctccacagttgattttactggatg
tgatgatgcttggatggatgggttgaagtgaccgaacscatccgccaagaagaggattaccctttatcccattttactgattaccgcttatg
atcagccgagtgtggcgaaggattggatagtgggcggatgattttattcgtaagccggttgaattagaagaattattagcacgagtcgctcat
tattacgtttaagcatagtggtgatgaacgagatgaaattgcccgtaacgggctgattttgtctctgctcactcatgatttacgaacgccgtt
agtcgctgccgatcggatgttaattttcagcagggcggttaggagaattatctgctccatgcaagaagcggtggcgactatggaacgca
gtaatcggaattactggatagtgtaataccttactggaagtgtatcgctttagggcggaagcctcaatttagccagttgatgtcaa
agaaatcattgatgaagtcatccaagaacttaacctttagcagaagaaaaagtttaagtttaacggttgaggatcacctcgaagctaatcaa
cccacaacggtcgaggagatcgattagagttacggcggttattacgaacttagtcgggaatgctattaagttactgatgaagtggggtgacg
gtgcaatgcaaccaaggaagaacagaaacccctcagcttataattgaagtggagataccggtcctggggttccccgagaacaaaa
gactttgttgaacggtttcgaaaggaaacatcagaattctggcagtggttaggggttcattgtcgcaacggattttagaaagtcatcatggc
aatattgctctagactcagaagtgggaaaggcagttgtttaccgtgacattacctctgacgcaaaattga

- PCC7418_2200 CDS T02379 : PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase ; 1173 nt

atgtcttcttctccaatcagctaaaaatatctctctcgcaaaacaaactccaacaacggattaccgaattagaagaagagaatcaacaa
ttaaacagcaactagcaactgaagcaaccgcaatgaccaacccttcgcaaaatttcaatgctccaacgatgcaatttagtcatcgatc
ccagtgtgatcaaatltagaagccaatcccaagctgaaaaactattaggctattcccgatgaattactcaattcagttccgtttctaag
attcatccagaagaatgcccacttatggcatttaccgtaattatcgccgttggtcaaggctggacgaatgaattgagttgttaacgaag
tctggagaaaaacgccgctggaatttctgcaaccgctgttactttcagaatcgctcttgatttctctgctgagatattcggaacga
ctaaaagcccaaaaagaagcgatagaagcaacagaagccctcgagaattgggagaattaaccagatgattgttcacgaaattcggatcc
ttaaagcagtttaattgggtttagaagccctacaaaaattgaattgctcccgagataaggctcgtttagaattagcttccgaagaagcac
agcgtttacagtctcttttagaagaattcgttatatacgaaccccaactggttgaaaaagaaccattgatttgaatcagtttagccaagat
gttttagaaattatctataaccaattctcagtacagcatgacattcaattgataacgatgctggaaccgctcaaagtttaggggatcaatcaa
actcaacaagcttctaatttaattaccaatgctggtgaaagcagtgagacagatgagccaattacctggaatagagcgggaaaaaga

gaaagttaaggtgcaagtcataactatggttcgccgattccaccagaaatattaccaagctaaccaaacatttttaccacaaaatcttca
 ggaatgggcttaggattgccattgcaaacgcattgtcgaagtcctcaagggaaactttcaattgaatctcatcaaatggaaggaactacgat
 cactctgtctttccggttgcttctgctgaagagaattag

- PCC7418_2222 CDS T02379 : response regulator receiver sensor signal transduction
 histidine kinase ; 1113 nt

Atgaataattaccatcttactgattgttgatgatgaacaaataatttgatgtattgaggctctattagaaggggaaaattacaaactctatt
 acgcagcgaatgcctctcgcgccctccgctggttagaaaaaatccagttgatgtgattttgctggatgtgatgatgccagaaattgacgggatt
 acattttgttcttacttaaaaaataatcctgattatcaatatatcccgattattatggctactgcattaacgggaaaagaagatttggcagcgtgtt
 tagaagcggggcgatgattttattagtaagccttaactggattgagcttcgatcgcgcttgattccatgatccgaattaagcaacaatatg
 acaatcttcagttattgttgcaacgccgtgaagaaatggcggaaattattgttcacttacaaaatccagtcaccagcattgtttatcttgca
 aatgctcaagtttacgaacttagatgataaacaagtaagaaagtggaaacaaattagtggttcggggaaacgggttagaagaacaattcaac
 ctactgacaatggcgaagtagaacaagggcgttagtttaaacccaactccactccctgaagccttttttagaaaaactggttcaagaatt
 tagcgcgatcgcgtccgcaaaatcaatcaccattacgccgaattaaagctgaaatgatttcgcagccgtggattcccattttttcacgga
 ttattaataattattatccaatgccttaaaagtattctccccgaggcaaagaaattaaacttcaacttttagatacatccgaaaaagtgcctga
 aagtgttgatcaaggaaaaggggttagtgattccttaagcagaaaatatttaagaaatgaaacagggcgttcagcatagtgatgtaaccaa
 acggggttaggactagcctttgtcagatggcagttctcgccatgggggtaaaatttatgttgaagataatgaaccacaaggggcaattttacc
 attgaaattcctcgattaatgtttctgaacctgattcagtaagttccgtaagcgaatag

