Thai J. Genet. 2011, 4(1) : 9-21

สาหร่ายเซลล์เดียวแคลมิโดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) กับงานวิจัยทางพันธุศาสตร์

The unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* and genetic research

อัญชลี ศิริขจรกิจ

Anchalee Sirikhachornkit

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

E-mail: anchalee.si@ku.ac.th

หากให้ยกตัวอย่างสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ที่รู้จัก หลายๆ ท่านคงจะนึกย้อนไปถึงสมัยเรียนวิชาพันธุศาสตร์ ที่ถูกบังคับให้ตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะสีตา หรือลักษณะปีกของแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* หรือบางท่านอาจจะเคยโคลนยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อตรวจสอบการทำงานของโปรตีนที่ต้องการ หรือท่านที่ศึกษากระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ของยูแคริโอต ก็อาจจะเลือกใช้ยีสต์ *Saccharomyces cereviseae* ส่วนท่านที่ทำงานวิจัยทางด้านพืชก็คงคุ้นเคยกับพืชในตระกูลมัสตาร์ดที่มีชื่อว่า อะราบิดอปซิส (*Arabidopsis thaliana*) เป็นอย่างดี จะสังเกตได้ว่าสิ่งมีชีวิตต้นแบบที่กล่าวมานี้ มีคุณลักษณะที่เหมือนกันหลายอย่าง ซึ่งทำให้เป็นที่นิยมใช้ในงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น มีขนาดเล็กทำให้ไม่ต้องใช้พื้นที่มากในการเพาะเลี้ยง หรือเจริญเติบโตได้เร็ว และมีวัฏจักรชีวิตสั้น ทำให้ย่นเวลาในการติดตามการถ่ายทอดลักษณะจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง และที่สำคัญในขณะนี้ก็คือ มีฐานข้อมูลลำดับเบสจีโนมที่สามารถเข้าไปใช้ตรวจสอบหายีนที่สนใจ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

สิ่งมีชีวิตต้นแบบอีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจไม่เป็นที่คุ้นเคยนัก แต่มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยหลายๆ ด้านมาเป็นเวลานาน ไม่ว่าจะเป็นงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง การสร้างคลอโรพลาสต์ การส่งสัญญาณและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม กลไกการทำงานของฟลาเจลลา การซ่อมแซมดีเอ็นเอ จังหวะวงจรชีวิต ฯลฯ และที่สำคัญสิ่งมีชีวิตชนิดนี้กำลังมีบทบาทสำคัญมากขึ้น ในยุคที่การวิจัยและพัฒนาพลังงานทางเลือกเป็นสิ่งจำเป็น เช่นในการพัฒนาแหล่งพลังงานไบโอดีเซล หรือพลังงานไฮโดรเจน สิ่งมีชีวิตที่กล่าวถึงนี้ก็คือ สาหร่ายสีเขียวแคลมิโดโมแนส (*Chlamydomonas reinhardtii*) ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีขนาดยาวประมาณ 10 ไมครอน และกว้างประมาณ 3 ไมครอน มีฟลาเจลลา 2 สายทางด้านหน้าสำหรับการเคลื่อนที่ มีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่หนึ่งอันซึ่งกินเนื้อที่ประมาณ 40% ของเซลล์ (Rochaix, 1995) และมี eye spot อยู่ที่ขอบด้านหนึ่งของคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ช่วยรับแสงและทำให้เซลล์รับรู้ว่า ควรจะเคลื่อนที่ไปยังทิศทางใด สาหร่ายชนิดนี้สามารถเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ ทั้งในอาหารเหลวและอาหารวุ้น โดยสามารถเจริญเติบโตโดยใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน

เพียงอย่างเดียว (photoautotrophic) หรือใช้แหล่งคาร์บอนอินทรีย์ในรูปของแอซีเทตในอาหารเลี้ยง โดยมีแสง (mixotrophic) หรือไม่ต้องมีแสง (heterotrophic) ก็ได้ เซลล์โดยทั่วไปอยู่ในสภาพแฮพลอยด์ ซึ่งทำให้สามารถศึกษาฟีโนไทป์ได้ง่ายเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ แต่ละเซลล์จะมีแบบการผสมพันธุ์เป็น mating type + (mt+) หรือ mating type – (mt-) อย่างใดอย่างหนึ่งตลอดชีวิต ซึ่งจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพื่อติดตามการถ่ายทอดลักษณะในรุ่นลูกได้

