



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase
ภายใต้ภาวะเครียด ในเฮลิคทีริโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418
Expression analysis of genes encoding Glutathione S-transferase
under stress condition in extremophile *Halotheca* sp. PCC7418

ชื่อนิสิต นายชนาญวัต กอธีระกุล **เลขประจำตัว** 5832308823

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase
ภายใต้ภาวะเครียด ในเชื้อราโมไฟล์ *Halothece* sp. PCC7418

โดย

นายชนาญวัต กอธีระกุล รหัสบัณฑิต 5832308823

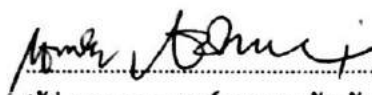
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา

ปีการศึกษา

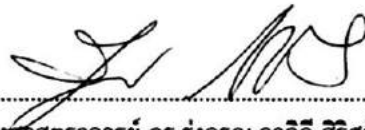
2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

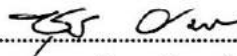


..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

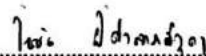
คณะกรรมการสอบโครงการ



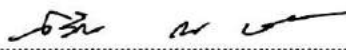
..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัสวลาภสกุล)



..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สรริสา ณ ป้อมเพชร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase ภายใต้ภาวะเครียด

ในเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418

Expression analysis of genes encoding Glutathione S-transferase under stress condition

in extremophile *Halotheca* sp. PCC7418

นิสิตในโครงการ

นายชญาญวัต กอธีระกุล

รหัสประจำตัวนิสิต 5832308823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดีถิ์ สิริศรัทธา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 2561

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase
ภายใต้ภาวะเครียดในเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halothece* sp. PCC7418

นิสิตผู้เสนอโครงการ นายชานาญวัต กอธีระกุล รหัสประจำตัวนิสิต 5832308823

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 จัดเป็นเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงได้ โดยกลไกหนึ่งที่ทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดในภาวะดังกล่าว คือกลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดด้วยปฏิกิริยาคอนจูเกชัน โดยใช้เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานส์เฟอเรส (GST) ซึ่งใช้ในการกำจัดสารพิษและสารอนุมูลอิสระ รวมถึงปรับสมดุลภายในเซลล์ให้เหมาะสมกับภาวะเครียดนั้น จากการศึกษาข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ของ *Halothece* sp. PCC7418 พบว่ามียีนกำหนดรหัส GST ทั้งหมด 4 ยีนซึ่งจะนำมาศึกษาการแสดงออกในครั้งนี้ ได้แก่ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 นอกจากนี้ยังศึกษา PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัสแกมมา-กลูตามิล ทรานส์เพปติเดส/กลูตาไธโอนไฮโดรเลส ซึ่งอยู่ในวิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอนเพิ่มเติมด้วย การวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศจากฐานข้อมูลต่างๆ และสร้างแผนภาพ phylogenetic tree พบว่า GST ที่ถอดรหัสได้จากยีนดังกล่าวถูกจัดอยู่ใน GSTA superfamily และส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับ *Dactylococcopsis salina* มากที่สุด จากการศึกษาในระดับการแสดงออกภายใต้ภาวะเครียด ด้วยการทำให้ semiquantitative RT-PCR ภายใต้ภาวะเครียด 3 ภาวะ ได้แก่ ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ พบว่า PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยยีน PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุด (ประมาณ 11 เท่า) แต่เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ลดลง ในระดับที่แตกต่างกัน ส่วนภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress พบว่า PCC7418_0647 และ PCC7418_0729 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกของยีนมากที่สุด เมื่อได้รับความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ และ PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และภาวะเครียดร่วมจากเกลือและ oxidative stress โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า PCC7418_0647 และ PCC7418_0729 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น แต่ PCC7418_3557 มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นสูงกว่าค่า IC₅₀ แต่ทั้ง 3 ภาวะเครียด ตรวจสอบไม่พบการแสดงออกของ PCC7418_1478 และ PCC7418_2276 อาจเป็นไปได้ว่า ยีนไม่มีการแสดงออกภายใต้ภาวะเครียดที่ทดสอบหรือเป็นยีนที่ไม่มีการแสดงออก (silent gene) หรือไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (cryptic gene) ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาด้วยวิธีอื่น หรือศึกษาการแสดงออกในระดับอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

Project title Expression analysis of genes encoding Glutathione S-transferase under stress condition in extremophile *Halothece* sp. PCC7418

Investigator Mister Chananwat Kortheerakul student ID 5832308823

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

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Halothece sp. PCC7418 is extremophilic cyanobacterium, which can grow under high salinity condition. One mechanism that enables cells to survive in this harsh condition is the mechanism of response to stress by conjugation reactions, using enzyme glutathione S-transferase (GST), which lead to detoxification of free radicals and xenobiotic compounds as well as cellular homeostasis control. From the entire genome analysis of *Halothece* sp. PCC7418, four putative genes encoding GST were found. There are PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 and PCC7418_3557. Another gene associated with glutathione metabolism is PCC7418_2276, which encodes putative gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)/glutathione hydrolase. Bioinformatics and phylogenetic analyses revealed that *Halothece* sp. PCC7418 GSTs were classified as GSTA superfamily and most of them showed high similarity to *Dactylococcopsis salina* GST. Gene expression analysis by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) showed that PCC7418_0647, PCC7418_0729 and PCC7418_3557 were up-regulated under high salinity condition (2M NaCl). Among these genes, expression level of PCC7418_3557 was the highest (11-fold increased). Further analysis was conducted by oxidative stress induced by H₂O₂. It was clearly observed that PCC7418_0647 and PCC7418_3557 were up-regulated under oxidative stress with dose dependent manners. Lastly, a combined stress (2M NaCl+H₂O₂) led to different pattern of gene expression. PCC7418_0647 and PCC7418_0729 were up-regulated while PCC6418_3557 was up-regulated at only low H₂O₂ concentration but significantly declined its expression level at higher H₂O₂ concentration. It should be noted that expressions of PCC7418_1478 and PCC7418_2276 could not be detected in all our tested conditions. These two genes may be cryptic genes and/or silent genes. Further study using other methods or expression analysis in other level should be performed.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษา ทั้งในด้านการวางแผนการทดลอง, การดำเนินการทดลอง และการอภิปรายผลการทดลอง รวมถึงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ในรายวิชาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ตลอดโครงการ

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องวิจัย 1904/17 และพี่ๆ ห้องวิจัยอื่นๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนถ่ายทอดเทคนิค วิธีการทดลองอันเป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา รุ่นที่ 42 ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษา ระหว่างการดำเนินการวิจัยตลอดทั้งโครงการ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

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	10
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	10
2.2 เคมีภัณฑ์	11
2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	13
3.1 ชีวสารสนเทศของ glutathione S-transferase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	13
3.1.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT	13
3.1.2 การหา GO function ของ GST และ GGT	13
3.1.3 การจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโน	13
3.1.4 การสร้าง phylogenetic tree	14
3.2 การออกแบบไพรเมอร์	15
3.3 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ในภาวะปกติ	15
3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง	15
3.3.2 การติดตามการเจริญ	15
3.4 การเลี้ยง <i>Halothece</i> sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียด	15
3.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อเปลี่ยนจากการเลี้ยงในภาวะปกติเป็นภาวะเครียด	15
3.4.2 การศึกษาเกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress	16

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
3.4.3 การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	16
3.4.4 การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress	16
3.4.5 การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดร่วม	17
3.4.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์	17
3.5 การสกัด total RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA	17
3.5.1 การสกัด total RNA	17
3.5.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	18
3.5.3 การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA	18
3.6 semiquantitative RT-PCR	18
บทที่ 4. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	21
4.1 ชีวสารสนเทศของ glutathione S-transferase ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	21
4.2 การออกแบบไพรเมอร์	31
4.3 การศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress	34
4.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียด	38
4.5 การสกัด total RNA	40
4.6 การทำ semiquantitative RT-PCR	46
4.6.1 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	46
4.6.2 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress	49
4.6.3 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัสภายใต้ภาวะเครียดร่วม	51
บทที่ 5. สรุปผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก.	64
สูตรอาหาร BG-11+turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะปกติ	64
สูตรอาหาร BG-11+turk solution สำหรับเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	65

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
การเตรียม 10X tris-Acetate-EDTA (TAE)	66
การเตรียม 1.2% agarose gel	66
การเตรียม 0.1% DEPC water	66
ภาคผนวก ข.	67
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	67
ลำดับกรดอะมิโนของ GST และ GGT ใน <i>Halothece</i> sp. PCC7418	69
ภาคผนวก ค.	71
ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA	71
ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band จากการทำ RT-PCR	72
ภาคผนวก ง.	76
แผนภาพแสดงตำแหน่งที่ตั้งของยีนในจีโนมสมบูรณ์	76

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย	2
1.2 วัฏจักรเอส-กลูตาไรโอนิเลชั่น	3
1.3 โครงสร้างของเอนไซม์ GST ชนิดอัลฟา ซึ่งพบในมนุษย์	4
1.4 การเกิดปฏิกิริยาการคอนจูเกตรหว่างกลูตาไรโอนและโปรตีนเป้าหมายโดยเอนไซม์ GST	7
3.1 แผนผังการดำเนินการทดลอง	20
4.1 วิธีเมแทบอลิซึมของกลูตาไรโอน โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ศึกษา	22
4.2 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_0647	26
4.3 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_3557	27
4.4 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_0729	28
4.5 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_1478	29
4.6 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_2276	30
4.7 กราฟการเจริญของเซลล์ภายใต้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง	35
4.8 กราฟการเจริญของเซลล์ภายใต้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง	36
4.9 ผลการทดลองศึกษาการเจริญของเชื้อภายใต้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
4.10 สันฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า	39
4.11 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จาก <i>Halothece</i> sp. PCC7418	41
4.12 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	42
4.13 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress (48ชม.)	43
4.14 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress (6 ชม.)	44
4.15 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดร่วม	45
4.16 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ	48
4.17 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress	50
4.18 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดร่วม	52

สารบัญตาราง

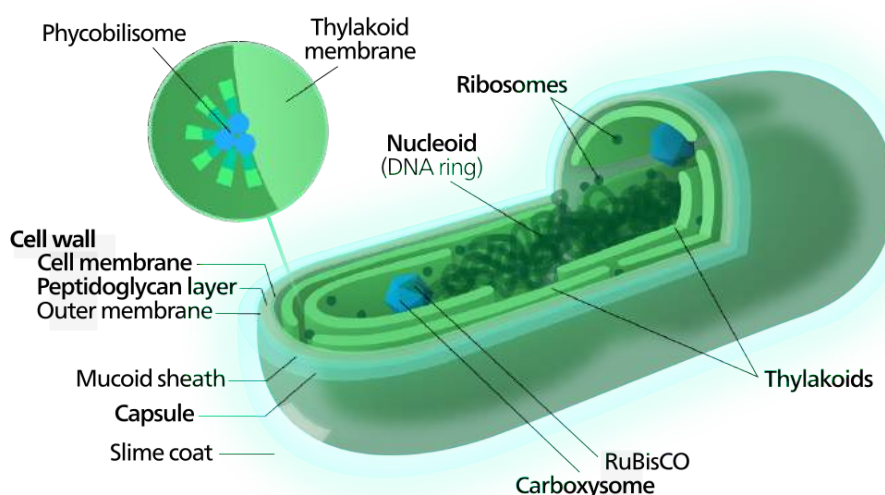
ตารางที่	หน้า
1.1 ไอโซไซม์ต่างๆ ของ GST ที่พบได้มากในสิ่งมีชีวิตต่างๆ และชนิดกรดอะมิโนที่ H-site	6
4.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ GST และ GGT / glutathione hydrolase	23
4.2 ผลการวิเคราะห์ GO function ของ GST และ GGT/hydrolase ใน <i>Halotheca</i> sp. PCC7418	24
4.3 ไพรมอร์สำหรับการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT	32

บทที่ 1

บทนำ

ไซยาโนแบคทีเรีย เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย ที่มีความหลากหลายสูง และมีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน โดยมีลักษณะเป็นเซลล์โพรคาริโอต (Shih และคณะ, 2013) กล่าวคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส, มีสารพันธุกรรมเป็น circular DNA ล่องลอยอยู่ในไซโทพลาสซึม และมีผนังเซลล์ประกอบด้วยเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) รวมทั้งสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ โดยใช้คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี, แคโรทีนอยด์ และกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีน ที่ประกอบด้วยไฟโคไซยานิน, อัลโลไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน เป็นรงควัตถุในการสังเคราะห์ด้วยแสง (Elanskaya และคณะ, 2018) โดยในไซยาโนแบคทีเรียไม่มีออร์แกเนลล์ที่ใช้บรรจุรงควัตถุเหล่านี้เหมือนอย่างคลอโรพลาสต์ หรือพลาสติดในพืช หรือจุลสาหร่ายอื่นๆ แต่รงควัตถุเหล่านี้จะกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม ทำให้มองเห็นเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียมีสีเขียวแกมน้ำเงิน (Koodkaew และคณะ, 2012)

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด จัดเป็นเอ็กซ์ตรีโมไฟล์ (extremophile) ซึ่งมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่สุดขั้ว (extreme environment) ที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หรือก่อให้เกิดภาวะเครียดต่อเซลล์ โดยการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ, เอนไซม์ หรือการปรับตัวเชิงโครงสร้างเพื่อตอบสนองภาวะเครียดดังกล่าว เช่น กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic cyanobacteria) ซึ่งสามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 50 องศาเซลเซียส เช่น น้ำพุร้อนใต้ (Amarouche-Yala และคณะ, 2014), กลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบภาวะเป็นกรด (acidophilic cyanobacteria) ซึ่งอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดสูงได้ และกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่ชอบเค็ม (halophilic cyanobacteria) ซึ่งอาศัยได้ในภาวะที่มีความเค็มจัด หรือมีความเข้มข้นของเกลือสูง ตั้งแต่ 3-5 โมลาร์ได้ เป็นต้น (Selvarajan และคณะ, 2017) ซึ่งสภาพแวดล้อมเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์อยู่ในภาวะเครียดในรูปแบบต่างๆ เช่นภาวะเครียดจากเกลือ, ภาวะเครียดจากความร้อน และภาวะเครียดจากสารพิษ (xenobiotic) เป็นต้น แต่ภาวะเครียดที่มีความสำคัญมาก คือภาวะเครียดจาก oxidative stress ซึ่งเกิดขึ้นได้จาก 2 สาเหตุหลัก ได้แก่ การที่เซลล์ได้รับสารที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง ซึ่งมักเป็นสารในกลุ่มไฮโดรเปอร์ออกไซด์ อย่างเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หรือ คิวมิน ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (cumene hydroperoxide: CuOOH) โดยตรง และเป็นภาวะเครียดที่เกิดขึ้นภายหลังการที่เซลล์อยู่ในภาวะเครียดอื่นๆ ก่อน เช่น ภาวะเครียดจากเกลือ ซึ่งท้ายที่สุดก็จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระประเภท Reactive Oxygen Species (ROS) ขึ้นในเซลล์ จนเกิด oxidative stress ตามมา และทำให้เซลล์มีเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติ หรือเกิดความเสียหายขึ้นภายในเซลล์ได้ ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียจึงต้องมีกลไกในการตอบสนองต่อภาวะเครียด เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์, ป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ และกำจัดสารพิษต่างๆ ออกจากเซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอดในภาวะเครียดนั้นได้



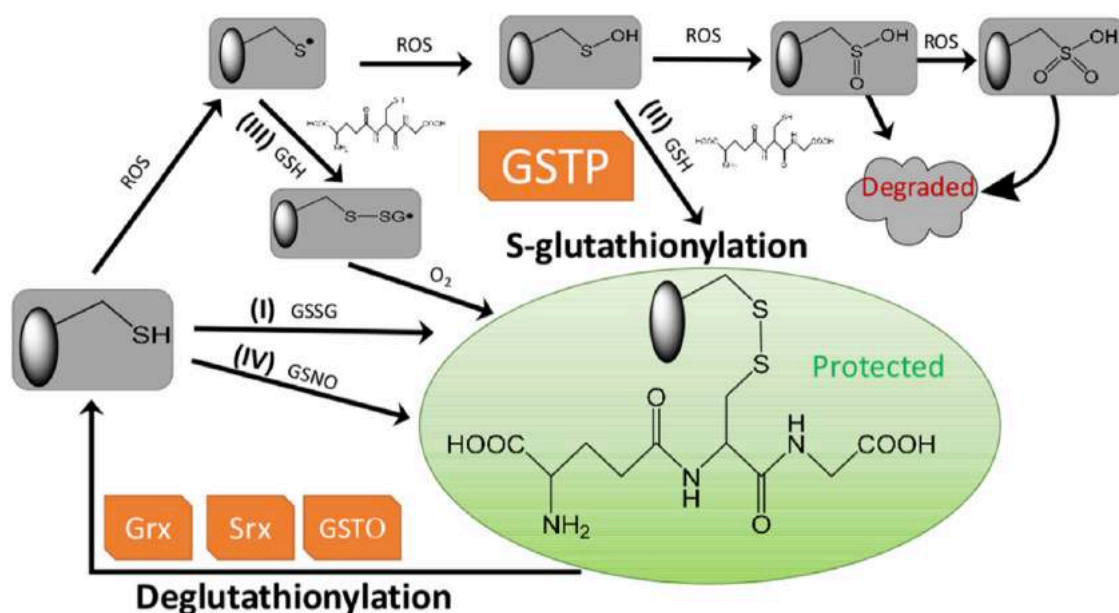
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

(ที่มา: Kelvinsong via Wikipedia.org under licensed of Wikimedia commons เข้าถึงข้อมูลวันที่ 23 มกราคม พ.ศ. 2562)

กลไกในการตอบสนองต่อภาวะเครียด เพื่อกำจัดสารพิษของเซลล์มีอยู่หลายรูปแบบ โดยหนึ่งในกลไกที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุด คือกลไกการกำจัดสารพิษโดยใช้ระบบกลูตาไธโอนคอนจูเกต (glutathione conjugation) ซึ่งมีกลไกเกิดเป็นวัฏจักร เริ่มจากการที่กลูตาไธโอนในรูปปรีดีทิวซ์ฟอร์ม จะเข้าไปจับกับสารประกอบอเล็กโตรไฟล์, สารพิษ หรืออนุมูลอิสระต่างๆ โดยสร้างพันธะไดซัลไฟด์กับโมเลกุลนั้น และเปลี่ยนเป็นรูปออกซิไดซ์ฟอร์ม ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เรียกว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการกลูตาไธโอนิเลต (S-glutathionylated product) หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการคอนจูเกต (conjugated product) ซึ่งมีขั้วมากขึ้น, ละลายน้ำได้มากขึ้น และมีความเป็นพิษต่ำลง (Theoharaki และคณะ, 2019) ซึ่งเซลล์จะมีกระบวนการกำจัดสารพิษเหล่านี้ทิ้งต่อไป และเปลี่ยน กลูตาไธโอนในรูปออกซิไดซ์ ที่ใช้ในการคอนจูเกตกลับไปเป็นกลูตาไธโอนอิสระในรูปปรีดีทิวซ์ฟอร์ม โดยใช้เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส (glutathione reductase) ซึ่งกลูตาไธโอนสามารถถูกนำกลับไปใช้ในการคอนจูเกตได้ใหม่ และเพื่อเป็นการรักษาระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์ให้คงที่ เรียกว่าวัฏจักรนี้ว่า เอส-กลูตาไธโอนิเลชัน (S-glutathionylation) (Pophaly และคณะ, 2017)

สำหรับขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาคอนจูเกตกลูตาไธโอน กับสารประกอบอเล็กโตรไฟล์, สารพิษ หรืออนุมูลอิสระต่างๆ ในวัฏจักรเอส-กลูตาไธโอนิเลชัน สามารถแบ่งเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ปฏิกิริยาแบบไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง (non-enzymatic reaction) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีแบบเกิดขึ้นเอง จนเป็นสารที่สามารถกำจัดออกจากเซลล์ได้ แต่พบได้น้อยและเกิดขึ้นช้า ตัวอย่างเช่น การเกิดการแลกเปลี่ยนหมู่ไธออลไดซัลไฟด์ (thiol-disulfide) ระหว่าง โปรตีนไธออล (protein thiol) กับ กลูตาไธโอน ไดซัลไฟด์ (glutathione disulfide) ผ่านการเกิด โปรตีน เอส-กลูตาไธโอนิเลชัน, การที่ โปรตีนไธออล ถูกออกซิไดซ์ด้วย อนุมูลอิสระประเภท ROS หรือสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

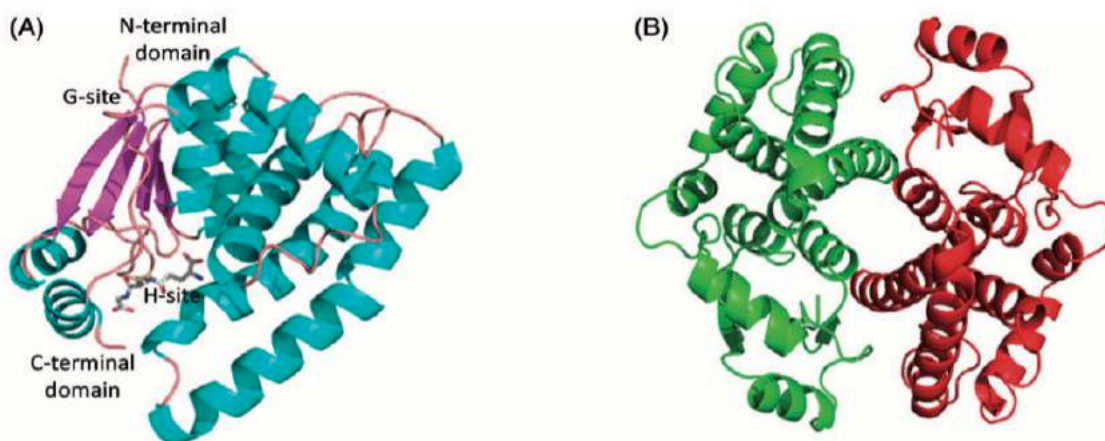
ได้เป็น sulfenic acid (PSOH) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับกลูตาไธโอน ได้เป็น ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับ การออกจุกเขต ซึ่งป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับโปรตีนได้ และ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) ซึ่งปกติเป็นออกซิแดนที่ไร้ออลที่อ่อน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา เอส-ไนโตรซิลเลชัน (S-nitrosylation) ผ่านการเกิดทุติยภูมิของอนุมูลอิสระประเภท Reactive Nitrogen Species (RNS) ได้ เป็นต้น ส่วนปฏิกิริยา แบบใช้เอนไซม์ (enzymatic Reaction) เป็นการใชเอนไซม์ต่างๆ เช่น กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase; GST), ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และ คาตาเลส (catalase) ในการเร่งปฏิกิริยาออกจุกเขต ระหว่างสารพิษกับสารตัวกลาง ให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียรมาก ขึ้น หรือมีความเป็นพิษลดลง (Zhang และคณะ, 2018)



รูปที่ 1.2 วงจรเอส-กลูตาไธโอนิลเลชัน (S-glutathionylation) (ที่มา: Zhang และคณะ, 2018)

สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *Halotheca* sp. PCC7418 ซึ่งเป็นเอ็กซ์ทรีโมไฟล์ ที่ คัดแยกได้จากทะเลเดดซี (Dead sea) ประเทศอิสราเอล (Waditee-sirisattha และคณะ, 2014) ซึ่งเป็น ทะเลสาบน้ำเค็มที่อยู่ในพื้นที่ต่ำมากที่สุดในโลก โดยต่ำกว่าระดับน้ำทะเลปานกลาง 420 เมตร และมีปริมาณ เกลือในแหล่งน้ำถึง 34% ซึ่งทำให้น้ำในทะเลเดดซีมีความเค็มมาก (hypersaline) อีกทั้งยังมีค่า pH ต่ำและมี องค์ประกอบของไอออนในน้ำต่างจากแหล่งน้ำอื่นๆ อีกด้วย (Jacob และคณะ, 2017) โดยภาวะดังกล่าวจะ ทำให้เซลล์เกิดความเครียดเนื่องจากเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (salt stress) และเป็นหนึ่งในภาวะเครียดที่ เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS ขึ้นมาจนเกิดเป็น oxidative stress ได้ ในการศึกษาจึงสนใจกลุ่มยีนกำหนด รหัสที่มีความสำคัญในการตอบสนองต่อภาวะเครียดแบบ oxidative Stress คือกลุ่มยีนกำหนดรหัส glutathione S-transferase (GST) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มทรานสเฟอเรส มีบทบาทในกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน ในแง่ของการกำจัดสารพิษและอนุมูลอิสระออกจากเซลล์ (detoxification),

การขนส่งสารระหว่างเซลล์ (extracellular transportation) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียด โดยเอนไซม์ GST นี้พบได้ในทุกสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่แบคทีเรีย จนถึงมนุษย์ (Zhang และคณะ, 2018a)



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของเอนไซม์ GST ชนิดอัลฟา ซึ่งพบในมนุษย์ (ที่มา: Perperopoulou และคณะ, 2018)