- PCC7418_2265 CDS T02379 : GAF sensor signal transduction histidine kinase ; 1953 nt

atgcacagatcgacttcttagtgacggagtattgggacaactccgcacttacgaacccaaatatttcaaactcctcttgactgctcttccc
acgcatggagatcaagttttgcaacggcagatccccactggtgattgcaagtttcaacaggaacggtttatcgacaagaagccatcgt
tatcgacgcttaggcgaaaaagcgatcacatctacatttttgggggaaatacctccttgaagagaatgagcaaaactgcaccaccattaa
tttctcccgatgatgcttctcaagaatggcatttaactgttattagcaaaactttaccagttgtctaattgtcgggaatgtgctgctcatga
taatgatgaagcggcactttagattcagcgcgacggttgaaggaatctggacatttgatgcggaagtgacaaaaaccgcaaccgctctcctgt
ttcaaaagattttatcttaccgccccgaattgcaatctcaaattgaagcagcccagcaatattatctaagaatccccacaaccggaatcttc
ctcagaatgggtgaatccagatgctttgtggaacggttggtaacgcatttacagcgggacaatatcgggtaattcgggcttacagcgcgatcg
cgaaaaagaagaaaaagaacgactcttgcggtcttaaccaatgccattcgtcaatcactagacttacaagaattctcgaattaccggtc
aggaagtaggagaagcccttgctgcttgcggtgttagttatcgcctgacccactgcaaccattgaacacgagttttacgag
ataatattacctctgtgaaaacgaaatttgcccgttaaaaataatccgctattgcaaacgtccgtgaaaaaggacacccatctatattaa
agacacaggatcagaaccgaccattcagaataattcctcttatcctcactggtgacgagcatcaaatttatagttggctctttattccctgtt
atatcagggacaagtattggcatgatcgaactgcatcattgctatcgtcgagaaaccgctggacagaggaaatattgaaactcgtcgaagcg
atcgcgccccaaatcgactcgccttaccgaagccgagcctataactctgaaaccctcaacgaacaactcgaagccctcgaacaaa
cgcgatctaaccttgctgccatcacggacacgaactccgcacccccctctccaccattcaagtgtgcttagaaaagcctagtcagtgaaccg
atatgtccgaagaactgcgacaggtgatgttatctaccgccctaatgatgcggaacgaatgctcgtctggtgcaagattcctcacccttccc
gttagaaagtggacgtattgagtggaatccagaaccaatgtctgtagaagaatgtattgagttatccctcagtaatattcgcggaaaaatacc
gaaaccccttaccgaaattgaaatcaggcaaaaacagacctcctcacttatgtggatggagagtggtagtggaagtgttagccaaac
tgttagataatgcttgaagttaccgacaactggcaaaattatccttccgcagaacccccaaaaccaatcaagtgaagttactgtctcg
gatacgggacgaggaattgaaccttccgcttagaaaccgtcttcgaccgttttatcaagaagaaggggcttgcacggacaacggggaggaa
caggtctcgggttagccatctgacctcaaatcgtcgaaaaatggggtggagagattgggcagaatcgacaggtaaaaaccaaggacacagtt
tcactttacgattcccatcgctaaagaagcccgcgttaaatctaccgtagccagtag

- PCC7418_2611 CDS T02379 : integral membrane sensor signal transduction histidine kinase ; 1446 nt

atgacccgactccaatctttgccagtaaacttcatcgtgcctttaaggcttggaatccgcgatcgtgcggtttcgtctcaccattggcattgcg
acagtatcagcagtcggttgggtggcgtggcaatctggttgggttggagtatgaagcaaattctgatcgcagcgcacaaagaaaatattgtgat
ttggcggaaacgaatgcctcaagatcagatttatcaggagatgtatgcgccacaggaagcaatgcaaaaagcagtcagaatttgagtgcg
atcatgttttctgtggattgaaaacgaacaagaccaattaattgctcgtacagacggttagactcaccgcatccgttacctgtgtccccgcaac
tatcgattttccctttctgggtgatgtgctgcaggtggaggatcgctattgggtactgtgtgccaacgccttgggtgtcaatcagcaaacggtg
ggaaaactgtatattgctcaagatattagctctgatcaaatcatgtttgtcagatgattagaaacttagggctagcaacagttgtgccattggtg
gaatgagtctggctggggcatttatattgcgcgatcgtgcttctcctccagcgcatttgaactcactgaaaggatttctgcgatcaattggg
agaagccaaaatagaactcgcgcgccccgacagaagtcaacaacttgccgagcgtttgatgagatggtgatgcgcttatatagggttg
gaacaacaacagcaatttgcagtgatgtctcccatgagttacgcactcccctgacgattgtgtctggtatttacaagtttgcaacggcgcgg
gataacttaagcccaccgcaacgagaggttagcttgcgacttccgaggcagatcgcacgattcaactcttgaagattggtgactttagct
cgcattgataatggtcagatgcagtttcaactggaagaccttgttgaaggaattgtacaagaggtgatcactcttctgaacaatatcacgat
cgcgcgattcgttacgaaggtagcaatgattcgattcgagttatggtgatgccaatcgtctcaagcaagtgttactcaatctcatcgacaatgcc
gtaagtattccgaaccgaaacagctgttatcctgagttacagaaacaggaaaacactgtcattttagccgtgcgtgatcagggaaataggat
tcctttgccaacaaactcgattttgaacggtttatcgggtggatgatgcgcgatcgcgctccactggcggaaacgggcttagggttatccatt
gtcaaaactctagtggaggatggacgstaagattacagttagttctcagttaggcgtgggaacaactttaccatttcttaccttcaagcaa
gagtga