วัฏจักรชีวิตของแคลมิโดโมแนส (Figure 1) เริ่มจากเซลล์ในสภาพแฮพลอยด์ ซึ่งจะแบ่งเซลล์ไมโทซิสทุกๆ 8 ชั่วโมงถ้ามีแอซีเทตในอาหารเลี้ยง หรือประมาณ 10-12 ชั่วโมงถ้าไม่มีคาร์บอนจากอาหาร แต่เมื่อสภาวะการเจริญไม่เหมาะสม เช่น เมื่อมีการขาดธาตุไนโตรเจน เซลล์จะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนให้เซลล์กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) โดยแต่ละเซลล์จะมีการสร้าง mating ring ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (actin) อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นจะหลั่ง agglutinin ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน เพื่อกระตุ้นการจับกันของฟลาเจลลาระหว่างเซลล์ที่มี mating type ตรงข้ามกัน โดยเริ่มจากการใช้ปลายของฟลาเจลลามาแตะกัน จนกระทั่งฟลาเจลลาของทั้งสองเซลล์สานเข้าด้วยกันทั้งสาย ทำให้เซลล์ทั้งสองเข้ามาอยู่ชิดกันและหลั่งเอนไซม์ autolysin เพื่อย่อยผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ทั้งสองสามารถรวมตัวกันกลายเป็นเซลล์เดียวที่มีฟลาเจลลา 4 สาย เมื่อฟลาเจลลาสลายไป เซลล์จะสร้างผนังเซลล์ที่มีความหนาเป็นพิเศษเพื่อปกป้องไซโกตซึ่งอยู่ในรูปดิพลอยด์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม ไซโกตจะแบ่งเซลล์ไมโอซิส เกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ ซึ่งแบ่งเซลล์ไมโทซิสต่อไป (Harris, 2001)

การที่มีวัฏจักรชีวิตคล้ายคลึงกับยีสต์ *Saccharomyces cereviseae* ซึ่งง่ายต่อการศึกษาและติดตามผล จากการกลายพันธุ์จากชั่วรุ่นหนึ่งไปอีกชั่วรุ่นหนึ่ง ทำให้แคลมิโดโมแนสได้รับชื่ออย่างไม่เป็นทางการอีกชื่อหนึ่งว่า “ยีสต์สีเขียว” (the green yeast) (Goodenough, 1992) หรือ “ยีสต์สังเคราะห์แสง” (photosynthetic yeast) (Rochaix, 1995) นอกเหนือจากนี้ สิ่งสำคัญที่ทำให้ความนิยมในการใช้สาหร่ายแคลมิโดโมแนส เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก คือการเริ่มโครงการหาลำดับเบสของ expressed sequence tag (EST) ในประเทศญี่ปุ่น (Asamisu *et al.*, 1999; 2000) และในสหรัฐอเมริกา (Shrager *et al.*, 2003) ซึ่งทำให้เกิดการสร้างฐานข้อมูลที่ทำให้การศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลง่ายขึ้น และนำไปสู่ลำดับเบสทั้งจีโนมในปี ค.ศ. 2007 (Merchant *et al.*, 2007)