เอนไซม์ GST เป็นเอนไซม์ที่สร้างและอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) โดยทั่วไปที่มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีโครงสร้างเหมือนกัน หรืออาจแตกต่างกันก็ได้ แต่ละหน่วยย่อยจะประกอบด้วยโดเมนย่อยหลายโดเมน ที่มีโครงสร้างผสมกันระหว่าง อัลฟา-เฮลิคซ์ (alpha-helix) และบีตา-ชีต (beta-sheet) โดยโดเมนที่ 1 เป็นบริเวณอนุรักษ์ด้านปลาย N ที่เชื่อมกับไฮโอรีดอกซิน (conserved thio redoxin liked N-terminus) โดยจะมีบริเวณเร่ง ที่ใช้เร่งปฏิกิริยา 1 ตำแหน่ง แต่ละตำแหน่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ตำแหน่งจับลิแกนด์ คือ บริเวณจับกลูตาไธโอน (glutathione binding site: G-site) และบริเวณจับซับสเตรต (electrophilic substrate binding site: H-site) ถ้าพิจารณาตัวตำแหน่ง สามารถแบ่ง GST ออกเป็น 4 ซูเปอร์แฟมิลี ได้แก่ GST ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม (cytosolic GSTs), GST ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial GSTs), GST ชนิดที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรน (microsomal membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism หรือ MMPEG) และ fosfomycin resistance protein หรือ fosA ซึ่งชนิดสุดท้ายนี้พบส่วนใหญ่ในแบคทีเรียแกรมลบ (Theoharaki และคณะ, 2019) จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคถ่ายภาพด้วยเทคนิคคริสตัลโลกราฟี เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของตำแหน่งจับลิแกนด์ทั้งสอง พบว่าบริเวณ G-site ซึ่งใช้จับกับกลูตาไธโอน จะอยู่ที่โดเมนที่ 1 ด้านปลาย N ส่วนบริเวณ H-site ซึ่งจะจับกับสารประกอบอเล็กโตรไฟล์ เช่น สารอนุมูลอิสระ, สารพิษ และ โปรตีนเป้าหมายต่างๆ จะอยู่ที่ด้านปลาย C (Perperopoulou และคณะ, 2018) ในส่วนของ H-site เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูง โดยเฉพาะ GST ที่อยู่ในไซโทพลาสซึมสามารถถูกจำแนกประเภท ออกเป็นไอโซไซม์ หรือคลาสย่อยได้หลายคลาส โดยจำแนกจากบริเวณ H-site ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีลำดับแตกต่างกัน และ ซับสเตรตของ

เอนไซม์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ GST บางคลาส มี H-site ที่สามารถเกิดโครงสร้างสร้างพิเศษ เช่นเกิดการขาดเป็นรูป เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานในสภาวะแวดล้อมเฉพาะได้ (Tossounian และคณะ, 2018)

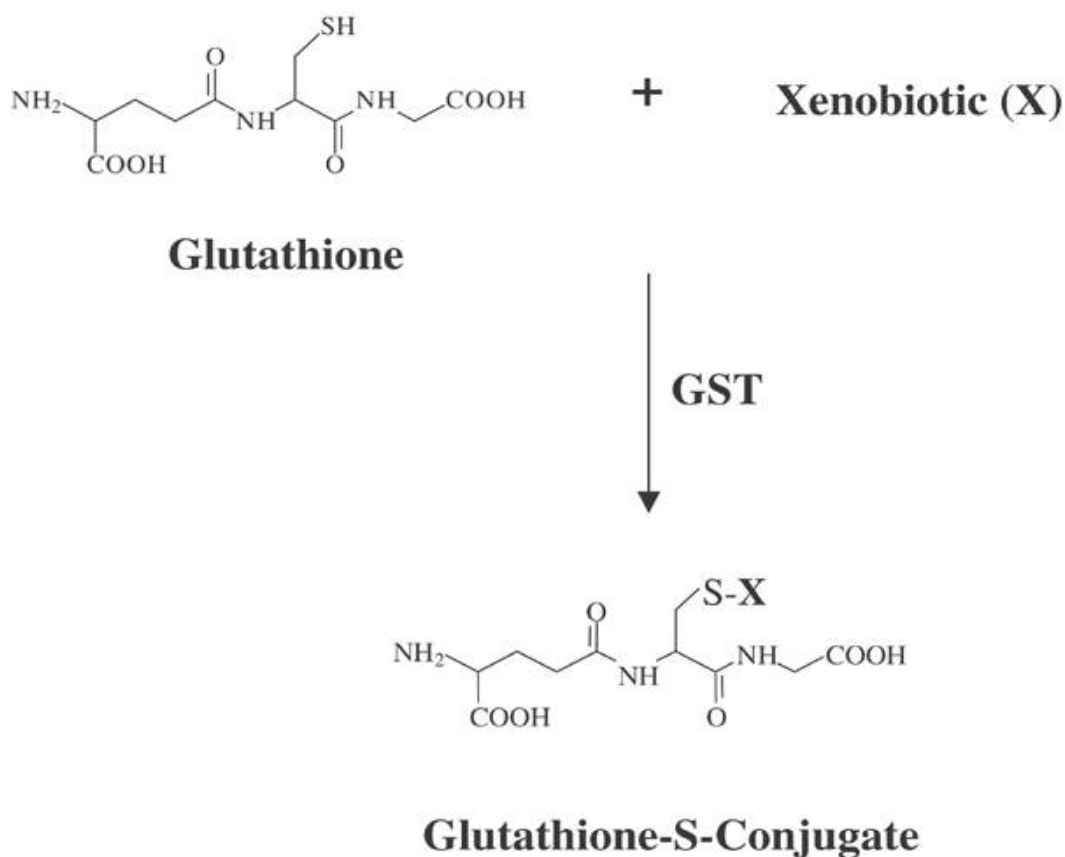
เอนไซม์ GST ในไซโทพลาสซึมที่มีรายงานในปัจจุบัน พบได้น้อย 17 คลาส แต่ละคลาสตั้งชื่อตามตัวอักษรกรีก ได้แก่ Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Lambda, Mu, Nu, Pi, Rho, Sigma, Tau, Phi และ Omega ส่วน GST ในไมโทคอนเดรีย อาจเรียกชื่อตามการจัดจำแนกในระบบคลาสได้เป็นคลาส Kappa (Morel และ Aninat 2011) ซึ่งการที่ลำดับกรดอะมิโนบริเวณ H-site ของ GST แต่ละคลาสมีความหลากหลายแตกต่างกัน จึงทำให้ GST ในแต่ละคลาสมีความจำเพาะต่อสารประกอบอเล็กโตรไฟล์ หรือซับสเตรตต่างกัน (Theoharaki และคณะ, 2019) จากรายงานการศึกษาพบว่า เอนไซม์ GST ในบางคลาส อาจมีคุณสมบัติเชิงโครงสร้าง หรือ คุณสมบัติเชิงฟังก์ชันที่ไม่พบใน GST คลาสอื่น เช่น Chi-class GST ซึ่งพบในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีคุณสมบัติที่ทนต่อ pH สูงได้ (Pandey และคณะ, 2015a) และ Theta, Alpha, Rho-class GST มี เพอร์ออกซิเดส แอคทิวิตี (peroxidase activity) ซึ่งสามารถใช้สารประกอบประเภทไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เป็นซับสเตรตอย่างจำเพาะ นำไปสู่การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดตและการกำจัดสารพิษจากเซลล์ต่อไป เป็นต้น (Pandey และคณะ, 2017) ในปัจจุบันยังคงมีการค้นพบและจำแนกเอนไซม์ GST ออกเป็นโอไซไซม์ คลาสใหม่เพิ่มเติมขึ้นอีก เช่น ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC6803 มีการค้นพบเอนไซม์ GST ที่มีคุณสมบัติเพอร์ออกซิเดส แอคทิวิตี เหมือนกับใน Theta- และ Alpha-Class แต่กลับมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัสที่ไม่ใกล้เคียงกับยีนกำหนดรหัสของ GST ทั้ง 2 คลาส ดังกล่าว จึงมีการศึกษาอย่างละเอียดและจำแนกว่าเป็น Rho-class GST ซึ่งเป็นคลาสใหม่ (Pandey และคณะ, 2015b) นอกจากนี้ ยังมี GST อีกหลายชนิด โดยเฉพาะที่พบในแบคทีเรีย ที่ค้นพบใหม่ไม่นานมานี้ หรือยังมีการศึกษาไม่ครอบคลุมมากเพียงพอ จึงยังไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจนว่าเป็น GST คลาสใด ระบุได้เพียงว่ามีความใกล้ชิดกับ GST คลาสใดที่มีการศึกษาแล้ว จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการสร้าง phylogenetic tree จำเป็นต้องทำการศึกษาด้านอื่นๆ เพิ่มเติม จึงจะสามารถจัดจำแนกคลาสที่ชัดเจนได้ (Theoharaki และคณะ, 2019) สำหรับการจัดจำแนกคลาสของ GST เบื้องต้น จะเริ่มจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ, การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน โดยการทำให้ blastP เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับ GST คลาสต่างๆ จากสิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกัน ที่เคยมีการศึกษาครอบคลุมเพียงพอจนสามารถจำแนกคลาสที่แน่นอนได้แล้ว (Rivera และ Landa, 2008) จากนั้นนำมาสร้างเป็น phylogenetic tree เพื่อดูความใกล้ชิดกันของสายวิวัฒนาการ (Nebert และ Vasiliou, 2004) ถ้า GST ที่ศึกษามีความใกล้ชิดกับ GST คลาสใดมากในระดับที่อยู่ใน clade เดียวกัน และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (% sequence similarity) มากกว่า 40% ขึ้นไป (Pandey และคณะ, 2017) จึงจะถือได้ว่าเป็นคลาสเดียวกัน ซึ่งก็จะต้องนำไปศึกษาคุณสมบัติเชิงฟังก์ชัน ความจำเพาะต่อซับสเตรต และปฏิสัมพันธ์เชิงภูมิคุ้มกันวิทยาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อใช้ประกอบการจัดจำแนกคลาสที่แน่นอน (Wiktelius และ Stenberg, 2007)

ตารางที่ 1.1 ไอโซไซม์ต่างๆ ของ GST ที่พบได้มากในสิ่งมีชีวิตต่างๆ และชนิดกรดอะมิโนที่ H-site

organism	class	catalytic amino acid residue
mammals	Alpha (A)	Tyr
	Mu (M)	Tyr
	Pi (P)	Tyr
	Sigma (S)	Tyr
	Theta (T)	Ser
	Zeta (Z)	Ser
	Omega (O)	Cys
plants	Theta (T)	Ser
	Zeta (Z)	Ser
	Phi (F)	Ser
	Tau (U)	Ser
	Lambda (L)	Cys
	EF1By	unknown
	DHAR	Cys
	Metaxin	unknown
	TCHQD	unknown
	GSTH	Cys
	Iota (I)	Cys
	GHR	Cys
	mPEGS2	Cys
Ure2p	unknown	
insects	Theta (T)	Ser
	Zeta (Z)	Ser
	Sigma (S)	Tyr
	Delta (D)	Ser
	Epsilon (E)	Ser
	Omega (O)	Cys
bacteria	Theta (T)	Ser
	Beta (B)	Cys
	Chi (X)	unknown
	Zeta (Z)	Ser
	Eta (H)	Arg
fungi	Phi (F)	Ser
	URE2p	unknown
	GTT	unknown
	Omega (O)	Cys
	GTE	unknown
	GHR	unknown
	EFb1	unknown
	MAK16	unknown
	GSTFuA	unknown

(ที่มา: Perperopoulou และคณะ, 2018)

เอนไซม์ GST จะถูกกระตุ้นให้มีการทำงานเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะ oxidative stress หรือ nitrosative stress จากอนุมูลอิสระประเภท ROS หรือ RNS (Uys และคณะ, 2011) โดยเอนไซม์ GST จะทำงานร่วมกับเอนไซม์อีก 3 ชนิดในการกำจัดสารพิษและอนุมูลอิสระในเซลล์ คือ คาตาเลส (catalase), แมงกานีส-ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Mn superoxide dismutase) และ คอปเปอร์-ซิงค์ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Cu-Zn superoxide dismutase) โดยมีการทำงานโดยภาพรวม คือการเร่งปฏิกิริยาให้สารพิษ อนุมูลอิสระ หรือโปรตีนเป้าหมายอื่นๆ สร้างพันธะไดซัลไฟด์ กับหมู่ไรโธล ของ กลูตาไธโอน (Cameron และคณะ, 2010) ซึ่งเป็น nonribosomal thiol-tripeptide ประกอบขึ้นจากกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ กรดกลูตามิก, ซิสเทอีน และ ไกลซีน โดยหมู่ไทโธลที่เกิดพันธะไดซัลไฟด์จะอยู่ที่กรดอะมิโนซิสเทอีน (Pophaly และคณะ, 2017) ให้เกิดเป็นโปรตีนที่คอนจูเกต ซึ่งหากเป็นการคอนจูเกตกับสารอนุมูลอิสระ จะทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ได้ ก่อนจะถูกกำจัดทิ้ง หรืออาจเป็นการคอนจูเกตกับโปรตีนบางชนิดในเซลล์ เพื่อปกป้องโปรตีนจากการทำปฏิกิริยากับสารพิษอื่นก็ได้ (Lyu และคณะ, 2016)



รูปที่ 1.4 การเกิดปฏิกิริยาการคอนจูเกตระหว่างกลูตาไธโอนและโปรตีนเป้าหมาย โดยเอนไซม์ GST (ที่มา: Townsend และ Tew, 2002)

เอนไซม์ GST ในจุลินทรีย์บางชนิด ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งรวมถึง ยาปฏิชีวนะ หรือสาร xenobiotic อื่นๆ ทำให้จุลินทรีย์บางชนิด สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิด ความเครียดจาก xenobiotic ได้ดีมากขึ้น เช่นการที่แบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคน้ำเน่า (bacterial soft rot disease) ในพืชหลายชนิด สามารถทนต่อสารกำจัดวัชพืชอะลาคลอร์ได้ โดยการ แสดงออกของ omega-like GST (Theoharaki และคณะ, 2019) หรืออาจทำให้จุลินทรีย์ดื้อยาปฏิชีวนะได้ จากการที่ GST มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการคอนจูเกตกับกลูตาไธโอน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของยา เช่นการเชื่อมพันธะไดซัลไฟด์กับกลูตาไธโอน หรือการเปิดวงอีพอกไซด์ เป็นต้น และทำให้ยา มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป หรือเป็นพิษต่อจุลินทรีย์น้อยลง ตัวอย่างเช่นการที่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ดื้อต่อยา ปฏิชีวนะฟอสโฟไมซิน และการดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดของแบคทีเรีย *Streptococci sp.*, *Staphylococci sp.* และ *Micrococcus sp.* เป็นต้น (Pugazhendhi และคณะ, 2017) ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้การกำจัด เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ทำได้ยากมากขึ้นตามไปด้วย

แต่ในทางกลับกัน เอนไซม์ GST ที่สร้างจากจุลินทรีย์หลายชนิดมีความเป็นไปได้ และมีศักยภาพที่จะ นำไปใช้ประโยชน์ทางด้านชีวบำบัด, การเกษตร, เทคโนโลยีทางชีวภาพ และการแพทย์ได้ (Perperopoulou และคณะ, 2018) ตัวอย่างเช่น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ด้านการเกษตร โดยใช้ยีน GST โคลนเข้าไปในพืช เพื่อ สร้างพืชตัดต่อพันธุกรรม (transgenic plant) ที่มีคุณสมบัติทนทานต่อความเค็มและแรงดันออสโมติก โดย GST มีบทบาทในการป้องกันเซลล์พืชจากการความเสียหายจากภาวะเครียดจากเกลือและแรงดันออสโมติก (Xu และคณะ, 2015) และด้านเทคโนโลยีและการวิเคราะห์ทางชีวภาพ สามารถนำไปประยุกต์สร้างตัวชี้วัด ทางชีวภาพ หรือ เซนเซอร์ทางชีวภาพ (biosensor) โดยใช้ GST คลาส phi จากหอยแมลงภู่มะกอก (Mytilus coruscus) ซึ่งเป็นหอยที่อาศัยในเขตชายฝั่งทะเลที่มีโรงงานอุตสาหกรรมอยู่มาก หากในแหล่งน้ำมีปริมาณของ เสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และโลหะหนักมาก จะมีการแสดงออกของ GST ดังกล่าวในระดับการถอดรหัส มากขึ้น (Liu และคณะ, 2015) ซึ่งในอนาคตอาจนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อใช้ เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพแหล่งน้ำได้ต่อไป เป็นต้น โดยภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมจะกระตุ้นให้มีการแสดงออก ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้มากขึ้น

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ GST มีความสำคัญอย่างมากต่อปฏิกิริยาและภาวะ โฮมีโอสเตซิสของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง บทบาทในด้านการตอบสนองต่อภาวะเครียดของเซลล์, การป้องกัน เซลล์จากการถูกทำลายโดยสารพิษและอนุมูลอิสระ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน หรือเอนไซม์ บางอย่างในเซลล์ให้เหมาะสมกับภาวะแวดล้อม การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสที่ตอบสนอง ต่อภาวะเครียด และการศึกษาภาวะที่เหนี่ยวนำให้มีระดับการแสดงออกของยีนที่มาก (up-regulation) จึง เป็นแนวทางการศึกษาที่น่าสนใจ โดยเลือกใช้ความเครียดจากความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และ ความเครียดจาก oxidative stress โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารเหนี่ยวนำ ซึ่งภาวะเครียดจากเกลือ ความเข้มข้นสูงและความเครียดจาก oxidative stress เป็นภาวะที่อาจเกิดขึ้นได้ในแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ

ของไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 หลังจากนั้นจะวิเคราะห์การแสดงออกในระดับการถอดรหัส (transcription) ด้วยวิธี semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) หลังจากนั้นใช้วิธีทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน กำหนดรหัส GST ระหว่างเซลล์ภายใต้ภาวะปกติและเซลล์ที่อยู่ในภาวะเครียด โดยคาดการณ์ว่าเมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากเกลือจะมีการแสดงออกของกลุ่มยีนกำหนดรหัส GST บางยีนมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดดังกล่าว

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase จาก เอ็กซ์ทรีโมไฟล์ *Halotheca* sp. PCC7418 และศึกษาภาวะที่ส่งผลให้เกิดการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulation) ของยีนนี้ เพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียด

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และชุดทดสอบสำเร็จ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. โกร่ง (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. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น MMS-3000 บริษัท Biosan (Lativia)
7. เครื่องชั่ง (balance) รุ่น PG2002-5 บริษัท Matler Toledo (Thailand)
8. เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (heat block) บริษัท Bioer technology (China)
9. เครื่องนาโนดรอป (nano-drop) รุ่น NanoDrop 2000 บริษัท Thermo scientific (USA)
10. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (rotary shaker) บริษัท Hercuvan Lab System (USA)
11. เครื่องปั่นตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated microcentrifuge) รุ่น KUBOTA6500 บริษัท Kubota (Japan)
12. เครื่องปั่นตกตะกอนขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น Centrifuge 5418-R บริษัท Eppendorf (Germany)
13. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie®2 บริษัท Scientific Industries (USA)
14. เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (thermal cycler) รุ่น T-100™ บริษัท BIO RAD (USA)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น genesis-20 และ Biomate-35 บริษัท Thermo Scientific (Thailand)
16. เครื่องให้กระแสไฟฟ้าสำหรับการรันเจล (power supply) บริษัท BIO RAD (USA)
17. เครื่องอ่านเจล (imager) รุ่น Gel Doc™ EZ บริษัท BIO RAD (USA)
18. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น ES-215 บริษัท Meditop (Thailand)
19. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Sanyo (Japan)
20. ตู้แช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Haier (China)
21. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (deep freezer) บริษัท Thermo Electron Corporation (USA)
22. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) บริษัท Contherm Scientific Limited (New Zealand)

23. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น Microtech บริษัท LabMicro (Thailand)
24. ทิป (tip) บริษัท Biohit Proline tip (Finland), บริษัท NEPTUNE (Mexico), บริษัท Axygen Scientific (China), บริษัท Rainin (USA)
25. ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette) รุ่น Proline Plus บริษัท Sartorius Biohit (Germany)
26. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) บริษัท Sarstedt (Germany)
27. หลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติก (microcentrifuge tube) บริษัท Corning (Germany)
28. หลอด PCR (PCR tubes) บริษัท BIO RAD (USA)

2.2 เคมีภัณฑ์

1. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) บริษัท Ensure (Germany)
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (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. ไทรโซลรีเอเจนต์ (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; $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)
บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)
23. ไดเอทิลไดไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate; DEPC) บริษัท Amresco (USA)
24. ผงอะกาโรส (Agarose) บริษัท QP products (USA)
25. ดีเอ็นเอ ไพรมเมอร์ (DNA primer) บริษัท Macrogen (Korea)
26. มาร์กเกอร์ (VC 1 kb DNA ladder) บริษัท Vivantis 9 (Malaysia)
27. มาร์กเกอร์ (Dyna Marker DNA low D) บริษัท BioDynamics Laboratory (USA)
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)
31. 30% ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) บริษัท Merck Ag Dramstadt (Germany)

2.3 ชุดทดสอบสำเร็จ

1. ชุดสำเร็จ SuperScript[®] III First-strand บริษัท Invergen (USA)
2. ชุดสำเร็จ iScript[™] บริษัท BIO RAD (USA)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ Glutathione S-transferase (GST) ใน *Halothece* sp. PCC7418

ไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษามีข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล โดยเลือกใช้ฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes: KEGG (<https://www.kegg.jp>), UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), SIB ExPaSy (<https://www.expasy.org>) และ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เป็นฐานข้อมูลหลัก ทำการสืบค้นและเลือกยีนกำหนดรหัส ทั้งหมด 5 ยีน แบ่งเป็นยีนกำหนดรหัส Glutathione S-transferase 4 ยีน ได้แก่ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 ส่วน PCC7418_2276 เป็นยีนกำหนดรหัส gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) / glutathione hydrolase ซึ่งแม้ไม่ใช่ยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ GST โดยตรงแต่อาจมีความเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน จึงเลือกยีนดังกล่าวมาศึกษาด้วย

3.1.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 จากฐานข้อมูล Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes (KEGG) จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 5 ยีน และถูกใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ต่อไป

3.1.2 การหา Gene Ontology (GO) function ของ GST และ GGT/glutathione hydrolase

หา GO function ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 โดยสืบค้นจาก Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) เพื่อทำนายการทำงานของ GST ทั้ง 4 ยีน

3.1.3 การจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence alignment)

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ GST และ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 กับ GST ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยการทำการ protein blast โดยใช้ชุดคำสั่ง BLASTp ในฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) แล้วเลือกลำดับกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกับ GST หรือ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 มากที่สุด 15 ลำดับแรกและ GST จากสิ่งมีชีวิตที่เลือกให้เป็น outgroup ไปจัดเรียงเทียบ โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (<https://www.megasoftware.net>) ซึ่งมีขั้นตอนโดยละเอียด ดังนี้

- คัดลอกลำดับกรดอะมิโนของ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 จากฐานข้อมูล KEGG
- เข้าเว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เลือกคำสั่ง protein blast
- ใส่ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนลงในช่อง Enter Query Sequence แล้วกด blast
- ระบบจะทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลใน ncbi และแสดงสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีลำดับกรดอะมิโนของ GST ใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนที่นำมาเปรียบเทียบ
- เลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีค่า identity สูงที่สุด 15 ลำดับแรก และสิ่งมีชีวิตที่ใช้เป็น outgroup บันทึกข้อมูลเป็นไฟล์ .fasta
- เปิดไฟล์ข้อมูล .fasta ด้วยโปรแกรม MEGA7 หรือกรณีที่ระบบคอมพิวเตอร์ไม่สามารถอ่านไฟล์ .fasta ได้ ให้คัดลอกข้อมูลมาวางลงในช่อง sequence ของโปรแกรม
- เลือกข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด จากนั้น เลือกคำสั่ง alignment และ align by MUSCLE
- บันทึกข้อมูลเป็นไฟล์ .mas หรือ .masx

3.1.4 การสร้าง Phylogenetic tree

นำข้อมูลการทำ alignment ที่ได้จากข้อ 3.1.4 มาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (<https://www.megasoftware.net>) ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ-method) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 ซึ่งมีขั้นตอนโดยละเอียด ดังนี้

- เข้าโปรแกรม MEGA7 เลือกคำสั่ง phylogenetic tree และ construct/test Neighbor-Joining trees แล้วเปิดไฟล์ .mas ที่บันทึกไว้ขึ้นมา
- ปรับค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในหน้าต่างที่ปรากฏ ดังนี้

Test of Phylogeny:	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications:	500
Substitutions Type:	Amino acid
Model/Method:	Poisson model
Rates among Sites:	Uniform rates
Gaps/Missing Data Treatment:	Complete deletion
- กด compute จะได้แผนภาพ phylogenetic tree ออกมา

3.2 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เลือกจากฐานข้อมูล KEGG มาออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Perl Primer (<http://www.perlprimer.sourceforge.net>) โดยกำหนดความยาว 15 คู่เบส 1 ชุด และ 20 คู่เบส 1 ชุดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ต่างกัน กำหนดอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) เท่ากับ 50-60 องศาเซลเซียส และ amplicon size ความยาวประมาณ 300 คู่เบส พิจารณาเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เข้าจับ ยีนตำแหน่งที่ไม่อยู่ปลายด้านใดด้านหนึ่งมากเกินไป และมีค่า Tm ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อใช้สังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ในภาวะปกติ

3.3.1 อาหารและภาวะในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418

ในการเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 จะเลี้ยงในอาหาร Blue Green medium (BG11) + Turk Solution (Waditee-Sirisattha และคณะ, 2014) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 950-1,000 lux จากหลอดฟลูออเรสเซนต์แสงขาวตลอดเวลา บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) จากนั้นติดตามการเจริญของเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418

3.3.2 การติดตามการเจริญของ *Halotheca* sp. PCC7418

ติดตามการเจริญของเชื้อโดยแบ่งสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปใส่ในคิวเวตต์ ปริมาตร 1-1.5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (OD_{730}) ซึ่งเป็นการวัดความหนาแน่นของเซลล์ โดยใช้อาหาร BG-11 + Turk solution เป็น blank เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงในช่วง 0.8-1.0 จึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ต่อไป

3.4 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียด (stress treatment)

3.4.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์ เพื่อเปลี่ยนจากการเพาะเลี้ยงในภาวะปกติ เป็นภาวะเครียด

เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยการเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยแบ่งเซลล์ตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นเซลล์ส่วนที่ไม่ได้ รับความเครียด (ชุดควบคุม) แบ่งให้น้ำหนักเปียกประมาณ 30-50 มิลลิกรัม และส่วนที่สองจะเลี้ยง ในภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด สำหรับตัวอย่างส่วนที่ไม่ได้รับความเครียด หลังจากปั่นเหวี่ยงเซลล์ แล้วแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเซลล์

ออกจากตะกอนเซลล์ แล้วเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างส่วนที่จะได้รับความเครียดจะถูกเลี้ยงในอาหารที่สร้างภาวะเครียดให้กับเซลล์ต่อไป

3.4.2 การศึกษาเบื้องต้น เกี่ยวกับการหยุดของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress

ทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร BG-11 + Turk solution 0.5M NaCl ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20 และ 40 mM เลี้ยงภายใต้ภาวะมีแสง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 110 rpm แล้ววัดค่า OD_{730} ด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี เพื่อติดตามเซลล์ที่อยู่รอด และการสร้างรงควัตถุหลัก ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ (ติดตามจากค่า OD_{665}) และรงควัตถุช่วย ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (ติดตามจากค่า OD_{620}), อัลโลไฟโคไซยานิน (ติดตามจากค่า OD_{565}), และ ไฟโคอีริทริน (ติดตามจากค่า OD_{650}) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นครึ่งหนึ่งของค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงสุดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์เกิดความเครียดมากแต่ยังมีเซลล์ที่ปรับตัวเหลือรอดอยู่ในภาวะดังกล่าวได้ โดยค่า IC_{50} นี้จะถูกทำไปใช้เป็นความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้ในการทดลองการแสดงออกของยีน *GST* ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress ต่อไป

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

นำเซลล์จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.4.1 มาเลี้ยงในอาหาร BG11+Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่าง ทุก 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ให้หมด แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัด RNA, เปลี่ยนเป็น cDNA และทำ RT-PCR ในขั้นตอนถัดไป

3.4.4 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative Stress

นำเซลล์จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.4.1 แบ่งเป็น 4 ชุด ทุกชุดเลี้ยงในอาหาร BG11+Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างกันในแต่ละชุดทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า IC_{50} , เท่ากับค่า IC_{50} และ $IC_{50}+0.9$ มิลลิโมลาร์ ร่วมกับชุดควบคุมที่ไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 6 และ 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่ออาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ให้หมด แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัด RNA, เปลี่ยนเป็น cDNA และทำ RT-PCR ในขั้นตอนถัดไป

3.4.5 การเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ร่วมกับ oxidative stress

นำเซลล์จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.4.1 แบ่งเป็น 4 ชุด ทุกชุดเลี้ยงในอาหาร BG11+Turk solution ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ แต่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างกันในแต่ละชุดทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นเท่ากับครึ่งหนึ่งของค่า IC_{50} , เท่ากับค่า IC_{50} และ $IC_{50}+0.9$ มิลลิโมลาร์ ร่วมกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เลี้ยงภายใต้แสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่ออาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากตะกอนเซลล์ให้หมด แล้วเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้สกัด RNA, เปลี่ยนเป็น cDNA และทำ RT-PCR ในขั้นตอนถัดไป

3.4.6 การศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Halotheca* sp. PCC7418

แบ่งตัวอย่างเซลล์มาจากชุดทดลองที่ทำการเลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ, ภาวะเครียดจากเกลือ และภาวะเครียดจาก oxidative stress มาศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus model BX51, Japan) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.5 การสกัด total RNA และการเปลี่ยนเป็น cDNA

3.5.1 การสกัด total RNA

นำเซลล์ที่เก็บได้จากภาวะที่ใช้ทดลอง ในขั้นตอนที่ 3.4.3-3.4.5 (ชุดทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ, oxidative stress และภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับ oxidative stress) มาสกัด total RNA ด้วยสารละลาย TRIzol[®] reagent (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต โดยมีรายละเอียดคือ เริ่มจากเติม TRIzol[®] reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับเซลล์ *Halotheca* sp. PCC7418 ที่มีน้ำหนักเปียก 30-50 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงในโกรงที่เย็นจัดและบดเซลล์ให้เซลล์แตก จะสังเกตได้จากเซลล์จะมีลักษณะเป็นผง รอให้เซลล์ละลาย แล้วดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้ตัวกลางที่ใช้ในการสกัดเกิดการแยกชั้น จากนั้นดูดส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสออก จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูด 70% เอทานอล ออกให้ได้มากที่สุด แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยการคว่ำหลอดไว้ประมาณ 20 นาที แต่ไม่แห้งมากจนเกินไป จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำที่

ปราศจาก RNase หรือน้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

แบ่งสารละลาย RNA ที่ได้บางส่วนไปตรวจสอบความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องนาโนทรอป 200 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเก็บ RNA ที่เหลือสำหรับเปลี่ยนเป็น cDNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

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

3.5.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA

เจือจาง RNA ที่สกัดได้ด้วยน้ำ DEPC ให้มีความเข้มข้น 500 ng/μl เท่ากันทุกชุดทดลอง จากนั้นใช้ชุดสำเร็จเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้เป็น cDNA ตามวิธีการที่ชุดสำเร็จแนะนำ โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript® III First-strand (Invitrogen, USA) หรือชุดสำเร็จ iScript™ (BIO RAD, USA)

สำหรับชุดสำเร็จ SuperScript® III First-strand จะใช้ RNA ตั้งต้นปฏิกิริยา 2,500 นาโนกรัม ซึ่งชุดสำเร็จมีองค์ประกอบหลักในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ Random hexamer, 10mM dNTP, น้ำปราศจาก RNase (treated DEPC water), 10X RT-buffer, 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, RNase OUT, Super Script III® Reverse Transcriptase และ RNase H ส่วนชุดสำเร็จ iScript™ โดยใช้ RNA ตั้งต้นปฏิกิริยา 5,000 นาโนกรัม ซึ่งชุดสำเร็จจะมีองค์ประกอบหลักในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ น้ำปราศจาก RNase (treated DEPC water) และ 5X iScript™ RT supermix

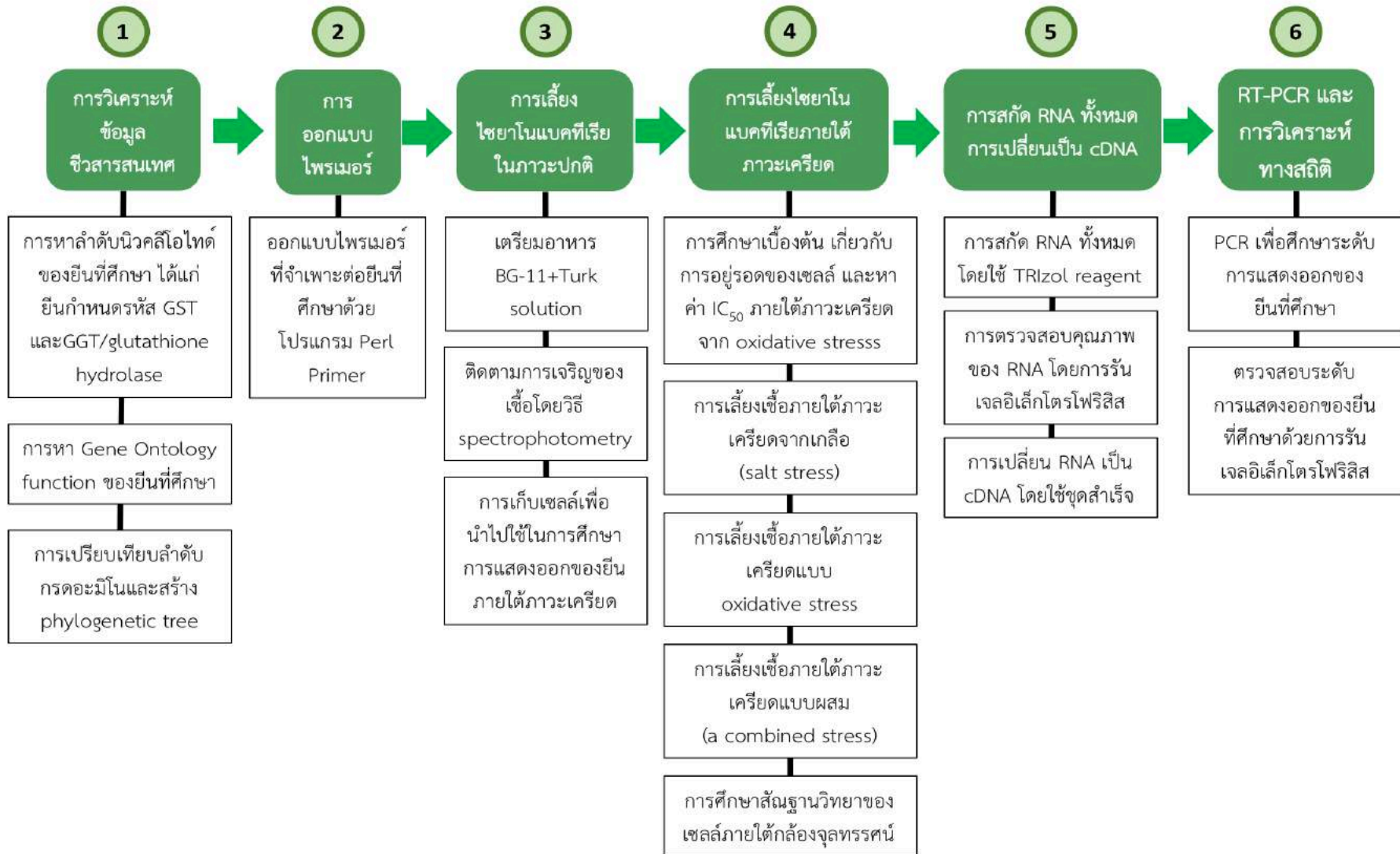
3.6 Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ GST ใน *Halothece sp. PCC7418*

นำ cDNA มาเพิ่มจำนวนโดยการ PCR มีขั้นตอน ได้แก่ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยการ annealing ให้ primer จับกับ DNA แม่แบบ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และการ extension เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ที่อุณหภูมิ 72 องศา

เซลเซียส, 30 วินาที ทำ 3 ขั้นตอนนี้ซ้ำ เป็นจำนวนประมาณ 25-30 รอบ และขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยจำนวนรอบและ annealing temperature ในการทำอาจแตกต่างกันในแต่ละยีน ตามความเหมาะสมและผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ สำหรับการทดลองนี้ใช้ *AprmpB* เป็นยีนควบคุมภายใน

จากนั้น ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มารันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส โดยใช้ agarose gel 1.2% (w/v) ผสมกับบัฟเฟอร์ 1X TAE และสีย้อมเจล SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invengen, USA) และใช้ marker เพื่อเทียบขนาดของ DNA คือ Dyna Marker DNA low D (BioDynamics Laboratory, USA) หรือ VC 1 kb (Vivantis, USA) โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า กำหนดให้กระแสไฟฟ้ามีค่าคงที่เท่ากับ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel doc[™] EZ อ่านผลและเปรียบเทียบความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab และคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS V22 (<http://www.it.chula.ac.th/th/spss-v22>)

ภาพที่ 3.1 แผนผังการดำเนินการทดลอง



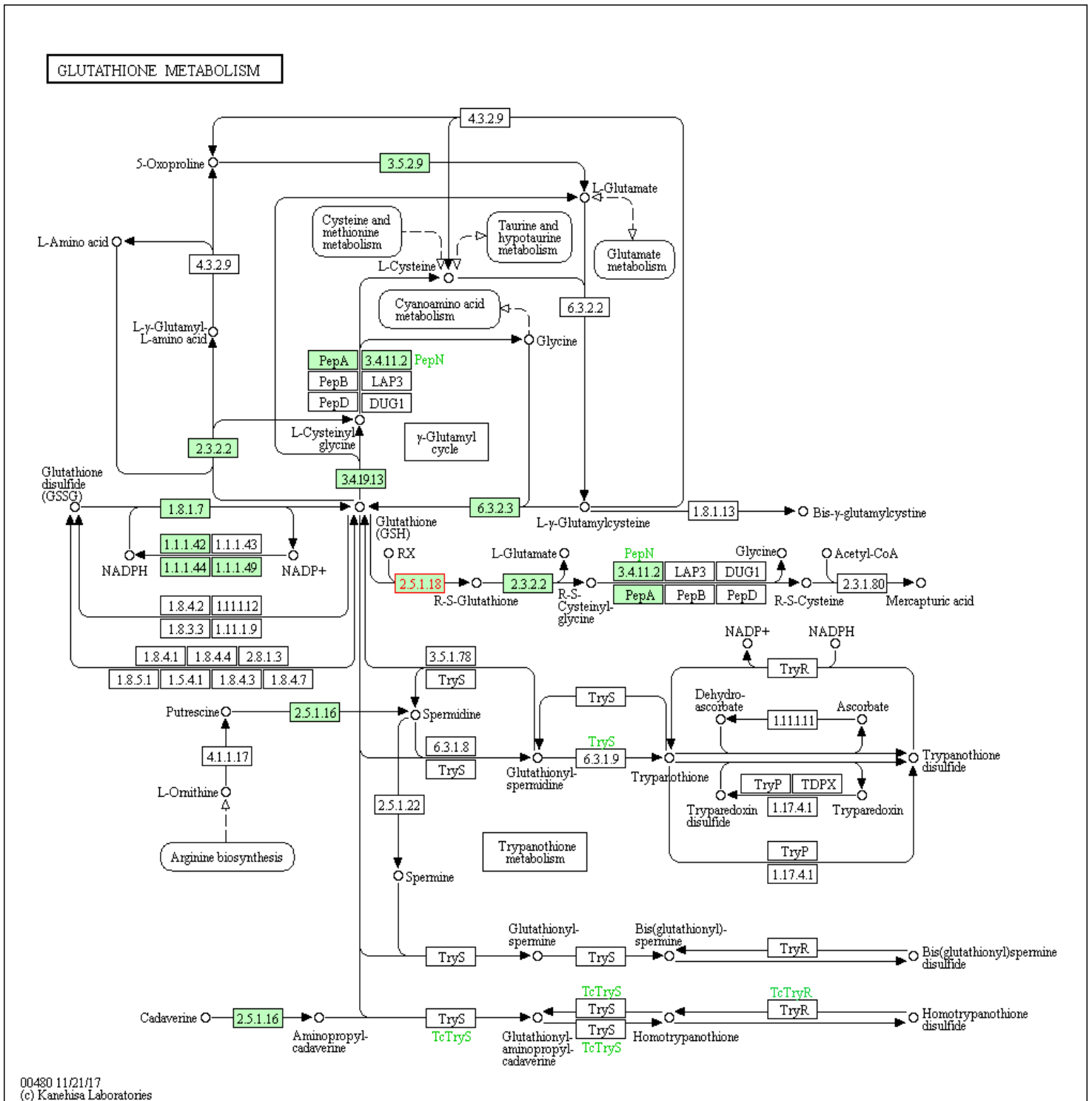
บทที่ 4

ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศของ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418

GST (EC 2.5.1.18) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานเฟอร์ส ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีความหลากหลายมากโดยเฉพาะ GST ที่พบในไซโทพลาสซึม ซึ่งสามารถถูกจำแนกออกเป็นไอโซไซม์ หรือคลาสย่อยได้หลายคลาส ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26-30 กิโลดาลตัน มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน (glutathione metabolism pathway) โดยจะทำหน้าที่หลักในการเร่งปฏิกิริยาการคอนจูเกต ระหว่างกลูตาไธโอน กับสารประกอบที่เป็นพิษ, อนุมูลอิสระ หรือโปรตีนเป้าหมายอื่นๆ รวมทั้งเป็นกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่ง ที่ใช้ในการตอบสนองต่อภาวะเครียดของเซลล์ โดยนอกจากการกำจัดสารพิษแล้ว GST ยังมีบทบาทอื่นๆ เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลภายในเซลล์, การขนส่งลำเลียงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ และการควบคุมการแสดงออกของเมแทบอลิซึม ภายใต้ภาวะต่างๆ อีกด้วย (Theoharaki และคณะ, 2019)

ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งมีข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ในฐานข้อมูล KEGG พบยีนกำหนดรหัส GST ทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 ซึ่งทั้ง 4 ยีนนี้ มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ และจำนวนกรดอะมิโนแตกต่างกัน นอกจากนั้น เมื่อทำการศึกษาแผนผังวิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน พบว่ายังมียีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีดังกล่าวที่น่าสนใจอีกหนึ่งยีน คือยีน PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัสเอนไซม์ gamma glutamyltranspeptidase (GGT) / glutathione hydrolase (EC 3.4.19.13 / 2.3.2.2) ซึ่งแม้ไม่ใช่ยีนกำหนดรหัส GST โดยตรง แต่ก็มีมีความเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน โดยหลังจากการเร่งปฏิกิริยาคอนจูเกชันของ GST แล้ว เอนไซม์ GGT / glutathione hydrolase สามารถตัดหมู่ L-glutamate ออกจากโครงสร้างของกลูตาไธโอนในผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการคอนจูเกตได้ ซึ่งส่วนที่เหลือสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดเมอร์แคปตริก (mercapturic acid) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำลงและสามารถถูกขับออกจากเซลล์ หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ (Hinchman และ Ballatori, 1994) ดังที่แสดงในแผนภาพวิถีเมแทบอลิซึม (ภาพที่ 4.1) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทำการศึกษาทั้งหมด 5 ยีนนี้จะแสดงในภาคผนวก ข. และมีรายละเอียดของแต่ละยีนดังแสดงในตารางที่ 4.1 ส่วนการค้นหาคำแหน่งที่ตั้งของยีนในฐานข้อมูลของทั้ง 5 ยีน แสดงในภาคผนวก ง.



ภาพที่ 4.1 วิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ศึกษา ได้แก่ GST (EC 2.5.1.18) และ GGT / glutathione hydrolase (EC 3.4.19.13 / 2.3.2.2) จากฐานข้อมูล KEGG

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ชีวสารสนเทศของ GST และ GGT / glutathione hydrolase

หมายเลขยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล KEGG	PCC7418_0647	PCC7418_0729	PCC7418_1478	PCC7418_2276	PCC7418_3557
หมายเลขโปรตีนที่ปรากฏในฐานข้อมูล UniProt	K9Y8X8	K9Y7Y6	K9YB35	K9YEA3	K9YGQ3
ชื่อเอนไซม์	Glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase	gamma-glutamyltranspeptidase / Glutathione hydrolase	Glutathione S-transferase
หมายเลข EC	2.5.1.18	2.5.1.18	2.5.1.18	3.4.19.13 / 2.3.2.2	2.5.1.18
วิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้อง	Glutathione Metabolism	Glutathione Metabolism	Glutathione Metabolism	Glutathione Metabolism	Glutathione Metabolism
ชนิดการเร่งปฏิกิริยา (catalytic class)	Transferase	Transferase	Transferase	Transpeptidase / Hydrolase	Transferase
จำนวนนิวคลีโอไทด์ (bp)	552	1200	561	1605	801
จำนวนกรดอะมิโน (residue)	183	399	186	534	266
มวลโมเลกุล ที่คำนวณได้ทางทฤษฎี (Da)	20,860.92	46,344.24	21,579.78	59,205.23	29,464.63
ค่า pI ที่คำนวณได้ทางทฤษฎี	5.05	5.48	5.44	5.70	4.60
กรดอะมิโนด้านปลาย N	80	82	78	-	78
กรดอะมิโนด้านปลาย C	102	-	103	-	-

การทำ GO function ของ GST และ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 เพื่อทำนายฟังก์ชันการทำงานของ GST และ GGT/glutathione hydrolase รวมทั้งหมด 5 ยีน จากการใช้ฐานข้อมูล UniProt จะสามารถแบ่ง GO function ได้เป็น 3 หมวดหมู่ ได้แก่ (1) ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function) ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะกิจกรรมเฉพาะ โดยการเปลี่ยนแปลงทางเคมี, (2) กระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง (biological process) และ (3) องค์ประกอบระดับเซลล์ (subcellular component) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ GO function ของ GST และ GGT/hydrolase ใน *Halothece* sp. PCC7418

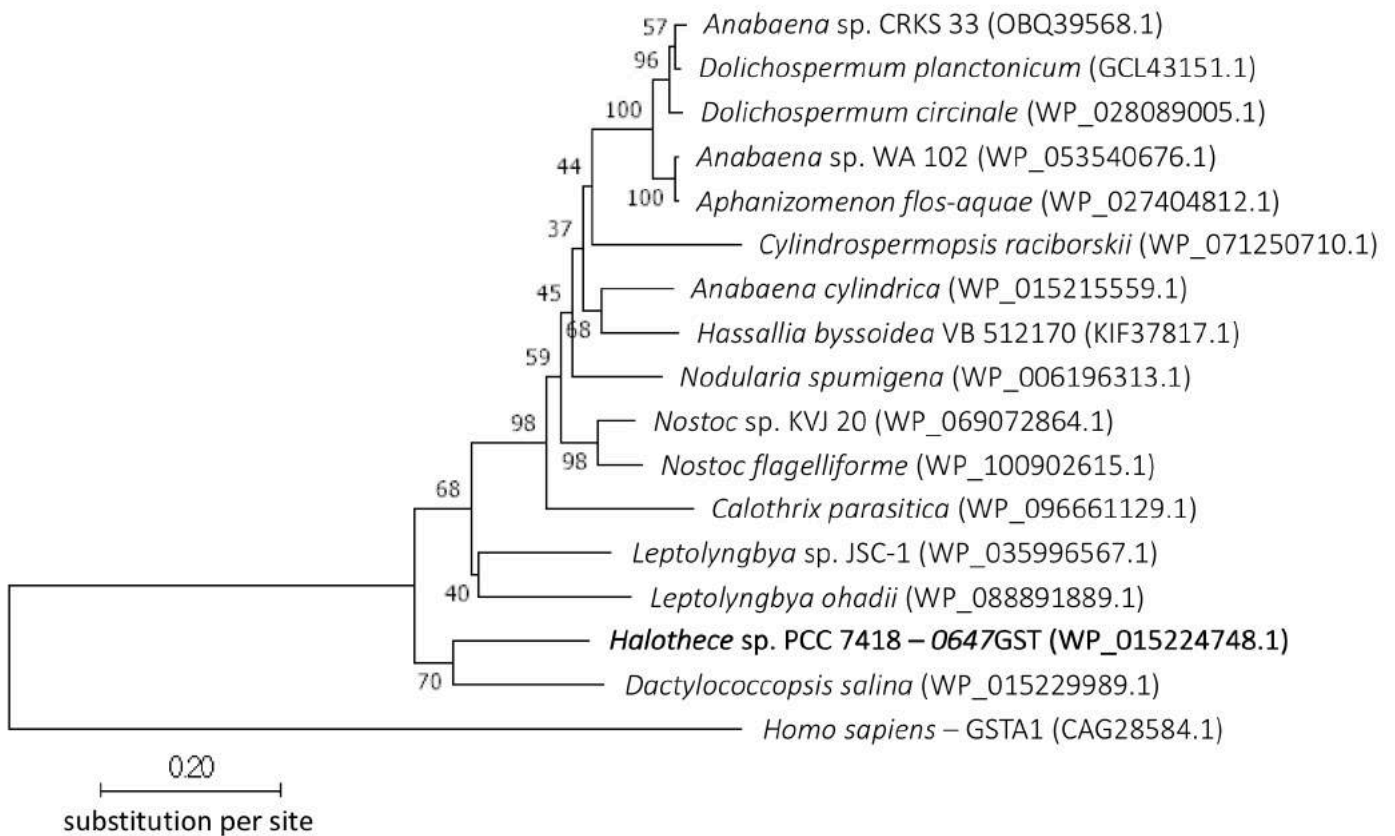
ชื่อยีน	GO function		
	ฟังก์ชันระดับโมเลกุล (molecular function)	กระบวนการทางชีวภาพ ที่เกี่ยวข้อง (biological process)	องค์ประกอบระดับเซลล์ (subcellular component)
PCC7418_0647	- transferase activity (glutathione transferase)	ไม่พบข้อมูล ในฐานข้อมูล	ไม่เกี่ยวข้องกับ องค์ประกอบระดับเซลล์
PCC7418_0729			
PCC7418_1478			
PCC7418_3557			
PCC7418_2276	- leukotriene C4 gamma-glutamyl transferase activity - hypoglycin A gamma-glutamyl transpeptidase activity - transferase activity (transferring acyl groups)		

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ GST และ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC7418 กับ GST ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยการทำ protein blast เทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า GST ที่ถูกกำหนดรหัสและแปลรหัสจากยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 มีความใกล้เคียงกับ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *Dactylococcopsis salina* มากที่สุด โดยมี %identity มากกว่า 70-80% แต่ GST ที่แปลรหัสจากยีน PCC7418_1478 มีความใกล้เคียงกับ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *Pleurocapsa* sp. PCC7319 มากที่สุด โดยมี %identity เท่ากับ 64.5% ส่วน GGT/glutathione hydrolase มีความใกล้เคียงกับไซยาโนแบคทีเรีย *Euhalothece* sp. KZN001 มากที่สุด โดยมี %identity เท่ากับ 78.5%

นอกจากนี้ การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ยังให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่า GST ที่แสดงออกจากยีนทั้ง 4 ยีนใน *Halotheca* sp. PCC7418 เป็น GST ในกลุ่ม GST-A superfamily ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418 อาจมีความใกล้ชิด หรือความใกล้เคียงเชิงโครงสร้างกับ GST คลาส alpha ซึ่งเป็น GST ที่พบได้มากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมนุษย์ แต่พบได้ไม่บ่อยในแบคทีเรีย (Perperopoulou และคณะ, 2018)