- PCC7418_2615 CDS T02379 : integral membrane sensor signal transduction histidine kinase ; 1314 nt

atgttccaaaccacacggagacggtagccttatggtacgccactgtcaccgcagtgctgttactcctgtttgcaacgggggtttatttctatgttc
 gtgtacgctcattgaacgggttgatgataccttaaagcacgtgtagaagtggtagaacgatcgtgatgattcagccagttgcaacttccgat
 aatggctaccgtctcgatattgaaccagctttggcaatgatacggaaacggtagaagacgaccatattgattagaatggttaatccagaggg
 ggagttagtgtggtcaacttttccgatgccattagctatcccctccataaaaatcgtccacagaaacggttcatttggcttcgggataccttta
 cgtcaagtgactgaaccgattcaactgggaaaacaaactttagggtatctgcgctcagtcaccttggttgaggtaaacaaagccgattcgaca
 gttacttttagattaacgattgggattagtgcggttggttgtggttcgcggaattagctgggttatctgggattcgattcaaccggtgaaaga
 atcctatcaaagtctgaacagtttaccgccgatgcttctcatgagttgcgaaaccgatcgcgatgattcaactaatgtgcaaatggcacttg
 cctacctgatggggaattacaacagcaacagttacaagtattgaacgcttgacgcaacgcttgggaaaattggcaatgatttatttcttag
 cgcgatcggatagtggtgattgcaacgcaacaacagtccttcccttggatgcggttattgatggaagtgatggaagaacaaagcgcgatcgc
 gcaacaaaaggaatcaaactcaacctccatctccctgaatcagaacagacactgcttcagtgcaaaaggcactgggatcagctagcgc
 gactttaccaacttgattagtaattgaattgaacattccgatcaagaaacggtttaccaactgtaaccattgaagttcagcagatcaaacg
 caaccatcatcattactacaagttgatattaagatacaggaaaaggcatcccagaacagcgattcccatttggctgatcgttctatcgcg
 tttctccctaccctcaagatagcaccactcaaggcgaacaggtgacgggttaggtctcgcgatcgcgcaagccatcgtccaaaatcatcacg
 gcgatattagcgtcttagtttcccaacaaggaacaaccttactgtcaccctccccgaaaacagtgaccctgga

- PCC7418_2831 CDS T02379 : putative CheA signal transduction histidine kinase ; 879 nt

Atgtcccttgatccagaaatccgtgaccaagcctatcaattctttagctgaagcccctgaactttacaacatagaatcagggttctaa
 ccctcagagaagactataaactgctaaagtccatggcattatgcgggcagcccattcgattaaaggggtgagcagggcgtgggcttagaggg
 aattaaatcgatcgcgatcgttagaagatatctcaaagccttatatcatgcagaagataaaattaccctgaatttgaacggaaattattac
 acggctatgactgcttacaacgcccgtaacggaacaaattgaaactgggagttatgacgcagaagcagccgttcaagaagcagaaagtgtcc
 tcagagggttagaacgagttaggggagggcagaccgaagcgaagactatatcccagttccgaagatttggcggttgatggttcttcc
 atcttgaagtggatggaacaagggttagaaccttagaactgtgattgcttcccctaatcagtatgaagtctgggagaagtacgggcgca
 agcggagtccttacaggattagcggaaatcatgggcttggcgggcttggtaaatgccaacagcgcgatcgtcactagatcgtcatccag
 aagccgtcattgagattcaaatattgattgaagacttagaagcgggacgcaatgcgttttaaacggcgatcgcgcagaaggagggaacc

ctccgcagcgttactggcttatacagaacggaagagacaactattaattagaagaaaatcttgagatgacaccgacagcgaagaataac
cgtaacgctgatgatctctttgggggtga