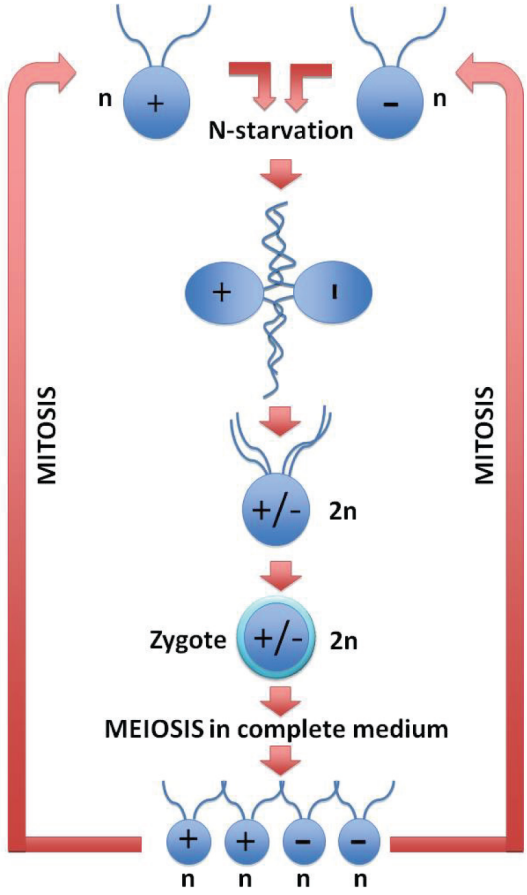

Figure 1 *Chlamydomonas* life cycle

จีโนมทั้งสาม

เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอตอื่นๆ ที่สังเคราะห์แสงได้ แคลมิโดโมแนสมีสามจีโนม คือ นิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย โดยปกติแล้วในระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมื่อเซลล์ที่เป็นดิพลอยด์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส รุ่นลูกจำนวนครึ่งหนึ่งจะได้รับการถ่ายทอดยีนจากนิวเคลียสจาก mt+ ส่วนอีกครึ่งหนึ่งจะได้รับจาก mt– ยกตัวอย่างเช่นการถ่ายทอดยีนที่กำหนด mating type ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส เป็นผลให้ครึ่งหนึ่งของรุ่นลูกเป็น mt+ และอีกครึ่งหนึ่งเป็น mt– เสมอ แต่ในปี ค.ศ. 1954 ได้มีรายงานเกี่ยวกับพันธุ์กลายที่ทนต่อยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน (Sager, 1954) โดยเมื่อสายพันธุ์ที่ดื้อยาเป็น mt+ ผสมกับสายพันธุ์ปกติ mt– รุ่นลูกจะดื้อยาทั้งหมด แต่ถ้าหากสายสายพันธุ์ที่ดื้อยาเป็น mt– ได้ผสมกับสายพันธุ์ปกติ mt+ รุ่นลูกทั้งหมดจะไม่ดื้อยา จึงสรุปได้ว่าความทนต่อยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซินมีการถ่ายทอดลักษณะทางเดียว (uniparental inheritance) และเป็นการถ่ายทอดลักษณะตาม mt+ ซึ่งต่อมาได้พบว่ายีนนี้เป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์นั่นเอง (Harris *et al*., 1989) ในทางกลับกันการถ่ายทอดยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียนั้นจะถ่ายทอดจาก mt– ไปสู่รุ่นลูกทั้งหมด โดยมีผู้พบเป็นครั้งแรกในการผสมพันธุ์ระหว่าง *C. reinhardtii* กับ *C. smithii* ซึ่งมีแผนที่การตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะของไมโทคอนเดรียที่แตกต่างกัน (Boynton *et al*., 1987) หลังจากนั้นได้มีรายงานตามมาอีกหลายฉบับเกี่ยวกับพันธุ์กลายที่มีความผิดปกติในกระบวนการหายใจซึ่งควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย (Matagne *et al*., 1989; Dorthu *et al*., 1992; Colin *et al*., 1995) ซึ่งสนับสนับสนุนข้อสรุปของ Boynton *et al*. (1987)

ลำดับจีโนมเป็นหนึ่งในหัวใจสำคัญ ที่ทำให้งานวิจัยทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในแคลมิโดโมแนสพัฒนาอย่างก้าวกระโดด โดยลำดับเบสจีโนมของนิวเคลียสเป็นจีโนมล่าสุดที่มีการรายงาน (Merchant *et al*., 2007) จีโนมของนิวเคลียสมี 17 โครโมโซม มีความยาวรวมประมาณ 120 ล้านคู่ และมีเปอร์เซ็นต์ของเบส G และ C สูงถึง 64 จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจีโนมกับฐานข้อมูล EST พบว่าลำดับเบสจีโนมนี้มีความสมบูรณ์ถึง 95% และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจีโนมของแคลมิโดโมแนส กับจีโนมของอะราบิดอปซิส และมนุษย์ พบว่ายีนบางกลุ่มมีความใกล้เคียงกับยีนจากพืชมาก แต่ยีนบางกลุ่มก็มีความใกล้เคียงกับยีนจากสัตว์มากกว่า จึงเป็นที่มาของข้อสันนิษฐานว่า สาหร่ายนี้น่าจะมีการวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษของพืชและสัตว์ หลังจากนั้นสายที่วิวัฒนาการเป็นสัตว์มีการสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์แสง ส่วนสายที่วิวัฒนาการมาเป็นพืชก็สูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่ ส่วนแคลมิโดโมแนสยังคงความสามารถบางอย่างของทั้งสองสายวิวัฒนาการ ด้วยเหตุนี้ จึงมีความพยายามจัดกลุ่มโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อสาหร่ายและพืชเท่านั้น โดยคัดเลือกเฉพาะโปรตีนที่พบทั้งในแคลมิโดโมแนส สาหร่ายสีเขียว *Ostreococcus* spp. อะราบิดอปซิส และมอส *Physcomitrella* ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ไม่พบในจีโนมของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสง โปรตีนในกลุ่มนี้ได้ชื่อว่า GreenCut ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 349 ชนิด จากทั้งหมดนี้มีเพียง 135 ชนิดที่เคยมีการศึกษาแล้ว ส่วนที่เหลืออีก 214 ชนิด ยังไม่ทราบการทำงานที่แน่ชัด โดยโปรตีนส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การสร้างคลอโรพลาสต์และไทลาคอยด์ การถ่ายทอดอิเล็กตรอน การตรึงคาร์บอน และการสังเคราะห์สารแอนติออกซิแดนต์ นอกจากโปรตีนในกลุ่ม GreenCut แล้ว ยังได้มีการจัดกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า CiliaCut โดยฟลาเจลลาที่แคลมิโดโมแนสใช้ในการเคลื่อนที่และรับรู้ความเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมก็คืออวัยวะเดียวกันกับซิเลียในสัตว์ เมื่อคัดเลือกเฉพาะโปรตีนที่พบในแคลมิโดโมแนส มนุษย์และปรสิต *Phytophthora* spp. พบว่ามี 186 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นโปรตีนที่พบในซิเลียที่ใช้สำหรับเคลื่อนที่ และโปรตีนที่พบในซิเลียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