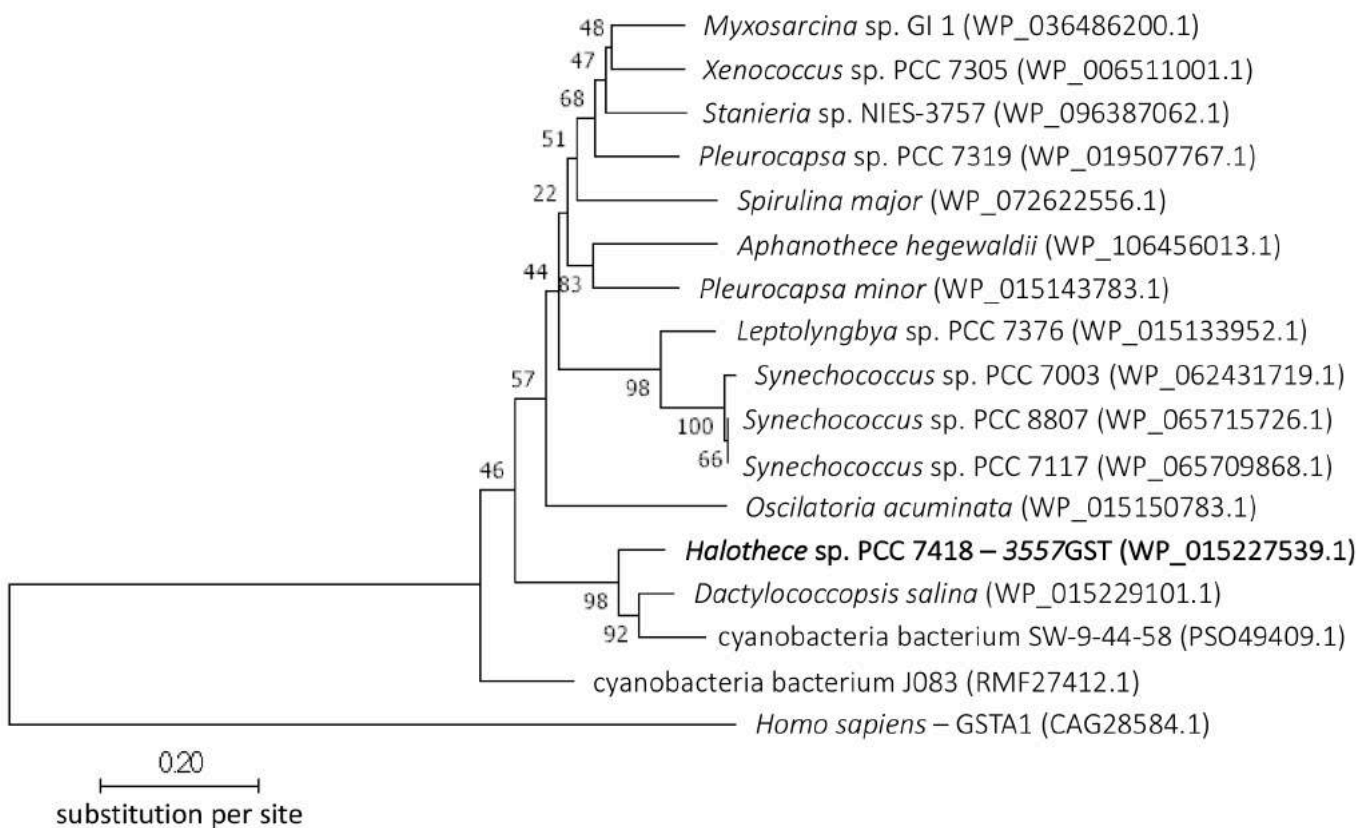
จากนั้น ได้เลือกออร์โธลอก (ortholog) กับ GST หรือ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 มากที่สุด 15 ลำดับแรก และจากสิ่งมีชีวิตที่เลือกให้เป็น outgroup ไปจัดเรียงเทียบ สำหรับการวิเคราะห์ยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 4 ยีน จะใช้ลำดับกรดอะมิโนของ GSTA-1 ที่พบในมนุษย์ เป็น outgroup ในการจัดเรียงเทียบและสร้าง phylogenetic tree ในขณะที่การวิเคราะห์ยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase จะใช้ GGT จาก *Escherichia coli* ATCC8739 เป็น outgroup ในการจัดเรียงเทียบ และสร้าง phylogenetic tree ซึ่งผลการจัดเรียงเทียบ ด้วยวิธี MUSCLE ทั้ง 5 ชุดการวิเคราะห์พบว่า มีทั้งลำดับกรดอะมิโนทั้งส่วนที่ตรงกันในทุกตัวแทนสิ่งมีชีวิตที่เลือกมาวิเคราะห์ ลำดับกรดอะมิโนที่ต่างชนิดกัน แต่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน และลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทั้งชนิดและคุณสมบัติ

จากการนำข้อมูลที่ได้จากการจัดเรียงเทียบ ไปสร้างเป็น phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ-method) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 พบว่า PCC7418_0647 มีความใกล้ชิดกับ GST จาก *Dactylococcopsis salina* มากที่สุดในระดับที่อยู่ใน clade เดียวกัน ส่วนกรดอะมิโนจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ พบว่ามีความใกล้ชิดกันน้อยลงตามลำดับ และมีความใกล้ชิดกับ GSTA-1 ในมนุษย์ซึ่งเป็น outgroup น้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.2 เช่นเดียวกับ PCC7418_3557 ที่มีความใกล้ชิดกับทั้ง GST จาก *D. salina* และ unclassified cyanobacterium SW-9-44-58 มากเช่นกัน และมีความใกล้ชิดกับ GSTA-1 ในมนุษย์ซึ่งเป็น outgroup น้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ส่วน GST ที่ได้จากการแสดงออกของยีน PCC7418_0729 แม้จะมีความใกล้ชิดกับ *D. salina* และ *Euhalotheca* sp. KZN001 แต่อยู่กันคนละกิ่งของแผนภาพการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า PCC7418_0729 นี้ อาจมีความแตกต่างเชิงวิวัฒนาการออกไปบ้าง ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ในขณะที่ PCC7418_1478 มีความแตกต่างกับ GST ทั้งสามชนิดก่อนหน้านี้ เพราะมีความใกล้ชิดกับ unclassified cyanobacterium SW-9-44-58 มาก แต่ไม่มีความใกล้ชิดกับ *D. salina* ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และ GGT/ glutathione hydrolase (PCC7418_2276) พบว่ามีความใกล้ชิดกับ *Euhalotheca* sp. KZN001 มาก และมีความใกล้ชิดกับ GGT ในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็น outgroup น้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งทั้ง *D. salina* และ *Euhalotheca* sp. ต่างก็ถูกจัดว่าเป็น halophilic cyanobacteria เช่นเดียวกับ *Halotheca* sp. PCC7418



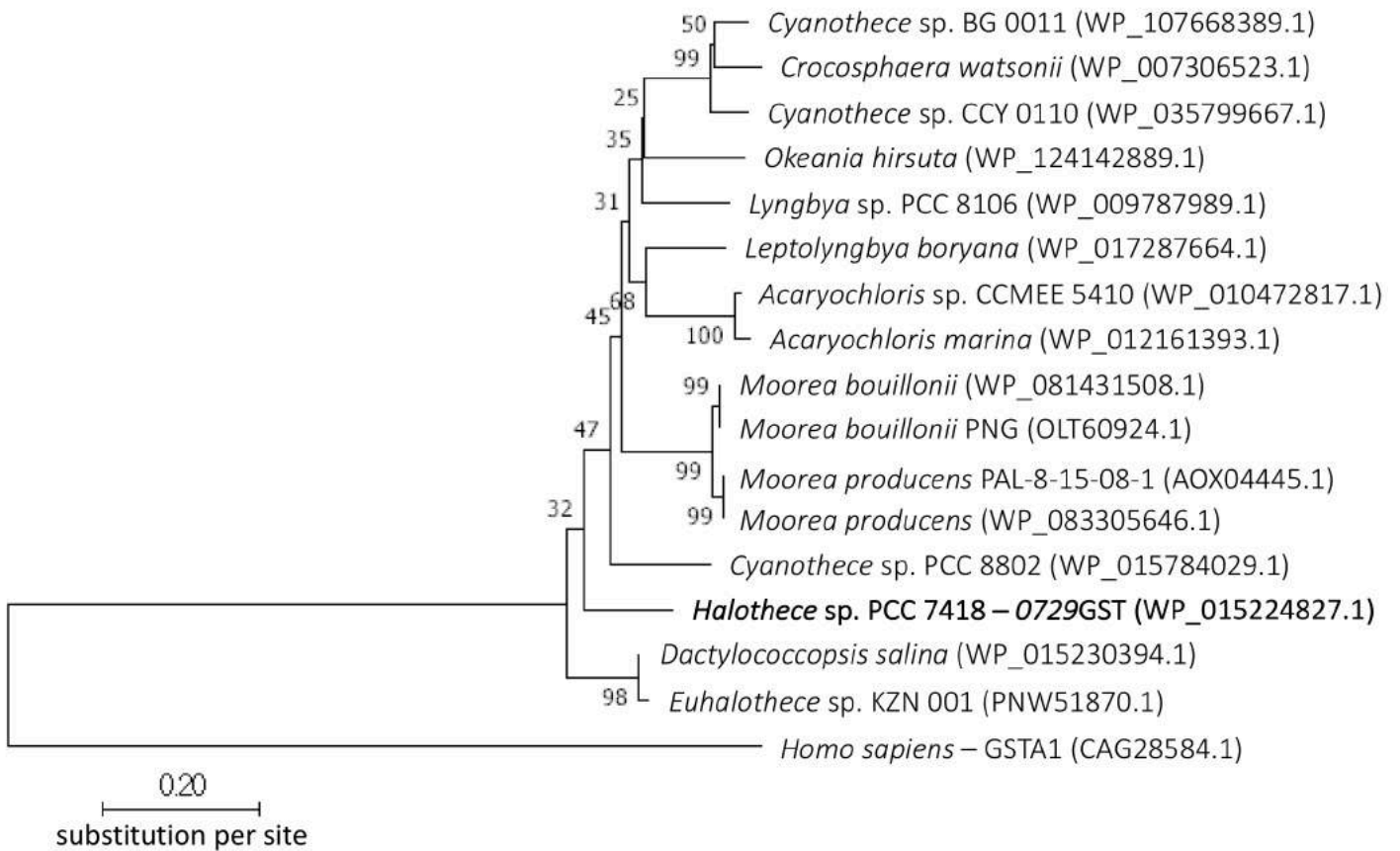
ภาพที่ 4.2 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากจากยีน PCC7418_0647

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและสร้างแผนภาพด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA7) โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (แสดงในเครื่องหมายวงเล็บ)



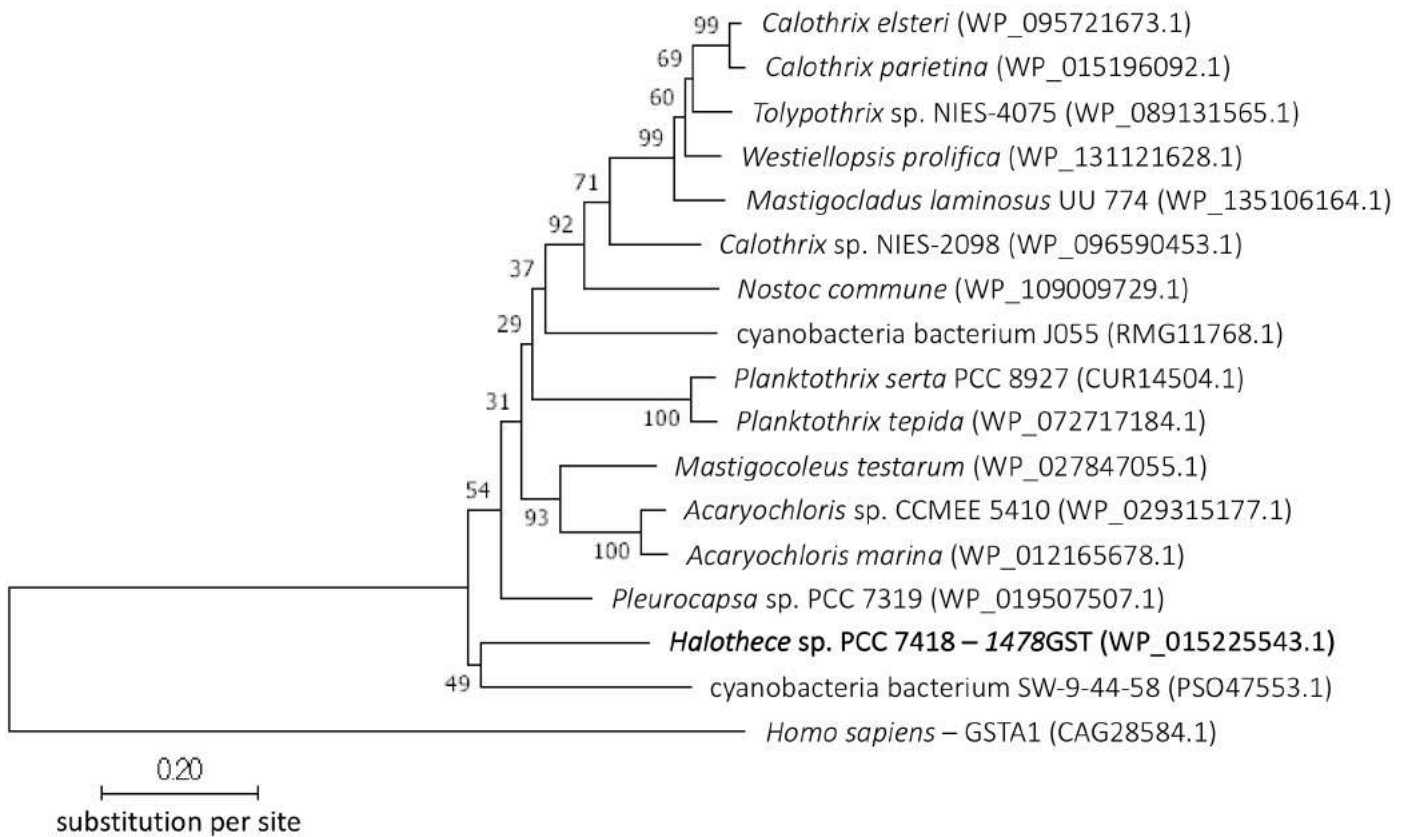
ภาพที่ 4.3 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากยีน PCC7418_3557

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและสร้างแผนภาพด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA7) โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (แสดงในเครื่องหมายวงเล็บ)



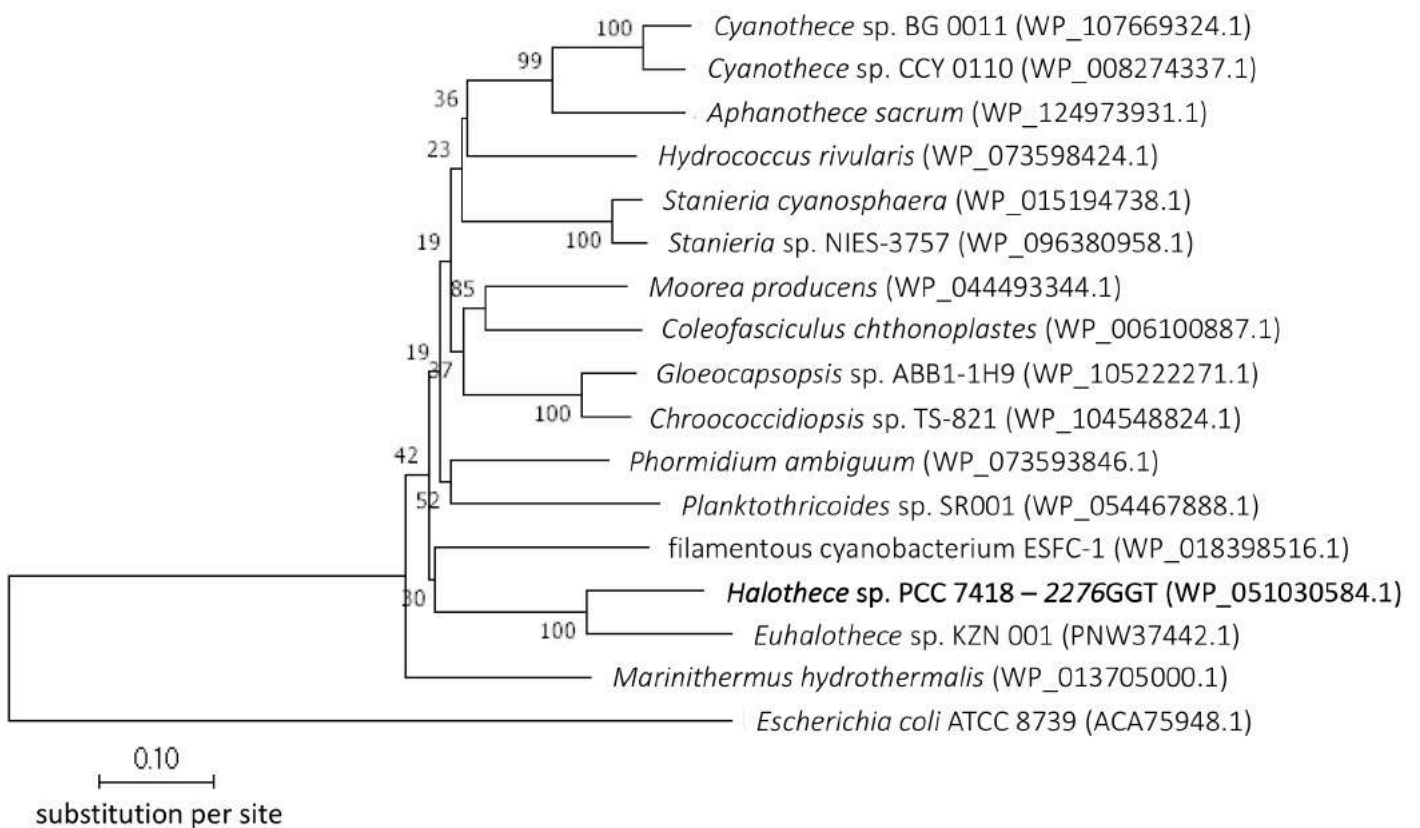
ภาพที่ 4.4 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากยีน PCC7418_0729

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและสร้างแผนภาพด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA7) โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (แสดงในเครื่องหมายวงเล็บ)



ภาพที่ 4.5 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากยีน PCC7418_1478

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและสร้างแผนภาพด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA7) โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (แสดงในเครื่องหมายวงเล็บ)



ภาพที่ 4.6 แผนภาพ phylogenetic tree ของ GST ที่ถอดรหัสจากยีน PCC7418_2276

วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและสร้างแผนภาพด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA7) โดยวิธี Neighbor Joining (NJ) และกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 500 replicates แสดงร่วมกับ accession number ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (แสดงในเครื่องหมายวงเล็บ)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมสมบูรณ์ด้วยฐานข้อมูล NCBI พบว่า GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ GSTA superfamily เมื่อวิเคราะห์ลำดับสายวิวัฒนาการจาก phylogenetic tree จะเห็นได้ว่า GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 ที่แสดงออกจากยีนกำหนดรหัส 3 จาก 4 ยีนมีความใกล้เคียงกับ GST ในไซยาโนแบคทีเรีย *D. salina* ซึ่งจากการเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล NCBI ก็พบว่าเป็น GSTA superfamily เช่นเดียวกัน แต่ว่าทั้งคู่ไม่มีความใกล้เคียงของสายวิวัฒนาการกับ GSTA-1 ในมนุษย์เลย ซึ่งอาจสรุปได้ว่า GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 แม้จะอยู่ในซูเปอร์แฟมิลีเดียวกันกับ GSTA-1 ในมนุษย์ แต่ไม่มีความใกล้เคียงกันของสายวิวัฒนาการ รวมทั้งโครงสร้างระดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ก็อาจมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ GST ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ มีความหลากหลายสูงมาก และหากจะจัดจำแนกคลาส GST ใน *Halothece* sp. PCC7418 จำเป็นต้องพิจารณาถึงองค์ประกอบอื่นๆ เพิ่มเติม รวมถึงการศึกษาลักษณะเชิงสมบัติของเอนไซม์ เพราะมีความเป็นไปได้ว่า GST ดังกล่าวอาจไม่ใช่ GST คลาส Alpha ที่ตรงกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เป็น uncharacterized class ที่คล้ายกับคลาส Alpha เท่านั้น

4.2 การออกแบบไพรเมอร์

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ทั้ง 5 ยีน ที่เลือกจากฐานข้อมูล KEGG มาออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Perl Primer โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ไปสังเคราะห์สำหรับการทดลองถัดไป ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4.3 และระบายด้วยแถบสีเทาในภาคผนวก ข.

ตารางที่ 4.3 ไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ใน *Halotheca* sp. PCC7418

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาดแอมพลิคอน (bp)
RT-PCC7418_0647-Forward_I	5' – AATTTGTTGAACTGG – 3'	15	37.9	300
RT-PCC7418_0647-Reverse_I	5' – CGATCATTTAACCCA– 3'	15	40.7	300
RT-PCC7418_0729-Forward_I	5' – GCGCTACAACAAACC– 3'	15	46.1	300
RT-PCC7418_0729-Reverse_I	5' – TGGATCAGGGACCTT– 3'	15	46.1	300
RT-PCC7418_1478-Forward_I	5' – GAACTGGAAATTTCC– 3'	15	40.7	300
RT-PCC7418_1478-Reverse_I	5' – TCTCTGACAAATGAG– 3'	15	40.7	300
RT-PCC7418_2276-Forward_I	5' – CAAACAACACCAACC– 3'	15	43.4	300
RT-PCC7418_2276-Reverse_I	5' – CGCCAAGTATTAGT– 3'	15	43.4	300
RT-PCC7418_3557-Forward_I	5' – TATTTGGAACGCACC– 3'	15	43.4	300
RT-PCC7418_3557-Reverse_I	5' – GCCTCAAGCAAGATT– 3'	15	43.4	300
RT-PCC7418_0647-Forward_II	5' – GCGATTGAAGATAATGGCT– 3'	19	53.0	300
RT-PCC7418_0647-Reverse_II	5' – ACATTCTGGGCATATAAGCT– 3'	20	54.3	300
RT-PCC7418_0729-Forward_II	5' – GTCCTTATTTCCGAGACAGC– 3'	20	58.4	300
RT-PCC7418_0729-Reverse_II	5' – ACATCAGGTAAACCTAGCCA– 3'	20	56.4	300
RT-PCC7418_1478-Forward_II	5' – TTTAGCCGATCAATATCCTG– 3'	20	54.3	300
RT-PCC7418_1478-Reverse_II	5' – ACCTGTAATAACATCAGCAG– 3'	20	54.3	300

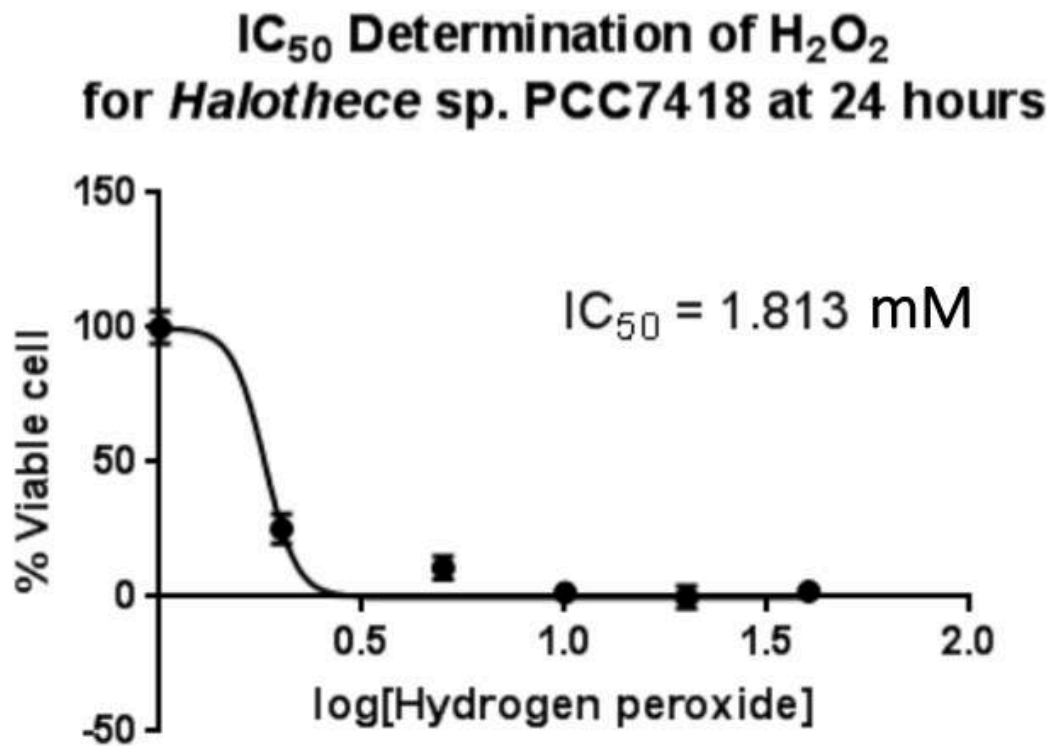
ตารางที่ 4.3 โพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ใน *Halotheca* sp. PCC7418 (ต่อ)

โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาว (bp)	Tm (°C)	ขนาดแอมพลิคอน (bp)
RT-PCC7418_2276-Forward_II	5' – ACGAAACCCTACTATCTGCT– 3'	20	56.4	300
RT-PCC7418_2276-Reverse_II	5' – AGAAAGCCAGGCATAATGGT– 3'	20	56.4	300
RT-PCC7418_3557-Forward_II	5' – CTCAAGCAAGATTTAGAGGC– 3'	20	56.4	300
RT-PCC7418_3557-Reverse_II	5' – TTTCAATAGAACTGGGTGCA– 3'	20	54.3	300
RT-PCC7418_0647-Forward_III	5' – TGTTGAACTGGATATGGCA– 3'	19	53.0	300
RT-PCC7418_0647-Reverse_III	5' – GTGTTGGGTAAATGATCGT– 3'	20	54.3	300
RT-PCC7418_3557-Forward_III	5' – ATTTGGAACGCACCTATCCT– 3'	20	56.4	300
RT-PCC7418_3557-Reverse_III	5' – AAATCTTGCTTGAGGCTACC– 3'	20	56.4	300