- PCC7418_2832 CDS T02379 : putative CheA signal transduction histidine kinase ;
2295 nt

atgatctctttgggggtgagttagaacagaagaagaacaacgattcacttagaagaacttcagaagataccgtaacgctgatgatctctt
tgggggtgagttagaacagaagaagaacaacgattcacttagaagaacttcagaagataccgtaacgctgatgatctctttgggggtgag
ttagaacagaagaagagacaactcaaagcatcccactaatctagacgatgcatgattaccgccattaacgaaaactttctgattaccgcca
gcgcaaaacttaccactccccctatccccaaagcagaaacagaaacgaccccacaccacaaccagaaccaagaatccccgaaaa
atcctctcaacctccattcgcgtcgatgtggaacggttacaagccatggataaccagttaggggaattagttatccaacgcaatagtcttgcgt
tcaaacgaacagctacaaagagagtaagagaactcctcaatcggtttcccgtttcaaaacttagtgggacgcttacaagaatctccgat
caagaagtgattcgagaagcactcaaaaacagtctcgactctctccgaaaagcaacagacagattcgtctcccgtcagtgaacaaccgga
atcggttctcgatattgattcgatagcttgggaattggatcaatatgggacattaaacgcatcttgcagaattatagaagaacggcgcaat
tgaagaatctgtcggcgatgttcttatttggcgatcaatccaacaaacgctacaagcagcgtaaaatgttgaacaattgcgagatgaat
tgatttggcgcgatgttgcctttagtaaatatttggatcgatttctcgatcttgcgcatcttccgatcagatcaaaaaccactcgcttaa
gtttagaaggaactggcgaagagtggataaaagtgttttagaaaagtgtatgatccccgacgcatctgattcgaacgcctttagatcatggca
tagaagccaccgaaaccagagaacaaaacgggaagtcaagaaggagaaattgcgattcgggcttattatcagggaatcaaaccgttatt
gaaattagtgatgatggcgggtgggattgatgtggagaaggtgaaagcgaagccttacaacgggttactcagtgaaaccaagccgaacgtt
tttctaagaacgattatataacttactatttgaacctgggtttctaccggaaggaagtcacggagttatcagggcgcgagttggttagatgt
ggtgcgcatcaaatcaagccttaaaaggaagcatcagtttacagtcaaaattaggacaaggaacaacctttatctttagtctccctaccact
cagtcaatggcgaagtattgattgttttagtgataccacgatttggcgctaccgtccgataatattgaacaaattattgttccatggctgaac
aagtgaaaaatacagggaatcaacgcttctctggtgggaagaccaagcaactcccatttatacctcagagacttactcgattataattgtcc
gcttctgctgctctcccacttacaagcattggcgagcaaccaaggacaaaatcgatcgcccccttattaatcttaaacggggaga
acaacgctatcccttagaattagaccgtaattactgaacaagaattagtgattaaatctcttggcagcgcgatcgccccagaatacgttt
caggtcgaccattttaggggatggcagaattgttctgtgatggatgtttcgccttattacaatccgttcaacaacgccccagcatcggtgt
tactcccactcccaccgttccctcaacagtaaaatccaacgattctttagtgatgactccgcaaccaacgccaacctaacttttcc
ttacaacgcgctggctatcaggtttacaagcaggagacgggagagaagccatttccatgttagaacgttatcccacacaaaatttagtggtg

cgatattgaaatgccaatcttaacggctttgaatttctccgtaccgtcgtcaaaataacactctcaatcaaatccctgtgtaatgtaacgtc
 tcgcagtagcgacaacatcggaactgtgcactcatctcggggcaagtcactattttacaaaaccttatctggaaaagattttctgttacac
 taaaaactatcatcgatcaataa

- PCC7418_3282 CDS T02379 : putative CheA signal transduction histidine kinase ;
 921 nt

atgagtataatcaacaacgtatcctcgatattttattgaagaagccaaagaacattagaaccttagaaaatggattactgaatctttccac
 agcttctgaagattcagaacaagtggatgatttatttcgagcagcccactccattaaaggaggcggagccatgttagggatgggagtatccaaa
 aaacagcccaccgcctagaagatgcctttaaagtctttcgcgacggcactgttaatggtgacgaaaagctcgaatcgcttttctctcggcgttg
 atgtgctcaaagatctaatacaccgittggaatgacagagggttaagtgaagcgcaagggaagaactggtcaaaggagcagaatctcagtt
 taaggaattacagcaacatttagatcaatgtgcggatgtggaagcagttatagccgacattggagacaactcaaaccaagaagaacagaaa
 ccattgctgctccagcacaagcagagaccgcgactccccttgcgaaatccgacccttgttacgggaaatgctgcaattgttagaggggaaga
 taacgctgagaccgggaaacctgtggaacacctgcgacgacgcaaaaatctcgtcccgatcacgccaactggacaaaattagtggaaa
 ctggcaaaagcgcgatcgtaatcccaaacattcctacaacaccctcgccccgctcattcaagaactcaacaaggggctgattgcttag
 aactcgatcaaccgaaacaatcaatattagcgacaccctcaagagcttctgtaataccccaccccccaagtcttaattcctgctgaaccag
 aagcagcagcagccttactcaaacggatctttaaccaacagcaactgtctcaactgagagaaaaaatcagtgctga