จีโนมของคลอโรพลาสต์ในแคลมิโดโมแนส มีลักษณะเป็นวงกลม มีจำนวนประมาณ 80 จีโนมในแต่ละเซลล์ มีจำนวนเบส A และ T มาก ซึ่งทำให้มีความหนาแน่นต่ำกว่าจีโนมของนิวเคลียส (Rochaix, 1995) การหาลำดับเบสของจีโนมคลอโรพลาสต์เสร็จสมบูรณ์ในปี ค.ศ. 2002 (Maul *et al*., 2002) โดยจีโนมมีขนาด 203,395 คู่เบส ประกอบไปด้วยยีน 99 ยีน ซึ่งถือได้ว่ามีขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับพืชและสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น (Simpson and Stern, 2002) หรือเมื่อเทียบกับไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 ซึ่งมี 3,168 ยีน (Kakeko and Tabata, 1997) และถือได้ว่าเป็นต้นกำเนิดของคลอโรพลาสต์ เนื่องจากโดยทั่วไปยีนที่ไม่พบในคลอโรพลาสต์แต่ยังจำเป็นในการดำรงชีวิต จะมีการถ่ายโอนเข้าสู่จีโนมของนิวเคลียส ซึ่งในกรณีของแคลมิโดโมแนส ดูเหมือนว่าจำนวนยีนที่ถูกถ่ายโอนจากรุ่นสู่รุ่นผ่านทางคลอโรพลาสต์ จะมีมากกว่าสาหร่ายหรือพืชชนิดอื่น แสดงให้เห็นถึงอัตราการถ่ายโอนยีนที่สูงกว่าปกติ (Maul *et al*., 2002) นอกจากจำนวนยีนที่น้อยแล้ว ลักษณะพิเศษอีกประการหนึ่งของจีโนมคลอโรพลาสต์นี้คือ การมีช่วงเบสซ้ำที่เรียกว่า short dispersed repeat (SDR) ซึ่งพบมากในบริเวณที่อยู่ระหว่างยีนและกระจายอยู่ทั่วจีโนม จำนวนของ SDR มีสัดส่วนถึง 20% ของจีโนม แต่ในปัจจุบันยังไม่พบการทำงานหรือความสำคัญที่แน่ชัด แต่มีผู้สันนิษฐานว่า SDR อาจมีความสำคัญทางวิวัฒนาการโดยจีโนมที่มี SDR มากจะมี genome rearrangement มากเช่นกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่า SDR มีความสำคัญกับกระบวนการ homologous recombination (Higgs, 2009)

จีโนมไมโทคอนเดรียของแคลมิโดโมแนส มีลักษณะเป็นสายตรงและมีจำนวนหลายจีโนมในเซลล์ อีกทั้งยังมีขนาดเล็กและมีจำนวนยีนน้อยเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Grant and Chiang, 1980) ด้วยขนาดเพียง 15.8 กิโลเบส และมีจำนวนยีนเพียง 13 ยีน ทำให้โปรตีนที่จำเป็นต้องถูกลำเลียงมาจากนิวเคลียสเป็นจำนวนมาก จากจำนวนยีนทั้งหมดที่พบบนจีโนมของไมโทคอนเดรีย มียีนสำหรับสร้าง tRNA เพียง 3 ยีน ยีนที่สร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 2 ยีน มีหนึ่งยีนที่มีลักษณะคล้ายกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ reverse transcriptase ส่วนที่เหลืออีก 7 ยีน คือยีนที่สร้างโปรตีนสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์ ได้แก่ cytochrome *b*, cytochrome oxidase 1 หน่วยย่อย (subunit) และ NADH:ubiquinone oxidoreductase หรือ complex I อีก 5 หน่วยย่อย ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกระบวนการหายใจ (Michaelis *et al*., 1990; Cardol and Remacle, 2009) และมีความสำคัญเกี่ยวเนื่องกับโรคในมนุษย์หลายโรค รวมไปถึง Parkinson's disease (Smigrodzki *et al*., 2004) ทำให้แคลมิโดโมแนสมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นต้นแบบการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ชนิดนี้ เนื่องจากยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตอีกเพียงชนิดเดียวที่สามารถถ่ายยีนไมโทคอนเดรียได้อย่างสะดวกไม่มี complex I

