รายงานผลการวิจัย

เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การเปลี่ยนแปลงด้านเมตาบอลิสมในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Aphanothece halophytica* ที่เจริญภายใต้ความเครียดของเกลือ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท
วท 15
005157

โดย

อรัญ อินเจริญศักดิ์

2532

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงด้านเมตาบอลิสมในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica ที่เจริญภายใต้ความเครียดของเกลือ

โดย

อรัญ อินเจริญศักดิ์

มกราคม 2532

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2531 ซึ่งทำให้การวิจัยในครั้งนี้เป็นไปได้ตามเป้าหมาย และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย	การเปลี่ยนแปลงด้านเมตาบอลิสมในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica ที่เจริญภายใต้ความเครียดของเกลือ
ชื่อผู้วิจัย	อรัญ อินเจริญศักดิ์
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	มกราคม 2532

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเมตาบอลิสมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica พบว่าที่ระยะ Late log phase เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จากสภาวะปรกติ 0.5 M เป็น 1 M และ 2 M เซลล์มีความสามารถในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นตามลำดับ ในขณะเดียวกันเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงคือเอนไซม์ไรบูโลสบิสฟอสเฟตคาร์-บอกซิเลสที่แยกสกัดออกมาจากเซลล์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น และจากการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ตัวนี้โดยวิธีอิมมิวโนบลอททิงก็พบว่าปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนส่วนที่ละลายได้ก็เพิ่มขึ้นด้วย ในช่วง Lag phase การเจริญของเซลล์ที่เลี้ยงในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 M จะช้ากว่าที่เลี้ยงใน 1 M และ 0.5 M ส่วนอัตราการเจริญในช่วง Log phase ไม่มีความแตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 0.5 M เป็น 2 M หรือจาก 2 M เป็น 0.5 M อย่างกระทันหันจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลา 36 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ในระยะยาวอัตราการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ตัวนี้ไม่แตกต่างกันนัก ไม่ว่าจะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 หรือ 1 หรือ 2 M นอกจากนี้ยังพบว่าในหลอดทดลองเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

Project Title: Metabolic Changes in a Blue-Green Alga, Aphanothece halophytica, Subjected to Salt Stress

Name of the Investigator: Aran Incharoensakdi

Year: January, 1989

Abstract

The effects of sodium chloride added to the culture medium on the metabolic changes of a cyanobacterium, Aphanothece halophytica were investigated. It was found that at late logarithmic phase the photosynthetic CO_2 fixation rate of A. halophytica was increased when the concentration of sodium chloride was raised from 0.5 M to 1 and 2 M. The same treatment also increased the activity of ribulosebisphosphate carboxylase, a key enzyme in photosynthesis. By using immunoblotting method the level of ribulosebisphosphate carboxylase was found to increase with increasing salt concentration. The increase in the level of the enzyme was to some extent comparable to the increase in the activity. The level of total soluble protein was also increased. On the other hand, the growth rate at logarithmic phase was similar. At the lag phase there was a slight delay in growth at 2 M and 1 M sodium chloride. The abrupt shift of salt either from 0.5 M to 2 M or from 2 M to 0.5 M caused an increase in ribonuclease activity during the test period of 36 hours. However, there were no long term differences of the enzyme activity regardless of the concentration of salt.

Sodium chloride as high as 0.6 M did not appear to cause an inhibition of ribonuclease *in vitro*.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
รายการสัญลักษณ์หรือคำย่อ	viii
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลของการวิจัย	8
การอภิปรายผล	21
ข้อสรุป	26
ข้อเสนอแนะ	27
ส่วนอ้างอิง	28
ส่วนผนวก	31

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์	12
รูปที่ 2	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase	13
รูปที่ 3	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase	14
รูปที่ 4	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้	15
รูปที่ 5	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญของเซลล์	16
รูปที่ 6	Growth curve ของสาหร่าย A. halophytica เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน	17
รูปที่ 7	ผลของอายุของเซลล์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียม-คลอไรด์ต่าง ๆ กัน	18
รูปที่ 8	ผลช่วงสั้นของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างกระทันหันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase	19
รูปที่ 9	ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase	20

เลขหมู่ วส
ดท 15
เลขทะเบียน 005157
วัน,เดือน,ปี 28 ก.ค. 32

รายการสัญลักษณ์หรือคำย่อ

RNA : กรดไรโบนิวคลีอิค (Ribonucleic acid)

RNase : ไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease)

RuBP carboxylase : ไรบูโลสบิสฟอสเฟตคาร์บอกซิเลส

บทนำ

การเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปมักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเป็นสำคัญ สภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย เช่น ความร้อน ความหนาวเย็น ความแห้งแล้ง หรือแม้กระทั่งความเค็ม เป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้พืชเจริญได้ไม่ดี พืชที่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมกดดันดังกล่าวจะสามารถพัฒนากลไกบางอย่างขึ้นมาตอบสนองเพื่อป้องกันตัวเอง มีผู้รายงานว่าในพืชทนเค็มนั้น กระบวนการเมตาบอลิสมทั้งในระดับของเอนไซม์ (1-3) และในระดับของออร์กาเนลล์ (4,5) จะถูกยับยั้งโดยเกลือ และเนื่องจากพืชทนเค็มเหล่านี้สามารถดูดซึมเกลือจากสิ่งแวดล้อมเข้าไปในเซลล์พืช ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกที่พืชทนเค็มสามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีความเค็มสูง มีหลักฐานหลายประการที่บ่งชัดว่าพืชทนเค็มสามารถสะสมเกลือที่ถูกดูดซึมเข้าไปไว้ในออร์กาเนลล์ที่เรียกว่า แวคคิวโอล (6-10) กระบวนการเมตาบอลิสมที่จำเป็นในการเจริญของเซลล์พืชซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในออร์กาเนลล์อื่นที่ไม่ใช่แวคคิวโอล จึงสามารถดำเนินไปได้ตามปรกติ สิ่งที่เกิดขึ้นตามมาภายหลังการที่อนุมูลของเกลือสะสมไว้ในแวคคิวโอล ก็คือการที่เซลล์จะต้องมีการสะสมสารประกอบที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่เรียกว่า คอมแพทิเบิลโซลูท (Compatible solute) ไว้ในไซโตปลาสม เพื่อรักษาสมดุลย์ของความดันระหว่างแวคคิวโอลและไซโตปลาสม (11-16) ตัวอย่างของคอมแพทิเบิลโซลูทส่วนใหญ่ได้แก่ กลีเซอรอล, ซูโครส, โปรลีน, ไกลซีนบีเทน สารประกอบ 2 ตัวแรกเป็นสารประกอบคาร์บอน ส่วน 2 ตัวหลังเป็นสารประกอบไนโตรเจน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green algae หรือเรียกในสมัยปัจจุบันว่า Cyanobacteria) จัดอยู่ในพวกโปรคาริโอท มีลำดับของการพัฒนา (Evolution ladder) อยู่ระหว่างสาหร่ายสีเขียว (Green algae) และแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica จัดเป็นสาหร่ายที่ชอบความเค็ม (Halophilic cyanobacterium) สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาณพอเหมาะ ถ้าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่า 3.5% สาหร่ายชนิดนี้จะหยุดการเจริญ (17) Miller และคณะ (18) ได้ทำการศึกษาเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับกลไกของ

สาหร่ายชนิดนี้ที่มีการตอบสนองต่อความเค็ม โดยพบว่าสาหร่าย A. halophytica จะทำการสะสม K^+ มีปริมาณสูงถึง 1 M เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง อย่างไรก็ตาม เร็ว ๆ นี้ Reed และคณะ (19) ได้รายงานว่าไกลซีนบีเทนเป็นสารประกอบที่สาหร่าย A. halophytica สะสมไว้มากที่สุด ในกรณีของสาหร่ายชนิดนี้นั้น การสะสมไกลซีนบีเทนนับว่ามีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อเมตาบอลิสมของเซลล์ กล่าวคือพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เซลล์จะดูดซึมทั้ง Na^+ (19) และ Cl^- (20) เข้าไปภายในเซลล์ เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้ไม่มีแวคคิวโอลเหมือนในพืชชั้นสูง Cl^- จะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase แต่การยับยั้งแอคติวิตีโดย Cl^- นี้จะลดน้อยลงเมื่อมีไกลซีนบีเทนอยู่ด้วย นอกจากนี้ไกลซีนบีเทนยังสามารถยับยั้งการแตกสลายของเอนไซม์ RuBP carboxylase ออกเป็นหน่วยย่อย (Subunit) (21) กล่าวโดยรวมแล้วไกลซีนบีเทนมีความสำคัญต่อเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นคอมแพทิเบิลโซลูท ช่วยรักษาระดับความดันภายในและภายนอกเซลล์ และทำหน้าที่ช่วยให้เอนไซม์ RuBP carboxylase มีความเสถียรและมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น

การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงกลไกที่สาหร่ายทนความเค็มโดยการศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิสมภายในเซลล์โดยเน้นที่เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง ศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการเจริญ รวมทั้งศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase ด้วย

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ Aphanothece halophytica ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ชอบความเค็ม (Halophilic cyanobacterium) ได้รับมาจากการบริจาคโดย Dr. G.A. Codd แห่งมหาวิทยาลัยดันดี สกอตแลนด์

2. การเลี้ยงสาหร่าย

ทำการเลี้ยงสาหร่าย A. halophytica ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG-11 ที่มี 18 mM โซเดียมไนเตรทและส่วนผสมของสารละลายเกลือเติร์กไอส์แลนด์ (Turk Island Salt Solution) (ดูรายละเอียดในส่วนผนวก) ส่วนผสมของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมี 3 ความเข้มข้น คือ 0.5 M, 1 M และ 2 M