- PCC7418_3344 CDS T02379 : CheA signal transduction histidine kinase ; 2868 nt

atggatagcgaagcacaagcgagacaggatcttgaagaagccattgaatattgtgatcagctagagtcagcccttttaggaattgcggaaca
 aggggttgattaaaagaatttgatgacgagccagggcagcccattccattaaaggggggctgcatgatggggttgctgctcagtcgca
 ccgctcatgctctggaagattacctgaaaatttgagcgcgctttcaacaggtagaagtcaatacggagttagaactttttactgagggag
 tcgattgttacgggcaattggtgaccaatctcgtcaaggtcagccccacaaccagactggttagagcaacaaacaacaagcattttgacc
 cctgcggaacggttaggcgaattaaccgaggcagatgaaactgcattactctcgaagaagaagatgctgatgttgctgatttgcttttgccac
 tggggtggaagagactttagagcgattaaaagaacaattgacgctgctttcctaagaattgacagttgctttaaaaataaccagcgaggaat
 tagcggattttgacggatgattgagtgtagccgtttggtgcttatgtgagtcggttcagcagcatttaattgagagtcctttagaacaggtaaa
 atctttaacgcgagcgcgatcgcgcaatgggaacgctcacaagccctgattcaactcggctcgaagaacatctctccctcaactcgacac
 cagtgaagtggtttctgaggaaatggaaaactgggaattcctgattttgatgattcgcattatccagttttgaagatctcgaagccgttcagca
 gaagaaaactgggagattcctgattttgacgctttagacatccctgaagcatcagaggagaaatggcaacggttactccaagtttatctgagaa
 gccagaagaacgstaagcgaacctctcaaccacaaattgaagaactccctgttcccaccaacgcaagagagtagcgtcagggtttctg
 tgaacaactcgtcgcacatcaatacccttttagtcgttaattctagaacgggaattactcaactcctcgtcctcggagttggaagagttgtaa
 atctcagtaaatcaagaactcagcaactagagcaagccaacacacaactgcgaaaatggtatgacaaattaaattatgaacgggtaaccgttt
 ctaacacgccagtcgtgaaacggaagacttcgacaccctagaaatggatcgtacagtgacttgacgcttcttccaagaacaaatggaaa
 ccattgttcagttacaggaagtaaccagtgacctagaagtcagttcccgagaagtaaccaagccatgggggaattaaattttaccaccagcga
 ttacaacgagggattactagagtacaaaccgcccttttccgaagcagtgaaaggattcgcgsggtgattcagattgtcggttcagtatga
 taaaccggttaccattgaaattcagggagaaaatacactcatcgcgctgctgttgaagccctatccgcccctaaatcacctcctcctg
 aatgcctttgaccatgggattgaagaccctcaactcgcctccagcaagggaaaccagagcaaggcaaaatcacctgaaatgcggtcaatca
 ggggaataaaacatgattccattagcagatgatggcgtgggattaatcgcgacaaaattaaagcgcgtttgcaggaaatgggctgaccccc
 tctgaaatcgaacaattcagcagatcaaaaacttctcactccattttaccctgctttccaccgccaacgggtgacagaattatcagggc
 tggcgtggcatggacgtagttcgcaccaacttagaaaaattcgcggtgacgttcatgtgatacaaaattggcgcggggaacaacctttaga
 atcagttttccgctcctcgtttccattgcgcggttacaatcgtggaaagtctgggctggtgtttgcccttctgtgaaatggtgaaagcctttgc
 gcccttcgatgccgaagccgaagctacaggagaaatcctctggaatggcgcgatcctccgatcaccagtttagaggcttggtcaggtttaat
 cgtcctgtgaaacctttgtcatgagaggaactgcaacgctcgcgctaccgtcttaattgtcaattatcggggatcatggcaagggctcgg
 gtagatcgttctggcaagagcaagaagtgcattgcgtagcgttgacagtccttcccttaccgctgggtaacaggtgcgacagtttagg
 agatggtcgtccgattccgtagttgatccagtaacttctcaactggtttcaacaacccccacagaaactgaagccccttctgatgtcgcct

ctcccgatcagaccatggagacagacaccattctcatcattgacgactcaattcatgtccgccgttatctcgccttagccttagaaaaagcggg
 ctatcaagtcgaacaagccaaagatggacaagaagcgggtggataaagttttagtggttacccatcaaagcagccatctgtgatattgaaatg
 cctcgtctggatggttacggggtttaggagaaatcaaaaatcatcccagtttaaacagttaccgattgcatgtaaacctctcggggaaatgag
 aaacaccgcaaactagcgataaagttaggcgcgtctgttacttctctaaaccctacaacgagcaagagttactcagacccttgccaccatg
 ataatgaacggatccccagcgcgtag