Forward genetics

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสาหร่ายแคลมิโดโมแนส สามารถทำได้ง่ายโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมี เช่น ethyl methanesulfonate (EMS) หรือ nitrosoguanidine (MNNG) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสเพียงหนึ่งเบส (point mutation) หรือเกิดการหายไปของเบสเพียงจำนวนน้อย (small deletion) ซึ่งโดยมากแล้วส่งผลให้ยีนยังมีการแสดงออกอยู่ แต่โปรตีนที่ได้อาจมีการทำงานที่ผิดแปลกไปหรือไม่มีการทำงานเลยก็ได้ อีกวิธีหนึ่งในการทำให้เกิดพันธุ์กลาย คือการถ่ายชิ้นดีเอ็นเอให้เข้าไปแทรกในส่วนต่างๆ ของจีโนม (insertional mutagenesis) ทำให้ยีนที่ถูกแทรกไม่สามารถทำงานได้ โดยวิธีการถ่ายยีนมีหลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการใช้ glass bead เขย่ากับเซลล์ (Kindle, 1990) electroporation (Shimogawara *et al*., 1998) particle bombardment (Boynton *et al*., 1988; Kindle *et al*., 1989) หรือการใช้ *Agrobacterium* (Kumar *et al*., 2004) ส่วนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกอาจเป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะ เช่น ยีน *ble* ซึ่งทำให้เซลล์ทนต่อ bleomycin

(Lumbreras *et al*., 1998) หรือ *aphVIII* ซึ่งทำให้เซลล์ทนต่อ paromomycin (Depege *et al*., 2003) หรืออาจเป็น auxotrophic marker เช่น ยีน *ARG7* สำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ argininosuccinate lyase (Debuchy *et al*., 1989) หรือยีน *NIT1* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ nitrate reductase (Fernández *et al*., 1989) ซึ่งยีนเหล่านี้ใช้ได้กับสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ในยีนดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถโตได้ในอาหารที่ปราศจากกรดอะมิโนอาร์จินีนหรือไนเทรต อย่างไรก็ดีการทำ insertional mutagenesis อาจไม่ได้ผลดีสำหรับยีนที่มีความจำเป็นในการดำรงชีวิต หากไม่มีวิธีการคัดเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากพันธุ์กลายไม่สามารถเจริญเติบโตได้