4.3 การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative Stress

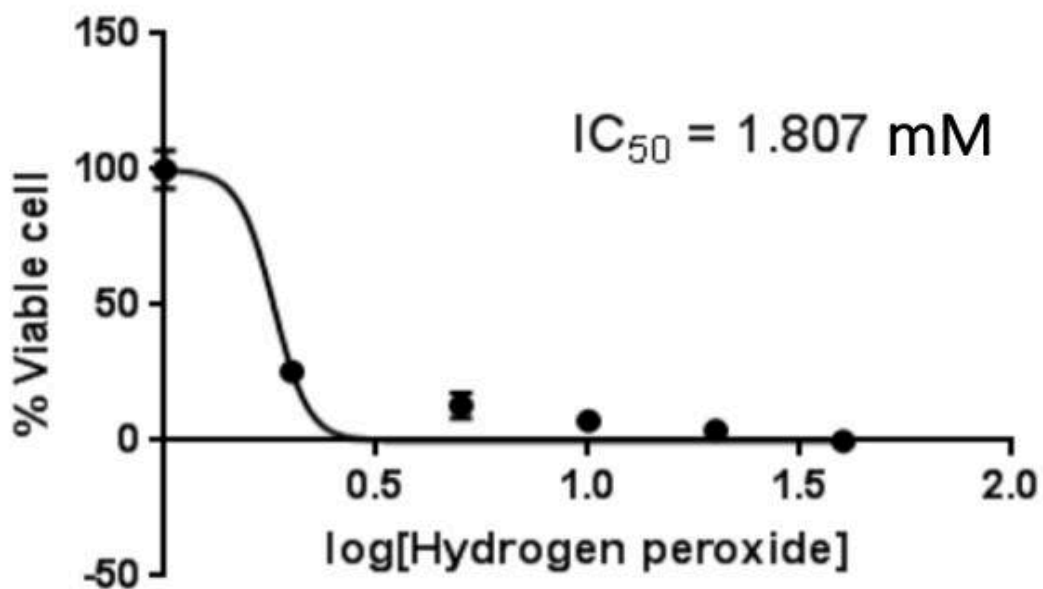
การทดลองเบื้องต้น เพื่อดูการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC 7418 ในอาหาร BG-11 + Turk solution 0.5M NaCl ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงภายใต้ภาวะมีแสง แล้ววัดค่า OD_{730} ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี เพื่อติดตามความหนาแน่นของเซลล์สำหรับนำไปคำนวณค่า IC_{50} ซึ่งเป็นครึ่งหนึ่งของค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงสุดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างเป็นกราฟ สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 1.813 มิลลิโมลาร์ หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 1.807 มิลลิโมลาร์ หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

ส่วนผลการติดตามการสร้างรงควัตถุต่างๆ ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halothece* sp. PCC 7418 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, ไฟโคไซยานิน, อัลโลไฟโคไซยานิน และ ไฟโคอิริธริน เมื่อเลี้ยงในอาหาร BG-11 + Turk solution 0.5M NaCl ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ พบว่า ยิ่งมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้น จะมีอัตราการสร้างรงควัตถุต่างๆ ทั้ง 4 ชนิด ลดลงตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบผลการติดตามหลังเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์จะมีอัตราการสร้างรงควัตถุ ทั้ง 4 ชนิด ลดลงเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดเป็นเวลานานขึ้นอีกด้วย ดังแสดงผลในรูปที่ 4.9



ภาพที่ 4.7 กราฟการเจริญของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่า log(ความเข้มข้น) คัดค่า % viable cell ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (OD₇₃₀) ซึ่งสามารถคำนวณค่า IC₅₀ ได้เท่ากับ 1.813 มิลลิโมลาร์

IC₅₀ Determination of H₂O₂ for *Halotheca* sp. PCC7418 at 48 hours



ภาพที่ 4.8 กราฟการเจริญของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ หลังเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงเป็นค่า log(ความเข้มข้น) คัดค่า % viable cell ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (OD₇₃₀) ซึ่งสามารถคำนวณค่า IC₅₀ ได้เท่ากับ 1.807 มิลลิโมลาร์

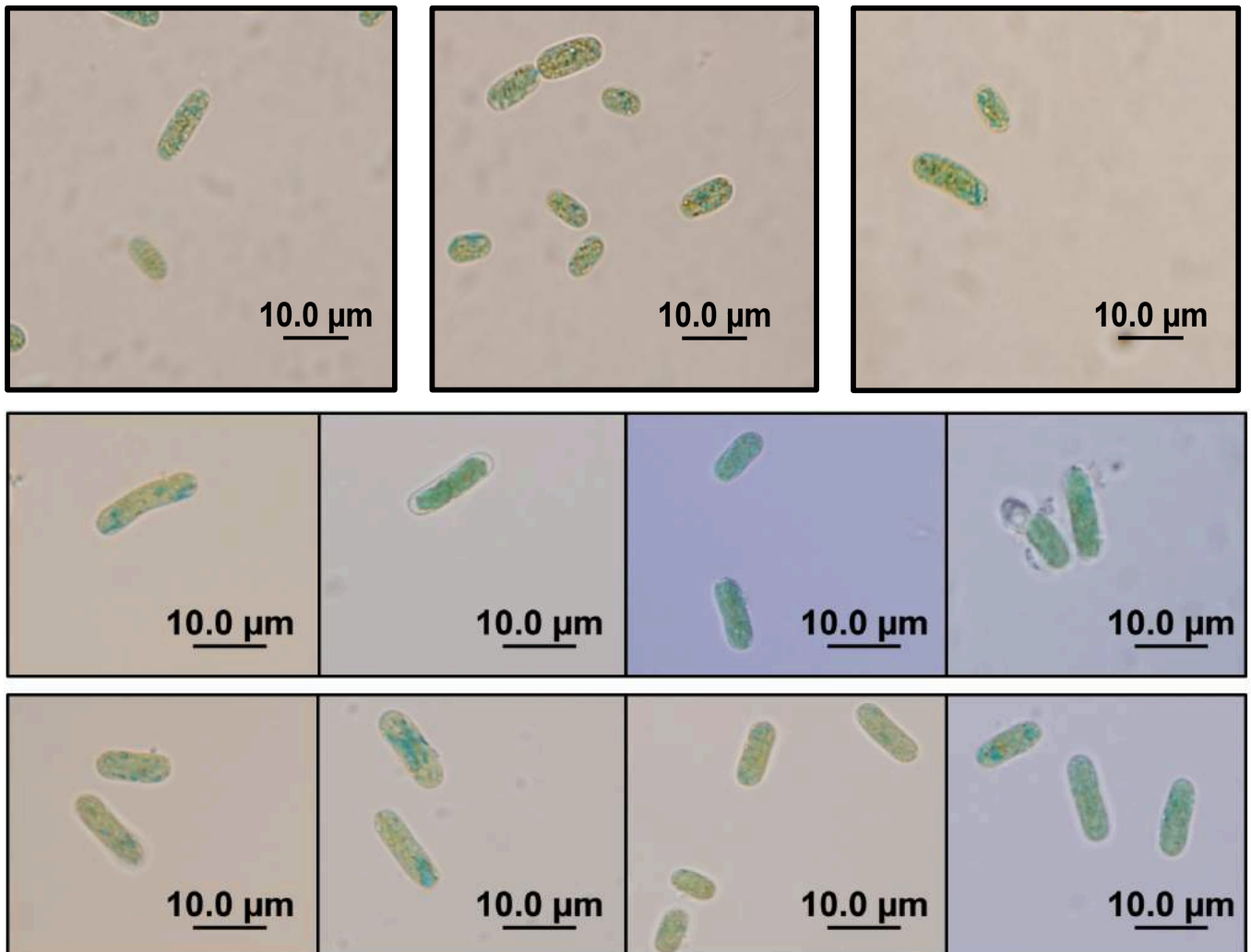


ภาพที่ 4.9 ผลการทดลองศึกษาการเจริญของเชื้อภายใต้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น (เรียงจากซ้ายไปขวา) 0, 1, 2, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ โดยถ่ายหลังทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพบน) และ 48 ชั่วโมง (ภาพล่าง)

โดยปกติ เซลล์ที่มีกระบวนการเมแทบอลิซึมภายใต้ภาวะแอโรบิก (aerobic condition) สามารถเกิดการสร้าง ROS ขึ้นมาได้เองอยู่แล้ว นอกจากนั้น กระบวนการสังเคราะห์แสงก็สามารถทำให้เกิด ROS ขึ้นมาได้มากขึ้นอีกด้วย เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ในเซลล์เพิ่มสูงมากกว่าระดับปกติ จึงทำให้เซลล์ต้องมีกลไกต่างๆ เพื่อที่จะกำจัด ROS เหล่านี้ และทำให้เซลล์อยู่ในภาวะสมดุลต่อไป (Latifi และคณะ, 2008) แต่หากเซลล์อยู่ในภาวะเครียดเนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นมากเกินไป อาจทำให้เกิดความเสียหายขึ้นกับเซลล์ได้มากกว่าที่กลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระสามารถทำงานได้ ส่งผลให้เกิดความเสียหายขึ้นกับโครงสร้างโปรตีน, ลิพิด และ DNA รวมทั้งอาจทำให้วิถีเมแทบอลิซึมบางอย่างหยุดทำงาน ตลอดจนอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นไปได้ และทำให้เซลล์ตายได้ในที่สุด (Asad และคณะ, 2004) ดังนั้นในการศึกษาการแสดงออกของยีน จึงเลือกช่วงความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาใช้สร้างภาวะเครียดแบบ oxidative stress เป็นช่วงเท่ากับค่า IC_{50} , ครึ่งหนึ่งของค่า IC_{50} และมากกว่าค่า IC_{50} ประมาณ 0.9 มิลลิโมลาร์ ซึ่งคาดว่าครอบคลุมช่วงที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน GST และ GGT/glutathione hydrolase มากที่สุด และเหมาะสมกับการศึกษา เพราะควรจะเห็นรูปแบบการเพิ่มหรือลดการแสดงออกได้ชัดเจนที่สุด โดยหากเลือกช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น้อยกว่านี้ อาจไม่เห็นรูปแบบการเพิ่มหรือลดการแสดงออกที่ชัดเจน แต่ถ้าใช้ช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่านี้ อาจทำให้เกิดความเสียหายกับสารพันธุกรรม หรืออาจทำให้เซลล์ตาย และไม่สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนได้

4.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียด (stress treatment)

หลังจากการนำไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC 7418 มาเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดต่างๆ ได้แบ่งตัวอย่างเซลล์จากภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยากับเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ที่เลี้ยงเป็นเวลาเท่ากัน พบว่า เซลล์ที่ได้รับความเครียดส่วนใหญ่มีขนาดไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ แต่เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะพบเซลล์แตกมากกว่าภาวะอื่นๆ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาจเป็นช่วงเวลาที่นานพอจะทำให้เห็นเซลล์บางเซลล์ตาย เนื่องจากมีการสะสมอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จนเริ่มเกิดความเป็นพิษและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

แถบบน: เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะปกติ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

แถวกกลาง: เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (จากซ้ายไปขวา)

แถวล่าง: เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ (จากซ้ายไปขวา) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

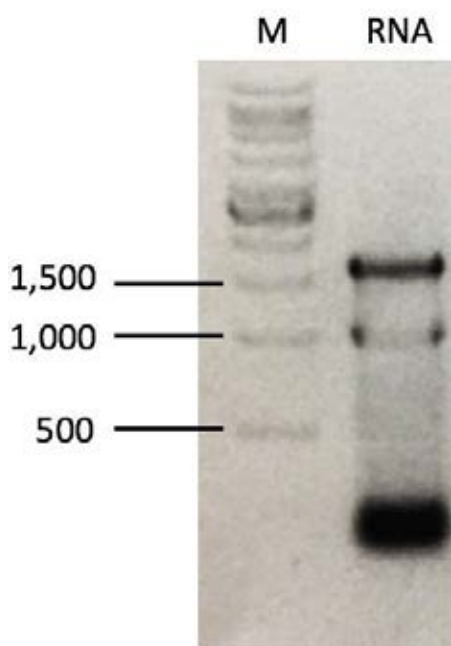
เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลาประมาณ 6-12 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสมของคลอโรฟิลล์ และไฟโคไซยานิน เพิ่มขึ้น เห็นได้จากในเซลล์มีรงควัตถุสีเขียวและสีน้ำเงินสะสมเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rym ในปี 2012 ซึ่งทำการเลี้ยง *Arthrospira platensis* (Spirulina) ภายใต้เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการสะสมของแคโรทีนอยด์และไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าการที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นกว่าปกติ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสะสมของสารกลุ่มไฟโคบิลิน ทำให้เกิดการดูดซับแสงที่ phycobilisomes แล้วส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ เอ ซึ่งเป็นศูนย์กลางปฏิกิริยา ทำให้มีกิจกรรมของ photosystem II เพิ่มขึ้น (Rym, 2012) นอกจากการเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงให้มากขึ้นโดยการสะสมรงควัตถุเหล่านี้แล้ว ไชยาโนแบคทีเรียยังมีกลไกการปรับตัวอื่นๆ หลากหลายรูปแบบ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียด กลไกการปรับตัวเหล่านี้จะทำงานร่วมกัน เพื่อทดแทนการทำงานบางส่วนที่อาจสูญเสียไป หรือเพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้ทนต่อภาวะเครียด และสามารถเจริญเติบโตได้ต่อไป แม้ในภาวะที่ไม่เหมาะสม (Demetriou และคณะ, 2007)

นอกจากนั้น เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ ซึ่งเป็นครึ่งหนึ่งของค่า IC_{50} เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการสะสมของไฟโคไซยานิน ซึ่งเห็นได้จากการที่ในเซลล์มีรงควัตถุสีน้ำเงินสะสมเพิ่มขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสารกลุ่มไฟโคบิลิน และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์หลายชนิด สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้อีกด้วย เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระประเภท ROS ขึ้นปริมาณมาก เซลล์อาจมีการสร้างสารกลุ่มไฟโคบิลิน และอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นกว่าปกติ เพื่อใช้ในการกำจัด ROS ที่เพิ่มขึ้น เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ในการตอบสนองต่อภาวะเครียดดังกล่าว (Wada และคณะ, 2013) แต่ในเซลล์ ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 และ 2.7 โมลาร์ ซึ่งเท่ากับค่า IC_{50} และมากกว่าค่า IC_{50} ตามลำดับ พบว่ามีการสะสมของไฟโคไซยานินน้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นนี้ มีความรุนแรงในระดับที่เริ่มส่งผลทำให้เซลล์มีเมแทบอลิซึมผิดปกติบ้างแล้ว ทำให้เซลล์มีการสะสมของรงควัตถุที่ลดลงตามลำดับ

4.5 การสกัด total RNA จากไชยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC 7418

จากการสกัด total RNA โดยใช้สารละลาย TRIzol[®] reagent เมื่อนำสารละลาย RNA ที่สกัดได้ ไปวัดความเข้มข้น รวมทั้งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}), 280 นาโนเมตร (A_{280}) และ 230 นาโนเมตร (A_{230}) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA โดยหาค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ซึ่งใช้บ่งบอกได้ว่ามีโปรตีนปนเปื้อนมาด้วยในปริมาณมากหรือไม่ และค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} ซึ่งใช้บ่งบอกได้ว่า มีตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น สารฟีนอล ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ตัวหนึ่งที่ใช้ในการสกัด ปนเปื้อนมาด้วย

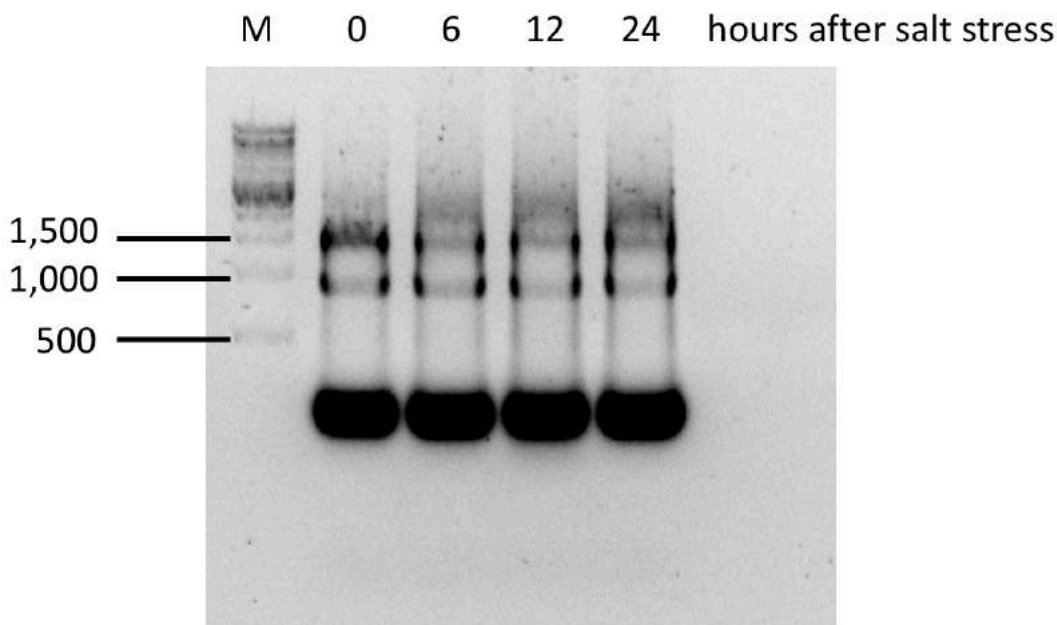
ในปริมาณมากหรือไม่ นอกจากนี้ ยังมีการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ โดยการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ RNA ปริมาณ 2,000-4,500 นาโนกรัม พบว่า band ที่ถูกตรวจวัดได้ จะมี 3 ส่วนหลักๆ ประกอบด้วย ส่วนของ 23S rRNA มีขนาดประมาณ 1,500-1,800 คู่เบส, ส่วนของ 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และส่วนของ RNA ขนาดเล็กๆ (small RNAs) จะเป็นแถบเข้มหนายู่ที่ด้านล่างของ 2 band แรก ดังแสดงรายละเอียดในภาพที่ 4.11 ซึ่งเป็นภาพผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบผลการสกัด RNA จาก *Halothece* sp. PCC7418 ที่เลี้ยงในภาวะปกติ ซึ่งหากผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลที่มีรูปแบบดังกล่าว และมีความคมชัดของ band แสดงว่าการสกัด RNA ในครั้งนั้นได้ผลิตภัณฑ์ RNA ที่สมบูรณ์และมีคุณภาพดี โดยในการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแต่ละครั้ง จะรันบนเจลที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ที่พรีแคส (precasted) ด้วยสี SYBR®



ภาพที่ 4.11 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halothece* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker และ RNA หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ

สำหรับการทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ประกอบด้วยชุดที่เลี้ยงในภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในภาพที่ 4.12 ซึ่งจะเห็นได้ว่า RNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง มีความบริสุทธิ์ และผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมีรูปแบบที่เห็นทั้งส่วน 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs อื่นๆ อย่างชัดเจนและมีความคมชัดของ band ส่วนผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป แสดงไว้ในภาคผนวก ค.

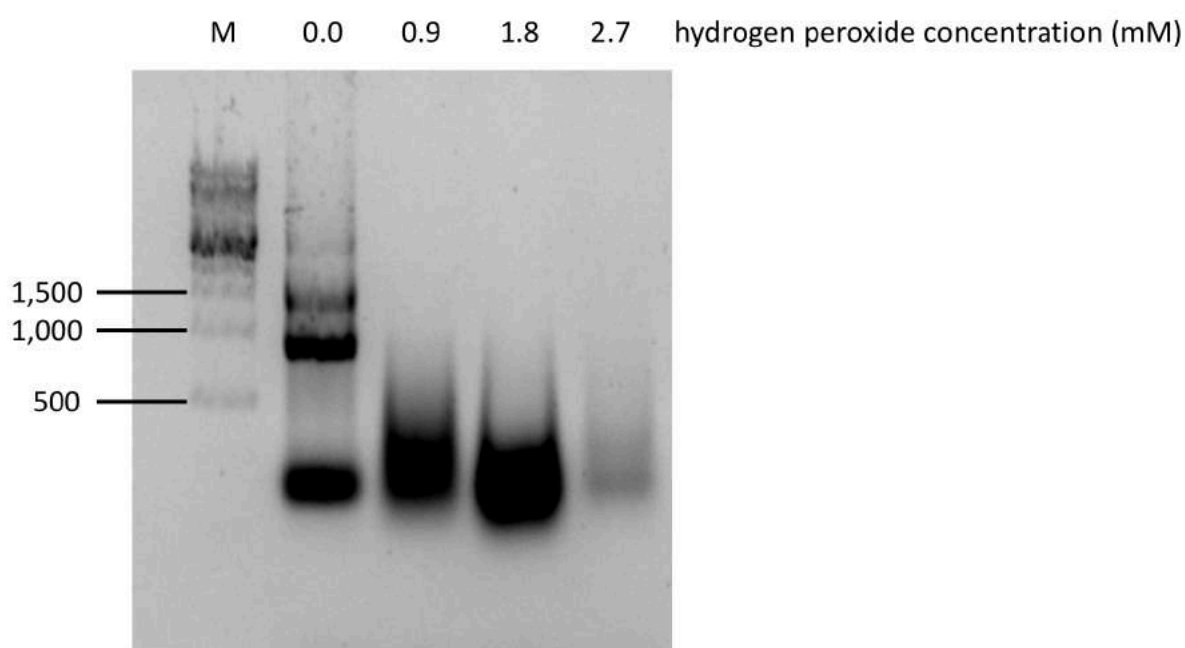


ภาพที่ 4.12 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker ส่วน 0, 6, 12 และ 24 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

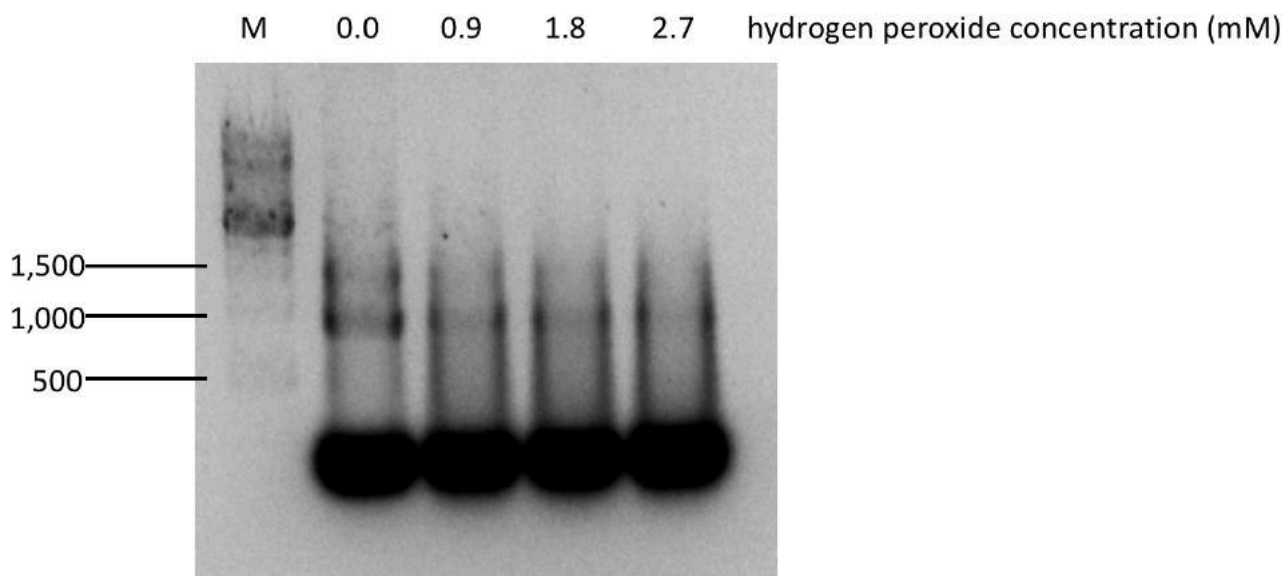
แต่เมื่อทำการทดลองภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress ประกอบด้วยชุดที่เลี้ยงในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงกลับพบว่า RNA ที่สกัดได้จากชุดทดลองที่ได้รับความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ มีความเข้มข้นต่ำมากจนไม่เพียงพอสำหรับเปลี่ยนเป็น cDNA ดังแสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป ในภาคผนวก ค. อีกทั้งผลการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีสิส พบว่าชุดที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดโดยเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปทุกความเข้มข้น จะไม่พบส่วน 23S rRNA และ 16S rRNA แต่มีส่วนของ small RNAs หนามาก แตกต่างจากชุดทดลองที่ไม่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0.0 mM) ที่ยังคงมีรูปแบบของ band เป็น 3 แถบหลักตามปกติ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.13 จึงคาดว่า การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แม้จะเลือกใช้ความเข้มข้นในช่วงของค่า IC_{50} และเลี้ยงในระยะเวลาเท่ากับที่ใช้ในการทดลองเบื้องต้น เพื่อศึกษาการเจริญของเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าวก่อนหน้านี้ แต่มีความเป็นไปได้ว่า ภาวะดังกล่าวอาจมีความรุนแรงหรือเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าที่คาดไว้ โดยในการศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้เป็นการทำนายค่า IC_{50} จากการติดตามความหนาแน่นเซลล์และในระดับพีโนไทป์ ซึ่งยังคงเห็นเซลล์มีการแสดงออกของลักษณะต่างๆ อยู่ แต่ในระดับยีน อาจเกิดความเสียหายขึ้น หรือทำให้สารพันธุกรรมบางส่วนเสียสภาพไปบ้างแล้ว ทำให้เมื่อใช้ภาวะดังกล่าวในการศึกษาการแสดงออกของยีน จึงไม่สามารถสกัด RNA ที่มีคุณภาพและปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ต่อไปได้ ดังนั้นจึงปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองใหม่ โดยยังคงใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในช่วงค่า IC_{50} เหมือนเดิม แต่ลดระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดลงจาก 48 ชั่วโมง เหลือเพียง 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยังถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนด้วยภาวะเดิม แต่ป้องกันไม่ให้อาการพันธุกรรมได้รับความเสียหายจากการที่เซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดนานเกินไป ซึ่งผลการสกัด RNA หลังปรับลดระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียด พบว่า RNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดังแสดงผลในภาคผนวก ค. และผลการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิสพบรูปแบบที่เห็นทั้งส่วน 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs อื่นๆ ชัดเจนขึ้นและมีความคมชัดของ band มากขึ้น ดังแสดงผลในรูปที่ 4.14 โดยในการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีสิสแต่ละครั้ง จะรันบนเจลที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ที่พรีแคส (precasted) ด้วยสี SYBR[®]