- PCC7418_3363 CDS T02379 : GAF sensor signal transduction histidine kinase ; 1473
 nt

ttgatttagtttctgcaggtgagtaatttttaaacgctggtctcaaactttcttcagaagccaatccagacctagaaccactagaataggg
 agtagtaccgttttgacaacggaatcaactttgtcctcaagcgaatgttcccaatggtgaaccgactttattccccgctagctctgaattta
 ccgactttgccgttcgcaagtgaatcaatcaagaaggttaaatgcagatcgcggtgctggttacttaacgaaagaattgacatctggaact
 cgacagttgattcccattgtgtctatcccgaagatagcagttgttgggaagagacagttgaaaaagacacaattgttacatccgatgattcatta
 ttgaaaatactcctttgaattgccagcaagtgttctccaccgaggttacaccacagttagccacagcgaaccgaaatctgatccctgatgt
 ggttaacaaaacaatcaacatcaaattgtttccggtactgcatgaaaatgtcatgatgggttattagtcgtgctcgtcaacaagcccagtg
 gtagtcagtgagggttacccaaattcagcgcactgcaacaacgatcgcgctggcttgcgttttagatcaacgtcagggactctcgcaacagcaa
 cttcgtgaacaacaatggcaacaacaacgacagcagatcaactcgtgatattctgcaccagttacgaaacccctcatggcctacgtac
 ctttggaaactgctgctgaaacggttcagcctgaggatgatgagaaaaacgctccctcggcgaatgtgctgcgagaaagtgaacgtctc
 cagcaattactgcaagaaatggggattatttgatcaaattggaaccctgacagaagaagatgtcactgttgagacccaacaaaaccgctt
 ctgggagtgatacaactgtcaaatccttaccccaagtacagccttaacttagaaaccttagcttgaatgaggtattgcagcaattgtaa
 ttccatgagcgcgatcgcgcaagaccataagattgatctcaaaaccgacattcccgatcatctccccgattcaagccaaccgcaaagcctt
 acaagaagtctgagtaatctcttgataacgccatcaaatacccccgaacaaggacggttgaagtcgtgatttgaacgacaaaaccgaa
 ccaacaaggattatcattcgggataatggtgctggtattccgcccagacgatcaacccaaaatcttcaacgacattatcgcggagtgcagtca
 gaagggatattccaggaactggcttaggcttagcattgcgaggattatgtggaacaaatgcaaggtgaaattgaattaatctctccagcag
 tccccctgaaaacccaccatgggacagctttattgttggctgaagcgtag

- PCC7418_3509 CDS T02379 : histidine kinase ; 1347 nt

gtgagtgtcaacagttgccagcattaagtcaaagtggaaagacaacagtcctcgggaaaaacggatcaattgcaaggatggcgggaatggt
acagcgcgatcgcgtcactagaatcattactcaaaccgatcgcgcaaggattgattttgtccagtcctcgcaccggtaccaacccaatcaa
gtttgacaactgtgttttaccctgaaatcacgttagcgggggtgagttcttcacgcctactgactttgcaccggtcgcggagaagaacag
cccaccattcctcaccgatccaagcaatcccgtatcagcagatgatcccctacaagatgagcagtttgcttagttttacctcagaatcttc
tgttactgatgctaacggttgactcagaaggaaactcccattttgattttccttgatcctgaagtgactcaacgggcttgctaaggctcgcgatc
gcgcttacaagaaattcccagaacacctgacctcgattgaagaaaaacgagaacagttcccctgtgctcctcattatcgtctggtcagc
gatttcactcgacaactattaactcattaccagccgagaacccgtcagcgaacatcacaatcttgatcaagccaaactcctgatgtggaa
ctgttcaagctctacccatgaagtgagaacgcccttaactacaattcggatgctaacgcggttacttctaaacggaaagatttaggatcag
atgtttgaaacggttgcgctgattgatcaagagtgtaccgaacaaattaaccgcatggaattaatttccaagcgacagaattagaaggaaaa
accaacaaggcgtgcagtaactcccattcccttagaagattattcgccaaaagtattccttactggaaaaacaagccaaacggcggat
gtggaattagatgtcattcttccaaacagttaccaccgtcattagtagtcagagttactgacacaagtgttaacgggattaatggaaaacttt
acatctcgtttaccagtgggcgcaaaatgaaaatccaagtactacagcaggaagtcaaattaagctgcaattattatctcaaactccaacg
cgaaagcatcggcctcaaatcgggttcagctccaggaaagtccattggtcaactgtaaccctacaacccgaaacaggaagtctgagttaa
atthaagtgtcacgaaaaacctattgaagcccttggggtaaatcaacggttcgtaacgtgcagaaatgggagaagtttaaccgtattcctcc
cagcaagcattattaatcagtga