จำนวนสายพันธุ์ที่ได้หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยปกติแล้วจะมากเกินกว่าที่จะนำทุกสายพันธุ์มาศึกษาโดยละเอียดว่ามีความผิดปกติในกระบวนการที่สนใจหรือไม่ ดังนั้น วิธีคัดเลือกพันธุ์กลายจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการลดจำนวนสายพันธุ์ที่จะนำมาศึกษา แต่ต้องให้แน่ใจว่าสายพันธุ์ที่ต้องการสามารถเจริญเติบโตได้ในวิธีการคัดเลือกนั้นๆ วิธีการ screen สามารถทำได้โดยการนำเซลล์ที่ผ่านการกลายพันธุ์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น ซึ่งใช้เวลาประมาณหนึ่งสัปดาห์เพื่อให้โคโลนีโตพอ แล้วจึงนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารวุ้นใหม่เพื่อใช้ในการทำ replica plating ก่อนนำมาทดสอบการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมต่อไป ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสง โดย Spreitzer and Mets (1981) ได้คัดเลือกพันธุ์กลายที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ โดยการนำเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ มาเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงในอาหารที่เติมแอซีเทต แล้วนำสายพันธุ์เหล่านี้มาเลี้ยงในที่มีแสงแต่ไม่มีแอซีเทต สายพันธุ์ที่ไม่สามารถโตได้ก็คือสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติในการสังเคราะห์แสง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถแยกเอาพันธุ์กลายที่ต้องการออกมาได้ทั้งหมด เนื่องจากความผิดปกติในการสังเคราะห์แสง อาจทำให้เซลล์ไม่สามารถทนแสงได้และตายในที่มีแสง ต่อมา Dent *et al*. (2005) อาศัยข้อดีที่แคลมิโดโมแนสสามารถเจริญเติบโตโดยไม่ต้องพึ่งการสังเคราะห์แสง ได้ใช้วิธีเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีแอซีเทตในที่มืด แล้วนำเซลล์มาคัดเลือกในสภาวะต่างๆ กัน เช่น ความเข้มแสงสูง อาหารที่มี metronidazole หรือ Rose Bengal ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ สายพันธุ์ที่มีความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะมีความไวต่อความเข้มแสงและสารเคมีในกลุ่มนี้ หลังจากได้สายพันธุ์ที่ต้องการแล้ว สามารถนำเซลล์สาหร่ายมาคัดแยกอีกครั้งหนึ่ง โดยการศึกษาความทนต่อระดับความเข้มแสงที่ต่างกัน หรือความทนต่อความเข้มข้นของสารเคมีที่ต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบระดับความทนของแต่ละสายพันธุ์ และเลือกพันธุ์กลายที่ต้องการศึกษาโดยละเอียดต่อไป นอกจากการ screen แล้วการแยกพันธุ์กลายอีกวิธีหนึ่งซึ่งสะดวกกว่ามาก คือ selection ซึ่งใช้ได้ในกรณีที่มีสภาวะการเลี้ยงจำเพาะ ซึ่งสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตได้เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการเท่านั้น ยกตัวอย่างเช่น การคัดเลือกพันธุ์กลายที่สามารถทนความเข้มแสงสูงได้ โดยการเลี้ยงเซลล์ในระดับความเข้มแสงที่พันธุ์ปกติไม่สามารถเจริญได้ (Fɔrster *et al*., 1999) หรือพันธุ์กลายที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยการคัดเลือกในอาหารเลี้ยงที่มี metronidazole ในปริมาณที่พันธุ์ปกติไม่สามารถเจริญได้ (Schmidt *et al*., 1977)

หลังจากได้พันธุ์กลายมาแล้วควรตรวจสอบว่าการถ่ายทอดลักษณะที่สนใจเป็นไปในรูปแบบใด ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าความผิดปกติหรือมิวเทชันที่เกิดขึ้นอยู่ในจีโนมใด โดยการทำ tetrad analysis เริ่มจากการนำพันธุ์กลายนั้นมาผสมกับสายพันธุ์ปกติ หลังจากไซโกตได้มีเวลาพักตัวในที่มืดเป็นเวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ นำไซโกตมาเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลาหนึ่งคืนเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เมื่อไซโกตได้แบ่งเซลล์ออกเป็นเซลล์แฮพลอยด์ 4 เซลล์ จึงใช้พาสเจอร์ปิเปตที่มีปลายแหลมแยกเอาแต่ละเซลล์ออกจากกันภายใต้กล้องสเตอริโอ หลังจากที่แต่ละเซลล์เจริญจนปรากฏเป็นโคโลนีบนอาหารวุ้นซึ่งใช้

เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ นำแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงในสภาวะปกติ และในสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือก ถ้ามิวเทชันอยู่ในจีโนมนิวเคลียส ก็จะเห็นอัตราส่วนของรุ่นลูกเป็น 1:1 ตามกฎของเมนเดล แต่ถ้ามิวเทชันอยู่ในจีโนมคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรีย ลักษณะของรุ่นลูกทั้งหมดจะเป็นไปตาม mt+ หรือ mt- อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เมื่อนำพันธุ์กลาย mt+ ที่มีความทนต่อสารเคมีชนิดหนึ่ง มาผสมกับสายพันธุ์ปกติ mt- แล้วทำ tetrad analysis ถ้ามิวเทชันอยู่ในจีโนมนิวเคลียส จะมีรุ่นลูก 2 สายพันธุ์ที่โตได้บนอาหารที่มีสารเคมีนั้น แต่อีก 2 สายพันธุ์จะตาย แต่ถ้ามิวเทชันอยู่ในคลอโรพลาสต์ รุ่นลูกทั้งหมดจะโตได้บนอาหารที่มีสารเคมี ในทางกลับกันหากรุ่นลูกทั้งหมดตายแสดงว่ามิวเทชันอยู่ในไมโทคอนเดรีย