ภาพที่ 4.13 เจลอิเล็กโตรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

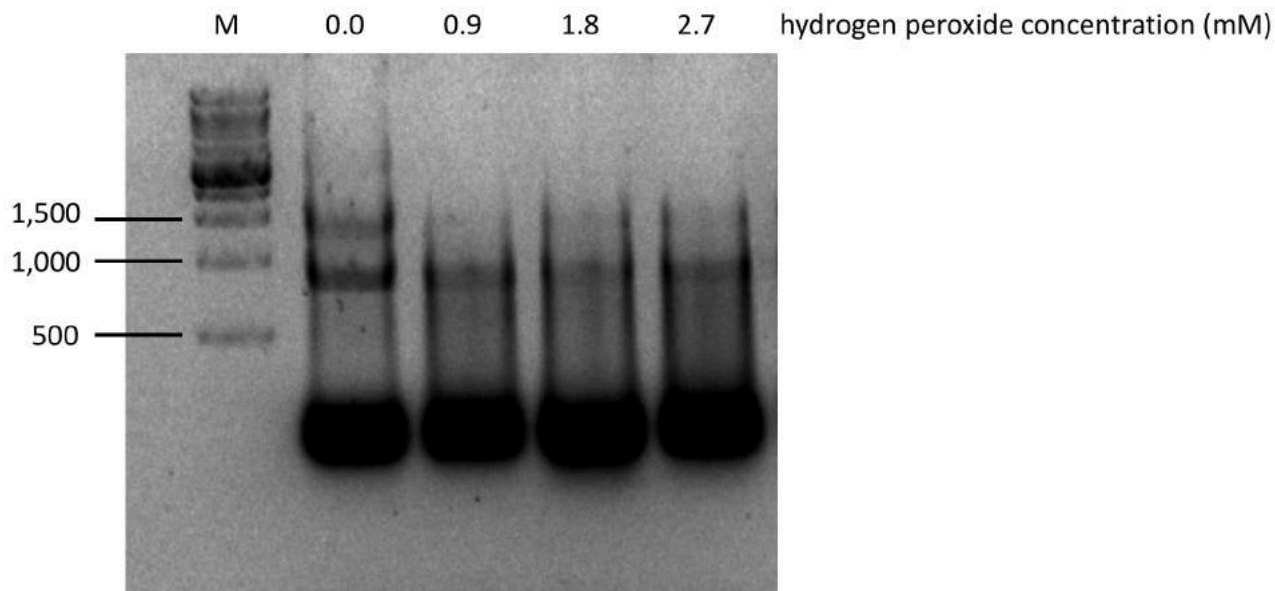
โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker ส่วน 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.14 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halothece* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker ส่วน 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

หลังจากนั้น ในการทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับ oxidative stress ประกอบด้วยชุดที่เลี้ยงในเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ร่วมกับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ จึงทำการปรับลดเวลาเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดลงเหลือ 6 ชั่วโมงด้วยเช่นเดียวกัน ซึ่งผลการสกัด RNA พบว่า RNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง และมีความบริสุทธิ์ ดังแสดงในภาคผนวก ค. และผลการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบรูปแบบที่เห็นทั้งส่วน 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs อื่นๆ ตามปกติ และมีความคมชัดของ band มากขึ้น ดังแสดงผลในรูปที่ 4.15



ภาพที่ 4.15 เจลอิเล็กโทรโฟรีสิสของ RNA ที่สกัดได้จาก *Halotheca* sp. PCC7418

โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker ส่วน 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 หมายถึง RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

จากการสกัด total RNA เพื่อนำไปเปลี่ยน cDNA และทำ RT-PCR โดยใช้สารละลาย TRIzol[®] reagent เมื่อนำไปตรวจวัดคุณภาพของ RNA โดยการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีสิส พบว่าทุกชุดการทดลองมีรูปแบบของ band ที่ตรวจพบ เห็นทั้งส่วน 23S rRNA, 16S rRNA และ small RNAs อื่นๆ อย่างชัดเจน และ band ค่อนข้างมีความสมบูรณ์ (intact) แสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดี ส่วนผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จะเห็นได้ว่าทุกชุดทดลองมีความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ค่อนข้างสูง โดยมีความเข้มข้นมากกว่า 800 ng/ μ l แสดงให้เห็นว่า การสกัด total RNA โดยใช้สารละลาย TRIzol[®] reagent ซึ่งเป็น reagent สำเร็จรูป สามารถคงสภาพ RNA และย่อยโปรตีนในสารละลายออกไปได้มาก ทำให้ผลการสกัด RNA ออกมาได้มีปริมาณมากและมีคุณภาพ ส่วนค่า A_{260}/A_{280} ซึ่งแสดงถึงความบริสุทธิ์ของ RNA ในด้านปริมาณโปรตีนปนเปื้อน พบว่าทุกชุดการทดลอง มีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่า RNA ที่สกัดได้จากทุกชุดทดลองมีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนต่ำ (Song และคณะ, 2013) แต่ค่า A_{260}/A_{230} เป็นค่าแสดงถึงความบริสุทธิ์ของ RNA ในด้านการปนเปื้อนจากตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งควรมีค่ามากกว่า 2.0 จึงจะถือว่าเป็น RNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง (Hiesinger และคณะ, 2001) แต่ผลการทดลองกลับพบว่าค่า A_{260}/A_{230} ของ RNA หลายตัวอย่าง มีค่าต่ำกว่า 2.0 เล็กน้อยซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยังมีตัวทำละลายอินทรีย์ตกค้างจากขั้นตอนการสกัดอยู่ แต่ปนเปื้อนในปริมาณไม่มาก ซึ่งอาจทำให้ความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้นี้ต่ำกว่ามาตรฐานเล็กน้อย แต่ไม่ถึงกับมีผลต่อการทดลองในขั้นถัดไป โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างนี้ มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารฟีนอล หรือ

คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ผสมอยู่ใน TRIzol[®] reagent สำหรับกรณีการเปลี่ยนเป็น cDNA เพื่อทำ RT-PCR อาจมีผลทำให้ปริมาณ cDNA ที่เปลี่ยนได้มีปริมาณต่ำกว่าที่ควรเป็นเล็กน้อย แต่ไม่น่าจะมีผลกระทบต่อการทำ RT-PCR อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งการใช้สารละลายสำเร็จรูปในการสกัด จะทำให้ได้ RNA ทั้งปริมาณและคุณภาพสูงอยู่แล้ว จึงไม่ส่งผลกระทบมากนัก นอกจากนี้ยังได้ยืนยันโดยการใช้ housekeeping gene *AprmpB* ซึ่งก็ได้ผลิตภัณฑ์ตามปกติ สำหรับการทดลองในอนาคต เพื่อลดการปนเปื้อนตัวทำละลายอินทรีย์อาจใช้ชุดสำเร็จสำหรับการสกัด RNA หรือใช้วิธีอื่นร่วม

4.4 การทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ใน *Halotheca* sp. PCC7418

หลังจากการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ชุดสำเร็จ SuperScript III[®] First-strand สำหรับชุดทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือและ oxidative stress หรือชุดสำเร็จ iScript[™] สำหรับชุดทดลองภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือร่วมกับ oxidative stress นำ cDNA ที่ได้มาทำ semiquantitative RT-PCR แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเจลที่ใช้มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.2% (w/v) ใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab โดยทำ PCR, รันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ภาวะเครียดที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ประกอบด้วยภาวะเครียดจากเกลือ มี 4 ชุดทดลองย่อย คือการเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าวเป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 6, 12 และ 24 ชั่วโมง, ภาวะเครียดแบบ oxidative stress มี 4 ชุดทดลองย่อย คือเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0 (ชุดควบคุม), 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ และภาวะเครียดแบบ combined stress มี 4 ชุดทดลองย่อย ได้แก่เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0 (ชุดควบคุม), 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ แต่ละภาวะเครียดที่ใช้ทดลองให้ผลการทดลอง ดังนี้

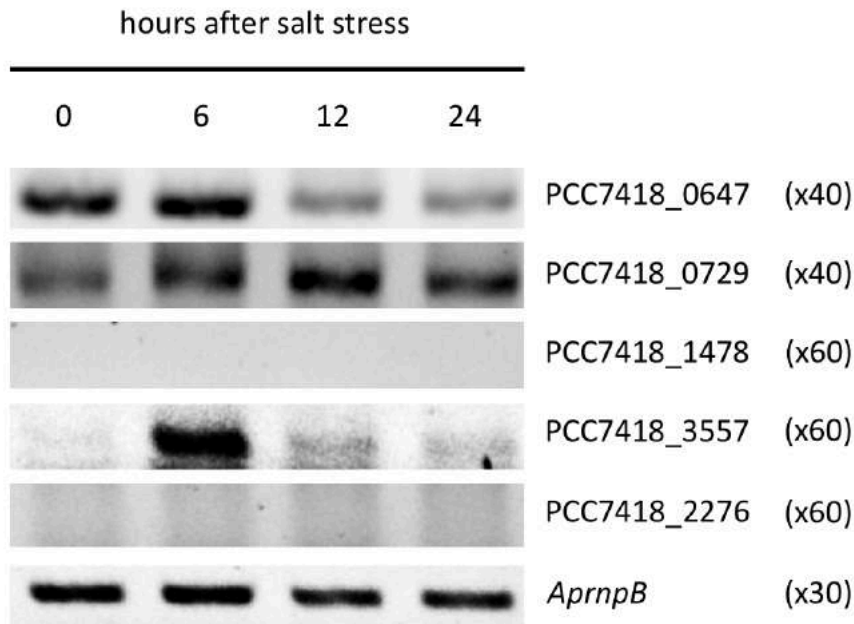
4.4.1 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (salt stress)

กลุ่มยีนที่พบการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ มีทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 ซึ่งทั้งหมด เป็นยีนกำหนดรหัส GST โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน PCC7418_0647 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 1.18 ± 0.02 เท่า เมื่อเทียบกับภาวะปกติ (เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 0 ชั่วโมง) แต่หลังจากนั้นพบว่าการแสดงออกลดลง (down-regulated)

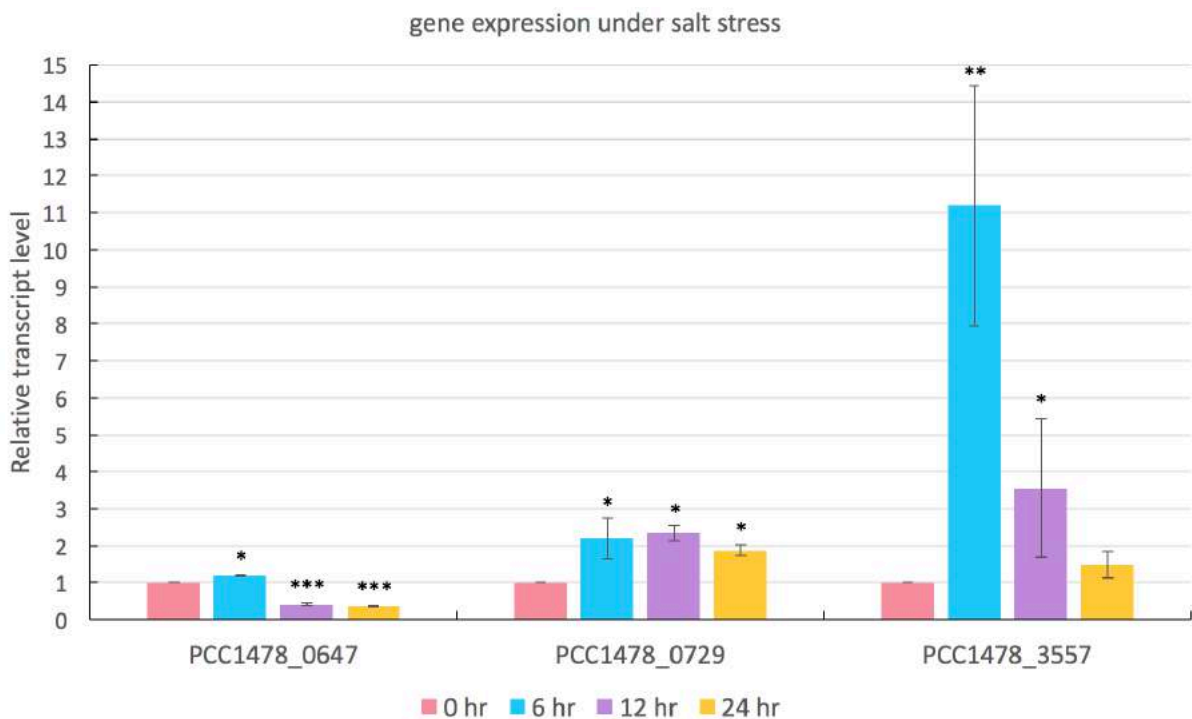
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยลดลงประมาณ 2.44 ± 0.03 และ 2.70 ± 0.02 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับภาวะปกติ ส่วนยีน PCC7418_0729 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2.20 ± 0.5 และ 2.34 ± 0.2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับภาวะปกติ แต่หลังจากนั้น เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่ามีการแสดงออกลดลงจากการเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่ยังมีระดับการแสดงออกมากกว่าภาวะปกติ ประมาณ 1.88 ± 0.1 เท่า ซึ่งถือได้ว่าทั้งหมดมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยีน PCC7418_3557 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 11.19 ± 3.2 เท่า แต่การเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของ band และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงถือว่า ยีนดังกล่าว หลังเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างจากภาวะปกติ ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (ก) และ (ข) และแสดงผลการทดลองอย่างละเอียดในภาคผนวก ค.

ส่วนยีน PCC7418_1478 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GST อีกยีนหนึ่ง และ PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase ไม่พบการแสดงออกของยีน โดยผลการทำ RT-PCR แม้จะเปลี่ยนไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RT-PCR ทั้งหมด 2 ชุด ซึ่งมีความยาวไพรเมอร์ที่ต่างกัน คือ 15 bp และ 20 bp ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ข. แต่ไม่พบ band ที่จำเพาะ (specific band) ทั้งในเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ และเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาต่างๆ จึงสรุปได้ว่า ยีนทั้งสองนี้ อาจไม่มีการแสดงออกหรือมีการแสดงออกน้อยมาก ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 4.16 (ก)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.16 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์

โดยมียีน *AprnpB* เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)

(ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ

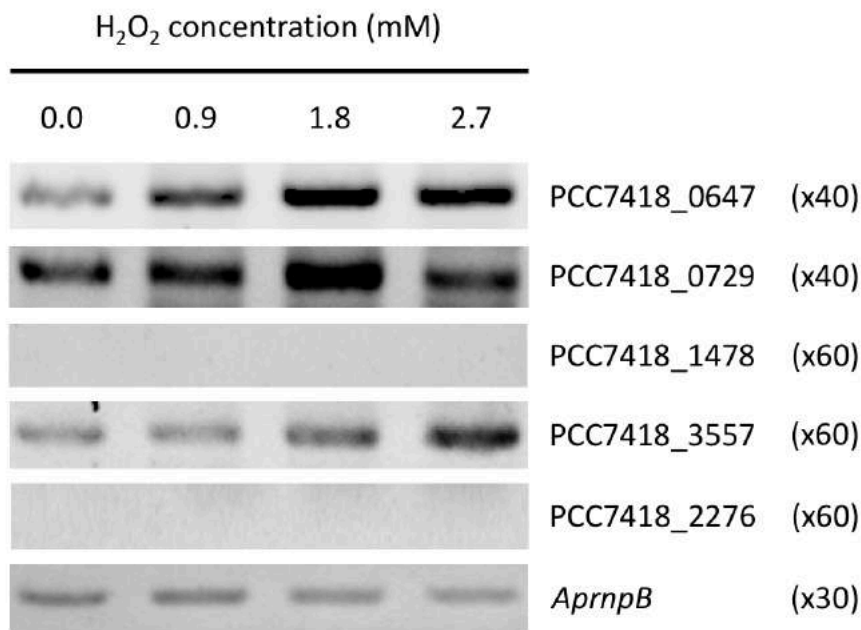
(ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image lab โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) และ *, **, *** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย post hoc test วิธี LSD ที่ค่า $\text{sig} \leq 0.05$, $\text{sig} \leq 0.01$ และ $\text{sig} \leq 0.001$ ตามลำดับ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

4.4.2 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress

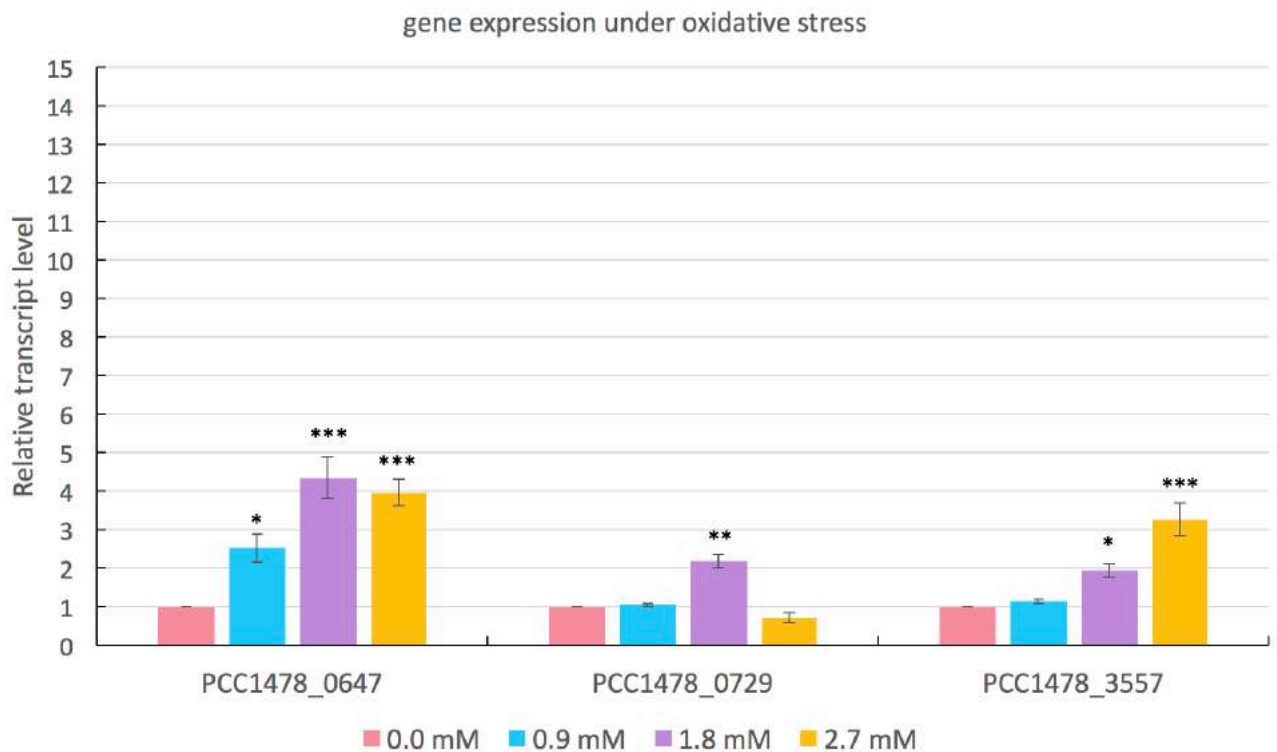
กลุ่มยีนที่พบการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ จากการทำให้ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะมีทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ ยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 ซึ่งทั้งหมด เป็นยีนกำหนดรหัส GST โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน PCC7418_0647 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเมื่อเทียบกับภาวะปกติ พบว่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2.53 ± 0.4 , 4.34 ± 0.5 และ 3.97 ± 0.4 เท่าตามลำดับ ส่วนยีน PCC7418_0729 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระดับการแสดงออกที่ภาวะปกติ แต่หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2.19 ± 0.2 เท่า หลังจากนั้น ที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างจากภาวะปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนยีน PCC7418_3557 ที่ความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระดับการแสดงออกที่ภาวะปกติ แต่หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 1.96 ± 0.2 และ 3.27 ± 0.4 เท่าตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.17 (ก) และ (ข) และแสดงผลการทดลองอย่างละเอียดในภาคผนวก ค.

ส่วนยีน PCC7418_1478 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GST อีกยีนหนึ่ง และ PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase ไม่พบการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกัน โดยผลการทำให้ RT-PCR แม้จะเปลี่ยนไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำให้ RT-PCR ทั้งหมด 2 ชุด ซึ่งมีความยาวไพรเมอร์ที่ต่างกัน คือ 15 bp และ 20 bp ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ข. แต่ไม่พบ band ที่จำเพาะ ทั้งในเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ และเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาต่างๆ จึงสรุปได้ว่า ยีนทั้งสองนี้ อาจไม่มีการแสดงออก หรือมีการแสดงออกน้อยมาก ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 4.17 (ก)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.17 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดแบบ oxidative stress

โดยมียีน *AprnpB* เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)

(ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ

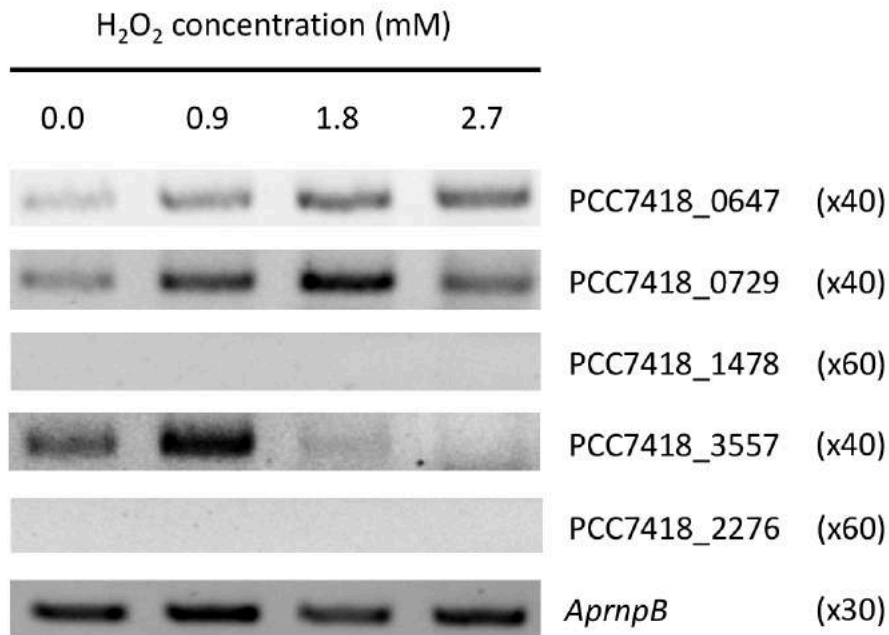
(ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image lab โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) และ *, **, *** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย post hoc test วิธี LSD ที่ค่า sig≤0.05, sig≤0.01 และ sig≤0.001 ตามลำดับ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

4.4.3 การแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ภายใต้ภาวะเครียดร่วมจากเกลือและ oxidative stress

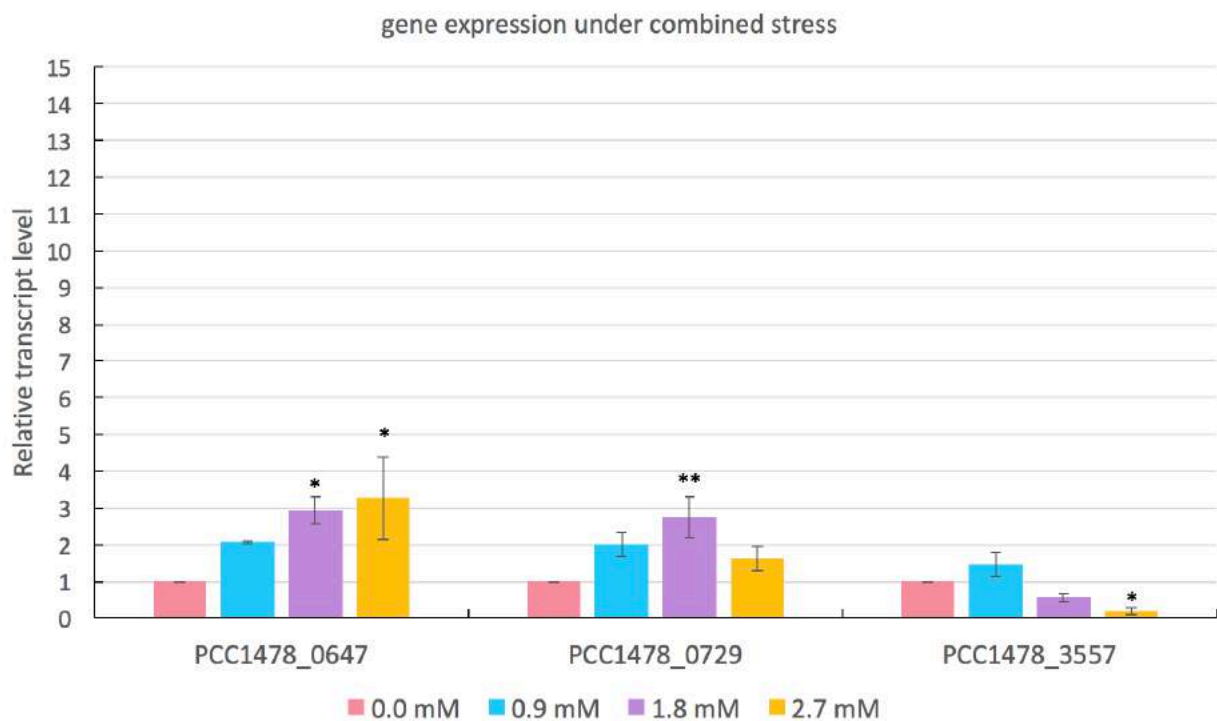
กลุ่มยีนที่พบการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดร่วมจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.0, 0.9, 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์จากการทำ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ มีทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 ซึ่งทั้งหมด เป็นยีนกำหนดรหัส GST โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน PCC7418_0647 พบว่าการเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระดับการแสดงออกที่ภาวะปกติ แต่หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.8 และ 2.7 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2.93 ± 0.4 และ 3.28 ± 1.1 เท่าตามลำดับ ส่วนยีน PCC7418_0729 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.9 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงออกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระดับการแสดงออกที่ภาวะปกติ แต่หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 2.75 ± 0.6 เท่า หลังจากนั้น ที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนยีน PCC7418_3557 ที่ความเข้มข้น 0.9 และ 1.8 มิลลิโมลาร์ มีการแสดงเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้ว พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เซลล์ที่เลี้ยงด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงประมาณ 0.19 ± 0.09 เท่า เมื่อเทียบกับภาวะปกติ ดังแสดงในภาพที่ 4.18 (ก) และ (ข) และแสดงผลการทดลองอย่างละเอียดในภาคผนวก ค.