ภาคผนวก ค

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA

ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง	ชุดการทดลองย่อย	ความเข้มข้นของ RNA (ng/ μ l)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
ภาวะปกติ	-	327.0	1.86
ภาวะเครียดจากเกลือ (salt stress)	0.5 hour	889.2	2.04
	1 hour	1,004.0	1.93
	3 hour	700.9	1.98
	6 hour	1,395.4	1.83

ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band ที่ได้จากการทำ PCR

ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2M

AprnpB (internal control)

Treatment	Control	1	6
Run1	1	0.52	0.35
Run2	1	0.42	1.35
average	1	0.47	0.85
SEM	0	0.07	0.71

PCC7418_0715

Treatment	Control	1	6
Run1	1	16.75	2.92
Run2	1	16.98	2.81
Run3	1	18.11	3.32
average	1	17.28	3.02
SEM	0	0.73	0.27

PCC7418_0766

Treatment	Control	1	6
Run1	1	12.32	2.05
Run2	1	14.54	2.75
Run3	1	12.48	2.92
average	1	13.11	2.57
SEM	0	1.24	0.46

PCC7418_1721

Treatment	Control	1	6
Run1	1	13.13	2.72
Run2	1	9.3	3.07
Run3	1	12.63	2.12
average	1	11.69	2.64
SEM	0	2.08	0.48

PCC7418_1838

Treatment	Control	1	6
Run1	1	18.27	1.36
Run2	1	18.36	1.38
Run3	1	20.31	2.72
average	1	18.98	1.82
SEM	0	1.15	0.78

PCC7418_2050

Treatment	Control	1	6
Run1	1	3.8	1.34
Run2	1	4.33	0.85
Run3	1	6.34	0.72
average	1	4.82	0.97
SEM	0	1.34	0.33

PCC7418_2178

Treatment	Control	1	6
Run1	1	3.27	0.82
Run2	1	3.36	0.5
Run3	1	4.78	0.71
average	1	3.80	0.68
SEM	0	0.85	0.16

PCC7418_2200

Treatment	Control	1	6
Run1	1	5.2	1.08
Run2	1	7.19	1.69
Run3	1	3.96	1.36
average	1	5.45	1.38
SEM	0	1.63	0.31

PCC7418_2222

Treatment	Control	1	6
Run1	1	2.58	1.08
Run2	1	2.24	1.26
Run3	1	3.12	0.63
average	1	2.65	0.99
SEM	0	0.44	0.32

PCC7418_2265

Treatment	Control	1	6
Run1	1	4.76	1.56
Run2	1	6.98	1.1
Run3	1	8.69	1.39
average	1	6.81	1.35
SEM	0	1.97	0.23

PCC7418_2611

Treatment	Control	1	6
Run1	1	7.9	1.83
Run2	1	6.02	1.9
Run3	1	7.92	2.5
average	1	7.28	2.08
SEM	0	1.09	0.37

PCC7418_2615

Treatment	Control	1	6
Run1	1	0.96	1.67
Run2	1	1.35	1.24
Run3	1	1.07	1.86
average	1	1.13	1.59
SEM	0	0.20	0.32

PCC7418_2831

Treatment	Control	1	6
Run1	1	7.46	1.29
Run2	1	4.16	1.64
Run3	1	5.2	1.43
average	1	5.61	1.45
SEM	0	1.69	0.18

PCC7418_2832

Treatment	Control	1	6
Run1	1	8.98	1.37
Run2	1	6.59	1.32
Run3	1	5.12	1.83
average	1	6.90	1.51
SEM	0	1.95	0.28

PCC7418_3282

Treatment	Control	1	6
Run1	1	1.81	0.6
Run2	1	1.15	0.75
Run3	1	1.11	0.78
average	1	1.36	0.71
SEM	0	0.39	0.10

PCC7418_3344

Treatment	Control	1	6
Run1	1	4.58	1.45
Run2	1	6.97	2.52
Run3	1	8.94	3.17
average	1	6.83	2.38
SEM	0	2.18	0.87

PCC7418_3363

Treatment	Control	1	6
Run1	1	7.65	2.39
Run2	1	6.99	1.83
average	1	7.32	2.11
SEM	0	0.47	0.40

PCC7418_3509

Treatment	Control	1	6
Run1	1	0.98	0.41
Run2	1	0.66	0.47
Run3	1	0.69	0.21
average	1	0.78	0.36
SEM	0	0.18	0.14

ผลการคำนวณระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส HK ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS v22

