



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาบทบาทของไฟโตเคเลตินในการลดพิษ
จากแคดเมียมในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

โดย ดร.เมธา มีแต้ม

กันยายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380056

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาบทบาทของไฟโตเคเลตินในการลดพิษ
จากแคดเมียมในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

ดร.เมธา มีแต้ม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5380056

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาบทบาทของไฟโตคีเลตินในการลดพิษจากแคดเมียมในสาหร่าย

Chlamydomonas reinhardtii

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ดร.เมธา มีแต้ม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : metha.mee@mahidol.ac.th

Project Period : 15 มิถุนายน 2553

ถึงวันที่ 14 กันยายน 2556

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและทั่วโลก การสะสมของโลหะในผลิตภัณฑ์ทางน้ำก่อให้เกิดความวิตกกังวลถึงสุขภาพของผู้บริโภคและอุตสาหกรรมทางด้านนี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว *Chlamydomonas reinhardtii* สะสมแคดเมียมเมื่อสัมผัสกับโลหะชนิดนี้ และแคดเมียมก่อให้เกิดพิษกับปริมาณคลอโรฟิลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่การเจริญที่ลดลงและการตายของสาหร่าย ยีนจำนวน 2 ยีนที่เชื่อว่าเป็น phytochelatin synthase (PCS) ถูกค้นพบในจีโนมของ *C. reinhardtii* เพื่อศึกษาว่ายีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสะสมและ/หรือทนทานแคดเมียมหรือไม่ สาหร่ายถูกนำมาลดการแสดงออกของยีน PCS ด้วย antisense RNA หรือ artificial microRNA อย่างไรก็ตาม transformants ที่ได้ไม่แสดงถึงการลดลงของการแสดงออกของยีน PCS ดังนั้นการทดลองในขั้นต่อไปจึงไม่สามารถดำเนินการได้ ในอีกส่วนหนึ่งของการศึกษานี้ สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ถูกนำมาศึกษาถึงศักยภาพในการดูดซับโลหะแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี จากอาหารที่เติมโลหะ ควบคู่ไปกับความสามารถในการสังเคราะห์ไขมันเพื่อผลิตไบโอดีเซล ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *C. vulgaris* สามารถกำจัดโลหะพร้อมกับผลิตไขมันได้ด้วยอัตราที่สูง

คำสำคัญ : *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, โลหะหนัก, phytochelatin, phytochelatin synthase, ไขมัน, ไบโอดีเซล

Abstract

Heavy metal contamination in water resources is a common problem in Thailand and worldwide. Accumulation of the metals in aquatic products causes serious concerns on consumer health and the industry. This study showed that unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* accumulated cadmium upon exposure to the metal, and cadmium exerted toxicity on chlorophyll content and cellular membrane, leading to growth inhibition and cell death. Two putative phytochelatin synthase (PCS) genes were identified in the genome of *C. reinhardtii*. To examine whether these genes have an important role in cadmium accumulation and/or tolerance, the alga was subjected to antisense RNA or artificial microRNA that was aimed to suppress PCS gene expression. However, the obtained transformants did not exhibit reduced PCS expression, so further experiments could not be carried out. In another part of study, a green alga *Chlorella vulgaris* was examined for its ability to absorb cadmium, copper, and zinc ions from supplemented medium and simultaneously with its ability to synthesize lipid for biodiesel production. The results showed that *C. vulgaris* could remove the metals as well as produce lipid at a high rate.

Keywords : *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, heavy metal, phytochelatin, phytochelatin synthase, lipid, biodiesel

Executive Summary

การปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำเป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งที่พบในประเทศไทยและทั่วโลก โลหะหนักในแหล่งน้ำอาจก่อให้เกิดพิษกับสิ่งมีชีวิตหรืออาจสะสมอยู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแหล่งน้ำนั้นและถูกส่งผ่านไปยังผู้บริโภค งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะเข้าใจถึงกลไกระดับเซลล์ที่ส่งผลต่อความทนทานหรือการสะสมโลหะหนักใน *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบของสาหร่ายสีเขียว ในการศึกษาเบื้องต้น ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของความเข้มข้นแคดเมียมภายนอกเซลล์ต่อการเจริญและการสะสมของแคดเมียมภายในเซลล์สาหร่าย พบว่าแคดเมียมที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 μM ทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญลดลง 5% และ 50% ตามลำดับ การสะสมแคดเมียมทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายลดลง เกิดความเสียหายกับเยื่อหุ้มเซลล์ และมีจำนวนเซลล์ตายมากขึ้น ในการศึกษาช่วงที่สอง ผู้วิจัยต้องการศึกษาบทบาทของยีน phytochelatin synthase (PCS) ในสาหร่าย ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้แสดงว่า PCS ช่วยสังเคราะห์ phytochelatin ที่ทำหน้าที่กักเก็บไอออนของโลหะที่เป็นพิษภายในเซลล์พืช ยีสต์ และสัตว์บางชนิด จากการศึกษาที่พบยีนจำนวน 2 ยีน ในจีโนมของ *C. reinhardtii* ที่มีลำดับคล้ายกับยีน PCS ในสิ่งมีชีวิตอื่น จึงตั้งชื่อว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2* อย่างไรก็ดีตาม เมื่อผู้วิจัยพยายามลดการแสดงออกของยีนทั้งสองเพื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นผลลัพธ์ โดยใช้เทคนิค antisense-mediated gene silencing และ artificial microRNA-mediated gene silencing ซึ่งใช้กันแพร่หลาย แม้ว่าจะได้ transformants แต่ก็ยังไม่พบสาหร่ายที่มีระดับการแสดงออกของ RNA ที่น้อยลง คาดว่าอาจเกิดจากประสิทธิภาพที่ต่ำของเทคนิคดังกล่าวใน *C. reinhardtii* และมีความเป็นไปได้สูงว่าอาจเกิดจากความผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองที่ปรากฏในฐานข้อมูลที่ใช้ด้วย จึงจะต้องมีการตรวจสอบถึงปัญหานี้ และสำรวจ transformants ของสาหร่ายที่ได้จำนวนมากขึ้นต่อไป นอกจากนี้ ในการคัดแยกสาหร่ายพันธุ์กลายที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม พบพันธุ์กลายจำนวน 2 สายพันธุ์ การศึกษาถึงยีนที่เกิดการกลายพันธุ์และกลไกที่บกพร่องจะช่วยเพิ่มความเข้าใจถึงกลไกที่มีผลต่อความทนทานและการสะสมแคดเมียมของสาหร่ายในอนาคต ในการศึกษาช่วงที่สาม ซึ่งสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแนวทางวิจัย ผู้วิจัยได้ศึกษาศักยภาพของสาหร่ายสีเขียวอีกชนิด คือ *Chlorella vulgaris* ในการดูดซับโลหะหนักเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำ และในการผลิตไขมันที่อาจนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลควบคู่กัน พบว่า *C. vulgaris* มีศักยภาพสูงในการดูดซับแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี โดยในเกือบทุกกรณีทดสอบ สามารถลดระดับโลหะให้ต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดสำหรับน้ำทิ้ง และในขณะเดียวกัน สามารถผลิตไขมันรวมได้ใกล้เคียงกับสาหร่ายขนาดเล็กที่จัดได้ว่ามีศักยภาพสูง จึงควรได้รับการสนับสนุนและพัฒนาต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นแคดเมียมภายนอกเซลล์ต่อการเจริญ การสะสมของ แคดเมียมภายในเซลล์ และกลไกการเกิดพิษ ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

1.2 เพื่อศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีน phytochelatin synthase (PCS) ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

1.3 เพื่อคัดแยกสาหร่าย *C. reinhardtii* พันธุ์กลาย (mutant) ที่สูญเสียความทนทานต่อ แคดเมียม

1.4 (วัตถุประสงค์ใหม่ ตามที่ได้รับอนุมัติให้เปลี่ยนแนวทางการวิจัย) เพื่อศึกษาศักยภาพของ สาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในการบำบัดโลหะหนัก ควบคู่กับการผลิตไขมันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซล

2. วิธีการทดลอง

2.1 ความเข้มข้นภายนอกเซลล์ของแคดเมียม ที่มีผลต่อการสะสมของแคดเมียมภายใน เซลล์และการเจริญของสาหร่าย *C. reinhardtii*

2.1.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการวัดการเจริญเติบโต

สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ได้มาจาก ผศ.ดร.กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการทดลอง เลี้ยงสาหร่ายในอาหาร เหลวสูตร TAP (Gorman and Levine, 1965) ในขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าที่ประมาณ 125 รอบต่อนาที ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 5,000 lux ต่อเนื่อง ตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิของห้องปฏิบัติการอยู่ในช่วง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความขุ่นของ เซลล์เริ่มต้นประมาณ $OD_{750nm} = 0.05$ เลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติม $CdCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นที่กำหนด และติดตามผลการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เวลา 0, 0.5, 3, 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากค่าความขุ่น (OD_{750nm}) ของอาหารที่ เพิ่มขึ้น และแปลงเป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำข้อมูล ที่ได้มาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ) ตามสมการที่ (1)

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

โดย N_1 และ N_2 เป็นค่า OD_{750nm} ที่เวลา t_1 และ t_2 (วัน) ตามลำดับ

2.1.2 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

ตัวอย่างเซลล์ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 1 ml ที่เวลาต่างๆ ถูกนำมาตกตะกอนในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 5 นาที แยกนำเซลล์ที่ได้มาเติม 1 ml 80% acetone ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 720 nm, 663.2 nm, 646.8 nm, 645 nm และ 470 nm นำไปคำนวณหาค่า Chlorophyll content (mg/ml) ตามสมการของ Arnon (1949)

2.1.3 การวัดปริมาณแคดเมียมสะสม

ตัวอย่างเซลล์ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 20 ml ที่เวลาต่างๆ ถูกนำมาตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 5 นาที แล้วล้างแคดเมียมที่ติดอยู่บริเวณภายนอกเซลล์ด้วย 10 ml 5 mM EDTA ทิ้งไว้ 10 นาที ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาย่อยด้วย 5 ml concentrated nitric acid และนำไปวัดปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

2.1.4 การวัดจำนวนเซลล์เป็นและเซลล์ตาย

ตัวอย่างเซลล์ปริมาณ 90 μ l ที่เวลาต่างๆ ถูกนำมาย้อมโดยการเติมสีย้อม Plant Cell Viability Assay kit (Sigma) ซึ่งประกอบด้วย fluorescein และ propidium iodine ที่ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 10 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำ 10 μ l มานับจำนวนเซลล์ด้วยกล้อง Fluorescent microscope เซลล์เป็นคือเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียวภายใต้ FITC band pass filter และเซลล์ตาย คือเซลล์ที่เรืองแสงสีแดงภายใต้ TRITC band pass filter

2.1.5 การวัดระดับ malondialdehyde (MDA)

ตัวอย่างเซลล์ในอาหารเลี้ยงปริมาณ 10 ml ที่เวลาต่างๆ ถูกนำมาวัดปริมาณ MDA เพื่อบ่งชี้ระดับ lipid peroxidation ด้วยการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ตามวิธีของ Baroli et al. (2003) โดยการเติม butylated hydroxytoluene ที่ความเข้มข้น 0.01% (w/v) เพื่อหยุดกระบวนการ lipid peroxidation จากนั้น ตกตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 5 นาที 4°C และนำตะกอนเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ 1.8 mL trichloroacetic acid/thiobarbituric acid reagent ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 45 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งและนำ supernatant มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440, 532 และ 600 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณ MDA ตามสมการของ Hodges et al. (1999)

2.2 การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของ PCS ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

2.2.1 ยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับยีนในสิ่งมีชีวิตใกล้เคียง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* หาจากการใช้ keyword และ โปรแกรม tblastn ในฐานข้อมูล GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และ Phytozome (www.phytozome.net/) ด้วยการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PCS จากพืชและ ยีสต์ซึ่งมีรายงานของการค้นพบยีนชนิดนี้แล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CrPCS1* ที่ใช้ตรงกับ ข้อมูลของยีน Cre07.g319500 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CrPCS2* ตรงกับ g15171.t1 และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CBLP* ตรงกับ Cre06.g6364 ในฐานข้อมูล Phytozome

Amino acid sequence alignment และ phylogenetic tree ทำด้วยโปรแกรม Clustalw2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) Genbank accession number ของ AtPCS1 AtPCS1 และ SpPCS1 ตรงกับ NP_199229 NP_171894 และ NP_593552 ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนของ putative PCS genes ของ *Volvox carteri* ได้จากฐานข้อมูล Phytozome

2.2.2 การแสดงออกของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

Total RNA สกัดได้จากเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* ที่เลี้ยงในอาหาร TAP เป็นเวลาต่าง ๆ กันตามกำหนด ด้วย Tizol reagent (Invitrogen) และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop (Thermo Scientific) จากนั้นเปลี่ยน 0.2 µg mRNA ให้เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ ImProm-II reverse transcriptase (Promega) นำ total cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์ GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ annealing temperature ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ที่ความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 2.5 mM

ตารางที่ 2.1 Primers ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ด้วย เทคนิค RT-PCR

Target Gene	Direction	Primer Sequence	Product size(bp)	T _a (°C)
<i>CrPCS1</i>	forward	5' - CGAGCCAGACGGAGTCAACA - 3'	149	58
	reverse	5' - TTCGGGGCAGGAGAACTCAA - 3'		
<i>CrPCS2</i>	forward	5' - TCTTCGCGTCCTCGCCGGTA - 3'	141	60
	reverse	5' - CAACCGCCACCGCACTGCTA - 3'		
<i>CBLP</i>	forward	5' - GCCACACCGAGTGGGTGTCGTGCG - 3'	201	60
	reverse	5' - CGCTGTGCGCCTCGGGCGGCAAGG - 3'		

2.2.3 การศึกษา heterologous expression ของยีน *CrPCS1* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