ในการเลี้ยงสาหร่าย ใช้ขวดแก้วรูปชมภู่ขนาด 500 มล. โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มล. เลี้ยงโดยเขย่าด้วยเครื่องเหวี่ยงเป็นวงกลม ภายใต้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาดความเข้ม 3,000 ลุกซ์ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงประมาณ 26-28^{o}ซ ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะปลายของ Log phase (10-14 วัน) แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{o}ซ

3. การวัดอัตราการสังเคราะห์แสง

นำเซลล์ในช่วงปลายของ Log phase คือที่เวลา 10 วัน หลังจากเริ่มเลี้ยง มาล้างด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของ 50 mM Hepes-NaOH บัฟเฟอร์ (pH 8.0) และ 10 mM $MgCl_2$ หลังจากล้างแล้ว นำตะกอนเซลล์มาละลายในสารละลายเดิมปริมาตรน้อย ๆ ใช้ 0.2 มล. ของสารละลายเซลล์สำหรับการวัดอัตราการสังเคราะห์แสง โดยนำไปบ่มภายใต้แสงสีขาวของหลอดทังสเตน ที่ความเข้มแสง 30,000 ลุกซ์ เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ จากนั้นจึงเติม 0.2 มล. ของสารละลาย 10 mM $NaH^{14}CO_3$ (10 mC/mmol) และทำการบ่มต่อไปนาน 10 นาที เติมสารละลายกรดอะซิติก 0.1 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำ

สารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยหลอดอินฟราเรด เติมน้ำ 0.3 มล. ลงในกากตะกอนที่แห้ง และเติมซินทิลเลชั่นฟลูอิด (Scintillation fluid) 3 มล. นำสารละลายทั้งหมดที่ได้ไปวัดปริมาณสารรังสีด้วยเครื่องลิควิดซินทิลเลชั่นเคาน์เตอร์ (Liquid scintillation counter, Packard, PL, Tri-Carb)

4. <u>การสกัดแยกเอนไซม์ RuBP carboxylase และการวัดแอคติวิตี</u>

นำ 3 กรัม ตะกอนเซลล์มาละลายใน 30 มล. ของบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Hepes-NaOH pH 7.8, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol และ 0.3 M KCl ซึ่งในที่นี้จะให้ชื่อว่า บัฟเฟอร์ A ทำให้เซลล์ในสารละลายแตกด้วยเครื่อง Sonicator (Ultrasonics, Inc. W-375) ที่ความเร็ว 5 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร่ง 94,000 x g เป็นเวลา 1 ชม. เก็บส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 25-50% นำตะกอนที่ได้หลังจากตกตะกอนที่ 50% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายใน 1 มล. ของบัฟเฟอร์ A แล้วทำการกำจัดเกลือออกโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 สารละลายโปรตีนที่ผ่านมาจากคอลัมน์ ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ RuBP carboxylase

การวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (21) ทำได้โดยนำสารละลายเอนไซม์มา 0.025 มล. บ่มใน 0.025 มล. สารละลายบัฟเฟอร์ 1 M Tris-HCl pH 7.8, 0.025 มล. สารละลาย 0.2 M $MgCl_2$, 0.025 มล. สารละลาย 0.5 M $NaH^{14}CO_3$ (0.4 mC/mmol) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 0.225 มล. ทำการบ่มขั้นต้นเพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม 0.025 มล. สารละลาย 10 mM RuBP แล้วทำการบ่มต่ออีก 10 นาที ก่อนที่จะหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.05 มล. สารละลายกรดอะซิติค จากนั้นจึงนำไปทำการวัดปริมาณสารรังสีในทำนองเดียวกับที่ทำในข้อ 3

5. การวัดปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase

ทำการวัดโดยวิธีอิมมิวโนบลอททิง (Immunoblotting) ตามแบบของ Yamaguchi et al. (22) โดยการใช้แอนติบอดีตัวที่สอง (Second antibody) ที่เชื่อมยึดกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase

นำเซลล์ที่มีอายุ 10 วัน มาทำให้แตกด้วยเครื่อง Sonicator (Ultrasonics, Inc. W-375) ที่ความเร็ว 5 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง หลังจากทำการปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอนส่วนของเซลล์ที่แตก นำส่วนใส (0.01 มก. โปรตีน) ไปแยกส่วนต่าง ๆ ของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริละ-ไมด์เจลอิเลคโทรฟอเรซิส (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (23) โปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลจะถูกถ่ายลงบนเมมเบรนฟิลเตอร์ (Membrane filter) โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electroblotting) นำแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ที่มีโปรตีนไปล้างเป็นเวลา 1 ชม. ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate buffer saline, PBS) ซึ่งมีส่วนผสมของ 0.1% Tween และ 2% หางนมที่ขจัดไขมันออกแล้ว (ส่วนประกอบของ PBS คือ 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 และ 8.1 mM Na_3PO_4) บัฟเฟอร์ชนิดนี้จะเรียกว่า บลอททิงบัฟเฟอร์ (Blotting buffer) นำเมมเบรนฟิลเตอร์ที่ล้างแล้วไปบ่มกับแอนติซีรัมของหน่วยใหญ่ (Large subunit) ของเอนไซม์ RuBP carboxylase โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องในสารละลายบลอททิงบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 2 ชม. ต่อจากนั้นจึงล้างเมมเบรนฟิลเตอร์ด้วยบลอททิงบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 30 นาที ขั้นสุดท้ายนำเมมเบรนฟิลเตอร์ไปบ่มกับแอนติบอดีตัวที่สองที่เชื่อมยึดกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสารละลายบลอททิงบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชม. ล้างเมมเบรนฟิลเตอร์ 1 ครั้ง ด้วยบลอททิงบัฟเฟอร์ก่อนที่จะนำไปบ่มกับสารละลายที่ทำให้เกิดสีกับเอนไซม์ Alkaline phosphatase เป็นเวลานาน 10 นาที (ส่วนประกอบของสารละลายนี้คือ 0.15 M Veronal acetate buffer pH 9.6, 1 M $MgCl_2$, 0.1% Nitro blue tetrazolium และ 0.5% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) วัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสแกนเนอร์ (Shimadzu, CS-940)

6. การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Biorad-dye reagent ตามวิธีของ Bradford (24) นำเซลล์ที่เลี้ยงได้ 10 วัน มาทำให้แตกโดยวิธีที่ทำในข้อ 5 จากนั้นนำส่วนใสจำนวนหนึ่ง (มีค่าเท่ากับ 10^8 เซลล์) ไปทำการวัดปริมาณโปรตีน โดยบ่มกับ 0.2 มล. สารละลาย Biorad dye reagent เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ปริมาณโปรตีนสามารถคำนวณได้จากความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)

7. การวัดอัตราการเจริญของเซลล์

7.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในเวลา 10 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนให้เป็นค่าจำนวนครั้งของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2 เท่า ต่อ 1 วัน

7.2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ โดยเปรียบเทียบ Growth curve ซึ่งเกิดจากการพลอตค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร บนแกน Y โดยใช้ log scale และระยะเวลาที่เซลล์เจริญภายใน 20 วัน บนแกน X

8. การสกัดแยกเอนไซม์ RNase และการวัดแอคติวิตี

นำเซลล์ (20 มล.) ที่เลี้ยงในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Citrate-phosphate pH 6.5 ต่อจากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator (Ultrasonics, Inc. W-375) ที่ความเร็ว 5 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 37,000 x g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 โดยใช้บัฟเฟอร์ 50 mM Citrate-phosphate pH 6.5 เป็นตัวชะ สารละลายโปรตีนที่ผ่านมาจากคอลัมน์นี้ใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ RNase

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase ทำตามวิธีของ Rouxel et al. (25) โดยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย นำสารละลายเอนไซม์มา 1 มล. มาบ่มกับ 0.1 มล. ของสารละลาย RNA (ความเข้มข้น 5 มก./มล.) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Citrate-phosphate pH 6.5 ลงไป 0.8 มล. จากนั้นจึงทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2.8 มล. ด้วยน้ำกลั่น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 มล. สารละลายแช่น้ำแข็ง 0.75% (w/v) Uranyl acetate (เตรียมในสารละลาย 25% (w/v) กรดเปอร์คลอริค) หลังจากทำให้เย็นโดยการแช่น้ำแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร่ง 2,000 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์โมเลกุลเล็ก ๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อย RNA ในสารละลายผสม 2.8 มล. เป็นเวลา 30 นาที จนได้นิวคลีโอไทด์โมเลกุลเล็ก ๆ ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ได้ A_{260} มีค่าเท่ากับ 1

สำหรับการทดลองเรื่องผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase นั้น (รูปที่ 9) มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยคือ ใช้สารละลายเอนไซม์ 0.2 มล., สารละลาย RNA (0.1 มก./มล.) 0.02 มล., สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Citrate-phosphate (pH 6.5) 0.8 มล., ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม และทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มล. ด้วยน้ำกลั่น

9. <u>การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์และจำนวนเซลล์</u>

ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวิธีของ Mackinney (26) นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 80% อะซิโตน ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator (Ultrasonics, Inc. W-375) ที่ความเร็ว 5 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง หลังจากแยกส่วนของเซลล์ที่แตกออกไปโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 665 นาโนเมตร ส่วนจำนวนเซลล์นั้นทำการวัดโดยใช้เครื่องนับเซลล์ (Coulter counter)