95%

One-Sample Test

	Test Value = 1					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
gene0715_1h	38.736	2	.001	16.28000	14.4717	18.0883
gene0715_6h	13.015	2	.006	2.01667	1.3499	2.6834
gene0766_1h	16.946	2	.003	12.11333	9.0377	15.1890
gene0766_6h	5.910	2	.027	1.57333	.4278	2.7188
gene1721_1h	8.891	2	.012	10.68667	5.5147	15.8586
gene1721_6h	5.900	2	.028	1.63667	.4432	2.8302
gene1838_1h	27.017	2	.001	17.98000	15.1166	20.8434
gene1838_6h	1.822	2	.210	.82000	-.1164	2.7564
gene2050_1h	4.942	2	.039	3.82333	.4947	7.1519
gene2050_6h	-.159	2	.888	-.03000	-.8422	.7822
gene2178_1h	5.733	2	.029	2.80333	.6992	4.9074
gene2178_6h	-3.445	2	.075	-.32333	-.7272	.0805
gene2200_1h	4.730	2	.042	4.45000	.4022	8.4978
gene2200_6h	2.137	2	.166	.37667	-.3818	1.1352
gene2222_1h	6.427	2	.023	1.64667	.5443	2.7491
gene2222_6h	-.053	2	.962	-.01000	-.8161	.7961
gene2265_1h	5.107	2	.036	5.81000	.9150	10.7050
gene2265_6h	2.606	2	.121	.35000	-.2278	.9278
gene2611_1h	9.968	2	.010	6.28000	3.5692	8.9908
gene2611_6h	5.064	2	.037	1.07667	.1618	1.9915
gene2615_1h	1.091	2	.389	.12667	-.3728	.6262
gene2615_6h	3.217	2	.085	.59000	-.1991	1.3791
gene2831_1h	4.729	2	.042	4.60667	.4155	8.7978
gene2831_6h	4.457	2	.047	.45333	.0157	.8909
gene2832_1h	5.242	2	.035	5.89667	1.0571	10.7362
gene2832_6h	3.122	2	.089	.50667	-.1917	1.2050
gene3282_1h	1.571	2	.257	.35667	-.6199	1.3332
gene3282_6h	-5.209	2	.035	-.29000	-.5296	-.0504
gene3344_1h	4.625	2	.044	5.83000	.4062	11.2538
gene3344_6h	2.752	2	.111	1.38000	-.7775	3.5375
gene3363_1h	7.519	2	.017	5.60000	2.3955	8.8045

gene3363_6h	6.320	2	.024	1.06333	.3394	1.7873
gene3509_1h	-2.189	2	.160	-.22333	-.6624	.2157
gene3509_6h	-8.100	2	.015	-.63667	-.9749	-.2985

99%

One-Sample Test

	Test Value = 1					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	99% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
gene0715_1h	38.736	2	.001	16.28000	12.1088	20.4512
gene0715_6h	13.015	2	.006	2.01667	.4788	3.5546
gene0766_1h	16.946	2	.003	12.11333	5.0188	19.2079
gene0766_6h	5.910	2	.027	1.57333	-1.0689	4.2156
gene1721_1h	8.891	2	.012	10.68667	-1.2433	22.6166
gene1721_6h	5.900	2	.028	1.63667	-1.1164	4.3897
gene1838_1h	27.017	2	.001	17.98000	11.3749	24.5851
gene1838_6h	1.822	2	.210	.82000	-3.6465	5.2865
gene2050_1h	4.942	2	.039	3.82333	-3.8547	11.5013
gene2050_6h	-.159	2	.888	-.03000	-1.9035	1.8435
gene2178_1h	5.733	2	.029	2.80333	-2.0502	7.6568
gene2178_6h	-3.445	2	.075	-.32333	-1.2550	.6083
gene2200_1h	4.730	2	.042	4.45000	-4.8869	13.7869
gene2200_6h	2.137	2	.166	.37667	-1.3730	2.1263
gene2222_1h	6.427	2	.023	1.64667	-.8962	4.1895
gene2222_6h	-.053	2	.962	-.01000	-1.8694	1.8494
gene2265_1h	5.107	2	.036	5.81000	-5.4812	17.1012
gene2265_6h	2.606	2	.121	.35000	-.9828	1.6828
gene2611_1h	9.968	2	.010	6.28000	.0271	12.5329
gene2611_6h	5.064	2	.037	1.07667	-1.0336	3.1870
gene2615_1h	1.091	2	.389	.12667	-1.0255	1.2789
gene2615_6h	3.217	2	.085	.59000	-1.2302	2.4102
gene2831_1h	4.729	2	.042	4.60667	-5.0610	14.2743
gene2831_6h	4.457	2	.047	.45333	-.5561	1.4628
gene2832_1h	5.242	2	.035	5.89667	-5.2667	17.0600
gene2832_6h	3.122	2	.089	.50667	-1.1042	2.1176
gene3282_1h	1.571	2	.257	.35667	-1.8959	2.6092
gene3282_6h	-5.209	2	.035	-.29000	-.8426	.2626
gene3344_1h	4.625	2	.044	5.83000	-6.6809	18.3409

gene3344_6h	2.752	2	.111	1.38000	-3.5966	6.3566
gene3363_1h	7.519	2	.017	5.60000	-1.7918	12.9918
gene3363_6h	6.320	2	.024	1.06333	-.6066	2.7333
gene3509_1h	-2.189	2	.160	-.22333	-1.2360	.7893
gene3509_6h	-8.100	2	.015	-.63667	-1.4167	.1434