นอกจากการทำ tetrad analysis แล้ว การทำ dominance test เพื่อทดสอบว่ามิวเทชันนั้นส่งผลให้เกิดลักษณะเด่นหรือลักษณะด้อย ก็ยังทำได้ง่ายในคลามิโดโมแนส โดยใช้ประโยชน์จากพันธุ์กลายที่มีมิวเทชันในยีนที่สร้างเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์อาร์จินีน ยกตัวอย่าง 2 แอลลีล คือ *arg 7-1* และ *arg 7-8* ซึ่งสายพันธุ์ที่เป็นแฮพลอยด์และมีแอลลีลใดแอลลีลหนึ่ง จะไม่สามารถโตได้ในอาหารที่ไม่มีอาร์จินีน แต่เมื่อนำสองสายพันธุ์นี้มาผสมเข้าด้วยกัน แล้วแยกเอาเซลล์ที่เป็นดิพลอยด์ออกมาเลี้ยง เซลล์ดิพลอยด์จะสามารถโตได้ถึงแม้ไม่มีอาร์จินีนในอาหาร สายพันธุ์ทั้งสองนี้จึงมีประโยชน์มาก ในการใช้คัดเลือกเซลล์ดิพลอยด์หลังจากการผสมพันธุ์ เนื่องจากในการผสมแต่ละครั้งจะมีเซลล์ประมาณ 5% ที่จะคงอยู่ในรูปดิพลอยด์โดยไม่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส วิธีการทำ dominance test จึงทำได้โดยการนำเอาพันธุ์กลายที่ต้องการศึกษา สมมติให้แทนด้วย *yfg* (your favorite gene) มาผสมเข้ากับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างอาร์จินีนสายพันธุ์หนึ่ง แล้วแยกเอาสายพันธุ์รุ่นลูกที่มีมิวเทชันทั้งสองออกมา เช่น ถ้าผสมพันธุ์กลาย *yfg* เข้ากับพันธุ์กลาย *arg 7-1* จะสามารถแยกเอาเซลล์แฮพลอยด์ที่เป็น *yfg arg 7-1* ออกมาได้ หรือถ้าผสมกับ *arg 7-8* ก็จะสามารถสร้างสายพันธุ์ *yfg arg 7-8* ได้ ถ้านำสายพันธุ์ทั้งสองนี้มาผสมกันแล้วแยกเอาเซลล์ดิพลอยด์ออกมา ก็จะได้สายพันธุ์กลายนี้แบบฮอโมไซกัส หรือถ้าผสม *yfg arg 7-1* เข้ากับ *arg 7-8* ก็จะสามารถแยกดิพลอยด์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสได้ ในทางเดียวกันถ้าผสม *arg 7-1* เข้ากับ *arg 7-8* ก็จะสามารถสร้างสายพันธุ์ปกติแบบฮอโมไซกัสได้ และเมื่อนำเอาสายพันธุ์ดิพลอยด์ทั้งสามมาเปรียบเทียบเพื่อทดสอบลักษณะที่สนใจ ก็จะสามารถสรุปได้ว่ามิวเทชันนี้ทำให้เกิดลักษณะเด่นหรือลักษณะด้อย

การตรวจสอบว่าเกิดมิวเทชันในยีนใดนั้นมีหลายวิธี ถ้าลักษณะที่ปรากฏสามารถตรวจสอบได้ง่ายว่าเกิดจากความผิดปกติในกระบวนการใด เช่น เซลล์มีสีขาวและสูญเสียความสามารถในการทนต่อความเข้มแสงสูง อาจเกิดจากมิวเทชันในยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สารสีจำพวกแคโรทีนอยด์ ซึ่งช่วยในการคายพลังงานที่มากเกินไปในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงมีความเป็นไปได้ว่าพันธุ์กลายที่มีสีขาวนั้นได้รับผลจากมิวเทชันในยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ phytoene synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์แรกในกระบวนการสร้างแคโรทีนอยด์ (McCarthy *et al*., 2004) จึงอาจทดสอบสมมุติฐานนี้ก่อนโดยการหาลำดับเบสของยีนนั้นๆ เพื่อตรวจสอบว่ามีมิวเทชันหรือไม่ ในกรณีที่คาดเดาได้ยากแต่พันธุ์กลายนั้นได้มาจาก insertional mutagenesis ก็สามารถใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถ่ายเข้าไปแทรกเข้าไปอยู่ในส่วนใดของจีโนม ซึ่งยีนที่ถูกแทรกหรืออยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับจุดที่แทรก มักเสียสภาพและเป็นเหตุให้เกิดลักษณะนั้นๆ (Dent *et al*., 2005) แต่หากพันธุ์กลายนั้นเกิดจากการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมี การหาตำแหน่งที่เกิดมิวเทชันอาจมีความยากลำบากกว่า แต่สามารถทำได้โดยใช้การถ่ายดีเอ็นเอจาก BAC library เข้าสู่พันธุ์กลายแล้วหาโคลนที่เปลี่ยนเป็นสายพันธุ์ปกติ (mutant rescue) แล้วจึงนำโคลนนั้นมาตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอจาก BAC library ชิ้นใดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนนั้น อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้ถ้าไม่มีวิธีคัดเลือกที่ดี ในกรณีนี้สามารถใช้อีกวิธีหนึ่งคือ map-based cloning หรือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในการหายีนที่ผิดปกติ โดยใช้ polymorphic strain หรือสาหร่ายต่างชนิดที่มีลำดับเบสแตกต่างจากชนิดที่ใช้ในการสร้างพันธุ์กลาย ที่นิยมใช้คือ *C. grossii* S 1-D2 ซึ่งสามารถผสมพันธุ์กับ *C. reinhadtii* ได้ และมีการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก (Kathir *et al*., 2003; Rymarquis *et al*., 2005) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถสั่งซื้อได้จาก *Chlamydomonas* stock center (www.chlamy.org)