การโคลนยีน *CrPCS1* ทำโดยการนำ total cDNA จากเซลล์ *C. reinhardtii* ที่ได้ข้างต้น มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อนำมาแทรกในพลาสมิด p425-GPD ที่ตำแหน่ง restriction site *SpeI* และ *SaI* โดยในเบื้องต้น ผู้วิจัยใช้ primers F2 และ F3 (ภาพที่ 2.1) ควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเข้มข้นของ $MgCl_2$ แต่ก็ยังไม่สามารถตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของ PCR ที่คาดหวัง จึงเปลี่ยนไปใช้ คู่ primer ที่ควรให้ชิ้นดีเอ็นเอที่เล็กลง คือ F2 + F5 และ F4 + F3 แต่ก็ยังไม่สามารถตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิตของ PCR ที่คาดหวัง จึงไม่สามารถดำเนินการวิจัยต่อไปได้

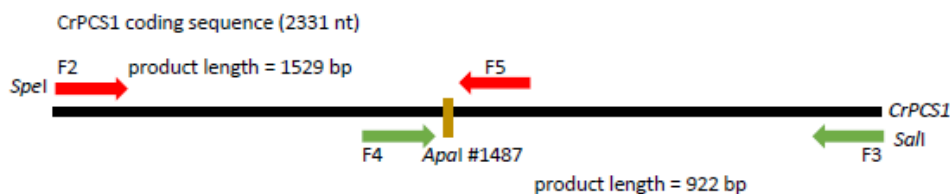
2.2.4 การสร้างสายสำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* ด้วยวิธีการ antisense RNA-mediated gene silencing

การโคลนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นบริเวณเป้าหมายของ *CrPCS1* ทำโดยการนำ total cDNA จากเซลล์ *C. reinhardtii* ที่ได้ข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ด้วย คู่ primer 5'-TCTTCAAACCTGATGGAGCAATTC-3' และ 5'-GGACACCACGATGTGTTCCCT-3' โดยใช้ annealing temperature เท่ากับ $54^{\circ}C$ และความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 2.5 mM โคลนขึ้น DNA ใน pGEM-T Easy (Promega) แล้วจึงย้ายชิ้นดีเอ็นเอสู่ pSL18 โดยใช้ *EcoRI* restriction site ที่พบบน pGEM-T Easy เลือกเฉพาะ recombinant DNA construct ที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอแทรกที่ทิศของ *CrPCS1* สวนกับทิศของ *PsaD* promoter บน pSL18 (ภาพที่ 2.2) แล้วนำเข้าสู่เซลล์สายสำหรับ *C. reinhardtii* ด้วยวิธี glass bead transformation (Kindle, 1990) เลือกโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารวันสูตร TAP ที่เติม $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ paromomycin มาเลี้ยงในอาหารเหลว TAP แล้ววิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังอธิบายข้างต้น

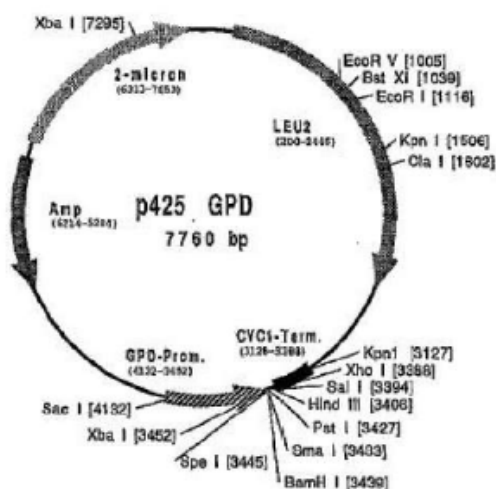
2.4.5 การสร้างสายสำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* ด้วยวิธีการ artificial microRNA-mediated gene silencing

โปรแกรม Designer ใน WMD3 – Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org/>) ถูกใช้ในการออกแบบบริเวณเป้าหมาย (target region) บนยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* และออกแบบ oligonucleotide ที่เมื่อนำมาเข้าคู่และโคลนภายใต้ promoter เพื่อแสดงออกภายในเซลล์สายแล้วจะได้ short hairpin RNA (shRNA) ที่จะถูกเซลล์ย่อยให้เป็น small interfering RNA (siRNA) ต่อไป โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งที่คาดว่าจะสามารถลดการแสดงออกของ *CrPCS1* (target ที่ตำแหน่ง +723 จาก start codon) และอีกลำดับหนึ่งที่คาดว่าจะสามารถลดการแสดงออกของ *CrPCS2* (target ที่ตำแหน่ง +2202 จาก start codon) ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเข้าคู่กันของ oligonucleotides (สังเคราะห์โดยบริษัท MacroGen, ประเทศเกาหลีใต้) ลงในพลาสมิด pChlamiRNA3 ที่บริเวณ *SpeI* restriction site ภายใต้การแสดงออกของ *PsaD* promoter แล้ว transform เข้าสู่เซลล์สาย

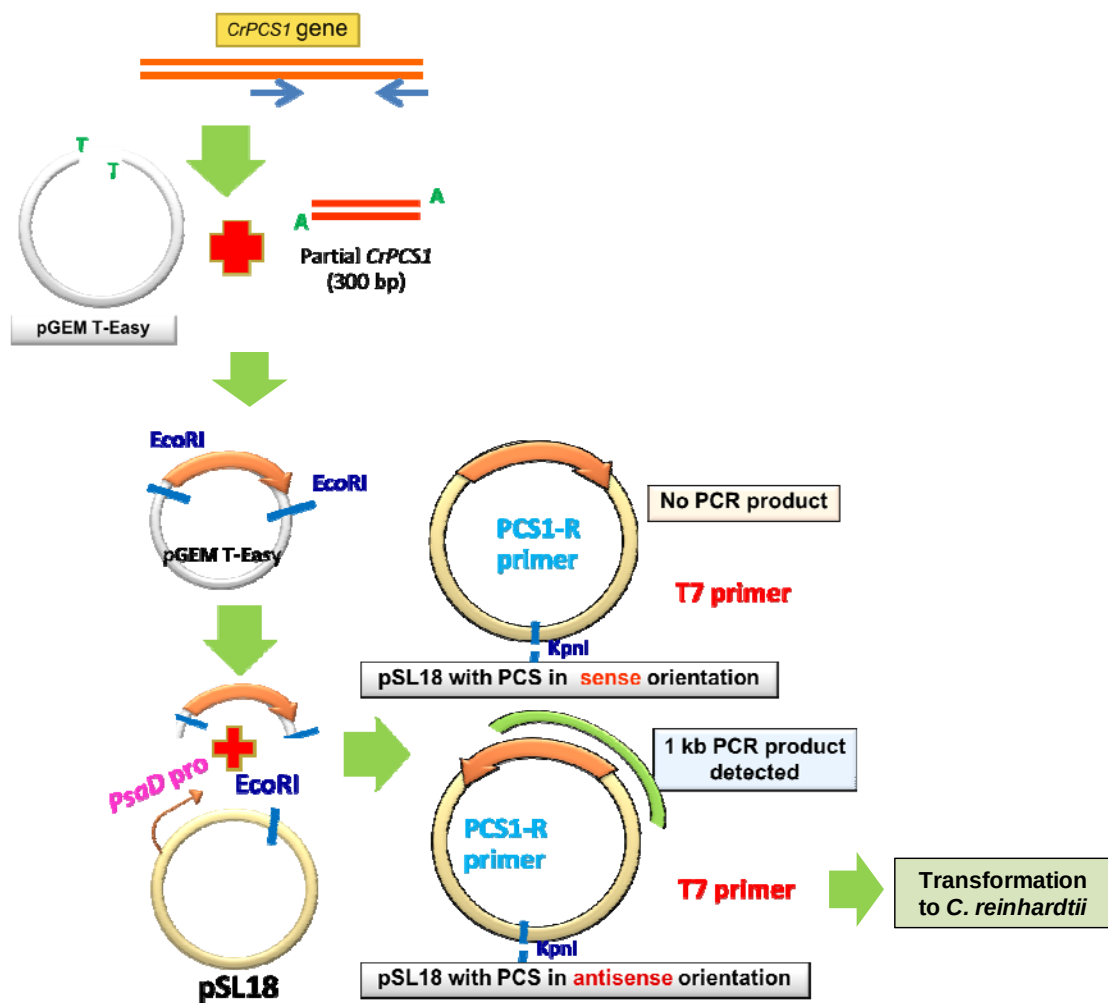
C. reinhardtii CC-503 (ภาพที่ 2.3) เลือกโคลนนี้ที่เจริญได้บนอาหารรุ้นสูตร TAP ที่เติม 10 µg/m paromomycin มาเลี้ยงในอาหารเหลว TAP แล้ววิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังอธิบายข้างต้น



Name	Sequence	Annealing Position	T _m	%GC
F2 (Forward)	TAC-GTC- <u>ACT-AGT</u> -ATG-AGC-GCC- GGT-CGT-GA	#1	65.0	55.2
F5 (Reverse)	CGC-TTT-GGG-ACT-TGT-CGA-TG	#1529	56.5	55.0
F4 (Forward)	GTC-AGA-GAT-GGG-CAA-CGC	#1410	56.4	61.1
F3 (Reverse)	TAG-CTG- <u>GTC-GAC</u> -TCA-GTG-GCC- GTG-TGC-GG	#2331	69.6	65.5

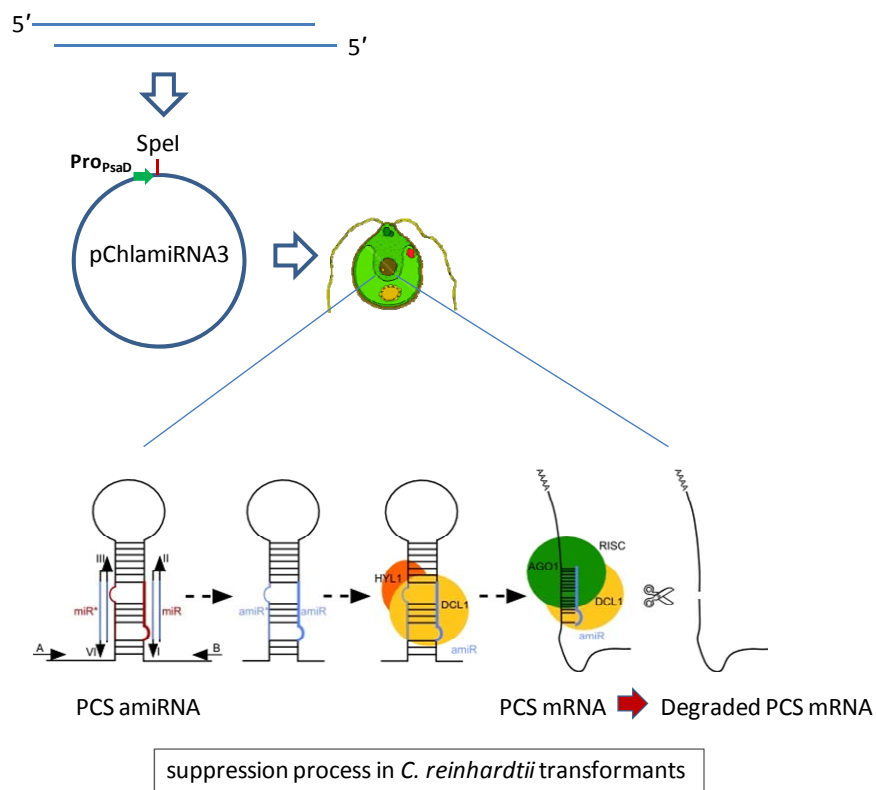


ภาพที่ 2.1 แผนการโคลน *CrPCS1* coding sequence สู่พลาสมิด p425-GPD เพื่อแสดงออกใน ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยโคลนด้วยเทคนิค RT-PCR ที่ใช้ primers F2 + F3 ใน one-step cloning หรือ primers F2 + F5 และ F4 + F3 และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาต่อกันด้วย *Apal* restriction site ใน two-step clone



ภาพที่ 2.2 แผนผังแสดงวิธีการสร้างสายสำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* ด้วยวิธีการ antisense RNA-mediated gene silencing

<i>CrPCS1</i>	
Target Region	5' - TTTTCGCTTGTAAGGCTT - 3'
Forward Oligo	ctagtAAGACCTTCTACAAGCGAAAtctcgctgatcggcaccatgggggtggtggtgatcagcgctaTTTTCGCTTGTAAGGCTTg
Reverse Oligo	ctagcAAGACCTTCTACAAGCGAAAtagcgctgatcaccaccaccccatggtgccgatcagcgagaTTTGGCTTGTAAGGCTTca
<i>CrPCS1/CrPCS2</i>	
Target Region	5' - TATGTTGGTGAAACGGAGCTC - 3'
Forward Oligo	ctagtGAGCTCCGTTTCACCGGCATatctcgctgatcggcaccatgggggtggtggtgatcagcgctaTATGTTGGTGAAACGGAGCTCg
Reverse Oligo	ctagcGAGCTCCGTTTCACCAACATatagcgctgatcaccaccaccccatggtgccgatcagcgagaTATGCCGGTGAAACGGAGCTCa



ภาพที่ 2.3 แผนผังแสดงวิธีการสร้างสายสำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* ด้วยวิธีการ amiRNA-mediated gene silencing

2.3 การคัดแยกสาหร่าย *C. reinhardtii* พันธุ์กลาย (mutant) ที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม

2.3.1 การสร้างประชากรพันธุ์กลาย (mutant population) ด้วยวิธี UV mutagenesis

สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ถูกนำมาเลี้ยงในอาหาร TAP จนถึง mid-log phase สาหร่ายในอาหารเลี้ยงปริมาตร 5 ml ที่ปรับความหนาแน่นให้ได้ประมาณ 5×10^6 cell/ml ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ถูกนำมาวางใต้หลอดไฟ UV germicidal lamp (GE Energy, ประเทศญี่ปุ่น) ที่ระยะห่าง 40 cm ภายในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลาต่างๆ กันระหว่าง 0 ถึง 20 นาที แล้วนำสาหร่ายไปเก็บในที่มืดประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำมา plate ในอาหารรุ้น TAP เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนับโคโลนีของสาหร่ายที่รอดชีวิต เทียบกับสาหร่ายที่ไม่ได้รับแสง UV (0 นาที) เพื่อคำนวณระยะเวลารับแสงที่ทำให้สาหร่ายรอดชีวิตที่อัตรา 10%