ผลการวิจัย

1. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์

เซลล์ของ A. halophytica จะเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วย ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสภาวะการเลี้ยงปรกติคือ 0.5 M ในการศึกษาถึงความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นนั้น สิ่งแรกที่จำเป็นในการศึกษาคือ การติดตามอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixation) จากรูปที่ 1 ชี้ให้เห็นว่าอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น อัตราการเพิ่มของการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มีไม่มากนักในกรณีที่เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มจาก 0.5 M เป็น 1 M แต่การเพิ่มของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จะมีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 2 M นั่นคือในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 M อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มีค่าประมาณ 2 เท่าของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะปรกติที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 0.5 M

2. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase ในเซลล์

อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ของเซลล์จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการสังเคราะห์แสงของเซลล์ เอนไซม์ RuBP carboxylase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง จากรูปที่ 2 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0.5 M เป็น 1 M และ 2 M เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M กับเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 M จะเห็นได้ว่าในกรณีหลังอัตราการทำงานของเอนไซม์มีค่าประมาณ 3 เท่าของกรณีแรก

3. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase ในเซลล์

จากผลการทดลองในรูปที่ 2 แสดงให้ทราบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์นั้นส่วนหนึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ จากรูปที่ 3 เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0.5 M เป็น 1 M และ 2 M จะทำให้ตรวจวัดปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 2 เท่า และ 2.5 เท่า ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการเพิ่มของปริมาณเอนไซม์และอัตราการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์มีลักษณะคล้ายกัน (เปรียบเทียบรูปที่ 2 กับรูปที่ 3)

4. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในเซลล์

ปริมาณโปรตีนในเซลล์มักจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งกระตุ้นหรือต่อความเครียดต่าง ๆ เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะพบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 20% เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มจาก 0.5 M เป็น 1 M และ 2 M ตามลำดับ (รูปที่ 4)

5. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญของเซลล์

เมื่อนำเซลล์ของ A. halophytica มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กันผสมอยู่ด้วย ติดตามอัตราการเจริญของเซลล์โดยการวัดจำนวนครั้งของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เป็น 2 เท่า ในระยะเวลา 10 วัน จากรูปที่ 5 อัตราการเจริญลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการติดตามการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ในเวลา 10 วัน ไม่สามารถบอกถึงรายละเอียดของอัตราการ

เจริญของเซลล์ที่แท้จริง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำรูปแบบของการเจริญของเซลล์ให้เหมาะสม ซึ่งทำได้โดยเปรียบเทียบ Growth curve ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กันผสมอยู่ จากรูปที่ 6 การเจริญของเซลล์ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 M และ 2 M การเจริญของเซลล์น้อยลงตามลำดับ อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของเซลล์ในช่วง Log phase (3 วัน ถึง 10 วัน) ไม่มีความแตกต่างกัน ช่วงที่มีความแตกต่างจะเป็นช่วง Lag phase (ช่วง 3 วันแรก) กล่าวคือ เซลล์ที่เลี้ยงในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 M จะใช้เวลาปรับตัวก่อนที่จะมีการเจริญมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 M ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M สามารถเจริญได้โดยไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัว

6. <u>ผลของอายุของเซลล์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน</u>

แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase จะลดลงเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นไม่ว่าจะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปรกติที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M หรือในสภาวะที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 1 M หรือ 2 M (รูปที่ 7) อัตราการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase ตลอดช่วง 21 วันที่ทำการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกันในทั้ง 3 สภาวะ

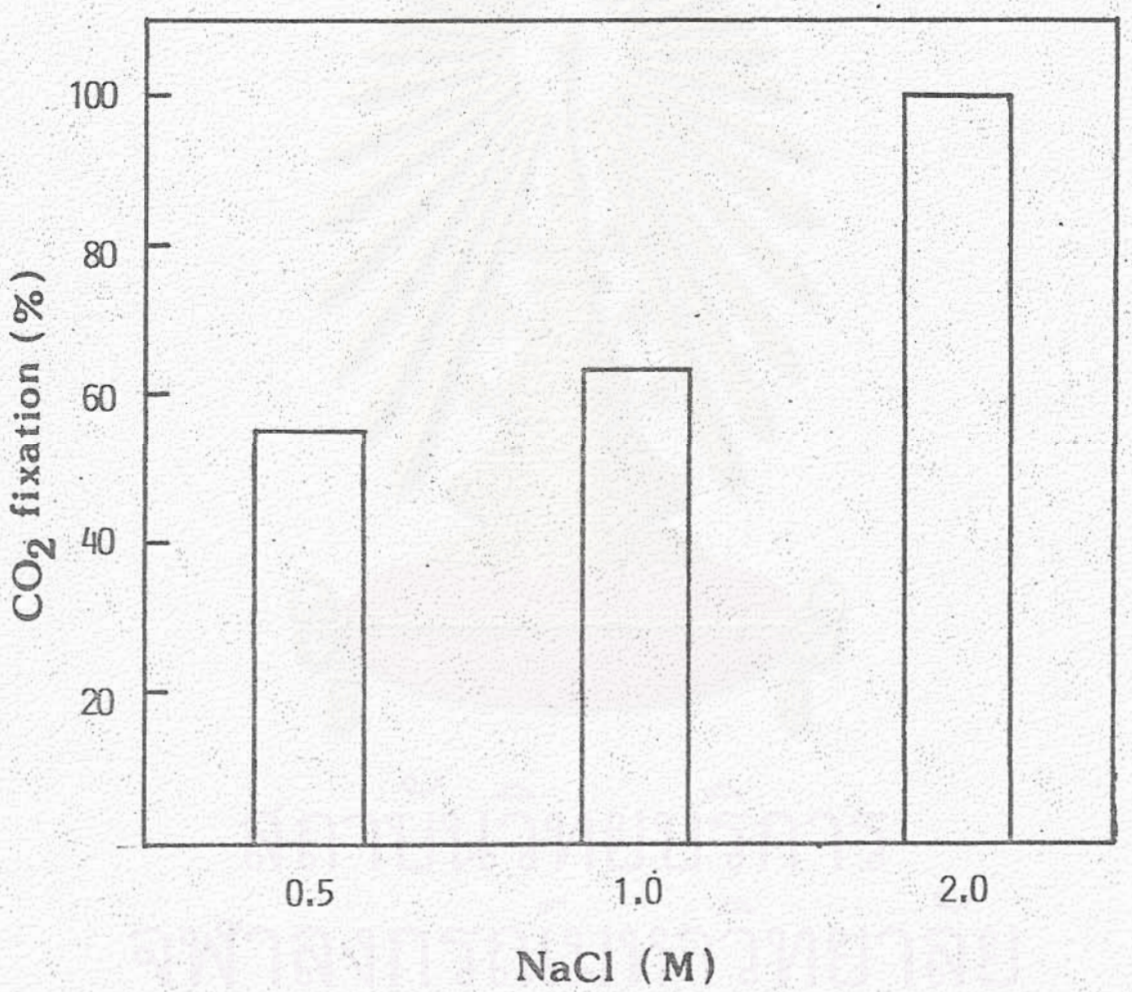
7. <u>ผลช่วงสั้นของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างกระทันหันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase</u>

แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะเพิ่มขึ้น (จาก 0.5 M เป็น 2 M) และในลักษณะลดลง (จาก 2 M เป็น 0.5 M) ในช่วง 36 ชม.แรก แสดงไว้ในรูปที่ 8 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 0.5 M เป็น 2 M (Upshock) แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 24 ชม. แรก แต่จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 12 ชม.สุดท้าย ในขณะเดียวกันเมื่อ

เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 2 M เป็น 0.5 M (Downshock) แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase จะคงที่ในช่วง 6 ชม.แรก หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราคงที่ใน 18 ชม.ต่อมา และจะมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการทำงานเพิ่มขึ้นอีกในช่วง 12 ชม.สุดท้าย ในการทดลองที่ใช้เป็นตัวควบคุมนั้น ตลอดระยะเวลา 36 ชม. แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M หรือ 2 M