ส่วนยีน PCC7418_1478 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GST อีกยีนหนึ่ง และ PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase ไม่พบการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกัน โดยผลการทำ RT-PCR แม้จะเปลี่ยนไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RT-PCR ทั้งหมด 2 ชุด ซึ่งมีความยาวไพรเมอร์ที่ต่างกัน คือ 15 bp และ 20 bp ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ข. แต่ไม่พบ band ที่จำเพาะ ทั้งในเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ และเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลาต่างๆ จึงสรุปได้ว่า ยีนทั้งสองนี้ อาจไม่มีการแสดงออก หรือมีการแสดงออกน้อยมาก ภายใต้ภาวะเครียดดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 4.18 (ก)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.18 semiquantitative RT-PCR ของกลุ่มยีนภายใต้ภาวะเครียดแบบ combined stress

โดยมียีน *AprnpB* เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)

(ก) ผลจากการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และ

(ข) ผลจากการวัดความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image lab โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) และ *, **, *** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย post hoc test วิธี LSD ที่ค่า sig≤0.05, sig≤0.01 และ sig≤0.001 ตามลำดับ วิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS v22

จากผลการทดลองศึกษาการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ทั้ง 5 ยีน โดยวิธี RT-PCR สรุปได้ว่า มียีนกำหนดรหัส GST 3 ยีนที่แสดงออกทั้งในภาวะปกติและภายใต้ภาวะเครียด ทั้งภาวะเครียดจากเกลือ, ภาวะเครียดแบบ oxidative stress และภาวะเครียดร่วมจากเกลือและ oxidative stress ได้แก่ PCC1478_0647, PCC1478_0729 และ PCC1478_3557 โดยแต่ละยีนมีรูปแบบการแสดงออกตอบสนองต่อภาวะเครียดแตกต่างกัน

ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ยีน PCC1478_0647 มีรูปแบบการแสดงออก ในช่วงแรกที่เซลล์อยู่ในภาวะเครียด (6 ชั่วโมง) ยีนนี้จะมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นจากภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือนานขึ้น (12-24 ชั่วโมง) เซลล์อาจมีการปรับตัวและเปลี่ยนรูปแบบการแสดงออก โดยลดการแสดงออกของยีน PCC1478_0647 นี้ลงจนต่ำกว่าภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนยีน PCC1478_0729 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีการแสดงออกสูงสุดหลังเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการแสดงออกลดลงเล็กน้อย และยีน PCC7418_3557 ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีการแสดงออกสูงสุดหลังเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าภาวะปกติ ถึงประมาณ 11 เท่า ซึ่งเป็นระดับการแสดงออกที่สูงที่สุด เมื่อเทียบกับผลการทดลองทั้งหมด ทุกภาวะ แสดงให้เห็นว่า ยีนดังกล่าวมีบทบาทมากที่สุดในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากเกลือ จะเห็นว่า ทั้ง 3 ยีนมีการแสดงออกที่ลดลง หลังเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลานาน ซึ่งอาจเป็นเพราะเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดในช่วงแรก จะมีการเหนี่ยวนำให้กลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดทำงานในปริมาณมากกว่าปกติ แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดจากเกลือ ซึ่งถือว่าเป็นภาวะเครียดที่มีความรุนแรงน้อยกว่าภาวะเครียดอื่นๆ เป็นเวลานาน เซลล์อาจมีการปรับเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมต่างๆ เพื่อปรับตัวให้เซลล์สามารถเจริญอยู่ในภาวะดังกล่าวได้ (Laloknam, 2011) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ กลไกการตอบสนองต่อภาวะเครียดเพื่อป้องกันเซลล์อย่าง GST จะถูกลดการทำงานลง เพราะเซลล์มีการปรับตัวให้อยู่รอดในภาวะเครียดนั้นแล้ว โดยยีน PCC7418_0647 มีการแสดงออกลดลงจนมีระดับการแสดงออกต่ำกว่าภาวะปกติ, ยีน PCC7418_0729 มีการแสดงออกลดลง แต่ยังเป็นระดับที่มากกว่าภาวะปกติ และยีน PCC7418_3557 มีระดับการแสดงออกลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกับภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าแต่ละยีนมีการลดลงของการแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันออกไป

ส่วนการแสดงออกภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress พบว่าทั้ง 3 ยีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีน PCC7418_0729 มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเท่ากับค่า IC_{50} และเริ่มลดลงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ ซึ่งการลดลงเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลานาน อาจเกิดจากการที่เซลล์มีเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติจนเริ่มเกิดความเสียหายขึ้นกับเซลล์แล้ว มากกว่าเกิดจากการปรับตัวของเซลล์เพื่อให้อยู่รอดในภาวะนั้น เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นสูงกว่าค่า IC_{50} ส่วนยีน PCC7418_0647 และ PCC7418_3557 มีรูปแบบการแสดงออกของยีนที่

แตกต่างกันออกไป คือเซลล์ที่เลี้ยงด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสูง (2.7 มิลลิโมลาร์) ยังคงมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นกว่าที่ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ หรือกล่าวได้ว่าการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และการที่ยีนกำหนดรหัส GST ทั้ง 3 ยีนดังกล่าว มีการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ ในส่วนการเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล NCBI ที่พบว่า GST ที่แสดงออกจากรหัสกำหนดรหัสทั้งหมดใน *Halotheca* sp. PCC7418 เป็น GSTA superfamily หรือ GST ที่มีความใกล้เคียงกับคลาส alpha ซึ่งเป็น GST กลุ่มที่มีคุณสมบัติพิเศษ สามารถมีการแสดงออกของเพอร์ออกซิเดส แอคทิวิตี (peroxidase activity) ได้ เช่นเดียวกับ GST คลาส Theta และ Rho (Pandey และคณะ, 2015b)

ส่วนการแสดงออกใต้ภาวะเครียดร่วม จากเกลือและ oxidative stress พบว่า ยีน PCC7418_0647 มีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยังมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากขึ้น ก็ยังมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นไปด้วย ส่วนยีน PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ และมีการแสดงออกที่ลดลง เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น ในขณะที่ยีน PCC7418_3557 มีรูปแบบการแสดงออกที่ต่างออกไป โดยมีการแสดงออกไม่แตกต่างจากภาวะปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นไม่เกิน 1.8 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ กลับมีการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกภายใต้ภาวะเครียดทั้ง 3 ภาวะจะพบว่า ภาวะเครียดจาก oxidative stress และ ภาวะเครียดร่วม จะมีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่าภาวะเครียดจากเกลือ โดยภาวะเครียดแบบ oxidative stress ถือเป็นภาวะเครียดที่มีความรุนแรงมากที่สุดอย่างหนึ่ง ยิ่งเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลานาน ก็จะมีมีความรุนแรงมากขึ้น และมีแนวโน้มที่จะส่งผลให้เซลล์มีเมแทบอลิซึมที่ผิดปกติ จนนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ (Sigler และคณะ, 1999) ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดดังกล่าว ย่อมส่งผลให้มีการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด รวมถึง GST ในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย และอาจทำนายได้ว่า ยีน PCC1478_0647 น่าจะมีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะเครียดร่วม ที่มีความรุนแรงมาก ในขณะที่ PCC7418_3557 ซึ่งมีการแสดงออกลดลง เมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดร่วม ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ อาจเป็นเพราะกลไกการปรับการแสดงออกของเซลล์ โดยมีการแสดงออกยีน PCC1478_0647 มาตอบสนองมากขึ้นแทนก็เป็นได้

จากการทำ RT-PCR ภายใต้ภาวะเครียดทั้ง 3 ภาวะ พบว่าไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน 3 ยีน ได้แก่ PCC7418_1478 และ PCC7418_2276 โดยยีน PCC7418_1478 เป็นยีนกำหนดรหัส GST เพียงยีนเดียวที่ไม่พบการแสดงออก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า (1) ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในระดับต่ำมากจนไม่

สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีนี้ หรือ (2) ยีนนี้อาจถอดรหัส หรือตอบสนองต่อภาวะเครียดอื่น นอกเหนือจากภาวะเครียดที่ใช้ทดลองในครั้งนี้ หรือ (3) อาจเป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (cryptic gene) หรือ (4) เป็นยีนที่ไม่มีการแสดงออกในระดับการถอดรหัส (silent gene) ซึ่งอาจต้องใช้การเหนี่ยวนำที่จำเพาะเป็นพิเศษ จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ (Ochi, 2017) ส่วนยีน PCC7418_2276 ซึ่งเป็นยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase ที่สามารถตัดหมู่ L-glutamate ออกจากโครงสร้างของกลูตาไธโอนในผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการคอนจูเกต (conjugated product) ได้ ซึ่งเคยสันนิษฐานไว้ในช่วงต้น ตามที่บรรยายไว้ในส่วนที่ 4.1 ว่า น่าจะมีการแสดงออกเพื่อเปลี่ยนส่วนที่เหลือให้เกิดปฏิกิริยาต่อจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดเมอร์แคปทริก ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำลงและสามารถถูกขับออกจากเซลล์ หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ (Hinchman และ Ballatori, 1994) แต่กลับไม่พบการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเซลล์ภายใต้ภาวะเครียดทั้ง 3 ภาวะ อาจเป็นเพราะ *Halotheca* sp. PCC7418 มีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยาคอนจูเกตขึ้นกับกลูตาไธโอนแล้ว แต่หลังจากการคอนจูเกตแล้ว มีกลไกในการกำจัดผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการคอนจูเกต ด้วยปฏิกิริยาอื่น โดยไม่ผ่านการเปลี่ยนเป็นกรดเมอร์แคปทริก ทำให้ไม่เห็นการแสดงออกของยีน PCC7418_2276 โดยยีนดังกล่าวอาจยังมีบทบาทหน้าที่อื่น ในวิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอนตามปกติ ยกเว้นในด้านการกำจัดสารอนุมูลอิสระ หรือการตอบสนองต่อภาวะเครียดที่ศึกษาก็คงเป็นได้ ทั้งนี้ ยังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาบทบาทโดยละเอียดของทั้งยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase แต่ละยีนที่ชัดเจน ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐาน และมีความสำคัญในการแสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ, ภาวะเครียดจาก oxidative stress และภาวะเครียดแบบ combined stress ซึ่งการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอื่นๆ รวมทั้งลักษณะเชิงสมบัติของเอนไซม์ (functional characterization) ของ GST และ GGT/glutathione hydrolase ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ ควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศของจีโนมสมบูรณ์ ในไซยาโนแบคทีเรีย *Halotheca* sp. PCC7418 พบว่ามียีนกำหนดรหัส GST ทั้งหมด 4 ยีน คือ PCC7418_0647, PCC7418_0729, PCC7418_1478 และ PCC7418_3557 ส่วนยีนกำหนดรหัส GGT/glutathione hydrolase มี 1 ยีน คือยีน PCC7418_2276 ซึ่งทั้งหมดมีความเกี่ยวข้องกับวิถีเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน ในด้านการตอบสนองต่อภาวะเครียดและกำจัดสารพิษโดยใช้ปฏิกิริยาเอส-กลูตาไธโอนิเลชัน และเมื่อทำนาย GO function พบว่า GST มีฟังก์ชันระดับโมเลกุล เกี่ยวข้องกับทรานสเฟอร์ส แอคทีวิตี ส่วน GGT/glutathione hydrolase มีฟังก์ชันระดับโมเลกุลเกี่ยวข้องกับกลูตามิลทรานสเฟอร์สและทรานสเพปทีเดส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับกรดอะมิโน โดยทำการ blast protein กับฐานข้อมูล NCBI จากนั้นจัดเรียงเทียบลำดับกรดอะมิโนและสร้าง phylogenetic tree พบว่า GST ส่วนใหญ่มีความใกล้ชิดกับไซยาโนแบคทีเรีย *Dactylococcopsis salina* ยกเว้น PCC7418_1478 ที่ใกล้ชิดกับ unclassified cyanobacteria SW-9-44-58 มากที่สุด แต่ทั้งหมดไม่มีความใกล้ชิดกับ GSTA1 ในมนุษย์ แม้ว่าผลการเปรียบเทียบข้อมูลจะระบุว่า GST ที่แสดงออกจากยีนกำหนดรหัสทั้ง 4 ยีน ถูกจัดให้อยู่ใน GSTA superfamily ก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่า GST เป็นเอนไซม์ที่มีความหลากหลาย และมีความซับซ้อนของการวิวัฒนาการมาก ส่วน GGT/glutathione hydrolase มีความใกล้ชิดกับ *Euhalotheca* sp. KZN001 มากที่สุด

จากการทดลองศึกษาการเจริญของ *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress พบว่า ยังมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น เซลล์จะมีอัตราการเจริญ และอัตราการสร้างรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงตามลำดับ โดยสามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 1.813 มิลลิโมลาร์ หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเท่ากับ 1.807 มิลลิโมลาร์ หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การศึกษาลักษณะวิทยาของ *Halotheca* sp. PCC7418 หลังจากเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียด พบว่า ทั้งเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะจากเกลือ และภาวะเครียดจาก oxidative stress มีขนาดของเซลล์ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเครียดนานขึ้น จะมีการสะสมของไฟโคไซยานินเพิ่มขึ้น เห็นได้จากการมีสีน้ำเงินสะสมมากขึ้นในเซลล์ ซึ่งเป็นหนึ่งในผลของการปรับตัวของเซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอดและเจริญต่อไปได้ภายใต้ภาวะเครียดนั้น

การทำ semiquantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase ใน *Halotheca* sp. PCC7418 ภายใต้ภาวะเครียด พบว่า ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ ยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ โดย PCC7418_3557 เป็นยีนที่มีระดับการแสดงออกสูงสุด หลังเลี้ยงภายใต้ภาวะเครียดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าภาวะปกติ ถึงประมาณ 11 เท่า แสดงให้เห็นว่า ยีนดังกล่าวมีบทบาทมากที่สุดในการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากเกลือ แต่เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ลดลง โดยยีน PCC7418_0647 มีการแสดงออกลดลงจนมีระดับการแสดงออกต่ำกว่าภาวะปกติ, ยีน PCC7418_0729 มีการแสดงออกลดลง แต่ยังเป็นระดับที่มากกว่าภาวะปกติ และยีน PCC7418_3557 มีระดับการแสดงออกลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกับภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าแต่ละยีนมีการลดลงของการแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการปรับตัวของเซลล์ให้สามารถอยู่รอดในภาวะเครียดนั้นได้แล้ว ส่วนภายใต้ภาวะเครียดจาก oxidative stress พบว่า ยีน PCC7418_0647, PCC7418_0729 และ ยีน PCC7418_3557 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยยีน PCC7418_0647 มีระดับการแสดงออกมากที่สุดเมื่อเทียบกับยีนอื่นๆ โดยรูปแบบการแสดงออกของ PCC7418_0729 พบการแสดงออกสูงสุด เมื่อได้รับความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 1.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเท่ากับค่า IC_{50} ส่วนยีน PCC7418_0647 และ PCC7418_3557 มีรูปแบบการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งการแสดงออกของยีนดังกล่าวก็สอดคล้องกับข้อมูลจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ที่พบว่า GST ใน *Halotheca* sp. PCC7418 เป็น GSTA superfamily หรือ GST ที่มีความใกล้ชิดกับคลาส Alpha ซึ่งเป็น GST กลุ่มที่มีคุณสมบัติพิเศษสามารถมีการแสดงออกของเพอร์ออกซิเดส แอคทิวิตี (peroxidase activity) ได้ (Pandey และคณะ, 2015b) และในส่วนภาวะเครียดร่วมจากเกลือและ oxidative stress พบว่า ยีน PCC7418_0647 และ PCC7418_0729 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สำหรับยีน PCC7418_3557 พบว่าการแสดงออกไม่แตกต่างกับภาวะปกติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นไม่มากกว่าค่า IC_{50} แต่มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นสูงกว่าค่า IC_{50} โดยยีน PCC7418_0647 มีการแสดงออกมากที่สุดเช่นเดียวกันกับภาวะเครียดจาก oxidative stress แสดงให้เห็นว่ายีน PCC7418_0647 เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะเครียดที่มีพื้นฐานจาก oxidative stress และภาวะเครียดที่มีความรุนแรงมาก ส่วนยีน PCC7418_1478 และ PCC7418_2276 ไม่พบการแสดงออกของยีน ภายใต้ภาวะเครียดทั้ง 3 ภาวะ ซึ่งเป็นไปได้ว่า ยีนทั้งสองนี้ อาจมีการแสดงออกในระดับต่ำมาก จนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีดังกล่าว หรืออาจเป็นยีนที่มีหน้าที่ตอบสนองต่อภาวะอื่นอย่างจำเพาะ โดยไม่ตอบสนองต่อภาวะเครียดที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ หรือยีนดังกล่าว อาจเป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (cryptic gene) หรือเป็นยีนที่ไม่มีการแสดงออกในระดับการถอดรหัส (silent gene) ซึ่งอาจต้องการเหนี่ยวนำที่จำเพาะเป็นพิเศษ จึงจะสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ ซึ่งการศึกษาโดยใช้วิธี semiquantitative เป็นวิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนในเบื้องต้น แต่ก็ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ, ภาวะเครียดจาก oxidative stress และภาวะเครียดร่วม ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาในด้านต่างๆ ทั้งการวิเคราะห์ลักษณะเชิงสมบัติและบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ โดยอาศัยเทคนิค วิธีการที่แตกต่างออกไป รวมถึงการแสดงออกของยีนในระดับอื่นๆ ที่ควรได้รับการศึกษาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., Bentabet, A. E. and López-García, P. (2014). "Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs." *Extremophiles*. 18(6): 1035-47.
2. Asad, N. R., Asad, L. M. B. O., Almeida, C. E. B. D., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J. B. and Leitão, A. C. (2004). "Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome." *Genetics and Molecular Biology*. 27: 291-303.
3. Board, P. G. and Menon, D. (2016). "Structure, function and disease relevance of Omega-class glutathione transferase." *Archives of Toxicology*. 90(5): 1049-1067.
4. Cameron, J. C. and Pakrasi, H. B. (2010). "Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." *Plant Physiol*. 154(4): 1672-1685.
5. Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E. and Kotzabasis, K. (2007). "Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus—The protective role of polyamines." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1767(4): 272-280.
6. Elanskaya, I. V., Zlenko, D. V., Lukashev, E. P., Suzina, N. E., Kononova, I. A. and Stadnichuk, I. N. (2018). "Phycobilisomes from the mutant cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 missing chromophore domain of ApcE." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1859(4): 280-291.
7. Fonseca, R. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Vasconcelos, V. and Antunes, A. (2010). "Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases." *BMC Evol Biol*. 10:281.
8. Hiesinger, M., Loeffert, D., Ritt, C. and Oelmüller, U. (2001). "The effects of phenol on nucleic acid preparation and downstream applications." *Qiagen-news*. 5: 23-26.

9. Hinchman, C. A. and Ballatori, N. (1994). "Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process." *J Toxicol Environ Health*. 41(4): 387-409.
10. Ho, M.-Y., Soulier, N. T., Canniffe, D. P., Shen, G. and Bryant, D. A. (2017). "Light regulation of pigment and photosystem biosynthesis in cyanobacteria." *Current Opinion in Plant Biology* 37: 24-33.
11. Jacob, J. H., Hussein, E. I., Shakhathreh, M., and Cornelison, C. T. (2017). "Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing." *Microbiology Open*. 6(5).
12. Joset, F., Jeanjean, R. and Hagemann, M. (1996). "Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: Deciphering the molecular events." *Physiology Plantarum*. 96: 738-744.
13. Koodkaew, I., Matsuyama, S., Sunohara, Y. and Matsumoto, H. (2012). "Hapalocyclamide: a novel phytotoxic hexapeptide of the cyanobacterium *Hapalosiphon* sp." *Tetrahedron Lett*. 53: 977-979.
14. Labrou N. E., Papageorgiou, A. C., Pavli, O. and Fliemetakakis, E. (2015). "Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response." *Curr Opin Biotechnol*. 32:186–194.
15. Laloknam, S. (2011). "Adaptation of Cyanobacteria under Salt stress condition." *J Res Unit Sci Technol Environ Learning*. 2(1): 82-88.
16. Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C. (2008). "Oxidative stress in cyanobacteria." *FEMS microbiology reviews*. 33(2): 258-78.
17. Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C. and Bao, Y. (2015). "A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*." *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 118: 47-54.

18. Lyu, K., Gu, L., Li, B., Lu, Y., Wu, C., Guan, H. and Yang, Z. (2016). "Stress-responsive expression of a glutathione S-transferase (delta) gene in waterflea *Daphnia magna* challenged by microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*." *Harmful Algae* 56: 1-8.
19. Mashiyama, S. T., Malabanan, M. M. and Akiva, E. (2014). "Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere." *PLoS Biol.* 12:1–19.
20. Morel, F. and Aninat, C. (2011). "The glutathione transferase Kappa family." *Drug Metabolism Reviews.* 43:2, 281-291.
21. Nebert, D. W. and Vasiliou, V. (2004). "Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family." *Human genomics.* 1(6): 460–464.
22. Ochi, K. (2017). "Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects." *J antibiot.* 70: 25–40.
23. Pandey, T., Singh, S. K., Chhetri, G., Tripathi, T. and Singh, A. K. (2015a). "Characterization of a highly pH stable Chi-class glutathione S-transferase from *Synechocystis* PCC 6803." *PLoS ONE* 10(5): e0126811.
24. Pandey, T., Chhetri, G., Chinta R., Kumar, B., Singh, D. B., Tripathi, T. and Singh, A. K. (2015b). "Functional classification and biochemical characterization of a novel rho class glutathione S-transferase in *Synechocystis* PCC 6803." *FEBS Open Bio* 5: 1-7.
25. Pandey, T., Shukla, R., Shukla, H., Sonkar, A., Tripathi, T., Singh, A. K. (2017). "A combined biochemical and computational studies of the Rho-class glutathione s-transferase sll 1545 of *Synechocystis* PCC6803." *Int L Biol Macromol* 94(Pt A): 378-385.
26. Perperopoulou, F., Pouliou, F. and Labrou, N. E. (2018). "Recent advances in protein engineering and biotechnological applications of glutathione transferases." *Critical Reviews in Biotechnology* 38(4): 511-528.

27. Pophaly, S., Poonam, S., Pophaly, S., Kapila, S., Nanda, D., Tomar, S. and Singh, R. (2017). "Glutathione biosynthesis and activity of dependent enzymes in food-grade lactic acid bacteria harbouring multidomain bifunctional fusion gene (*gshF*)." J Appl Microbiol. 123: 194-203.
28. Pugazhendhi, A., Dhanarani, S., Shankar, C., Prakash, P., Ranganathan, K., Saratale, R. G. and Thamaraiselvi, K. (2017). "Electrophoretic pattern of glutathione S-transferase (GST) in antibiotic resistance Gram-positive bacteria from poultry litter." Microbial Pathogenesis. 110: 285-290.
29. Rivera, A. T. and Landa, A. (2008). "Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme." Arch biochem biophys. 477(2): 372-378.
30. Rosen, B. and Mares, J. (2016). "Catalog of microscopic organisms of the everglades, part 1-the cyanobacteria." U.S. Geological Survey Open-File Report. 1114:7-8.
31. Rym, B. D. (2012). "Photosynthetic behavior of microalgae in response to environmental factors." Applied Photosynthesis. 10.5772/27944.
32. Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H. and Meddows-Taylor, S. (2017). "Diversity analysis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a south african saltpan." Molecules. 22(4).
33. Shih, P. M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K. W., Han, C. S., Rubin, E. M., Eisen, J. A., Woyke, T., Gugger, M. and Kerfeld, C. A. (2013). "Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110(3): 1053-1058.

34. Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N. and Höfer, M. (1999). "Oxidative stress in microorganisms--I. Microbial vs. higher cells--damage and defenses in relation to cell aging and death." *Folia Microbiol (Praha)*. 44(6): 587-624.
35. Song, Y., Fahs, A., Feldman, C., Shah, S., Gu, Y., Wang, Y., Machado, R. F., Wunderink, R. G. and Chen, J. (2013). "A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards." *Springer Plus*. 2: 616.
36. Theoharaki, C., Chronopoulou, E., Vlachakis, D., Ataya, F. S., Giannopoulos, P., Maurikou, S., Skopelitou, K., Papageorgiou, A. C., and Labrou N. E. (2019). "Delineation of the functional and structural properties of the glutathione transferase family from the plant pathogen *Erwinia carotovora*." *Functional & Integrative Genomics*. 19(1): 1-12.
37. Thomas, C., Ionescu, D. and Ariztegui, D. (2015). "Impact of paleoclimate on the distribution of microbial communities in the subsurface sediment of the Dead Sea." *Geobiology*. 13(6): 546-561.
38. Tossounian, M. A., Wahni, K., Van Molle, I., Vertommen, D., Astolfi Rosado, L. and Messens, J. (2018). "Redox regulated methionine oxidation of *Arabidopsis thaliana* glutathione transferase Phi9 induces H-site flexibility." *Protein Sci*. 28(1): 56-67.
39. Townsend, D. M. and Tew, K. D. (2002). "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance." *Oncogene* 22: 7369.
40. Uys, J. D., Xiong, Y. and Townsend, D. M. (2011). "Chapter eighteen - nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase." *Methods in Enzymology*. P. M. Conn, Academic Press. 490: 321-332.
41. Wada, N., Sakamoto, T. and Matsugo, S. (2013). "Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress." *Metabolites*. 3(2): 463-483.

42. Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Sopun, W., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2014). "Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of Mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*." *Applied and environmental microbiology*. 80(5), 1763-1769.
43. Wiktelius, E. and Stenberg, G. (2007). "Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates." *J Biol Chem*. 406(1): 115-123.
44. Xu, J., Xing, X., Tian, Y., Peng, R., Xue, Y., Zhao, W. and Yao, Q. H. (2015). "Transgenic *Arabidopsis* Plants Expressing Tomato Glutathione S-Transferase Showed Enhanced Resistance to Salt and Drought Stress" *PLoS One*. 10(9): e0136960.
45. Zhang, J., Ye, Z. W., Singh, S., Townsend, D. M. and Tew K. D. (2018a). "An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation." *Free Radical Biology and Medicine* 120: 204-216.
46. Zhang, J., Ye, Z. W., Chen, W., Manevich, Y., Mehrotra, S., Ball, L., Janssen-Heininger, Y., Tew K. D. and Townsend D. M. (2018b). "S-glutathionylation of estrogen receptor alpha affects dendritic cell function." *J Biol Chem* 293(12): 4366-4380.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

สูตรอาหาร BG-11 ที่มีการเติม Turk solution สำหรับเลี้ยง *Halotheca* sp. PCC7418

ภายใต้ภาวะปกติ (0.5M NaCl) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

NaNO ₃	1.500	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.004	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 citrate	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

ภายใต้ภาวะเครียด (2M NaCl) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

NaNO ₃	0.750	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.002	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0375	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.018	กรัม
Na ₂ CO ₃	0.010	กรัม
EDTA disodium salt	0.0005	กรัม
Citric acid	0.003	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.003	กรัม
Trace element A5+Co		
H ₃ BO ₃	1.415	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.905	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.110	กรัม
NaMoO ₄ ·5H ₂ O	0.195	กรัม
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0395	กรัม
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0245	กรัม

Turk solution

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

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

ประกอบด้วย

Tris base	48.4	กรัม
EDTA	3.72	กรัม
Acetic acid	11.4	มิลลิลิตร

1.2% agarose gel

ผงอะกาโรส	0.48	กรัม
1X TAE buffer	40	มิลลิลิตร

ละลายผงอะกาโรสโดยอุ่นร้อน ที่ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลง แล้วเติมสี SYBR[®] Safe DNA gel stain

ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน

0.1% DEPC water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ภาคผนวก ข.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase

ใน *Halotheca* sp. PCC7418

แถบสีเหลือง และสีเขียว หมายถึงบริเวณที่ไพรเมอร์ชุดที่ 1 และ 2 จับตามลำดับ

1.) PCC7418_0647 (552 นิวคลีโอไทด์)

atgcttaaactatatggtgcaaccagaaatcgcgccgcatcgcgcatggtatttagaagaactgaaagttccctacgaatttgttgaact
 ggatatggcaaatggggaacatcgcaaccaccatttcttctattaaccccatgggaaaagtcccgcgattgaagataatggcttttctt
 tatgggagtcgggagcaattctttatatttagccgatcactacgaacccgaaccactaactccacaaaaacgggcaattctgaatcaatg
 gattttattgcaattcaacccttagcattggtattttatcgagagtaaccgcatgaatgaaatgcaaaaactcttcccccttaaacga
 tcatttaaccaacacgactacttagttgatgatcaatttagtgctgctgatgttgctgctggggcttatttagcttatatgccagaatgta
 caactggattttccgactatcctgctattgctaaatatgtggaaaatctctcccaacgctctgcatttaaaacaggaatgggcttctaa

2.) PCC7418_0729 (1,200 นิวคลีโอไทด์)

atgcaggcactgagttgggaagaattagaaaaccgtacaaatttgaaattgatcgcttaatggaccgacgaatgcacaatctcgttac
 gcttatttgggcgcatgaatcggaggttcgagtgacgttataaccgtgacatcatgcttggtgcccctattgtcagaaagtttggtatggtt
 agaagaaaaacaagttccctatcgtgtggaaaaagtcacgatgtttgctatggggataaagagcgttggtataagcagattgttccctcag
 ggatgttacctgcgttaaaactcgatgatcgtttgcttactgaaagtgatgatatttaagccaacttgagcaaaccttcggaacgctgggtt
 atagtatgaacgatcgccagatttccctacggaagttagaacgactgttatttcgggctggtgtagttggttatgtttcctgcgcatc
 gcgccgtgaagaccagtataaccgcaacagtttacggatgtggtctccaagttgaggacgcgctacaacaaaccgggtccttattt
 ccgagacagcttagcattattgatcttatcttaccctgttctggaacggatgaacgcaagttattctattacaaagggtactccctacg
 agaagaaaaccctcaactgggcttatggttgatgggatggaacagcagatccacctatcgcggaacgcaaagtatttcataccacggtt
 catgatttacccccacagatgggctgctatgctaaccgatgaaccgcaacaaaactgaatcaagcacgggtggatcagggaccttgg
 ctagtttacctgatgtagtatcctgaacccgaaacctcgcgagaagaagccttacaacgggttttaagcatcgagagaactgttaa
 acgtgaatccagcctcagaagacttattgaggaagccttgcgctgctgcttaaccaatttgattactggtgaagtgttctcccctgctg
 gatcagcatctgcattaagatatttgcgcatcgctgagtggtccttagagatatgctgatttatgcagcaaacgcttacgagaagcctta

gaaaacaccgccagcttagctggagacgaacaaggaacaccgattccagttcgacatcgcgcatcaagatcccgcgaattttgcaaa
agtttga

3.) PCC7418_1478 (561 นิวคลีโอไทด์)

atgaaactttattatcttccgtaaacccgagccagtcgcctcattggctattagaaggaactggaaatttccatgaattaattcaagtgc
ccctgatgaaatgtcggagaaccagaatataaaggactccatcctcatggaagattccagtttagttgatgataatcacaattcatg
aatctgctggaatttgcttatttagccgatcaatatcctgataaacaactgctcctctcttatgagctccgcaagaggctattattac
aatggtgtttatgctgctgacgttagaacctcctgtggaacgatatcttttcatgttttccctcattgtcagagaaagtattacctgat
agtgaatatgaaaaccttctaaggacgaaacattacactggttgaaaagtctgtcaaccctcaatgaccactaaaagagaatcaa
tatctcgtgaaatcaattacgctgctgatgttattacaggtggtgtttgtttggcggtcaaaataggattactaaaaagaacccc
cgtga

4.) PCC7418_2276 (1,605 นิวคลีโอไทด์)

gtgaaactcgatcccgatcaattaagttactcccctatccctccaacgtcgcttatgctgggaagccgttgggctgtggcaaccagtc
aacggttagccagtttagcgggaatggaatgtaatggcaggaggaagcgcgatcgatgctgctgttggcatggcgattacgttaacggtt
gttgaaccaacatcgaatgggattggtgggatgctctggttagtatgggatggtcagcttcacggcttaaatggatcgggaaaaagccc
gcaagggttaactcaagaacaattaatcgggaacggaaaaaactcgtctcgttggcaatggtcacggttccaggtgcagtctcaaca
tggcgggagttatggaatcaatgggaaaaactgcctttgaacaattatttggcccagcaatacggtagcagaagaaggctttcccgtttc
tctgtcaccgcttagcttgcaacaagccgaggtcattatttacttggatgcccagaatatcaagcatttaaggaagtgttttccc
ttatcaacgcgccccaaaagtgggagaaatttgcgagctcccctcatgcaaaaacttaagcgcgatcgcgaaaactggaggagaag
catttatcaaggagaattagcggaaaaatcgcgaatttctgctgtaatacaggggttctcagcaagaagacttcaacaacacc
aacccgaatgggttaaaccttgcacaacctatcgcgatcgcgagttgggaactcccctaacttcaaggatagcaacctcat
tgccttaaacctcctagaaggctttgatctcaagtcgattccctacgacagcgaacaacgctatcactggcaattgaagcaatgaaactt
gcctttgctgataaccgttatctgagcgcgacccaattggatgaaaattgataacgaaacctactatctgctaaaaataccaacagc
gtcggcaactgattagtgaacaagccattaccgatattcaacctagtttctgatcacggtacggttatttaaccgcttctgatgggatt
aatggtgctctgatccaatctaactatgaaggcttggcagtggtatttagttccagaacggggattgcattacataatcaggcagttgt

ttaatttagaaccaaacatcccaacgctttgccctggaaaacgtccctttcataccattatgcctggctttctgagcaaagatgacc
 aaccgtaggcccatttgggtaatggggggacaaatgcagcccaaggtcatttacaagttgatctaatttggctgattacgagatgaac
 ccgcaaaccgacctagatgccctcgtggcttatttaaatgatcaacgagtcgttttagaaacaggcattccttcagaagtcagatttc
 tctctccaacggggtcatgaagtgagagttaatcccagtaaagggtgtttggcaaaggacaaatgattctcaggcaaaatggggttttg
 ttgctgcttctgaacctcgcgctgatggggttgcctcgcctatgtaa

5.) PCC7418_3557 (801 นิวคลีโอไทด์)

atgtagaactttatcaatttgaactctccaatatacgcaaaaagtcggttttctctcgattacaaaggcttagaataaccgtaaaattga
 agtgactccgggggttgacaagtggaggtctatcaaatgtctggacagcgacaagttcccgttctcaaagatggggaaccggttgcgc
 gactccactgaaatcgccatgtatttggaacgcacctatcctgaacgtcccctgattcccaccgagcgaaaagaaaggattaacctta
 ttaatggaagaatgggctgatgaatccattggcttaaaaagtagaaaagcctttatggggcgctaaaccgcaatgaagccctacgct
 gcggtcttaccgccaagaaccccagatttgcagaagcattgtcagtcgattccttctgatttcttagacgttttagaacaggtgtcggc
 attgggggagatgccctaaaagcgttgaaggtagcctcaagcaagatttagaggcgtgtgttaattttagaagaacaaccctatctca
 cgggtgcagttcccaccttgctgatttactgtggcaagctgagttattattaaaattcccagaagaatcctatagatattcccagtc
 aactggcggggaagccctccctgcttggagataaccctgcgtttgaacctttcttacgtggcgcgatcgtctctatcgagaatatcgtc
 aaccactgttcccagcagccgtagcgcaccagcacctctgcaccagttctattgaaattgagtaa

ลำดับกรดอะมิโนของ GST และ GGT/glutathione hydrolase ใน *Halotheca* sp. PCC7418

1.) PCC7418_0647 (183 residues)

MLKLYGATRSRAAIARWYLEELKVPYEFVELDMANGEHRKPPFLAINPMGKVPAIEDNGFSLWESGAILLYLA
 DHYEPEPLTPQKRAILNQWILFANSTLSIGIFIESNRDNEMPKLFPPLNDHLTQHDYLVDDQFSAADVAVGAY
 LAYMPRMLQLDFSDYPAIAKYVENLSQRPAFKTGMGF

2.) PCC7418_0729 (399 residues)

MQALSWELENRTNFEIDRVNGPTNAQSRLRLFGRDESEVRVTLYRDHAWCPYCQKWWLWLEEKQVPYR
 VEKVTMFCYGDKERWYKQIVPSGMLPALKLDDRLLTESDDILSQLEQTFGTLGYSMNDRASIALRKLERLLFR

AWCSWLCVPARSRREDQYNRQQFTDVVSQVEDALQQTPGPYFRDSFSIIDLIFTPFLERMNASLFYYKGYSL
 REENPQLGLWFDGMEQRSTYRGTQSDFHTHVHDLPPQMGGCYANDEPQTKLNQARVDQGPWLGLPDVM
 YPEPETSREEALQRVLKHRENLLNVNPAEDLFEEALRCALTNLITGEVCSPPAGSASALRYLRDRVSVPRDMS
 IYAAKRLREALENTASLAGDEQGTPIPVRRHRDQDPANFAKV

3.) PCC7418_1478 (186 residues)

MKLYYLPLTRASRPHWLLLEELEISYELIQVTPDEMSEKPEYKGLHPHGKIPVLVDDNITIHESAGICAYLADQYP
 DKQLAPSLMSPARGYYYQWLFYAAVTLEPPVERYLFHVFPHLSEKVLDPSEYENLSKDETLHWFGKVCQPLN
 DHLKENQYLVENQFTAADVITGGVLFWAFKIGLLKKKPP

4.) PCC7418_2276 (534 residues)

MKLDPDQLSYYPYPSQRRVMLGSRWAVATSQPLASLAGMEMLMAGGSAIDAAVAMAITLTVVEPTSNIGIGG
 DACGLVWDGQLHGLNGSGKSPQGLTQEQFNRRERKTRLGWSMVTVPGAVSTWRELWNQWGLKLPFEQLF
 APAIRYAEEGFPVSPVTALAWQQAEAHYLHLDAPYQAFKEVFFPYQRAPKVGEIWRSPHAKTLSAIAQTGG
 EALYQGELAIEKIANFAANTGGFLTQEDFKQHQPWWKPISTTYRDLRWELPPNFQGIATLIALNLLEGFDLK
 SIPYDSEQRYHWQIEAMKLAFAFINRYLSDPNWMKIDNETLLSAKNTQORRQLISEQAITDIQPSFPDHGTVY
 LTASDGDLMVSLIQSNYEGFGSGILVPETGIALHNRGSCFNLEPNHPNAFAPGKRPFHTIMPGLSKDDQPLG
 PFGVMGGQMOPQGHLLQVSNLADYEMNPQTALDAPRWRYLNDQRVVLETGIPSEVMISLSQRGHEVRVN
 PSKGMFGKGMILRQNGVFVAASEPRADGVALAM

5.) PCC7418_3557 (266 residues)

MLELYQFELSQYSEKVRFLLDYKGLEYSRKEIVTPGVGQVEVYQMSGQRQVPVLKDGETVVADSTEIAMYLERT
 YPERPLIPTAAKEKGLTLLMEEWADESIGLKSRAFMGALNRNEALRAAVLPPETPDFVRSIVSAIPSDFLDVLG
 TGVGIGGDALKAIEGSLKQDLEALCLILEEQPYLTGAVPTLADFTVASLSLLLKFPEESYMDIPSQLAGKALPGL
 GDNPAFEPFFTWRDRLYREYRQPTVPSSRSDTSTSAPSSIEIE

ภาคผนวก ค.

ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนาโนทรอป จากการสกัด total RNA

ภาวะเครียด ที่ใช้ในการเลี้ยง	ชุดทดลองย่อย	ความเข้มข้นของ RNA (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
salt stress	0 hour	979.40	2.06	2.14
	6 hour	983.65	2.06	2.01
	12 hour	876.60	2.09	1.99
	24 hour	1,984.00	2.03	1.94
oxidative stress เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	0.0 mM H_2O_2	556.65	ND	ND
	0.9 mM H_2O_2	426.35	ND	ND
	1.8 mM H_2O_2	1,060.50	ND	ND
	2.7 mM H_2O_2	124.3	ND	ND
oxidative stress เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	0.0 mM H_2O_2	984.35	2.45	1.68
	0.9 mM H_2O_2	984.25	2.45	1.53
	1.8 mM H_2O_2	973.80	2.50	1.82
	2.7 mM H_2O_2	1,133.25	2.45	1.74
combined stress เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	0.0 mM H_2O_2	1,105.05	2.00	1.70
	0.9 mM H_2O_2	988.75	1.96	1.73
	1.8 mM H_2O_2	1,776.30	2.02	1.87
	2.7 mM H_2O_2	1229.55	2.03	1.89

* ND: not determined

ผลการเปรียบเทียบความเข้มของ band ที่ได้จากการทำ RT-PCR

1. Salt stress

2M NaCl: sampling at 0, 6, 12 and 24 hours

AprnpB (internal control)

treatment	0 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.
run 1	1.00	1.10	0.82	0.80
run 2	1.00	1.16	0.86	0.99
run 2	1.00	1.22	1.06	0.72
average	1	1.16	0.91	0.84
SEM	0	0.03	0.07	0.08

3557

treatment	0 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.
run 1	1.00	10.87	2.57	2.07
run 2	1.00	5.74	0.96	0.82
run 2	1.00	16.96	7.15	1.59
average	1	11.19	3.56	1.49
SEM	0	3.24	1.85	0.36

0729

treatment	0 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.
run 1	1.00	1.78	2.27	2.13
run 2	1.00	1.53	2.02	1.65
run 2	1.00	3.30	2.74	1.85
average	1	2.20	2.34	1.88
SEM	0	0.55	0.21	0.14

0647

treatment	0 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.
run 1	1.00	1.19	0.43	0.37
run 2	1.00	1.20	0.45	0.40
run 2	1.00	1.15	0.36	0.34
average	1	1.18	0.41	0.37
SEM	0	0.02	0.03	0.02

1478

No specific bands detected

2276

No specific bands detected

2. Oxidative stress

0.5M NaCl with 0.0, 0.9, 1.8, 2.7 mM H₂O₂: sampling at 6 hours*AprnpB* (internal control)

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	1.19	0.91	0.80
run 2	1.00	1.28	1.05	0.74
run 2	1.00	1.35	1.33	0.90
average	1	1.27	1.10	0.81
SEM	0	0.05	0.12	0.05

3557

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	1.05	1.63	2.44
run 2	1.00	1.12	2.12	3.52
run 2	1.00	1.23	2.12	3.86
average	1	1.13	1.96	3.27
SEM	0	0.05	0.16	0.43

0729

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	1.09	2.01	0.86
run 2	1.00	1.01	2.37	0.57
run 2	N/A*	N/A	N/A*	N/A
average	1	1.05	2.19	0.72
SEM	0	0.06	0.25	0.21

* band ที่ความเข้มข้น 0.0 และ 1.8 mM H₂O₂ ไม่ขึ้น ทำให้เปรียบเทียบปริมาณไม่ได้

0647

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	2.04	3.79	3.54
run 2	1.00	2.34	3.83	3.68
run 2	1.00	3.21	5.41	4.68
average	1	2.53	4.34	3.97
SEM	0	0.61	0.92	0.62

1478

No specific bands detected

2276

No specific bands detected

3. Combined stress

2M NaCl with 0.0, 0.9, 1.8, 2.7 mM H₂O₂: sampling at 6 hours

AprmpB (internal control)

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	0.82	1.11	0.90
run 2	1.00	1.18	0.81	0.97
run 2	1.00	0.72	1.33	0.90
average	1	0.91	1.08	0.92
SEM	0	0.24	0.26	0.04

3557

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	2.11	0.36	0.01
run 2	1.00	1.20	0.68	0.25
run 2	1.00	1.06	0.64	0.31
average	1	1.46	0.56	0.19
SEM	0	0.57	0.17	0.16

0729

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	2.12	3.00	1.43
run 2	1.00	2.49	3.59	2.27
run 2	1.00	1.40	1.67	1.17
average	1	2.00	2.75	1.62
SEM	0	0.55	0.98	0.57

0647

treatment	0.0 mM H ₂ O ₂	0.9 mM H ₂ O ₂	1.8 mM H ₂ O ₂	2.7 mM H ₂ O ₂
run 1	1.00	1.99	2.82	2.90
run 2	1.00	2.11	2.34	1.56
run 2	1.00	2.11	3.63	5.39
average	1	2.07	2.93	3.28
SEM	0	0.07	0.65	1.94

1478

No specific bands detected

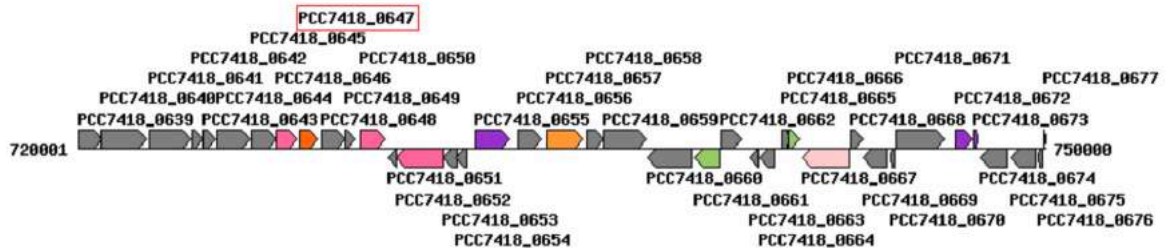
2276

No specific bands detected

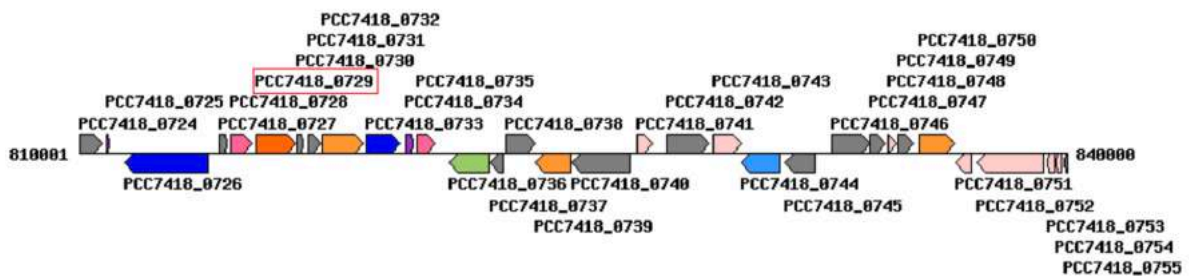
ภาคผนวก ง.

แผนภาพแสดงตำแหน่งที่ตั้งของยีนกำหนดรหัส GST และ GGT/glutathione hydrolase
ในจีโนมสมบูรณ์ของ *Halothece* sp. PCC7418 จากฐานข้อมูล KEGG

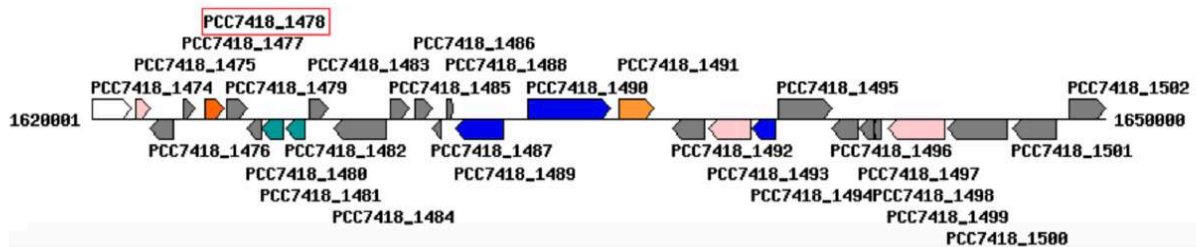
ยีน PCC7418_0647 (GST)



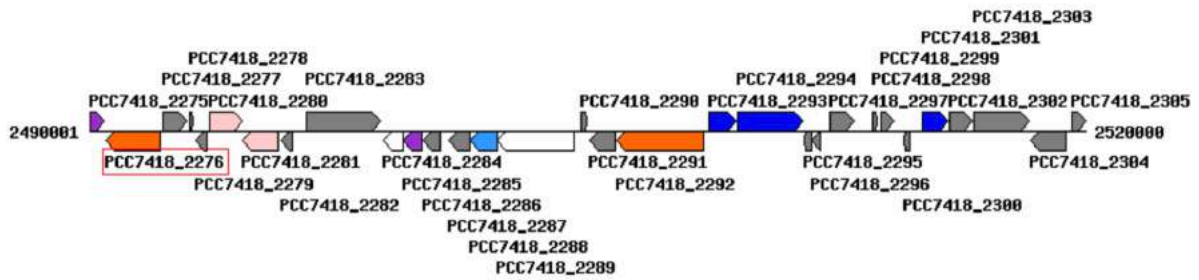
ยีน PCC7418_0729 (GST)



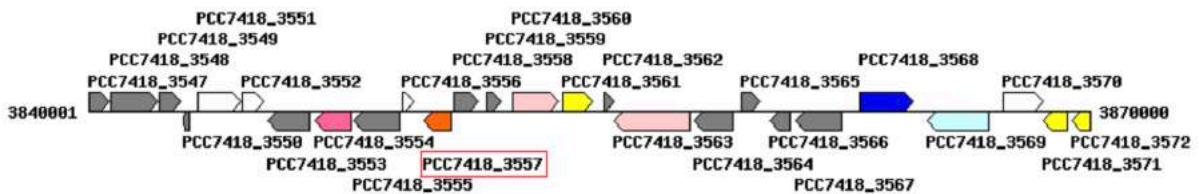
ยีน PCC7418_1478 (GST)



ยีน PCC7418_2276 (GGT/glutathione hydrolase)



ยีน PCC7418_3557 (GST)



ความหมายของสีที่แสดงในแผนภาพ

	Carbohydrate metabolism		Genetic Information Processing
	Energy metabolism		Environmental Information Processing
	Lipid metabolism		Cellular Processes
	Nucleotide metabolism		Organismal Systems
	Amino acid metabolism		Human Diseases
	Metabolism of other amino acids		Unclassified
	Glycan biosynthesis and metabolism		
	Metabolism of cofactors and vitamins		
	Metabolism of terpenoids and polyketides		
	Biosynthesis of other secondary metabolites		
	Xenobiotics biodegradation and metabolism		
	Enzyme families		