2.3.2 การสร้างประชากรพันธุ์กลาย (mutant population) ด้วยวิธี insertional mutagenesis

เซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ถูกนำมา transform ด้วย pSL18 พลาสมิดโดยวิธี glass bead transformation ดังอธิบายข้างต้น เลือกโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารรุ้นสูตร TAP ที่เติม 10 µg/m paromomycin มาศึกษาต่อไป

2.3.3 การคัดแยกสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม

โคโลนีสาหร่ายที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV หรือผ่านการ transform ด้วย pSL18 ถูกนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TAP ใน 96-well plate เป็นเวลา 14 วัน ให้ได้หัวเชื้อสาหร่ายเข้มข้น หยดสาหร่ายปริมาตร 5 µl ลงบนอาหารรุ้น TAP ที่เติม 50 µM CdCl₂ เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญจากขนาดและความเข้มของโคโลนีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ในอาหารเลี้ยงเดียวกัน เพื่อคัดแยกพันธุ์กลายที่เจริญได้ช้ากว่าอย่างชัดเจน

2.4 การศึกษาศักยภาพของสาหร่าย *C. vulgaris* ในการบำบัดโลหะหนัก ควบคู่กับการผลิตไขมันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซล

2.4.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและการวัดการเจริญเติบโต

สาหร่าย *C. vulgaris* var. *vulgaris* ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11 (Allen and Stanier, 1968) ในขวดรูปชมพู่ โดยให้อากาศที่ผ่านการกรองผ่านเยื่อขนาด 0.45 µm และให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ 5,000 lux ต่อเนื่องตลอด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิของ

ห้องปฏิบัติการอยู่ในช่วง 25±2 องศาเซลเซียส และให้อากาศโดยเครื่องปั๊มอากาศที่อัตราประมาณ 1 ml ต่ออาหารเลี้ยง 1 ml ด้วยอากาศปกติ

ในการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียม ทองแดง และสังกะสี เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลว 200 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมโลหะสารละลายโลหะเข้มข้น ดังนี้

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 และ 25 μM

CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μM

ZnCl_2 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 250, 500 และ 1,000 μM

โดยให้มีค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหารเริ่มต้นที่ $\text{OD}_{680\text{nm}}$ เท่ากับ 0.05 หรือเปรียบเทียบเป็นความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ติดตามผลการเจริญด้วยการบันทึกค่า $\text{OD}_{680\text{nm}}$ ตลอดระยะการเลี้ยง และนำข้อมูลช่วง log phase มาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ตามสมการที่ (1)

2.4.2 การวัดปริมาณโลหะหนักที่สะสมในเซลล์ โลหะหนักที่เหลือในอาหาร และผลผลิตไขมัน

สาหร่ายถูกเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ปริมาตร 400 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมโลหะหนักให้มีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 30 μM

CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 μM

ZnCl_2 ที่ความเข้มข้น 4 และ 80 μM

ให้ความหนาแน่นเริ่มต้นของสาหร่ายประมาณ 3 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะการเลี้ยงและติดตามการเจริญเช่นเดียวกันข้างต้น เมื่อสาหร่ายอายุครบ 7 วัน นำสาหร่ายไปปั่นเหวี่ยง เช่นเดียวกับข้างต้น เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์และส่วนอาหารเลี้ยง ส่วนที่เป็นเซลล์สาหร่ายนำไปล้างด้วยอาหารเปล่า 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer และเก็บชีวมวลแห้งใน desiccator ก่อนชั่งน้ำหนักเพื่อวัดผลผลิตชีวมวล แยกตัวอย่างเซลล์ที่ทราบน้ำหนักมาสกัดไขมันและวัดปริมาณโลหะหนักสะสม ส่วนอาหารเหลว นำไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักที่คงเหลือ

การสกัดน้ำมันจากชีวมวลสาหร่ายใช้วิธีของ Bligh & Dyer (1959) โดยนำมวลสาหร่ายแห้งน้ำหนัก 80 mg ผสมกับตัวทำละลาย chloroform:methanol ในอัตราส่วน 1:2 ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator 30 นาที แยก supernatant มาระเหยตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณปริมาณไขมันต่อน้ำหนักแห้ง และคำนวณผลผลิตชีวมวล (lipid productivity) ตามสมการที่ (2)

$$\text{Lipid productivity (g/l/d)} = \frac{\text{Lipid content (\%)} \times \text{Biomass (g/l)}}{100 \times 7 \text{ day}} \quad (2)$$

การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ทำโดยการย่อยมวลสารแห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ด้วยกรด concentrated nitric:perchloric acid ในอัตราส่วน 1:3 หรือส่วนที่เป็นอาหารย่อย ด้วยกรด concentrated nitric acid นำไปวัดปริมาณโลหะด้วยเครื่อง flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณโลหะที่ถูกกำจัด (metal removal) จากอาหารเลี้ยงด้วยสมการ (3)

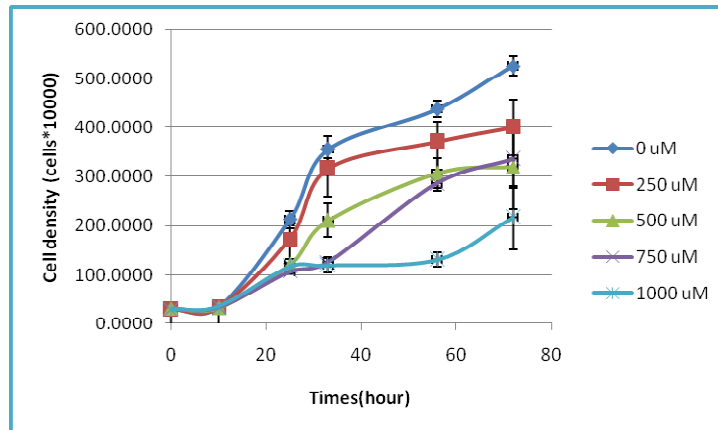
$$\text{Metal removal (\%)} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (3)$$

โดย C_i และ C_f เป็นค่าความเข้มข้นของโลหะในอาหารที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย ตามลำดับ

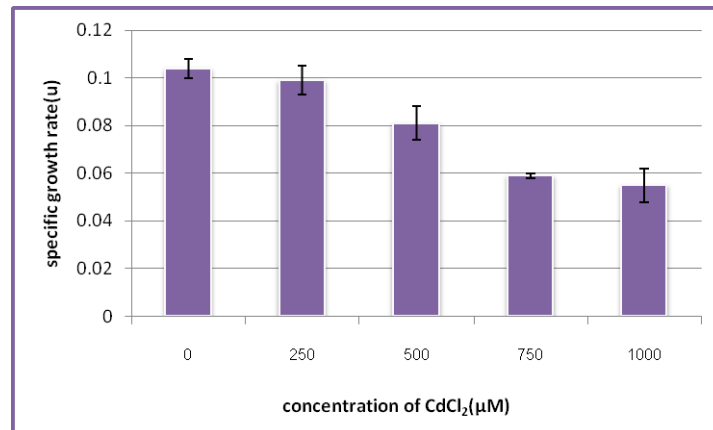
3. ผลการทดลอง

3.1 ความเข้มข้นภายนอกเซลล์ของแคดเมียม ที่มีผลต่อการสะสมของแคดเมียมภายในเซลล์และการเจริญของสาหร่าย *C. reinhardtii*

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นแคดเมียมต่อการเจริญของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-503 ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะหาช่วงความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย โดยได้เลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารเหลวสูตร TAP กำหนดให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ $OD_{750nm} = 0.05$ และเลี้ยงสาหร่ายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม $CdCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, 500, 750 และ 1000 μM และติดตามการเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดค่า OD_{750nm} ซึ่งแปรผันตรงกับความหนาแน่นของเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้สาหร่ายเจริญได้ช้าลง (ภาพที่ 3.1) เมื่อนำกราฟการเจริญมาคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) พบว่า ความเข้มข้นของแคดเมียมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้ประมาณ 5% และ 50% คือ ประมาณ 250 μM และ 1000 μM $CdCl_2$ ตามลำดับ (ภาพที่ 3.2)



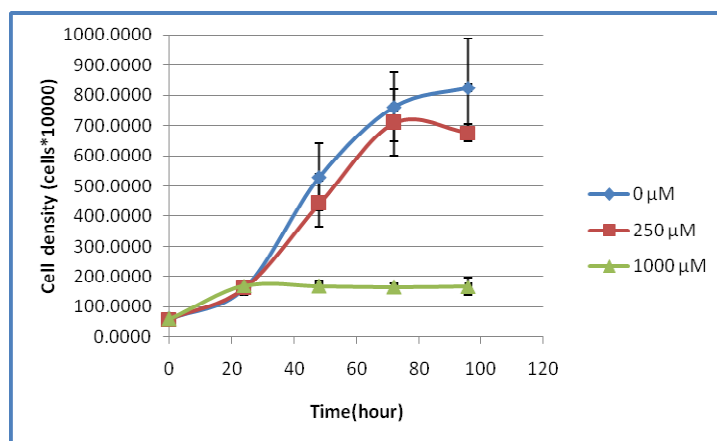
ภาพที่ 3.1 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่มีผลต่อการเจริญของสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว TAP



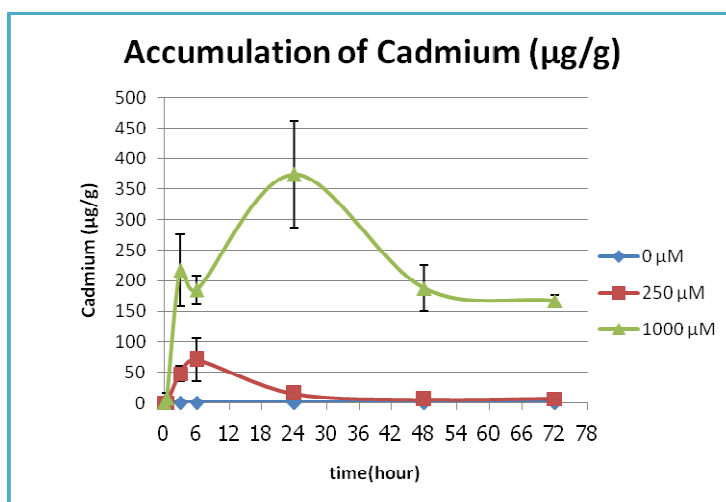
ภาพที่ 3.2 ผลของแคดเมียมในอาหารเลี้ยง TAP ที่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดสาหร่าย *C. reinhardtii*

ในการศึกษาระดับการสะสมของแคดเมียมในเซลล์ สาหร่าย *C. reinhardtii* CC-503 ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหลว TAP ที่ความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ $OD_{750nm} = 0.05$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นเติม $CdCl_2$ ลงในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, และ 1000 μM ซึ่งตามผลการทดลองข้างต้นเป็นความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษกับสาหร่ายในระดับประมาณ IC_5 และ IC_{50} หลังจากที่ได้เติมแคดเมียมแล้วเป็นเวลา 0.5, 3, 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จึงวัดการเจริญของสาหร่ายด้วยค่า OD_{750nm} และเก็บเซลล์ปริมาตร 20 ml ล้างเซลล์ด้วย 5 mM EDTA แล้วนำไปวัดปริมาณแคดเมียมสะสมด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer จากผลการทดลองพบว่าหลังจากเติม $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้น 250, และ 1000 μM ส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดลดลง 10% และ 50% ตามลำดับเทียบกับค่าที่ได้จากการเลี้ยงแบบไม่เติมแคดเมียม (ภาพที่ 3.3) ซึ่งใกล้เคียงระดับการยับยั้งใน

การทดลองเดิมข้างต้น เมื่อพิจารณาปริมาณแคดเมียมสะสมต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ พบว่ามีปริมาณแคดเมียมในเซลล์มีแนวโน้มสูงขึ้นเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงมีระดับที่ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 250 μM CdCl_2 ในอาหารเลี้ยง การสะสมของแคดเมียมลดระดับลงหลังจาก 6 ชั่วโมง และที่ 1000 μM CdCl_2 การสะสมของแคดเมียมลดระดับลงหลังจาก 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.4) โดยสาเหตุของการลดระดับลงนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดจากอัตราการนำแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ลดลง หรือมีอัตราการขับออกนอกเซลล์ที่สูงขึ้น



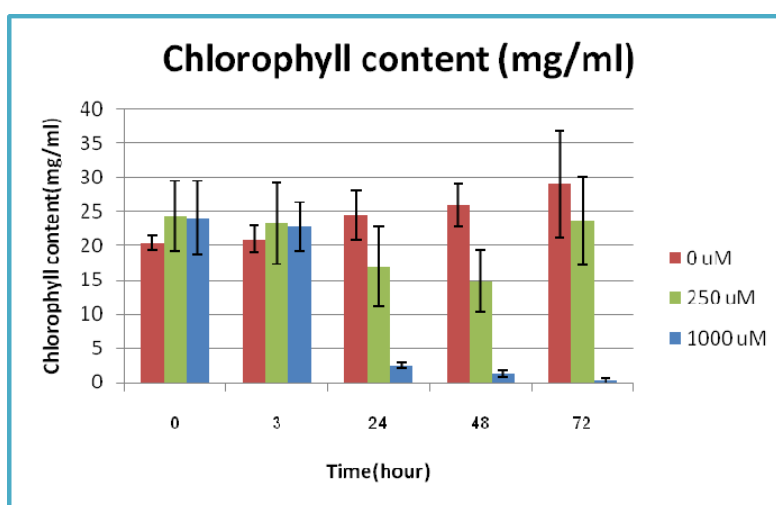
ภาพที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *C. reinhardtii* ในอาหารเหลว TAP ที่เติม 250, และ 1000 μM CdCl_2 ที่ชั่วโมง 24