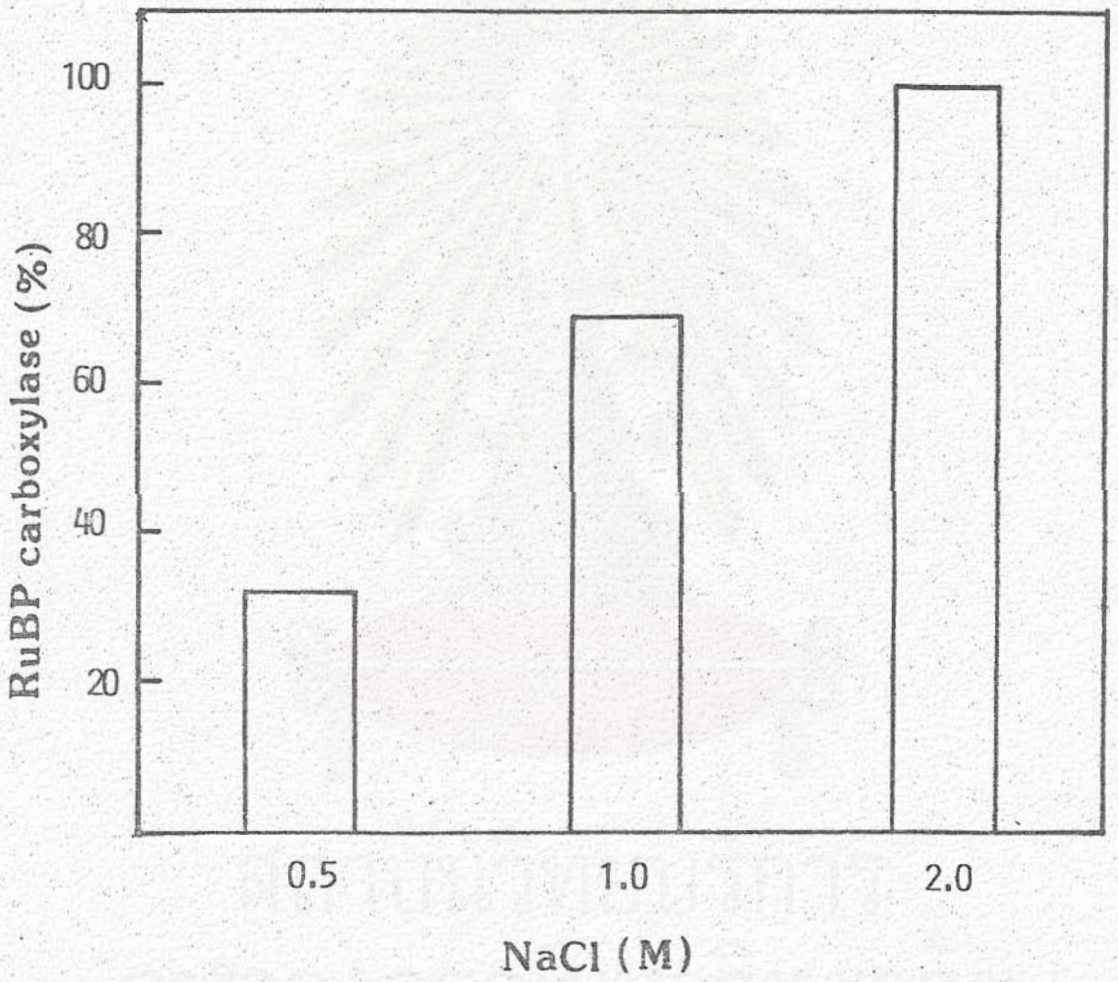
8. <u>ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase</u>

อิทธิพลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase ในหลอดทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 9 หลังจากการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นตามที่แสดงไว้แล้ว ทำการปรับ pH ให้มีค่า 6.5 เท่ากันทุกหลอด ผลการทดลองแสดงว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เอนไซม์มีแอคติวิตีดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 mM เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไปจนถึง 600 mM การกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 600 mM ก็ยังไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้ผลที่ได้ในรูปที่ 9 ยังแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นลักษณะเดียวกัน ไม่ว่าเอนไซม์นั้นแยกออกมาจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M หรือ 2 M



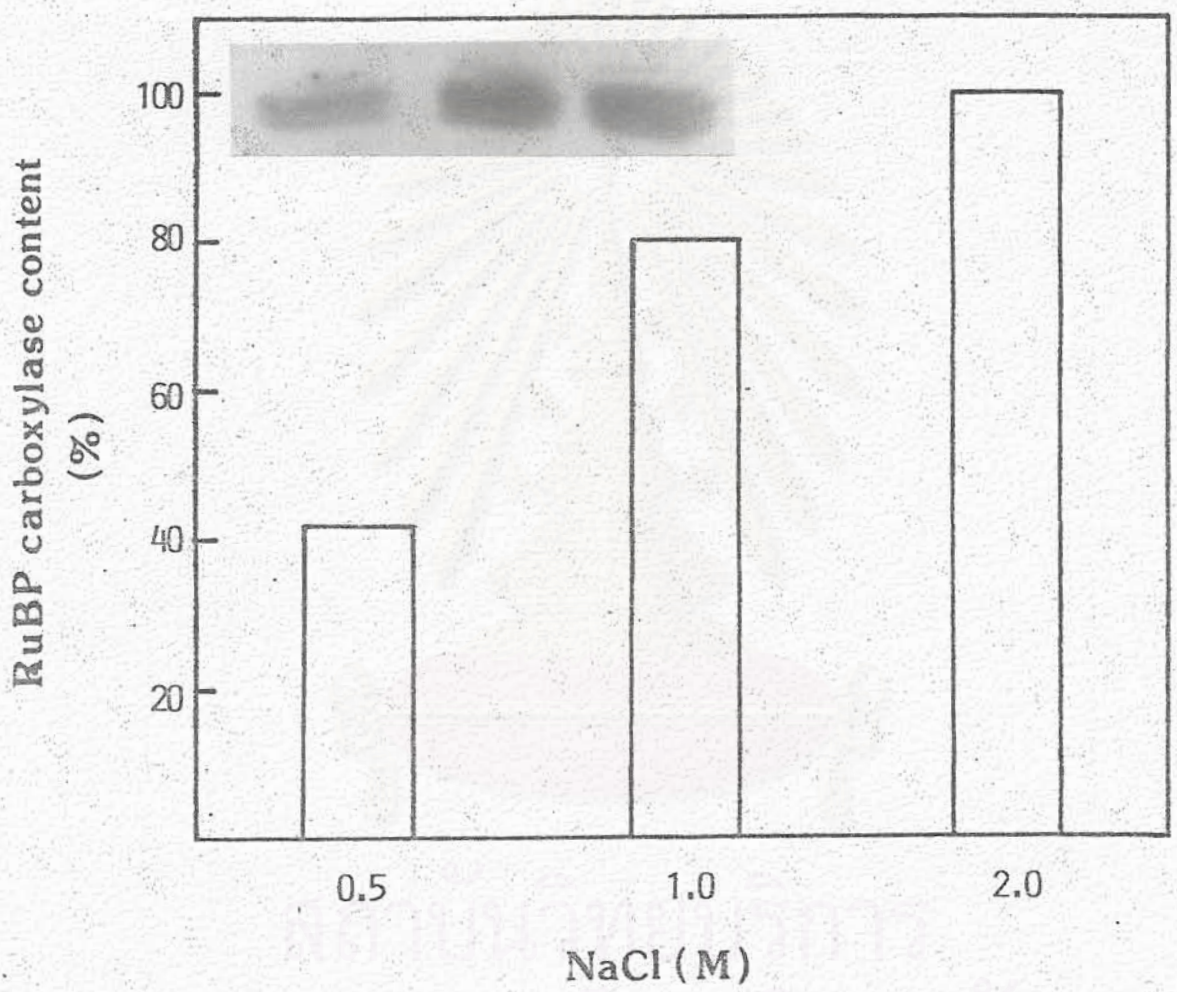
รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

100% = 41 นาโนโมล นาที$^{-1}$ มก.คลอโรฟิลล์$^{-1}$



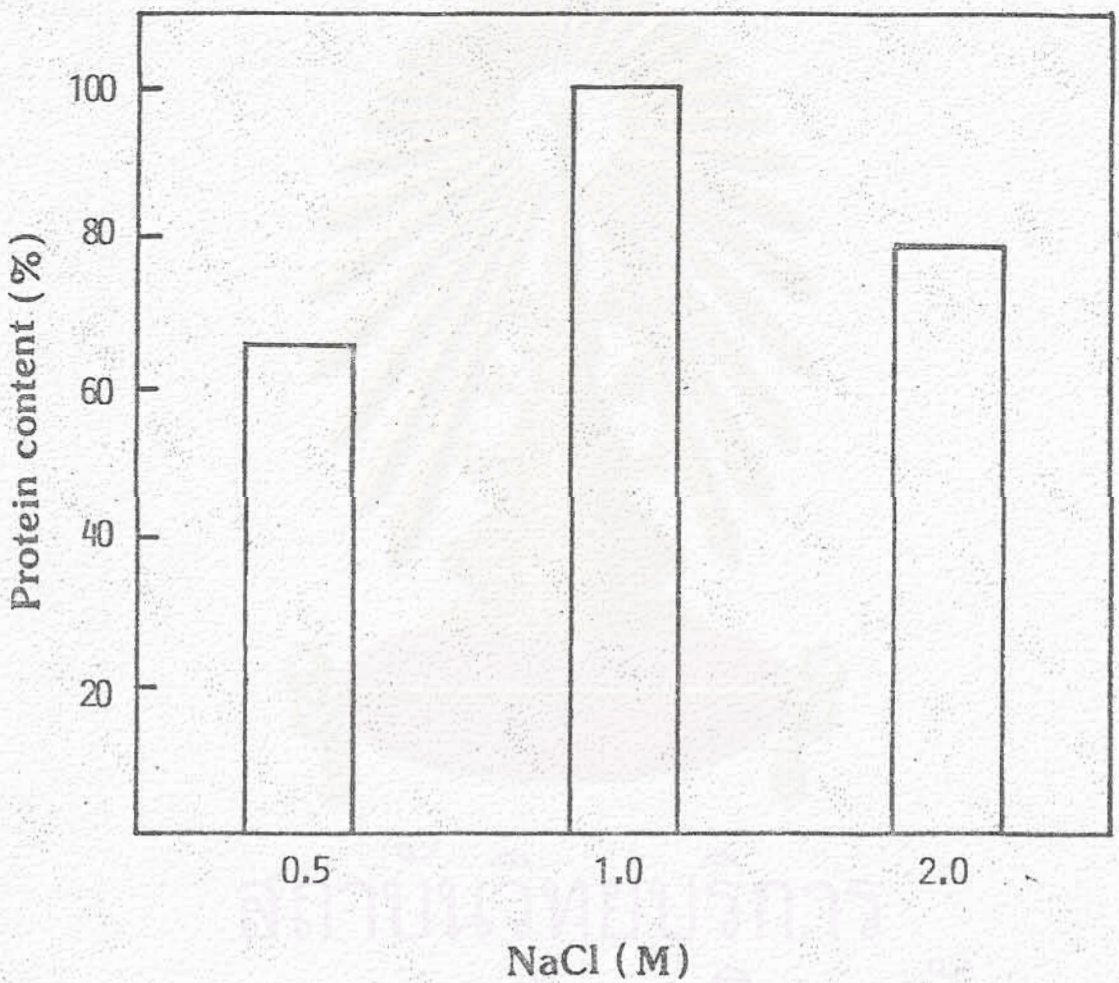
รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase

100% = 84 นาโนโมล นาที$^{-1}$ มก.โปรตีน$^{-1}$



รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase

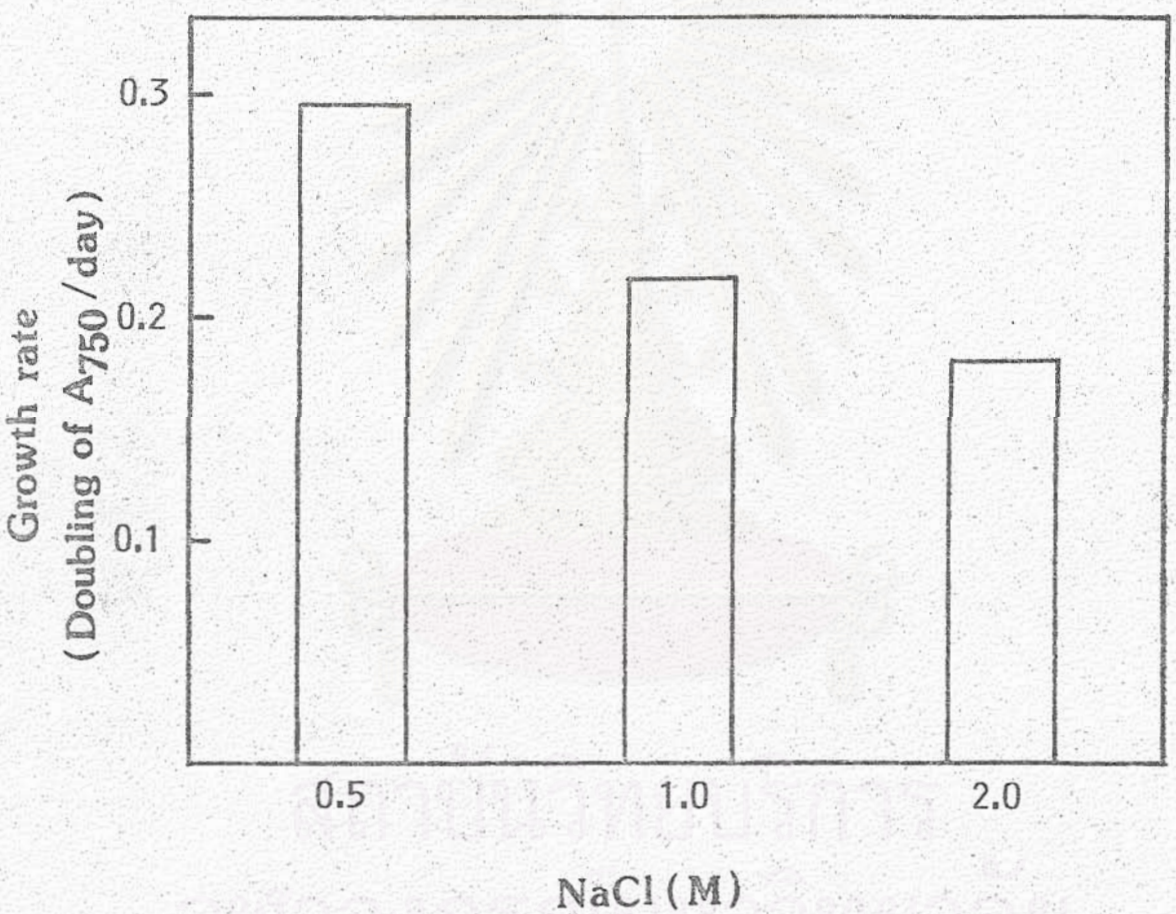
รูปถ่ายแสดงความเข้มของสีที่เกิดขึ้น เรียงจากซ้ายไปขวา คือ 0.5 M, 1 M และ 2 M ตามลำดับ



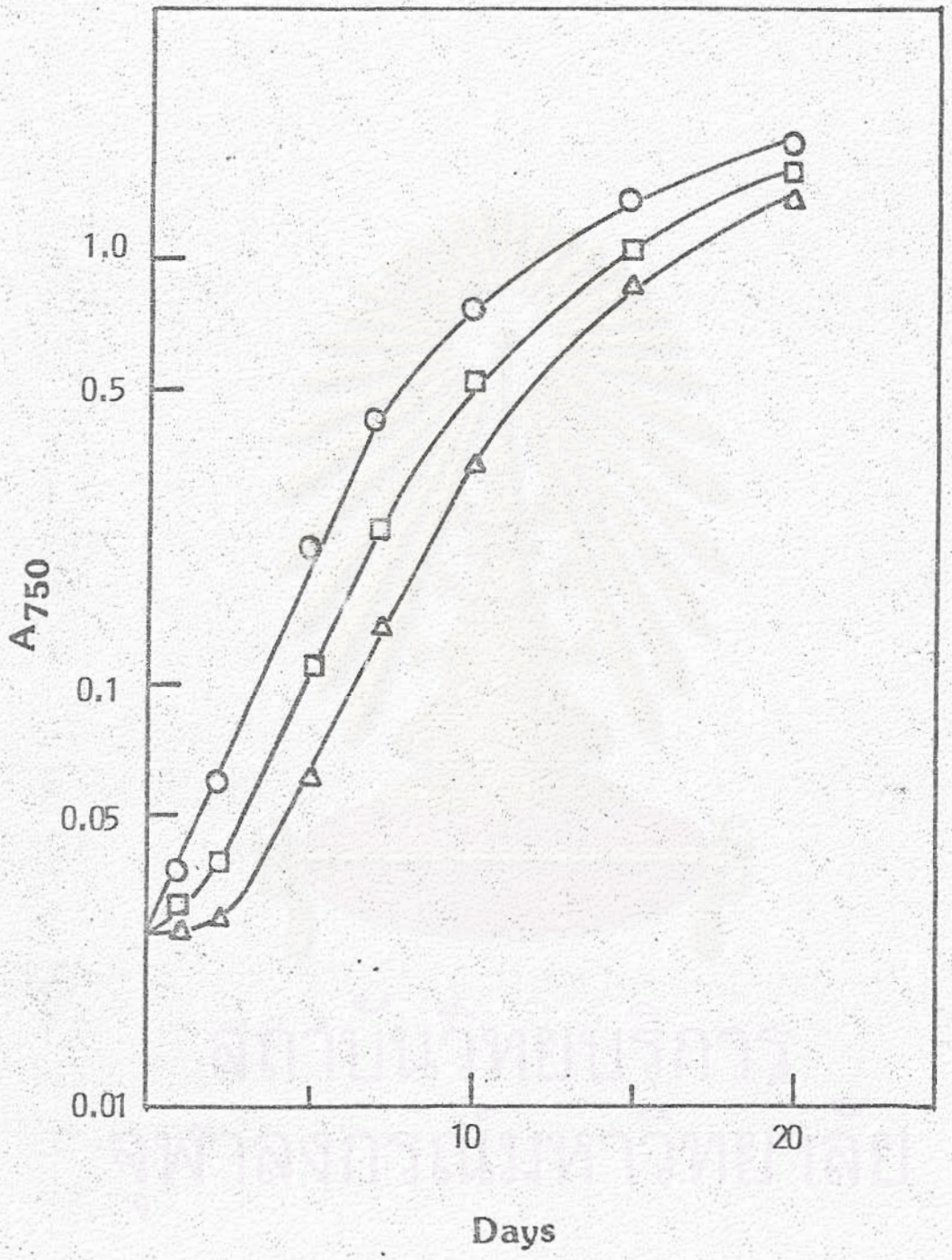
รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