ภาพที่ 3.4 ปริมาณแคดเมียมในเซลล์ *C. reinhardtii* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว TAP หลังการเติม 250 และ 1000 μM CdCl_2 (ที่ชั่วโมง 24)

เพื่อศึกษาว่าแคดเมียมที่สะสมภายในเซลล์สำหรับส่งผลให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญลดลงได้อย่างไร ผู้วิจัยได้ทดลองวัดผลกระทบของการสะสมแคดเมียมต่อปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของสาหร่าย ได้แก่ ความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง (วัดจากปริมาณรงค

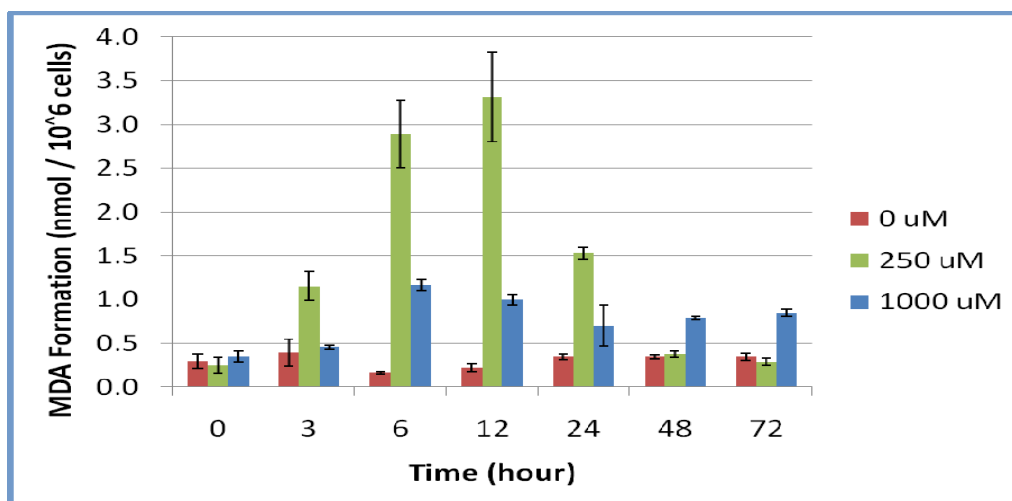
วัตถุ), ความเสียหายที่เกิดกับโครงสร้างเซลล์ (membrane peroxidation) และจำนวนเซลล์ที่ตาย (non-viable cell) โดยในการศึกษาผลของแคดเมียมต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ (คลอโรฟิลล์ เอ + คลอโรฟิลล์ บี) พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีระดับต่ำลงหลังจากเติมแคดเมียมลงในอาหารเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. (ภาพที่ 3.5) โดยการเติม 250 μM CdCl_2 ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง 30-40% ในช่วงแรก และปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มที่จะเพิ่มกลับสูงขึ้นในภายหลัง ในทางตรงกันข้าม การเติม 1,000 μM CdCl_2 ทำให้เซลล์สูญเสียคลอโรฟิลล์เกือบทั้งหมดและไม่สามารถฟื้นตัวได้อีกเลย จึงสามารถสรุปได้ว่าการเจริญของสาหร่ายที่ลดลงหลังการเติมแคดเมียมในอาหารเลี้ยงทั้งสองความเข้มข้น ส่วนหนึ่งเกิดจากความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายที่ลดลง



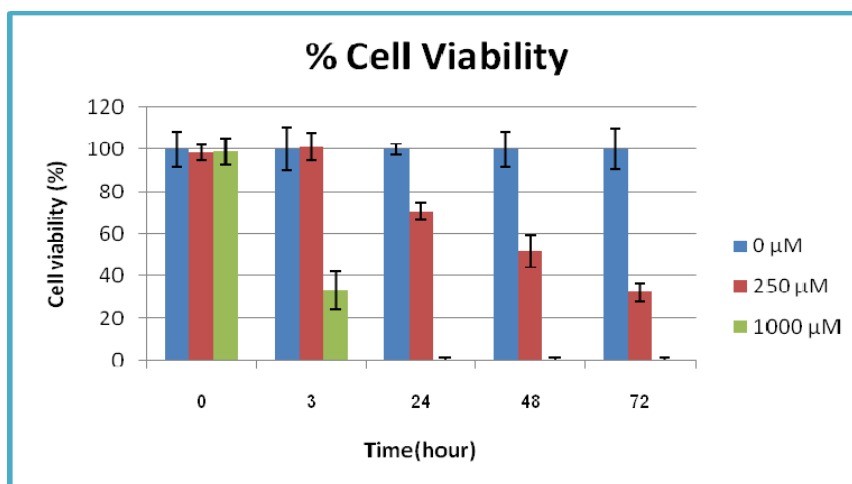
ภาพที่ 3.5 ผลของแคดเมียมในอาหารเลี้ยง TAP ที่มีผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์รวมในสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่เวลาต่างๆ หลังการเติม 250 และ 1,000 μM CdCl_2

เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าการเจริญที่ลดลงของสาหร่ายที่สะสมแคดเมียม ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่แคดเมียมก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cell membrane ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ใกล้เคียงมากที่สุดกับแคดเมียมความเข้มข้นสูง ซึ่งความเสียหายเหล่านี้อาจทำให้สาหร่ายไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ หรือแม้กระทั่งทำให้เซลล์สาหร่ายมีอัตราการตายที่สูงขึ้นได้ ผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated lipids) ในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอนุมูลอิสระ (free radicals) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP ปกติมีปริมาณ MDA ต่ำและคงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเติม 250 μM CdCl_2 มีปริมาณ MDA สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและมากที่สุดในช่วงเวลาที่ 12 จากนั้นระดับ MDA จึงค่อยๆ ลดลงสู่ระดับปกติที่ชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 3.6) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแคดเมียมในเซลล์ที่ลดลง ณ เวลานั้น (ภาพที่ 4) และปริมาณคลอโรฟิลล์ที่เริ่มกลับสูงขึ้น (ภาพที่ 3.5) ส่วนปริมาณ MDA ในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเติม 1,000 μM CdCl_2 นั้นมีปริมาณสูงขึ้นเทียบกับ

สำหรับที่เลี้ยงในอาหารปกติ และปริมาณ MDA คงอยู่ในระดับสูงกว่าปกติตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่ทั้งนี้ ปริมาณ MDA อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าสำหรับที่เลี้ยงในอาหารเติม 250 μM CdCl_2 ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ผิดไปจากความคาดหวัง ซึ่งอาจอธิบายได้จากการที่เซลล์สำหรับในกลุ่มนี้ได้รับพิษในระดับที่สูงมากจนเกิดการตายหรือเกิดปฏิกิริยาอื่นๆ ที่ไม่สามารถคาดเดาได้ จนทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนไป



ภาพที่ 3.6 ผลของแคดเมียมในอาหารเลี้ยง TAP ที่มีผลต่อระดับ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดในสำหรับ *C. reinhardtii* ที่เวลาต่างๆ หลังการเติม 250 และ 1000 μM CdCl_2



ภาพที่ 3.7: สัดส่วนของเซลล์เป็น (viable cell) และ เซลล์ตาย (non-viable cell) จากการย้อมสี Fluorescent และ Propidium iodine เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเติม CdCl_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, และ 1000 μM ที่เวลา 0, 3, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

เพื่อทดสอบสมมติฐานว่า พิษจากแคดเมียมนอกจากจะลดอัตราการเจริญของสาหร่ายแล้ว ยังสามารถทำให้เซลล์สาหร่ายถึงกับตายได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น $1,000 \mu\text{M CdCl}_2$ ผู้วิจัยจึงได้วัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable) และเซลล์ตาย (non-viable) ด้วยเทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี Fluorescein and Propidium Iodine ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะเห็นฟลูออเรสเซนส์สีเขียวของ Fluorescein ในขณะที่เซลล์ตายแล้วจะเห็นฟลูออเรสเซนส์สีแดงของ Propidium Iodine ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายที่ได้รับ $250 \mu\text{M CdCl}_2$ มีสัดส่วนของเซลล์ที่ตายเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่สาหร่ายที่ได้รับ $1,000 \mu\text{M CdCl}_2$ นั้น พบเซลล์ตายตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 และไม่เหลือ viable cell เลยเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า แคดเมียมที่ความเข้มข้น $1,000 \mu\text{M}$ ส่งผลให้เกิดพิษอย่างร้ายแรงต่อเซลล์สาหร่าย

3.2 การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของ PCS ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

3.2.1 การสำรวจจีโนมของ *C. reinhardtii* CC-503 เพื่อค้นหาลำดับพันธุกรรมที่คล้ายยีน PCS

จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของสาหร่าย *C. reinhardtii* CC-503 ที่น่าจะตรงกับยีนที่สร้าง PCS พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 2 ยีน ได้แก่

1. ยีนบนโครโมโซม 7 ตำแหน่งที่ 1,027,380 ถึง 1,033,725 ซึ่งกำหนดให้เป็น *CrPCS1* (ภาพที่ 3.8)
2. ยีนบนโครโมโซม 14 ตำแหน่งที่ 3,331,597 ถึง 3,338,882 ซึ่งกำหนดให้เป็น *CrPCS2* (ภาพที่ 3.9)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่แปลงได้จากยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* มาเปรียบเทียบกับโปรตีน AtPCS1 จากพืชใบเลี้ยงคู่ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งได้มีการศึกษาบทบาทของยีน PCS ในพืชชนิดนี้มาเป็นอย่างดี พบว่าโปรตีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* มีลำดับที่คล้ายกับ AtPCS1 โดยมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 35% และ 33% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง *CrPCS1* และ *CrPCS2* พบว่า มีตำแหน่งที่เหมือนกันอยู่ 37% (ภาพที่ 3.10) ข้อมูลเหล่านี้จึงเป็นหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนว่า ลำดับดีเอ็นเอทั้งสองที่พบในจีโนมของ *C. reinhardtii* นี้ น่าจะที่จะตรงกับยีน PCS และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* กับยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ทราบลำดับพันธุกรรมแล้ว (ภาพที่ 3.11) พบว่าในจีโนมของ *Volvox carteri* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyceae) เช่นเดียวกัน แต่มีวิวัฒนาการเป็นสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ก็มี ortholog ของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2* มีต้นกำเนิดมาตั้งแต่ยุคเริ่มต้นวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียว และการอนุรักษ์ของยีนทั้งสองในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวช่วยสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า ยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* มีหน้าที่จำเพาะและมีความสำคัญต่อสาหร่ายกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม หน้าที่ที่แท้จริงของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* จะต้องได้รับการยืนยันจากการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป

ATGAGCGCCGGTCTGTGAGGGCCTACGACACCTCTCAGCAAGCTTGCTGAAGCAGCTCGTCGCCGCCGAA
CGGGTCGCGATAGCGACGCCGTCCATGCTGCCGGGTGCCCTGCCCTCTTCCCGCCACGCCGTGCCACGC
GCCCCGACGCGCGCTTTACTTACCACCCAGCGGCTCTTCGCGGCGATGCCGCAGACACAGCAGCATGCT
GCGACCGCCTCGGTCTGTGCAACGGAGCAGCTGAAGCCGGCGGATAGCGGTGCGGGCGCAACGAGCCAG
ACGGAGTCAACACCCATACAGCAGGGCTTCAGCATTCCCACACTCGCCACCGCGGGCCGGCGCTCCCGCC
ACCGGGTTCAAGAAGACCTTCTACAAGCGAAAGCTGCCCTCACCCCTGCAATTGAGTTCTCCTGCCCC
GAAGGCCGGCAGCTGTTCCAAGAGGCGCTCCTGGACGGCACCATGACCGGCTTCTTCAAACCTGATGGAG
CAATTCAACACGCAGGACGAGCCGGCCTTCTGCGGTCTGGCGTCCCTGGCCATGACGCTCAACGCGCTG
TCCATTGACCCGCGCCGGACCTGGAAGGGCTCCTGGCGCTGGTTCCACGAGGCCATGTTGGACTGCTGC
AGGCCGCTGGACGCTGTGAAGGAGGAGGGCATCACCTGTACCAGGCCTCCTGCCCTGGCCCGCTGCAAC
GGCGCGCGGGTGGAGCTGGTGCCGTACGGCTCGGCCGGGCTGAGCCTGGAGCGCTTCCGTGCGGAGGTG
GAGGCGGTGTGCGGCAGCGGCAGGAACACATCGTGGTGTCTACAGCCGCAAGGCATTCTGACAGACG
GGGACGGGCACTTCAGCCCCATAGGCGGCTACCACCGCGGCCGCGACCTGGTGCTTGTGCTGGACGTG
GCTCGCTTCAAGTACCCACCGCACTGGGTGCCGCTGCCCATGCTGTACCACGGCATGTCGTACGTGGAC
AAGGTGACGGGCCGCCGCGCGGCTACATGCGGCTGGCCTCCAACCCGCTGCTGGACAGCGTGCTGCTG
ACCTGCGACGTGCGCAGCGCGCCGGAGGACTGGCGGCCGGCGGAGGCGTTTCGTGCGCTCCGGTGCGGCC
GCCCTGGTGAGGATCTGGCGGCGGCTGGCGGCTTGAGCGCGGAGGCGGTTGTTTCGCGCCGTGGTGAC
GCCGCGCCCCCTAGCGGCACTGGACACATTCTGGTGGTCCGGTCCGGGGCGCCCATGGCGGCGGCGCCA
CCAGACCAGACCGGCGCCACCGCCGCTCCGGCCACGTCTGCCCCGGGCCGCCGCCGCTTCGGCGCCG
GCGGCGGGTGCAGGGGCGGGTGCCTTGGATGCGGCTGCGGGTCCGTTGGGGGCTGTGTGTGACACGCCA
GAGGCAATGGTGGCGGCACTGCGGCGGGCGTCAGAGATGGGCAACGCGGCGGCAACGGACTTGGCGGCG
GCGACGGCCGCCGCTCCGCGGCTCCGCCGCTGGGCCCTCTGCTTCTTCCGCCGCCGGCAGCGCCCT
GCCGTAGCCGCATCGACAAGTCCCAAAGCGAAGAAGGGCTGTGGCACTGGCAAGACGCCCTGCGGCTCT
GGCAGCTGCGGCACCTCCGCCGTGAGCACGGACGGCGGCGGCGGCTGCAGCCGCCGCCGCCGCCGCC
GCCAGCTGTAGCAGCACACGATGATGGCGGCTGCTACTGCCATCTTCACGGCGCACGACCGCTGCATC
CCGATGGCGCAGCGGCGAGCAGCTGCTGGACGAGCTGAAGGGCATGCCATTGTACGGCATAGTGTACGCG
CACCTGACGGTGCGCCGCGCCGAGCTACGAATGCCGACGGCGCAGCTGGCGCCGGCGCCGACGGCAGG
TCGGGCGTGTACGCGGCGGAGGCGGAGGCGGATCGACGTGTGTTGCTGCACGGCGAGTACCTCACCGAG
AAGTTGGTGATGGCGCTGCTGCTGCAGCGGCCAGAGGCTGGCCCTCCGCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
CCCGCCGCGGCGGCGCAAGCCGCCGCTGCCGCCGCCGCTGCGGCCGCCGCCGCGTGGGGCGCAGCGGCG
CCCGGATCGCCACGGCAGCCGGCCCGGCGGCGGTGCCGGCGACGGCGCCTGGCGGCGGGGCGTGGGGC
TGGGCGGACCCGGCTGCGGGGCGAGCTGGAGTGGTCTGGTGGGACTGGGCAACTACAATGTGGTGGAG
GCGGAGGCGGCTACCTGCGGGAGCAGTTGGCGCACATCGACGAGGTGCTGCAGGGCGGCGACGTGACG
CGCACGTGTGGCGAGCACGTGCACCGCCTGGACTGCGCCGCACACGGCCACTGAGGCCCTGA

ภาพที่ 3.8: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CrPCS1* coding sequence

ATGCCGAGCGCAAACCGTCGCACCTATTTTAAGCGGGAGCTGCCGGCTCCTGCGGTGCGCTTTTCATGC
 GCAGAAGGCCGAGCTATCTTTGCCGAGGCCCTGGCGGGCGGGGACCATGGTCGGATTCTTCCGACTTATT
 GAGCAATTACACACGCAGGAGGAGCCCCAGTACTGCGGGCTGGCGGCGTTGGTGGTGGCGCTGAACGCG
 CTGGGCATTGACCCGCGCCGCACCTGGAAGGGCGCGTGGCGGTGGTGGGCGGAGACGATGCTGGACTGC
 TGCAAGAGCCTGGAGGACATCCGGAGGGACGGCATCACCATGGGCCAGGTGGCCTGCCTGGCCCGCTGC
 AACGGCGCTGACGTACGCTGCACCGCCACGGCGCCTTCGACCCGGCCGCGTTCCGGCGGCTGCTGGCG
 GAGGTGTGCGCGGCAGAGGTGTTTCGCCAGTCGGGCGACGGGCACTTCAGCCCCGTGGGCGGCTACTGC
 CCGGGCAGGGACATGGTGCTCATATTGGACGTGGCCCCGCTTCAAGTACAGCCCCCACTGGGTGCGTGTG
 GACGACCTGCTTGAAGCCATGGCACAGCCGACCCGGCCATTGGCAAGCCGCGCGGCTTCTGCTCCTG
 GGCTGCCGACGCCCCGCGAGTCCGCCCTCTTCATGCTGGACCCCGCGGTGGCGCCCCCTGCCACGTGAG
 CTGCCGCCCCGACGACTTCGCTCGGCGCTACGGCCGGCGGCACCGGCTGTAGCAGCAGCGGCAGCGGCA
 GCGGCAGTGGCGGCACCGCAGGCTGTGGCATCTGCGCCGCTGGCGCCCGCGGCGCTGGCGGGGGGTAGC
 AGCGGCGATCTGGGGCCGGCGGCGGCGGCGCTCAGCAGTAGCAGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
 TGGGGGTGCGGTCTGCTGGGGATGGGGATGGACAAGGCGGGAAGCTGTAGCAGCCTGAGCAGCCTGGGT
 GGCTGTAGCATCAATGGCGGCGGCGGCGCGCTCGCCGCGGCTGGCGGCGGCGGCGGCGAGTGCCGACGTG
 GATGCGGACGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGCCGAGGTGGCGGAGGCGTATGCCTTCATCACACGGCAG
 GCGCCGGCGCTGCTGCGGCAGCAGCTAGGACTGGCGCCGCCGCGGCGGCGGCTACTGCTACTGCTACT
 GGCCAGGTGAGCGCTTCCGGGGAGGGTGCTACAGCCGCCGCGCCGCCGCTGGCGGCGGCGCGGAGGCG
 GCGCATGAGGACCACGACCTGGAGGAGGAGGACGAGGAGGAGGCGGCAGCTACAGCCGCCGCCGCGGCGGCG
 AGTAGCAGCAGCAGCAGCGGCAGTAGCAGCGGAGGCGTGCCGACGCTGGAGGCGCTGGTGGCGGCGCTG
 GTGGCGGCGGCGCGGCTGCGGAGCATCTGCACACTGCTGGTGAGGCGCCCCACGCTGGCGGCGGTGGGG
 GAGGCGGTGCCGGGGCCGTGCTGCGGCTGCCCCATCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCA
 GGGCCGACAGGAGGCA
 GCGAGGGGTGCGGGGTGCGCGTGACAGCAGGCGCTGCTGTAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGTGGT
 GCAGTTGTTGGCGGGATCAGCATTGTTACGGCGGTGGCTCCCTCGCCCTTCTGCGGCTTGCCGGGACG
 CGCGCTGCCCCGCACACGACGCGCACGCACACGCACACGCACTCACACACGCACACGACAGCAGCAGT
 AGCCACGGCAGTAGCAGCAGCATCGGCAGCAGCTGCTGCAAAGCCGTGAGCAGCAGTAGCAGCAGCAGC
 GGCAGCACACCACCACCAGCAGCAGCGGCGTCAGAGGGGCTGGCATCCGCTGACGGCAACGGCAGCAGC
 GCCAGCGGCGCCAGCGGCAGTAGCAATAGCGGCAGTAGCATGGCCGGCGATGACGGCGCCAGCCCGGAT
 CCGCCGCTTGGTCTGTACGGCCGCAACAGTGTGGGAGCCACGTTCTGTTGGTGGCGGCAGTAGCAGCAGC
 AACGGCGACGGCAGTAGCATGCTCATGATGGCGGGTGCTACTGCCGGGGGCGACGGCAGTAGCCGCTGC
 TGCCACGGGGAGCCGCTGGAGCACCACTGCGTGCCGCCGAGGTCCAGGCCCTTGACCCTGGAGGAGCTC
 CGTTTTACCAACATGTTCAAGCTGGTCAGCTACTGCCTGCGCCGAGCCGCCGGCTGTAGCCACGCGCCG
 CCGCCCGACCTGTCCGCTTTTCATGAAGCCAGCCATGCCGGCTGCAGCAGCGGCGCCCGCGGCTGTAGCA
 GCGCAGCCGGCTGTAGCAGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCCCAGTGGGTGAGGGCGCCTCTGCTACTGCCACT
 GCCTCTGCTACTGCCATTTCCGCCGCGGCACCGGCGGCGCACCCGCGGCTGCTGCGGCTGCTACAGCCGGC
 GCGAGTGCGGCTGTAGCCTGCACCTGCCGACATGGCGGCGGAGAAAGCTGACGGCGGCGCTGCTACTG
 CTGTCCGAGGCCGACTGCTGGCCCGTACAACAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCATCCAGCCGGGC
 GCTGGCGGCGCCAACGGCGACGGCTGCAGCGAGGGCAGCAGCGCTGCCACCGCAGCAGCAGCGGCGGCG
 GCGGCCGCCGCCGCCGCCGCTGCGCATGTGCAAGCGGCCCAACTGCCGGCGCTGCCGGCGGCGGCTGGCG
 GCGGCGGGCGATGCGCGGCGGCGGCTGGCGGTCTGCGTGAGGAGTGGGGCTCGCTGCTGCGACTGGCG
 CCGCTGGGGCTCTTCGCGTCTTCGCCGCTACTGCGCGACGAGCTGGCGTTCTGTGCGGCTGCAGCTGGCG
 GCGTCCGCGCTGCTGGCGGCGAGCCGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGCGGTTCTGTAGCAGT
 GCGGTGGCGGTTGTGTGA

ภาพที่ 3.9: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CrPCS2* coding sequence

```

AtPCS1      -----MAMAS----- 5
CrPCS1      AMPQTQQHAATASVAATEQLKPADSGAGATSQTESTPIQQGFSIPTLATAAGAPATGFKK 120
CrPCS2      -----MPSAN-----RR 7
               :. *
AtPCS1      -LYRRSLPSPPAIDFSSAEGKLIFNEALQKGTMEGFFRLISYFQTQSEPAYCGLASLSV 64
CrPCS1      TFYKRKLPSPPAIEFSCPEGRQLFQEALLDGMTGFFKLMEQFNTQDEPAFCGLASLAMT 180
CrPCS2      TYFKRELPAV-AVAFSCAEGRAIFAEALAAGTMVGGFFRLIEQFTTQEEPQYCGLAALVVA 66
               : * * * * : * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * : * * * * :
AtPCS1      LNALSIDPGRKWKGPWRWFDESMLDCCEPLEVVKEKGISFGKVVCLAHCSGAKVEAFRTS 124
CrPCS1      LNALSIDPRRTWKGSWRWFHEAMLDCCRPLDAVKEEGITLYQASCLARCNAGARVLPYG 240
CrPCS2      LNALGIDPRRTWKGAWRWAAETMLDCCKSLIEDIRRDGITMGQVACLARCNAGADVSVHRHG 126
               * * * * * * * * * * : * * * * * : : * * * : : * * * * * *
AtPCS1      QS--TIDDFRKFFVKCTSSENCHMISTYHRGVFKQTGTGHFSPIGGYNAERDMALILDVA 182
CrPCS1      SAGLSLERFRREVEAVCGSGEEHIVVSYSRKAFLQTGDGHFSPIGGYHRGRDLVLVDVA 300
CrPCS2      AF--DPAAFRRLLAEVCAA-----EVFRQSGDGHFSPLGGYCPGRDMVLILDVA 173
               * * : : : * * * * * * * * * * : * * * * *
AtPCS1      RFKYPPHWVPLKLLWEAMDSIDQSTGKRRGFMLISRPHREPGLLYTLCK--DESWIEIA 240
CrPCS1      RFKYPPHWVPLPMLYHGMSYVDKVTGRPRGYMRLASNPLDSVLLTCDVRSAPEDWRPVA 360
CrPCS2      RFKYSPHWVRVDDLLEAMAQPDPAIGKPRGFLLLGCRTPRESALFMLDPAVAPLPRQLPP 233
               * * * * * : * * * * * : * * : : : *
AtPCS1      KYLKEDVPRLVSSQHVDS---VEKIISVVFKSLP----- 271
CrPCS1      AFVRSGAALVQDLAAAGGLSAEAVRAVVDAAPL----- 395
CrPCS2      AALRSALRPAAPAVAAAAAAVAAPQAVASAPLAPPALAGGSSGDLGPAAAAALSSSSGG 293
               : : . . . : * .
AtPCS1      -----
CrPCS1      -----
CrPCS2      GGGGGGWCGLLGMGMDKAGSCSSLSLGGCSINGGGGASPRPGGGGSADVDADAAAAA 353

AtPCS1      -----SNFNQFIRWVAEIRITEDS-----NQNLSAEEKS-----R 301
CrPCS1      -----AALDTFLVVRSGAPMAAAP-----PDQTGATAASGHVCPGPPPSAPAAGAGAGA 445
CrPCS2      AAAEVAEAYAFITRQAPALLRQQLGLAPPPPAATATATGQVSASGEGATAAAAAAGGGAE 413
               : * : : : *
AtPCS1      LKLKQLVLKEVHETELFKHINKFLSTVGYEDSLT----- 335
CrPCS1      LDAAAGPLGAVCDTPEAMVAAVRRASEMGNAAAT----- 479
CrPCS2      AGDEDHDLLEEDEEEAAATAAAGSSSSSSSGSGVPTLEALVAALVAAAPLRSICTLL 473
               * : : : :
AtPCS1      -----YAAAKACCQGAELSGSPSKEFCCRETVCVKIKGPDDSE--- 374
CrPCS1      -----DLAAATAAASAAAGPPASSAAGSAPAVAASTSPKAKKGC 521
CrPCS2      VRRPTLAAVGEAVPGPCGCPAAAAAAGPQEAAGAREAPVPAPQAVVAGAGVG 533
               . : . * : * . * .
AtPCS1      -----
CrPCS1      -----
CrPCS2      GARDQQACSGGGGGGGGAVVGGISIVTAVAPSPFLPLAGTRAAPHTDAHAAHHTSHT 593

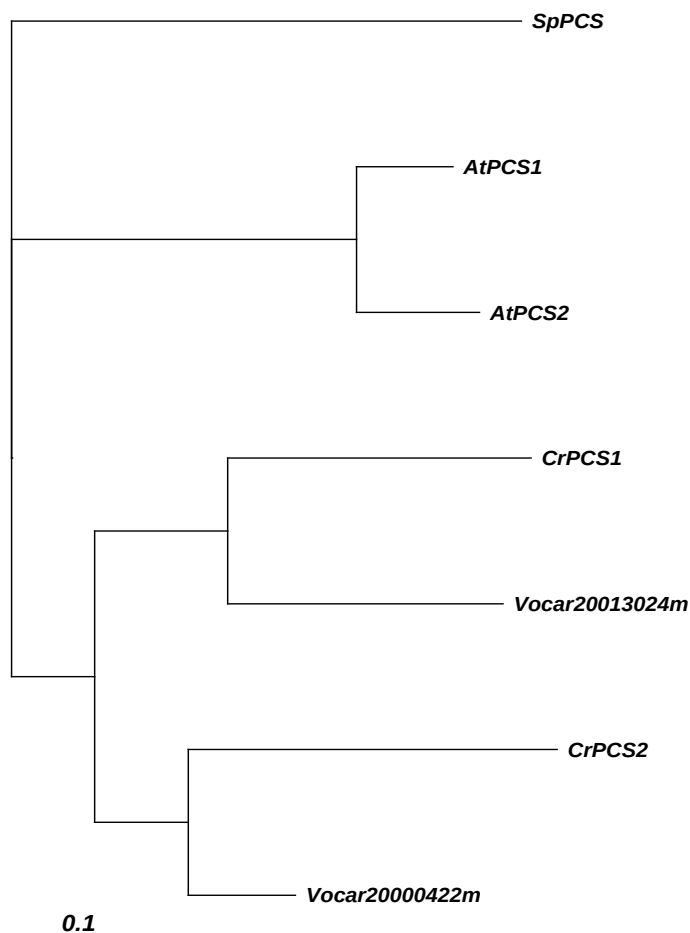
AtPCS1      -----GTVVTGVVVRDGN---EQKVDLLVP 396
CrPCS1      -----TGKTPCGSGSCGTSASVTDGGGGAAAAAAS 554
CrPCS2      HQHDSHSGSSSSIGSSCKAVSSSSSSSGSTTTTSTASEGLASADGNGSSASGSSSN 653
               . : . * .
AtPCS1      S-----TQTECECGPEATYPAGN-- 414
CrPCS1      C-----SSTTMMAAATAIFTAHDRC 574
CrPCS2      CGSSMAGDDGASPDPLGLYGRNSVGATFVGGGSSSSNGDGSSMLMMAGATAGGDGSSRC 713
               . : . * .
AtPCS1      -----
CrPCS1      IP----- 576
CrPCS2      CHGEPLHHCVPVQVQALTLEELRFTNMFKLVSYCLRRRAAGCSHAPPPDLSAFMKPAMPA 773

AtPCS1      -----
CrPCS1      --MAQRQQLLDELKGMPLYGIVSAHLTVRRAATNADGAAGAGADGRSGVSAAEAADR 633
CrPCS2      AAAAPAAVAAQPAVAAAAAASPVGQASATATASATAISAAAPAAAAAATAGGECGC 833

AtPCS1      -----DVFTALLLALPPQTWS----- 430
CrPCS1      RVLLHGEYLTEKLVMAALLQRPEAWSPAPPPPSAAAAQAAAAAAAAAAAAAGAAAPGS 693
CrPCS2      SLHLPDMAAEKLTAAALLLSEADCWPVQPPPPPPPSQPGAGGANGDGCSEGSAAATAA 893
               . * * : *
AtPCS1      -----GIKDQALMHMKQLISMASL-----PT 452
CrPCS1      PTAAGPAAV-----PATAPGGGAWGWADPAAGQQWGLVGLGNYNVVEAEAA 740
CrPCS2      AAAAAAAAGVRMCKRPNCRRCRRRLAAAGDRAAALAVLREEWGSLLRLAPLG-LFASSP 952
               . : * : :
AtPCS1      LLQEEVLHLRRQLQ---LLKRCQENKEEDLAAPAY----- 485
CrPCS1      YLREQLAHIDEVLQGGDVTRTCGEHVHRLDCAAHGH----- 776
CrPCS2      VLRDELAFVRLQLAASPLLAGSLAAPAAPAEFVSSAVAVV 994
               * : : : :