100% = 1.93 มก./10^8 เซลล์

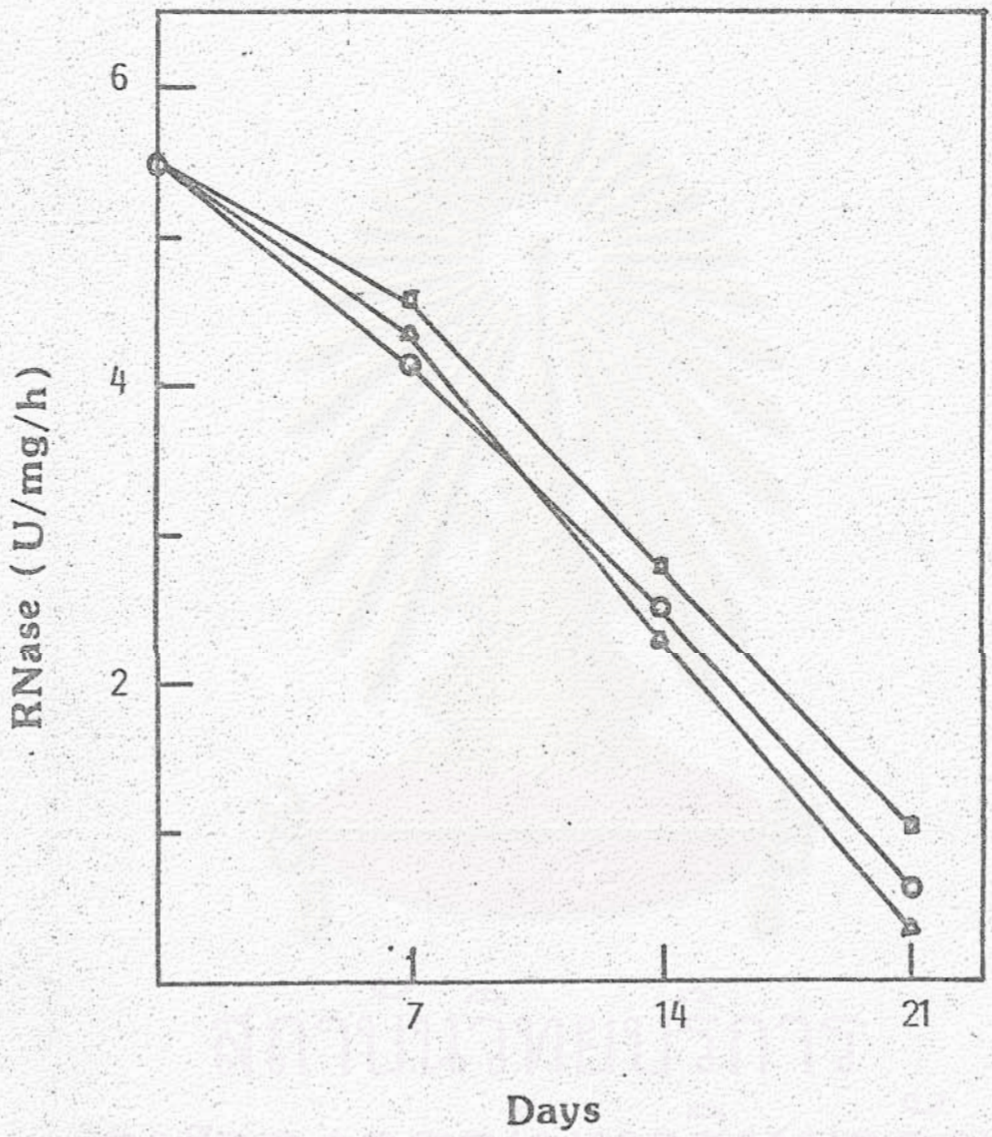
049855



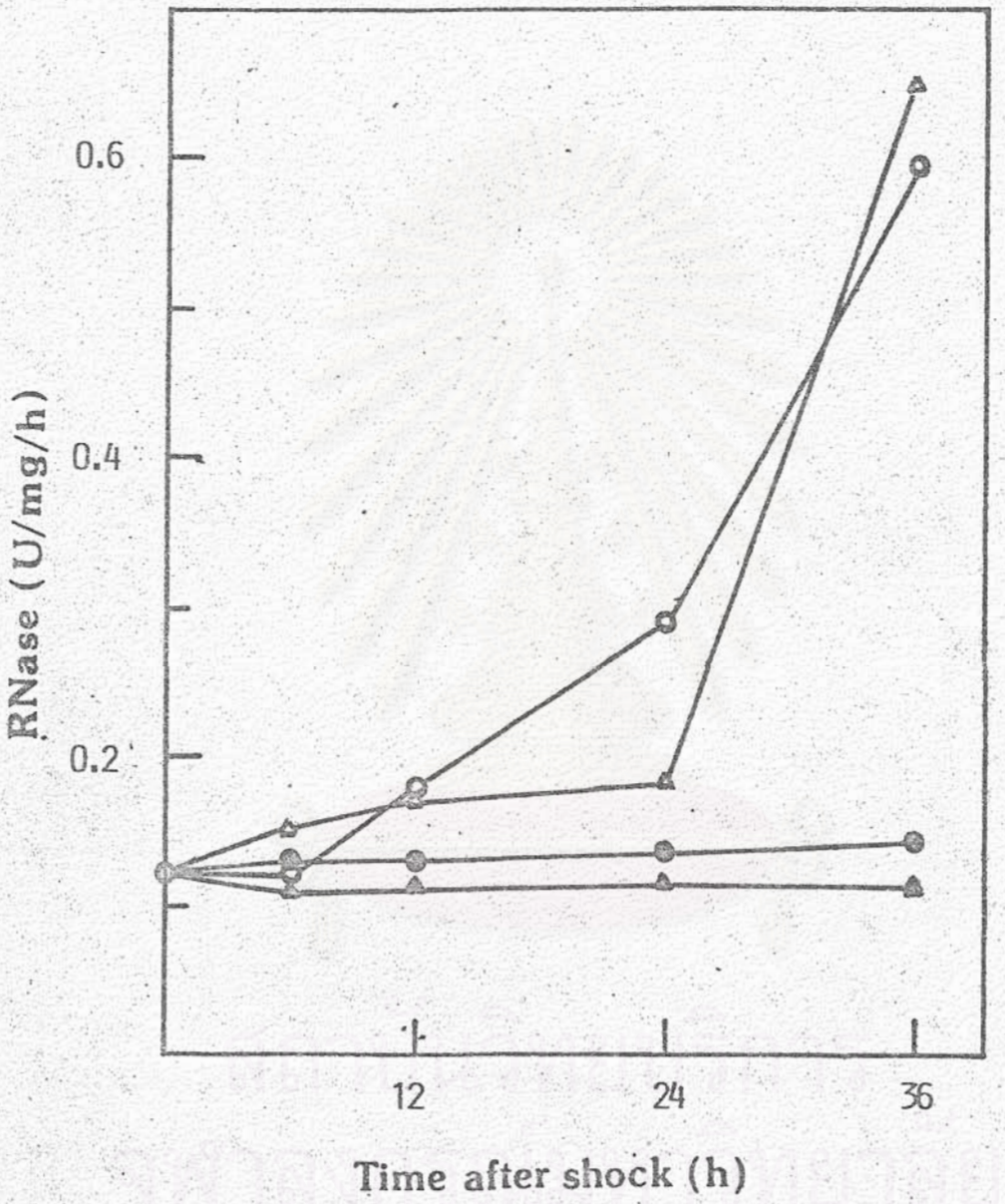
รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการเจริญของเซลล์



รูปที่ 6 Growth curve ของสาหร่าย A. halophytica เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน 0.5 M (○), 1 M (□), 2 M (△)

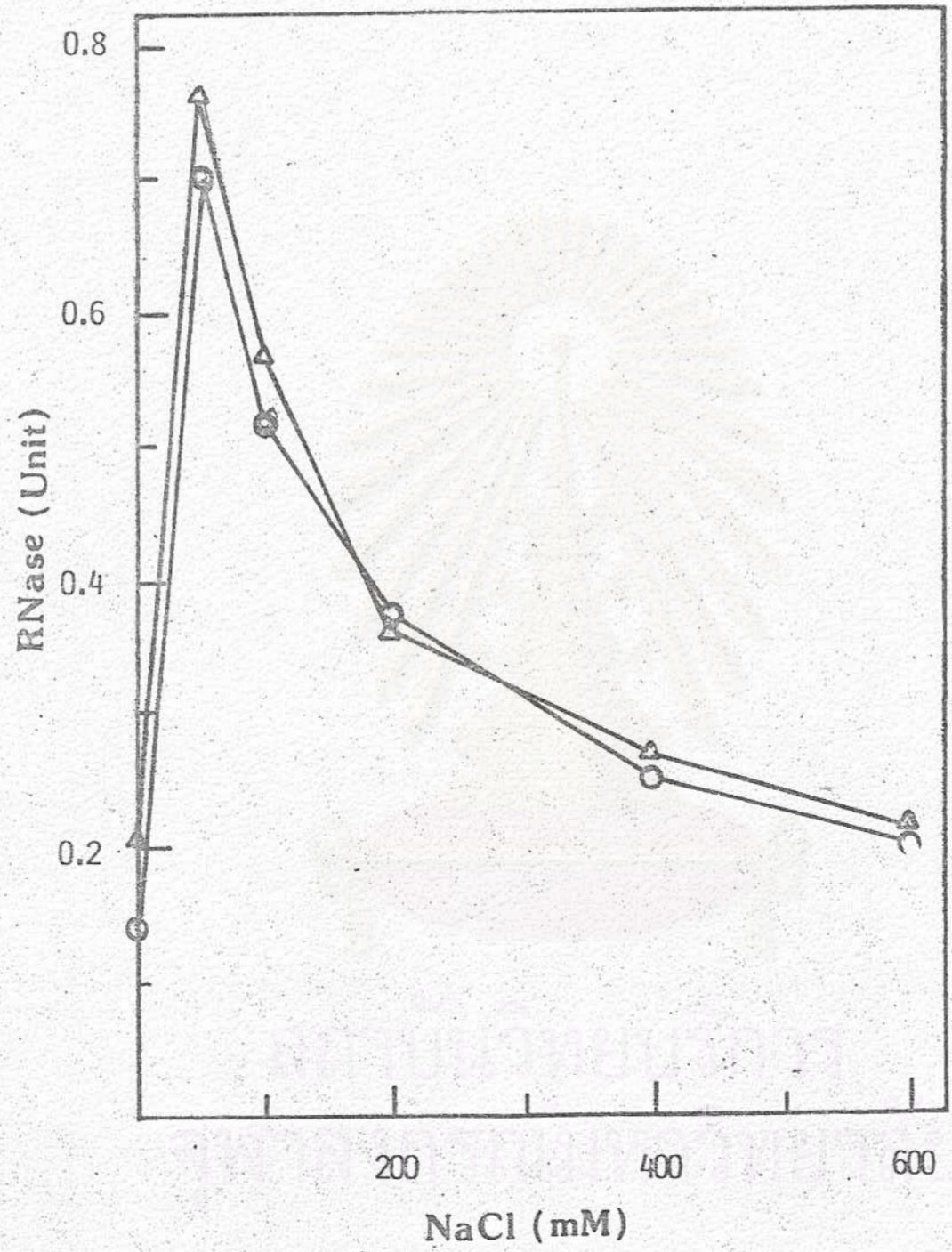


รูปที่ 7 ผลของอายุของเซลล์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน 0.5 M (○), 1 M (□), 2 M (△)



รูปที่ 8 ผลช่วงสั้นของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างกระทันหันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase

เปลี่ยนจาก 0.5 M เป็น 2 M (△), เปลี่ยนจาก 2 M เป็น 0.5 M (○), 0.5 M ตลอดการทดลอง (▲), 2 M ตลอดการทดลอง (●)



รูปที่ 9 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase

เอนไซม์จากเซลล์ที่เลี้ยงใน 0.5 M โซเดียมคลอไรด์ (○), เอนไซม์จากเซลล์ที่เลี้ยงใน 2 M โซเดียมคลอไรด์ (△)

การอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงกลไกที่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน A. halophytica ปรับตัวในสภาวะที่มีความเครียดของเกลือ การที่เลือกใช้สาหร่ายสีเขียวชนิดนี้เป็นตัวอย่างในการศึกษาก็เนื่องจากสาหร่าย A. halophytica เป็นสาหร่ายที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นในช่วงกว้าง กล่าวคือจาก 0.1 M - 3 M ถ้าใช้ตัวอย่างของพืชหรือสาหร่ายชนิดอื่นอาจจะเกิดปัญหาถ้าพืชหรือสาหร่ายนั้นไม่สามารถเจริญหรืออาจตายได้ในกรณีที่อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง

ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ต่อหน่วยน้ำหนักคลอโรฟิลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 1) การเพิ่มขึ้นของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์นี้มิได้เกิดจากการที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง ในทางตรงกันข้าม พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 60% เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เปลี่ยนจาก 0.5 M เป็น 2 M (ข้อมูลมิได้แสดงไว้ในรูป)

การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase ต่อหน่วยน้ำหนักโปรตีน เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2) ก็สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และในทำนองเดียวกันอัตราการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase มิได้เกิดจากการลดลงของปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Blumwald และ Tel-Or (27) และของ Gimmler et al. (28) กล่าวคือในกรณีแรกพบว่าเมื่อเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน Synechococcus 6311 จากสภาวะน้ำจืดเป็นสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2-0.4 M จะทำให้มีอัตราการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นปริมาณ 2 เท่า ถึงแม้การเพิ่มขึ้นนี้จะเป็นการเพิ่มภายในระยะเวลาสั้น ๆ ก็ตาม ในกรณีของ Gimmler et al. พบว่าแอคติวิตีของ RuBP carboxylase ที่แยกสกัดได้ มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว Dunaliella parva ในสภาวะที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

จาก 1 M เป็น 3 M

การที่ปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3) แสดงให้ทราบว่า การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RuBP carboxylase เกิดจากการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ อิทธิพลของเกลือที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ RuBP carboxylase เพิ่มขึ้นนั้นอาจจะเกิดเนื่องจากสาเหตุ 2 ประการ กล่าวคือ สาเหตุแรก อิทธิพลของเกลือมีผลโดยอ้อม นั่นคือมีผลทำให้มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นก่อน ผลิตผลของปฏิกิริยาการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ตัวแรกได้แก่น้ำตาล Trioses ซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 3 อะตอม จากนั้นน้ำตาล Trioses ก็จะถูกเปลี่ยนแปลงในวัฏจักรคาลวิน (Calvin cycle) (29) ซึ่งจะเกิดผลิตผลของน้ำตาลที่ประกอบด้วยจำนวนคาร์บอน 4, 5, 6 และ 7 อะตอม หนึ่งในน้ำตาลต่าง ๆ เหล่านี้ก็คือ RuBP ซึ่งทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ RuBP carboxylase การที่เกิดสับสเตรทมากขึ้นน่าจะเป็นสาเหตุให้มีการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น สาเหตุประการที่ 2 ก็น่าจะเป็นอิทธิพลของเกลือโดยตรงที่มีต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ RuBP carboxylase เกี่ยวกับกรณีนี้ได้เคยมีผู้รายงานถึงการที่เซลล์มีการเพิ่มความสามารถการถอดรหัสของยีนของเอนไซม์บางชนิด เมื่อเซลล์นั้นเจริญภายใต้สภาวะที่ขาดน้ำ (30)

การที่ปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase เพิ่มขึ้นนั้นจะเป็นประโยชน์ต่อเซลล์โดยตรง กล่าวคือในการที่เลี้ยงเซลล์ A. halophytica ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงนั้น พบว่าภายในเซลล์มีการสะสมอนุมูลคลอไรด์เพิ่มขึ้น (20) และอนุมูลคลอไรด์นี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RuBP carboxylase การที่ความเข้มข้นของเกลือกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มขึ้นก็จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ตัวนี้โดยรวมแล้วไม่ลดลง ถึงแม้ว่าจะมีอนุมูลคลอไรด์เป็นตัวยับยั้งการทำงานก็ตาม

กลไกอันหนึ่งในการตอบสนองของเซลล์ A. halophytica ที่มีความเครียดของเกลือ (Salt stress) ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่มีชื่อว่า ไกลซีนบีเทน (19) สารประกอบตัวนี้เป็นสารประเภทที่เรียกว่า คอมแพทิเบิลโซลูท ซึ่งทำหน้าที่เป็นออสโมเรกูเลเทอร์ (Osmoregulator) ในเซลล์ต่างชนิดกันชนิดของคอมแพทิเบิลโซลูทที่สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียด

ของเกลือจะแตกต่างกัน (11) อย่างไรก็ตามชนิดของคอมแพทิเบิลโซลูทที่พบเป็นส่วนใหญ่ได้แก่ สารประกอบคาร์โบไฮเดรท ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นซูโครส และกลีเซอรอล สารประกอบกรดอะมิโนและอนุพันธุ์ เช่น โปรลีน กรดกลูตามิค ไกลซีนบีเทน

จากผลการทดลองที่แสดงว่าความเครียดของเกลือไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ A. halophytica (รูปที่ 6) ชี้ให้เห็นว่า สารประกอบคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ มิได้ถูกนำไปใช้เกี่ยวกับการเจริญของเซลล์ ดังนั้นสารประกอบคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวน่าจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไกลซีนบีเทน นอกจากนั้นบางส่วนของสารประกอบคาร์บอนดังกล่าวอาจถูกเปลี่ยนให้เป็นไกลโคเจน ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่า สารประกอบคาร์บอนสำรอง (Reserve carbon) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่ในรูปไกลโคเจน เมื่อเกิดการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทน ความจำเป็นในการใช้พลังงานเพื่อการสังเคราะห์ก็เกิดขึ้น ซึ่งสามารถจะได้รับมาจากการสลายของสารประกอบคาร์บอนสำรองไกลโคเจน นอกจากนี้ยังเป็นที่คาดหมายว่า อัตราส่วนของสารประกอบในรูปของไกลโคเจนน่าจะมากกว่าสารประกอบไกลซีนบีเทน เนื่องจากว่าไกลซีนบีเทนทำหน้าที่เป็นเพียงออสโมเรกูเลเทอร์ไม่สามารถเปลี่ยนรูปหรือถูกนำไปใช้ในการสร้างพลังงานได้ อย่างไรก็ตาม ในอนาคตน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนและความสามารถในการสังเคราะห์ไกลโคเจน เมื่อเซลล์ A. halophytica อยู่ภายใต้ความเครียดของเกลือ ได้มีการศึกษาในใบของผักปวยเล้ง (Spinach leaves) พบว่าอัตราการสร้างไกลซีนบีเทนเมื่อเลี้ยงผักในสภาวะที่ไม่มีและสภาวะที่มีความเครียดของเกลือมีค่าประมาณ 20 และ 70 นาโนโมลต่อ 1 มก. คลอโรฟิลล์ต่อ 1 ชม. ตามลำดับ (31,32) อัตราดังกล่าวนี้นับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับอัตราการที่เซลล์ของใบผักสามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งหมายความว่าการนำสารประกอบคาร์บอนที่ได้จากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ไปใช้ในการสร้างไกลซีนบีเทน ไม่มีผลต่อการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามในกรณีของสาหร่ายสีเขียว Dunaliella พบว่าประมาณ 20% ของคาร์บอนที่ถูกตรึงโดยการสังเคราะห์แสงสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบคอมแพทิเบิลโซลูทชนิดกลีเซอรอล เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ความ

เครียดของเกลือ (33,34) ในกรณีเช่นนี้การสังเคราะห์กลีเซอรอลจะมีผลต่อการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ และสิ่งที่น่าศึกษาต่อไปในกรณีเช่นนี้คือ การศึกษาอัตราการสังเคราะห์แป้งจำพวกสตาช (Starch) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนสำรองในสาหร่ายสีเขียว