```

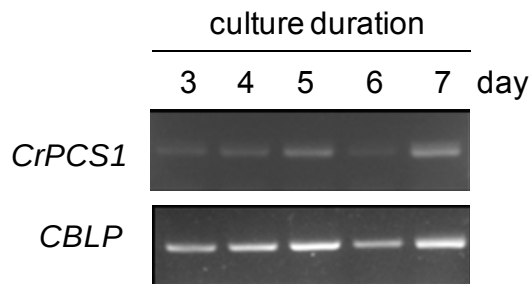
ภาพที่ 3.10: Sequence alignment ระหว่าง CrPCS1, CrPCS2 และ Arabidopsis AtPCS1



ภาพที่ 3.11: Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง CrPCS1, CrPCS2 และ PCS จากสิ่งมีชีวิตอื่น (AtPCS1, AtPCS1 จาก *Arabidopsis*; Vocar20000422m, Vocar20013024m จาก *Volvox carteri*; และ SpPCS จาก *Schizosaccharomyces pombe*)

3.2.2 การแสดงออกของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ในสาหร่าย *C. reinhardtii*

เพื่อทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ผู้วิจัยได้ออกแบบ oligonucleotide primers ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* และทำการตรวจวัดปริมาณของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* RNAs ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR เทียบกับปริมาณของ *CBLP* RNA ซึ่งเป็น loading control ที่นิยมใช้ในงานวิจัย *C. reinhardtii* โดยในเบื้องต้น ทำการศึกษาถึงการแสดงออกในสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหาร TAP สูตรปกติ เป็นเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่วันที่ 3 ถึง วันที่ 7 ของการเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า *CrPCS1* มีการแสดงออกตลอดระยะเวลาที่ทดสอบ และไม่ได้มีระดับที่แตกต่างกันมากนัก สำหรับ *CrPCS2* ผู้วิจัยยังไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกได้ แม้ว่าจะได้พยายามหลายครั้งและด้วย primer คู่อื่น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *CrPCS2* มีระดับการแสดงออกที่ต่ำมากภายใต้สภาวะการเลี้ยงปกติ หรืออาจจะเกิดจากปัญหาทางเทคนิคซึ่งจะต้องผู้วิจัยจะพยายามแก้ไขต่อไป และจะดำเนินการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ได้รับพิษจากโลหะหนัก



ภาพที่ 3.12 การแสดงออกระดับ RNA ของ *CrPCS1* เทียบกับ *CBLP* (loading control) ในสาหร่าย *C. reinhardtii* เลี้ยงในอาหาร TAP ที่ระยะเวลาต่างกัน วัดผลด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

3.2.3 การศึกษา heterologous expression ของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

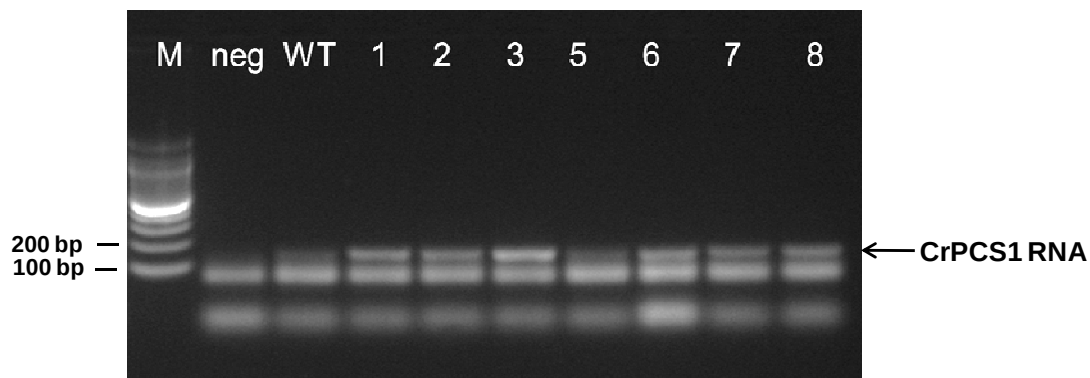
เพื่อทดสอบว่า ยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ในสาหร่ายสามารถแปลรหัสได้เป็น PCS ที่ช่วยในการสังเคราะห์ PC ได้จริง ผู้วิจัยมีแผนการทดลองที่จะนำยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* จากสาหร่าย *C. reinhardtii* มาแสดงออกแบบต่างเจ้าบ้าน (heterologous host expression) คือ ในยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งโดยปกติไม่มียีน PCS และไม่สามารถสังเคราะห์ PC ได้ แต่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงว่า หากนำยีน PCS อื่นมาแสดงออกใน *S. cerevisiae* ก็จะสามารถผลิต PC ได้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากทดสอบผลการแสดงออกในยีสต์สายพันธุ์ $\Delta ycf1$ ซึ่งเป็น mutant ที่ไม่สามารถนำ glutathione-Cd conjugate ไปเก็บในแวคิวโอลได้และมีความสามารถในการทนแคดเมียมต่ำ ก็จะเห็นความต้านทานของยีสต์สายพันธุ์ที่นำยีน PCS มาใส่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (Vatamaniuk et al., 1999)

ลำดับแรกของการทดลองเป็นการโคลน full-length *CrPCS1* และ *CrPCS2* coding sequence เพื่อนำมาตัดต่อเข้ากับพลาสมิด p425-GPD อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน full-length cDNAs ของยีนทั้งสองด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุที่ยีนมีการแสดงออกต่ำ ขึ้นต้นเอ็นเอมีขนาดยาว และ/หรือ primers ที่ใช้ขาดประสิทธิภาพในการเกาะที่ตำแหน่งที่คาดหวัง ทั้งนี้ ผู้วิจัยได้พยายามแก้ปัญหาที่ 2 และ 3 ด้วยการออกแบบ primers ใหม่ และรวมถึงการ amplify *CrPCS1* coding sequence ที่ละครั้งยีนและนำมาต่อกันที่ตำแหน่ง *Apa I* restriction site (ภาพที่ 2.1) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR ที่ใช้ primers เหล่านี้ โดยผู้วิจัยสันนิษฐานว่าปัญหาอาจเกิดจากความผิดพลาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน database ที่ไม่ตรงต่อความเป็นจริง จึงจะต้องดำเนินการตรวจสอบหาข้อผิดพลาดนี้ต่อไป

3.2.4 การสร้างสาหร่าย *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* ด้วยวิธีการ antisense RNA-mediated gene silencing

เนื่องจาก *C. reinhardtii* ไม่สามารถเกิด homologous recombination ได้ใน nuclear genome ดังนั้นจึงไม่สามารถชักนำให้เกิด targeted gene disruption ได้ การศึกษาความสำคัญของยีนจึงทำได้เพียงแค่ลดระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธีหนึ่งที่ใช้มานานแต่ความสามารถไม่สูงมากนักคือ วิธี antisense RNA-mediated gene silencing ผู้วิจัยจึงออกแบบ primers สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะช่วงบริเวณตรงกลาง coding sequence ของ *CrPCS1* ยาวประมาณ 300 bp หลังจากโคลนใส่ในพลาสมิด pGEM T-Easy ย้ายมาใส่ในลักษณะกลับทิศในพลาสมิด pSL18 ภายใต้การแสดงออกที่ควบคุมโดย *PsaD* promoter

เมื่อได้ *C. reinhardtii* transformants แล้วจึงทำการวัดการแสดงออกของ *CrPCS1* ใน 32 transformants ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า ไม่พบ transformant ที่มีระดับการแสดงออกลดลงมากกว่า 50% (ภาพที่ 3.13) จึงไม่สามารถดำเนินการศึกษาต่อไปได้ และเปลี่ยนแนวทางไปใช้วิธี artificial microRNA-mediated gene silencing ที่เพิ่งได้รับการคิดค้นใหม่และแสดงว่ามีประสิทธิภาพมากกว่า (Molnar et al., 2009)



ภาพที่ 3.13 ระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* ในตัวอย่างของ *C. reinhardtii* transformants ที่ได้จากการบวกรับการ antisense RNA-mediated gene silencing

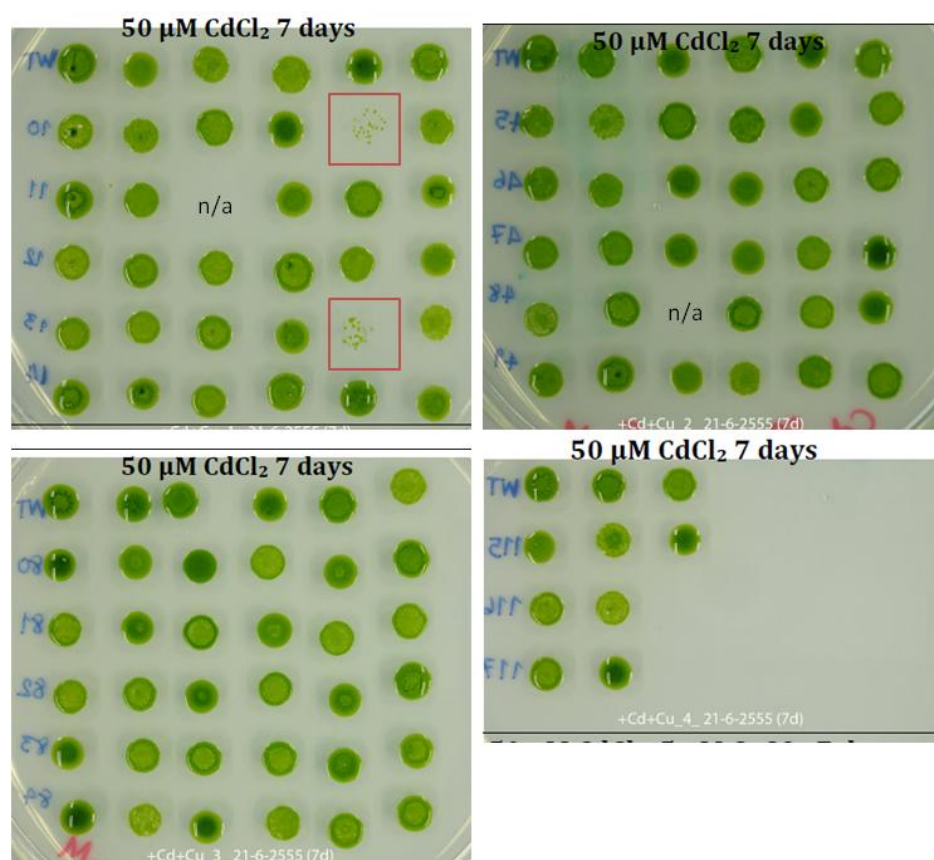
3.2.5 การสร้างสายสำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ที่ลดระดับการแสดงออกของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* ด้วยวิธีการ artificial microRNA-mediated gene silencing