ผลของความเครียดของเกลือที่มีต่อกระบวนการเมตาบอลิสมของ A. halophytica ทางด้านการสังเคราะห์ (Anabolism) เกี่ยวกับเอนไซม์ทางด้านการสังเคราะห์แสงเป็นไปในทางเพิ่มขึ้น ในผลการทดลองเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิสม ทางด้านการสลาย (Catabolism) โดยใช้เอนไซม์ RNase เป็นเอนไซม์ตัวอย่างปรากฏว่า ความเครียดของเกลือในช่วงสั้นที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลืออย่างกระทันหัน ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่ม (Upshock) หรือลด (Downshock) จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เพิ่มขึ้น (รูปที่ 8) ก่อนหน้านั้นได้มีรายงานว่า พืชที่ขาดน้ำจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เพิ่มขึ้น ซึ่งกลไกการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เกิดขึ้นโดยมีการสังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มขึ้น (35) หรืออาจเกิดขึ้นโดยการที่เอนไซม์ปริมาณเดิมถูกกระตุ้นให้มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น (36) จากการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ในเซลล์ของ A. halophytica การเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase น่าจะเป็นการเพิ่มขึ้นเนื่องจากการกระตุ้นให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น เหตุผลที่สนับสนุนก็คือ ในรูปที่ 9 เกลือโซเดียมคลอไรด์ มีผลต่อการกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ และได้มีรายงานถึงการสะสม Na^+ (19) และ Cl^- (20) เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงเซลล์ A. halophytica ในสภาวะที่มีความเค็มเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างกระทันหันอาจทำให้เกิดการส่งผ่าน Na^+ และ Cl^- เข้าไปภายในเซลล์ หรือออกมาจากภายในเซลล์ ปริมาณ Na^+ และ Cl^- ที่อยู่ภายในเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงให้โมเลกุลของเอนไซม์ RNase อยู่ในสภาพพัก (Inactive) หรือตื่นตัว (Active) ได้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าในระยะยาวเมื่อเซลล์เจริญมากขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase กลับมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 7) เซลล์ A. halophytica สามารถสะสมไกลซีนบีเทนเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเค็มสูง (19) ถึงแม้ว่าไกลซีนบีเทนนั้นมีประโยชน์ต่อเอนไซม์ RuBP carboxylase (21) แต่ในกรณีของเอนไซม์ RNase ผลของ

ไกลซีนบีเทนยังไม่มีผู้ใดศึกษา ไกลซีนบีเทนอาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase โดยตรงหรือโดยอ้อม เพื่อที่จะทำให้ปริมาณ RNA ซึ่งไม่ถูกย่อยสลาย สามารถนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนเพื่อเซลล์จะได้เจริญต่อไป

โดยสรุปแล้ว การทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของอัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ RuBP carboxylase น่าจะเป็นกระบวนการสำคัญในการปรับระดับความดันภายนอกและภายในเซลล์ (ผ่านการสังเคราะห์สารไกลซีนบีเทนที่ทำหน้าที่เป็นออสโมเรกูเลเทอร์) เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดของเกลือ ส่วนการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เมื่อปรับความเข้มข้นของเกลือโดยกระทันหัน น่าจะเป็นการตอบสนองในช่วงสั้น ๆ และคงไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้างสารไกลซีนบีเทนโดยตรง

ข้อสรุป

1. ความเครียดของเกลือมีผลทำให้เซลล์ A. halophytica สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากขึ้น

2. ความเครียดของเกลือมีผลทำให้เซลล์ A. halophytica สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ RuBP carboxylase ได้มากขึ้น

3. ความเครียดของเกลือมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนส่วนที่ละลายได้เพิ่มขึ้นในเซลล์ A. halophytica

4. ความเครียดของเกลือไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ A. halophytica ในช่วง Log phase

5. ความเครียดของเกลือในช่วงสั้น ๆ มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase เพิ่มขึ้น แต่ในระยะยาวความเครียดของเกลือไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase

6. เมื่อเซลล์ A. halophytica มีอายุเพิ่มขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ RNase จะลดลง

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยที่ควรทำต่อไปมีดังนี้

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือที่มีต่ออัตราการสังเคราะห์ไกลโคเจนในสาหร่าย A. halophytica

2. ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนที่ถูกนำไปสร้างสารประกอบไกลซีนบีเทน และที่ถูกนำไปสร้างเอนไซม์ RuBP carboxylase ภายใต้สภาวะที่มีความเครียดของเกลือในสาหร่าย A. halophytica

3. ศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่ระดับของยีน โดยศึกษาความเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ที่สามารถนำไปสร้างสารประกอบไกลซีนบีเทน รวมทั้งระดับ mRNA ของเอนไซม์ RuBP carboxylase

4. ศึกษาผลของสารประกอบไกลซีนบีเทนที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ RNase

ส่วนอ้างอิง

1. Flowers, T.J. (1972) J. Exp. Bot. 23, 310-321.
2. Greenway, H. and Osmond, C.B. (1972) Plant Physiol. 49, 256-259.
3. Stewart, G.R. and Lee, J.A. (1974) Planta 120, 279-284.
4. Hall, J.L. and Flowers, T.J. (1973) Planta 110, 361-368.
5. Flowers, T.J. (1974) J. Exp. Bot. 101, 101-110.
6. Hess, W.M., Hansen, D.J. and Weber, D.J. (1975) Can. J. Bot. 53, 1176-1187.
7. Harvey, D.M.R., Flowers, T.J. and Hall, J.L. (1976) New Phytol. 77, 319-323.
8. Nassery, H. and Jones, R.L. (1976) J. Exp. Bot. 27, 1279-1289.
9. Van Steveninck, R.F.M., Armstrong, W.D., Peters, P.D. and Hall T.A. (1976) Aust. J. Plant Physiol. 3, 367-376.
10. Harvey, D.M.R., Flowers, T.J. and Hall, J.L. (1977) In "Transmembrane ionic exchanges in plants" Dainty, J. and Thellier, M., eds. (Colloques du CNRS, Paris) pp. 451-457.
11. Hellebust, J.A. (1976) Annu. Rev. Plant Physiol. 27, 485-505.
12. Flowers, T.J., Troke, B.F. and Teo, A.R. (1977) Ibid. 28, 89-
13. Jefferies, R.L. (1980) In "Genetic engineering of osmoregulation" Rains, D.W. et al eds. (Plenum, New York)

pp. 135-154.

14. Aspinall, D. and Paleg, L.G. (1981) In "Physiology and biochemistry of drought resistance in plants" Paleg, L.G. and Aspinall, D., eds. (Academic Press, New York) pp. 205-241.
15. Wyn Jones, R.G. and Storey, R. (1981) Ibid. pp. 171-204.
16. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. (1982) Science 217, 1214-1222.
17. Brock, T.D. (1976) Arch. Microbiol. 107, 109-111.
18. Miller, D.M., Jones, J.H., Yopp. J.H., Tindall, D.R. and Schmid, W.E. (1976) Ibid. 111, 145-149.
19. Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. and Stewart, W.D.P. (1984) Ibid. 138, 333-337.
20. Incharoensakdi, A. and Takabe, T. (1988) Plant Cell Physiol. 29, 1073-1075.
21. Incharoensakdi, A., Takabe, T. and Akazawa, T. (1986) Plant Physiol. 81, 1044-1049.
22. Yamaguchi, J., Nishimura, M. and Akazawa, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA.) 81, 4809-4813.
23. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
24. Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
25. Rouxel, M.F., Billard, J.P. and Boucaud, J. (1987) Physiol. Plant. 69, 330-336.
26. Mackineey, G. (1941) J. Biol. Chem. 140, 315-322.
27. Blumwald, E. and Tel-Or, E. (1984) Plant Physiol. 74, 184-185.

28. Gimmler, H., Kaaden, R., Kirchner, U. and Weyard, A. (1984) Z. Pflanzenphysiol 114, 131-150.

29. Lehninger, A.L. (1982) In "Principles of biochemistry" Anderson, S. and Fox, J. eds. (Worth Publishing Inc., New York) pp. 664-667.

30. Jacobsen, J.V., Hanson, A.D. and Chandler, P.C. (1986) Plant Physiol. 80, 350-359.

31. Coughlan, S.J. and Wyn Jones, R.G. (1982) Planta 154, 6-17.

32. Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C. and Rhodes, D. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA.) 82, 3678-3682.

33. Craigie, J.S. and McLachlan, J. (1964) Can. J. Bot. 42, 777-778.

34. Wegmann, K. (1971) Biochim. Biophys. Acta. 234, 317-323.

35. Genkel, P.A., Satarova, N.A., Blekhman, G.I. and Tvorus, E.K. (1974) Sov. Plant Physiol. (Engl. translation) 21, 91-96.

36. Yi, C. and Todd, G.W. (1979) Physiol. Plant. 46, 13-18.

ส่วนผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสาหร่าย A. halophytica

1. สารละลายเกลือเติร์กไอส์แลนด์ (Turk Island Salt Solution)

ในน้ำกลั่น 5 ลิตร เติมเกลือปริมาณต่าง ๆ ดังนี้

1.1	KCl	3.33 กรัม
1.2	$MgCl_2.6H_2O$	2.75 กรัม
1.3	$CaCl_2.2H_2O$	7.33 กรัม
1.4	$MgSO_4.7H_2O$	34.70 กรัม
1.5	$NaCl$	140.80 กรัม

2. สารละลาย BG-11

ส่วนผสมของสารละลาย BG-11 มีดังนี้ (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร)

2.1	$NaNO_3$	150
2.2	KH_2PO_4	4
2.3	$MgSO_4.7H_2O$	75
2.4	$CaCl_2.2H_2O$	36
2.5	Na_2CO_3	20
2.6	กรดซิตริก	6
2.7	$EDTA.Na_2$	1
2.8	$FeSO_4.7H_2O$	6

2.9 สารละลายแร่ธาตุที่จำเป็นซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร)

H_3BO_3	2.68
$MnCl_2.4H_2O$	1.81
$ZnSO_4.2H_2O$	0.22
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.39

$CuSO_4.5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.049

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้โดยการเติม 50 มล. ของสารละลายข้อ 2.1 และ 5 มล. ของสารละลายข้อ 2.2 ถึงข้อ 2.9 ลงใน 5 ลิตรของสารละลายข้อ 1 หลังจากนั้นปรับ pH ให้มีค่า 7.4 ด้วยสารละลาย 2N NaOH