ในการออกแบบบริเวณเป้าหมาย (target region) บนยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ผู้วิจัยใช้โปรแกรม Designer ใน WMD3 – Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org/>) และเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งที่สามารถลดการแสดงออกของ *CrPCS1* และอีกลำดับหนึ่งที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *CrPCS2* เมื่อ transform สำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ CC-503 ด้วยพลาสมิดที่มี artificial microRNA ที่จำเพาะกับ *CrPCS1* หรือ *CrPCS2* นี้แล้ว ได้โคลนของ transformants จำนวนมาก แต่จากการวัดระดับการแสดงออกของยีน *CrPCS1* ใน transformants ทั้งสองแบบ อย่างละ 8 โคลน ยังไม่พบสายพันธุ์ที่ลดการแสดงออกมากกว่า 50% จึงจะต้องดำเนินการตรวจสอบระดับการแสดงออกในโคลนอื่นๆ ต่อไป เพื่อทดสอบว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2*

ที่คาดว่าเป็นยีน PCS ในจีโนมของ *C. reinhardtii* สามารถช่วยสังเคราะห์ phytochelatin และเพิ่มความทนทานต่อแคดเมียมและโลหะอื่น ๆ หรือไม่ อย่างไร

4. การคัดแยกสาหร่าย *C. reinhardtii* พันธุ์กลาย (mutant) ที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม

สาหร่ายพันธุ์กลายที่นำมาศึกษาได้มาจากการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutagenesis) จากประชากรของสาหร่ายที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี UV หรือจากการ transform ด้วยพลาสมิด pSL18 ที่ผ่านการ linearized ด้วย KpnI restriction enzyme ซึ่งเมื่อเข้าสู่เซลล์สาหร่ายแล้ว สามารถแทรกที่ตำแหน่งต่างๆ ในจีโนม จากการศึกษาลำดับประชากรของสาหร่ายพันธุ์กลายจาก UV mutagenesis 5,000 โคโลนี ไม่พบสายพันธุ์ที่มีความทนทานลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่จาก 500 โคโลนีกลายที่ได้จาก insertional mutagenesis พบ 2 สายพันธุ์ที่มีความทนทานลดลง (ภาพที่ 3.14) เนื่องจากการศึกษานี้จึงตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่า พันธุ์กลายที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม (cadmium-sensitive mutant) มีชิ้นดีเอ็นเอของ pSL18 แทรกอยู่ในยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการนำแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ หรือกระบวนการลดพิษของแคดเมียมภายในเซลล์ ดังนั้น ผู้วิจัยจะนำ cadmium-sensitive mutants ทั้งสองสายพันธุ์นี้ไปศึกษาเพื่อตรวจหาชิ้นสำคัญ รวมถึงคัดแยกสาหร่ายให้ได้จำนวนมากยิ่งขึ้นต่อไป



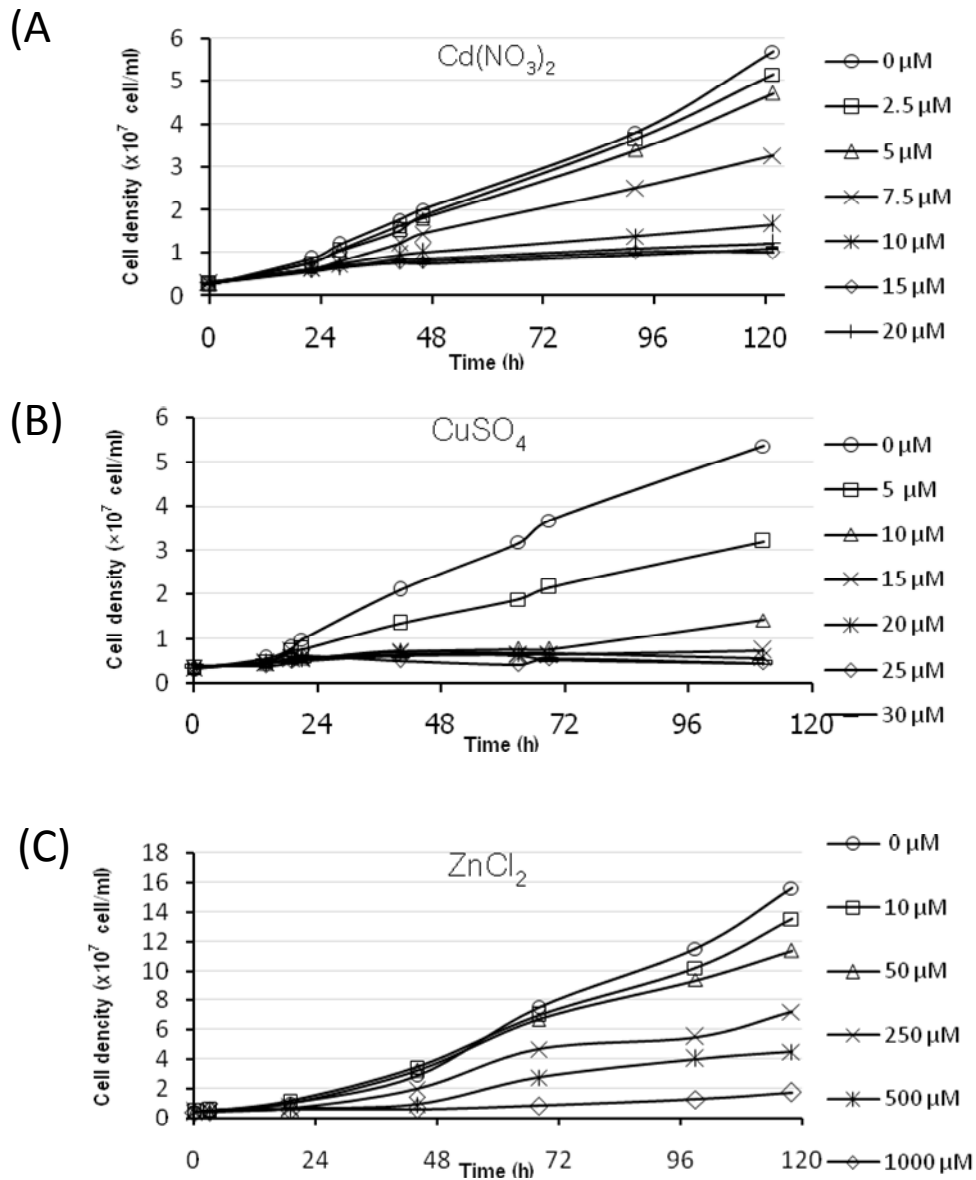
ภาพที่ 3.14 ตัวอย่างผลการคัดแยกสาหร่าย *C. reinhardtii* พันธุ์กลายที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียมจากประชากรที่ได้จาก insertional mutagenesis ด้วยพลาสมิด pSL18

5. การศึกษาศักยภาพของสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ในการบำบัดโลหะหนัก ควบคู่กับการผลิตไขมันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซล

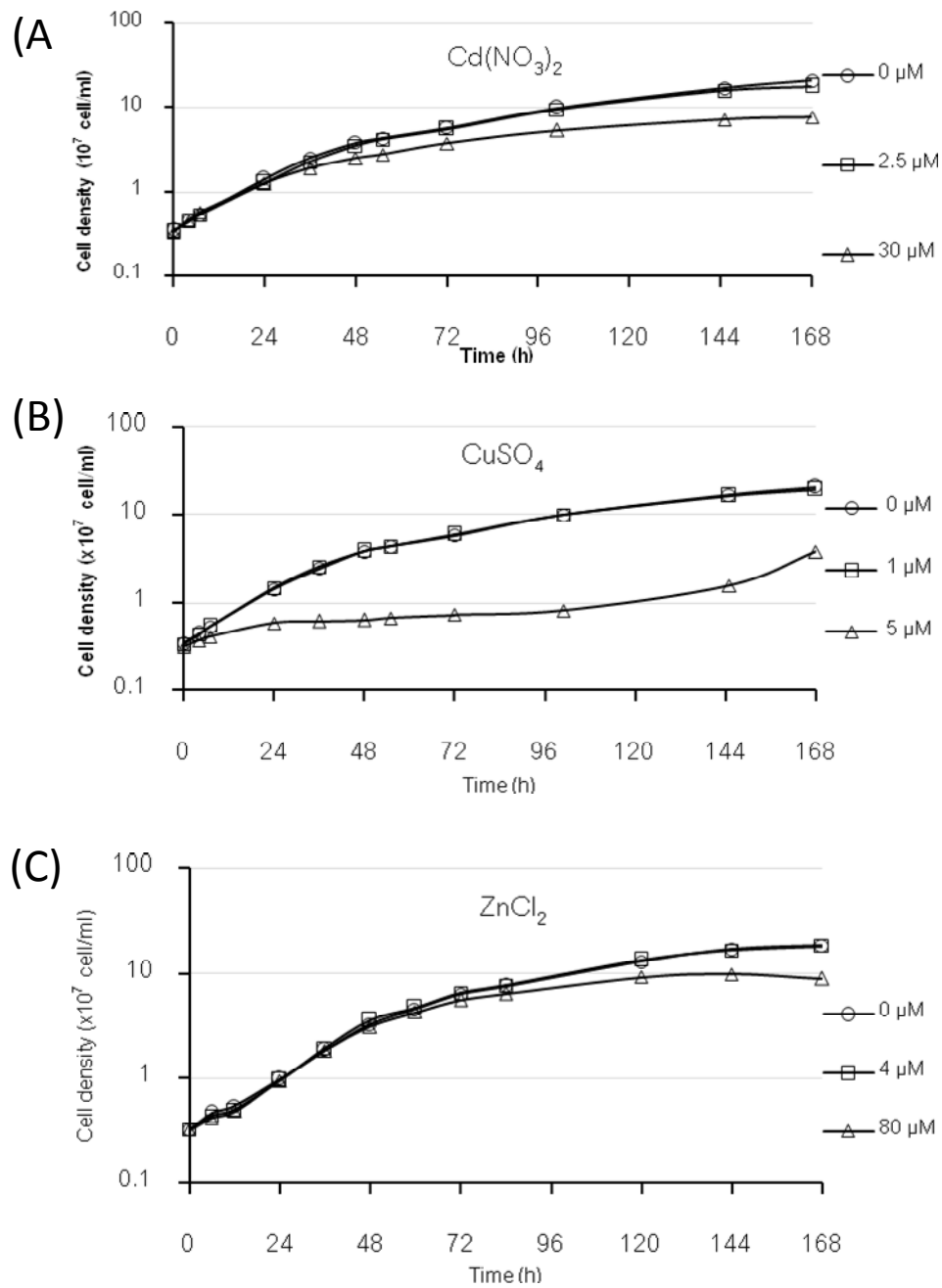
จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาผลของความเข้มข้นโลหะ 3 ชนิด คือ แคดเมียม ทองแดง และสังกะสี ต่อการเจริญของสาหร่าย *C. vulgaris* ในอาหารเหลว BG-11 พบว่า ปริมาณโลหะที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้สาหร่ายมีการเจริญเติบโตลดลง ดังกราฟประชากรที่แสดงในภาพที่ 3.15 และเมื่อพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะและความหนาแน่นสุดท้ายของเซลล์พบว่า สาหร่ายมีการเจริญที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งโลหะ 3 ชนิด

เพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นโลหะหนักต่อระดับการสะสมโลหะในเซลล์และผลผลิตไขมันของสาหร่าย ผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายอีกครั้งในอาหารเหลว BG-11 เติมสารละลายโลหะแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสองระดับ คือ ความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญมากนัก และความเข้มข้นที่ลดอัตราการเจริญอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 30 μM , CuSO_4 ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 μM และ ZnCl_2 ที่ความเข้มข้น 4 และ 80 μM พบว่าสาหร่ายมีการเจริญเติบโตเป็นไปตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 3.16, ตารางที่ 3.1) เมื่อนำสาหร่ายที่เลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวมาศึกษาปริมาณไขมันที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายไร้ขั้ว พบว่า สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเติมโลหะความเข้มข้นต่ำมีปริมาณไขมันต่อน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างจากสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารปกติมากนัก ในขณะที่สาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารที่เติมโลหะความเข้มข้นสูงมีปริมาณไขมันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นเมื่อนำผลชีวมวลสะสมและปริมาณไขมันที่ได้นี้มาคำนวณผลผลิตไขมัน พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงในอาหารเติมโลหะความเข้มข้นต่ำไม่ได้รับผลกระทบในเชิงผลผลิตไขมัน แต่ความเข้มข้นโลหะในระดับที่เป็นพิษส่งผลให้ผลผลิตไขมันลดลงได้ (ตารางที่ 3.1)

เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพของสาหร่ายในการบำบัดโลหะที่ปนเปื้อนพบว่า ประสิทธิภาพของสาหร่ายที่สามารถกำจัดโลหะหนักแตกต่างกันออกไป ตั้งแต่ 39% ถึง 98% removal efficiency โดยสูงที่สุดในอาหารที่เติม 2.5 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ และต่ำที่สุดในอาหารที่เติม 5 μM CuSO_4 (ตารางที่ 3.2) และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโลหะที่คงเหลือในอาหารเลี้ยงหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีความเข้มข้นต่ำกว่ามาตรฐานที่กำหนดสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงาน (Notification of the Ministry of Science, Technology and Environment, No. 3, B.E.2539, 1996) และน้ำทิ้งสู่ระบบชลประทานเพื่อการเกษตร (Royal Irrigation Department Order No. 883/2532ม 1989) ยกเว้นในกรณีของแคดเมียมในการทดลองที่เติม 30 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ดังนั้นสาหร่าย *C. vulgaris* จึงอาจจะจัดได้ว่ามีศักยภาพในการเลี้ยงเพื่อการกำจัดโลหะหนักที่มีความเข้มข้นไม่สูงเกินไป ควบคู่กับการผลิตไขมันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซล



ภาพที่ 3.15 การเจริญของสาหร่าย *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 เติบโตภายใต้ความเข้มข้นต่างๆ กัน (A): $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (B): CuSO_4 (C): ZnCl_2



ภาพที่ 3.16 การเจริญของสาหร่าย *C. vulgaris* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่เติมโลหะที่
สองความเข้มข้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลผลิตไขมันและศักยภาพในการบำบัดโลหะที่ปนเปื้อน
(A): $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (B): CuSO_4 (C): ZnCl_2

ตารางที่ 3.1 การเจริญเติบโตและไขมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *C. vulgaris* ในอาหาร BG-11 ที่เติมโลหะ เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ (mean $\pm$ SD; n = 3)

Treatment	Relative Specific growth rate ¹ (%)	Relative Final cell density ² (%)	Relative Biomass ³ (%)	Relative Lipid content ⁴ (%)	Relative Lipid productivity ⁵ (%)
Cd(NO₃)₂					
2.5 μ M	88 $\pm$ 10	86 $\pm$ 3	99 $\pm$ 7	90 $\pm$ 11	94 $\pm$ 17
30 μ M	85 $\pm$ 11	37 $\pm$ 6	56 $\pm$ 3	130 $\pm$ 6	76 $\pm$ 8
CuSO₄					
1 μ M	104 $\pm$ 4	94 $\pm$ 8	101 $\pm$ 6	93 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4
5 μ M	39 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3	21 $\pm$ 5	118 $\pm$ 6	26 $\pm$ 5
ZnCl₂					
4 μ M	109 $\pm$ 5	99 $\pm$ 5	100 $\pm$ 6	103 $\pm$ 5	103 $\pm$ 5
80 μ M	104 $\pm$ 8	48 $\pm$ 2	68 $\pm$ 2	119 $\pm$ 7	81 $\pm$ 7

¹ อัตราการเจริญจำเพาะของสาหร่ายที่เลี้ยงโดยไม่เติมโลหะหนักเท่ากับ 0.053 d⁻¹

² ความหนาแน่นของเซลล์สุดท้ายของสาหร่ายที่เลี้ยงโดยไม่เติมโลหะหนักเท่ากับ 196 $\times$ 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

³ ชีวมวลของสาหร่ายที่เลี้ยงโดยไม่เติมโลหะหนักเท่ากับ 0.752 กรัมต่อลิตร

⁴ ปริมาณน้ำมันของสาหร่ายที่เลี้ยงโดยไม่เติมโลหะหนักเท่ากับ 28.53 เปอร์เซ็นต์ของชีวมวลแห้ง

⁵ ผลผลิตน้ำมันของสาหร่ายที่เลี้ยงโดยไม่เติมโลหะหนักเท่ากับ 0.030 กรัมต่อลิตรต่อวัน

ตารางที่ 3.2 ประสิทธิภาพของสาหร่าย *C. vulgaris* ในการกำจัดโลหะที่เติมในอาหาร BG-11

Treatment	Initial conc. (mg/l)	Final conc. (mg/l)	Metal removal (%)	Bioaccumulation (pg/cell)	Concentration factor
Cd(NO₃)₂					
2.5 μ M	0.253	0.01 $\pm$ 0.0	98 $\pm$ 1	0.74 $\pm$ 0.02	686 $\pm$ 25
30 μ M	3.385	1.33 $\pm$ 0.16	57 $\pm$ 5	11.99 $\pm$ 1.22	712 $\pm$ 64
CuSO₄					
1 μ M	0.088	0.047 $\pm$ 0.01	59 $\pm$ 10	0.68 $\pm$ 0.05	1001 $\pm$ 141
5 μ M	0.320	0.095 $\pm$ 0.00	39 $\pm$ 0	23.82 $\pm$ 1.81	1149 $\pm$ 142
ZnCl₂					
4 μ M	0.483	0.19 $\pm$ 0.04	56 $\pm$ 9	1.36 $\pm$ 0.08	761 $\pm$ 82
80 μ M	5.15	2.55 $\pm$ 0.14	62 $\pm$ 2	22.29 $\pm$ 0.95	583 $\pm$ 51

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของความเข้มข้นนอกเซลล์ต่อการเจริญและการสะสมแคดเมียมของสาหร่าย *C. reinhardtii* แสดงให้เห็นว่า แคดเมียมความเข้มข้นสูงยับยั้งการเจริญของสาหร่าย โดยหากวัดจากการอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากการเติมแคดเมียมในอาหารเลี้ยง TAP พบว่าค่า IC_5 และ IC_{50} อยู่ที่ประมาณ 250 μM และ 1,000 μM ความเข้มข้นของแคดเมียมในอาหารเลี้ยงส่งผลให้สาหร่ายสะสมแคดเมียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วงแรก และลดต่ำลงในระยะเวลาต่อมา ระดับการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วไม่น่าที่จะเกิดจากการเพิ่มจำนวนของสาหร่าย เนื่องจากภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่มีโลหะหนักนี้ สาหร่ายมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าความเร็วของการเปลี่ยนแปลงระดับโลหะภายในเซลล์มาก จึงน่าจะสรุปได้ว่าสาหร่ายมีกลไกในการขับแคดเมียมออกนอกเซลล์ อย่างไรก็ตาม หากความเข้มข้นของแคดเมียมภายนอกสูงเกินไป กลไกการลดการสะสมแคดเมียมก็ไม่อาจป้องกันไม่ให้เซลล์สะสมแคดเมียมได้ และการสะสมของแคดเมียมทำให้สาหร่ายทำให้เกิดการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ซึ่งสำคัญต่อการสังเคราะห์ด้วยแสง เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ สังเกตได้จากปริมาณ MDA ซึ่งเกิดจากการออกซิไดซ์ของไขมันอิ่มตัว การทดลองวัดสัดส่วนเซลล์เป็นและเซลล์ตายแสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นภายนอกของแคดเมียม 1,000 μM พิษของแคดเมียมทำให้เซลล์สาหร่ายตายได้

การศึกษายีนในจีโนมของสาหร่าย *C. reinhardtii* ที่มีลำดับคล้ายยีน PCS พบยีนที่ 2 ตำแหน่ง คือ ที่โครโมโซม 7 และ 14 ซึ่งตั้งชื่อว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2* ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเดิมที่เคยค้นพบเพียง 1 ยีน เมื่อเริ่มโครงการ ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีรายงานของยีนประเภทนี้มีบางสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบยีน PCS ได้มากกว่า 1 ยีน เช่น ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* (Lee and Kang, 2005) แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *CrPCS1* และ *CrPCS2* ที่พบ กับลำดับของยีนใน *A. thaliana* พบว่ายีนทั้งสองของ *C. reinhardtii* มีลำดับใกล้เคียงกันเองมากกว่าใกล้เคียงกับยีนของ *A. thaliana* ผลการเปรียบเทียบนี้บ่งชี้ว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2* น่าจะเกิดจาก gene duplication หลังจากการแยกกันเชิงวิวัฒนาการของพืชและสาหร่ายแล้ว นอกจากนี้ ยังพบยีนในจีโนมของ *Volvox carteri* ยีนหนึ่งคล้ายกับ *CrPCS1* และอีกยีนคล้ายกับ *CrPCS2* การที่พบ orthologous genes ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว บ่งชี้ว่า *CrPCS1* และ *CrPCS2* เกิดจาก gene duplication ตั้งแต่ยุคเริ่มต้นวิวัฒนาการของสาหร่ายสีเขียว และยีนทั้งสองน่าที่จะมีหน้าที่จำเพาะที่จำเป็นต่อความอยู่รอดของสาหร่าย

เพื่อค้นหาหน้าที่เฉพาะของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* ผู้วิจัยได้พยายามลดการแสดงออกของแต่ละยีน รวมถึงการลดการแสดงออกของทั้งสองยีนพร้อมกัน ด้วยวิธี antisense-mediated gene silencing แต่จากการทดลองกับ *CrPCS1* ผลปรากฏว่าไม่มี transformant ของสาหร่ายที่มีระดับการแสดงออกลดลง ซึ่งอาจจะเกิดจากประสิทธิภาพที่ต่ำของวิธี antisense-mediated gene silencing ในสาหร่ายชนิดนี้ (Schroda, 2006) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปใช้วิธีลดการแสดงออกด้วย artificial microRNA-mediated gene silencing ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่ามาก (Molnar et al., 2009) ผู้วิจัยได้ดำเนินการสำรวจ transformants ที่ได้จากกระบวนการนี้แล้วจำนวนหนึ่ง แต่ยังไม่พบสายพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกลดลง

มากกว่า 50% และจะดำเนินการสำรวจ transformants ที่ได้ ต่อไปในอนาคต รวมถึงจะดำเนินการศึกษาสายพันธุ์ที่ผ่านการลดการแสดงออกนี้ ร่วมกับสายพันธุ์กลายที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียมที่คัดแยกได้จากประชากรสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยแสงยูวี ถึงปริมาณของ PC ที่ผลิตในเซลล์สายพันธุ์เหล่านี้และความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนและสะสมแคดเมียม

ด้วยเหตุที่ไม่สามารถดำเนินการศึกษาสายพันธุ์ *C. reinhardtii* ที่มีระดับยีน PCS ลดลงได้ในช่วงระยะเวลาวิจัยที่กำหนดนี้ ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนแนวทางวิจัยไปศึกษาถึงศักยภาพของสายพันธุ์ *C. vulgaris* ในการบำบัดโลหะหนักควบคู่กับการผลิตไขมัน เนื่องจากมีรายงานว่า *C. vulgaris* มีศักยภาพสูงในทั้งสองกระบวนการนี้ แต่ยังไม่มีการศึกษาการใช้ประโยชน์แบบควบคู่กัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในขณะที่ *C. vulgaris* ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเติม $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 หรือ ZnCl_2 สายพันธุ์ชนิดสามารถผลิตไขมันรวมในปริมาณที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้เติมโลหะหนัก และที่ความเข้มข้นของโลหะไม่สูงจนทำให้ผลผลิตชีวมวลลดลงมากจนเกินไป *C. vulgaris* สามารถให้ผลผลิตไขมัน (กรัมต่อลิตรต่อวัน) ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในสภาวะปกติ และสามารถลดระดับการปนเปื้อนของโลหะให้อยู่ต่ำกว่าระดับที่กำหนดสำหรับน้ำทิ้งจากโรงงานและน้ำทิ้งสู่ระบบชลประทานเพื่อการเกษตรได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า *C. vulgaris* มีศักยภาพในการบำบัดโลหะหนักควบคู่กับการผลิตไขมัน และควรได้รับการสนับสนุนการวิจัยและพัฒนาในขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. การศึกษาเพื่อค้นหาหน้าที่เฉพาะของยีน *CrPCS1* และ *CrPCS2* โดยการลดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค artificial microRNA-mediated gene silence ซึ่งจากการทดลองนี้ได้ผลลัพธ์เป็น transformants จำนวนมาก ซึ่งจะต้องทำการสำรวจเพื่อหาสายพันธุ์ที่มีระดับการแสดงออกของทั้งสองยีนหรือยีนใดยีนหนึ่งลดลงอย่างชัดเจน และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับการสูญเสียยีน PCS นี้
2. การแสดงออกระดับมากเกินไป (overexpression) ของยีน *CrPCS1* และหรือ *CrPCS2* ใน *C. reinhardtii* หรือสายพันธุ์อื่น เช่น *C. vulgaris* เพื่อเพิ่มความสามารถในการบำบัดโลหะหนักในแหล่งน้ำ
3. การศึกษาสายพันธุ์กลายที่สูญเสียความทนทานต่อแคดเมียม เพื่อค้นหากลไกที่บกพร่องและยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจพื้นฐานถึงกลไกและยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลดพิษและสะสมโลหะของสายพันธุ์
4. การศึกษาเพิ่มเติมถึงศักยภาพของ *C. vulgaris* และสายพันธุ์อื่นๆ ในการบำบัดคุณภาพน้ำควบคู่กับการผลิตไขมันเพื่อพลังงานชีวภาพ โดยอาจศึกษาเพิ่มเติมถึงสารปนเปื้อนชนิดอื่น เช่น สารประกอบอินทรีย์ สารประกอบไนโตรเจน และสารประกอบฟอสฟอรัส และการศึกษาโดยใช้น้ำทิ้งจริง

เอกสารอ้างอิง

Allen, M.M. and stanier R.Y. (1968). Selective isolation of blue-green algae from water and soil. J Gen Microbiol 51, 203-209.

Arnon, D.I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. Plant Physiol 24, 1-15.

Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T., and Niyogi, K.K. (2003). Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. Plant Cell 15, 992-1008.

Bligh, E.G., DYER W.J (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37, 911-917.

Gorman, D.S., and Levine, R.P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 54, 1665-1669.

Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., and Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207, 604–611.

Kindle, K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 87, 1228-1232.

Lee, S., Kang, B.S. (2005). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective *cad1-3* mutant. Mol Cells 19, 81-87.

Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., Baulcombe, D. (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 58, 165-174.

Notification of the Ministry of Science, Technology and Environment, No. 3, B.E.2539 (1996) issued under the Enhancement and Conservation of the National Environmental

Quality Act B.E.2535 (1992), published in the Royal Government Gazette, Vol. 113 Part 13 D, dated February 13, B.E.2539 (1996).

Royal Irrigation Department Order No. 883/2532 (1989), dated 19 December B. E. 2532 (1989).

Schroda, M. (2006) RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet* 49, 69-84.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., and Rea, P.A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7110-7115.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

ยังอยู่ในระหว่างการจัดเตรียม manuscript

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

งานวิจัยนี้ได้ใช้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอน วิชาโครงงานวิจัยทางชีววิทยา ของนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 3 คน

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในการประชุมประจำปี “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 12