Reverse genetics

เนื่องจากทั้งสามจีโนมของแคลมิโดโมแนสสามารถรับการถ่ายยีนได้ การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนหรือการทำให้ยีนเกิดมิวเทชัน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ ในกรณีของจีโนมคลอโรพลาสต์ ซึ่งเกิด homologous recombination ได้ง่าย จึงสามารถทำให้เกิดมิวเทชันในยีนที่ต้องการโดยการใช้ยีน *aadA* จากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะ spectinomycin สำหรับเป็นเครื่องหมายในการถ่ายยีน (Goldschmidt-Clarmont, 1991) แล้วแทรกยีนนี้เข้าไปในยีนที่ต้องการยับยั้งการแสดงออก ส่วนจีโนมไมโทคอนเดรียแม้ว่าได้มีการพัฒนาวิธีถ่ายยีนมาเป็นเวลานานแล้ว แต่การยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยการทำให้เกิดมิวเทชันในยีนที่ต้องการ เพิ่งประสบความสำเร็จเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา (Remacle *et al*., 2006) และยังมีประสิทธิภาพต่ำมากเมื่อเทียบกับคลอโรพลาสต์ อีกทั้งการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนต์ (transformant) ก็ใช้เวลานานถึงสองเดือนหรือมากกว่า

ในส่วนของจีโนมนิวเคลียสซึ่งชักนำให้เกิด homologous recombination ได้ยาก การยับยั้งการแสดงออกของยีนทำได้โดยการลดปริมาณอาร์เอ็นเอของยีนนั้นๆ โดยในรายงานผลการทำ antisense RNA ครั้งแรกในปี ค. ศ. 1999 Schroda *et al*. ได้พยายามลดการแสดงออกของยีน *HSP70B* (heat shock protein 70B) โดยการโคลน cDNA ของยีนนี้ในทิศทางกลับ (antisense orientation) เข้ากับโพรโมเตอร์ *HSP70A-RBCS2* (heat shock protein 70A-ribulose biphosphate carboxylase) ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ 2 ชนิดที่มีการแสดงออกสูง ผลปรากฏว่าการแสดงออกของยีน *HSP70B* ลดลงประมาณ 20-40% แต่ทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้ไม่มีความเสถียรพอ เนื่องจากฟีโนไทป์นี้หายไปหลังจากเวลาไม่กี่เดือน ต่อมาได้มีอีกหลายกลุ่มที่ใช้วิธีเดียวกันกับยีนอื่นๆ และมีการปรับเปลี่ยนบางอย่าง เช่น การใช้ *RBCS2* โพรโมเตอร์เพียงอย่างเดียว (Chen and Melis, 2004; Fuhrmann *et al*., 2001) การใช้โพรโมเตอร์ของยีนนั้นๆ หรือการเติมส่วนอินทรอนเพิ่มเข้าไป (Fuhrmann *et al*., 2001) อย่างไรก็ดี พบการแสดงออกของยีนลดลงได้สูงที่สุดเพียง 50% (Chen and Melis, 2004)

การลดปริมาณอาร์เอ็นเอที่ดูเหมือนจะมีประสิทธิภาพมากกว่า antisense RNA คือการทำ RNA interference (RNAi) โดยใช้ inverted repeat construct โดย Fuhrmann *et al*. (2001) ได้ทดลองใช้ลำดับเบสของยีน *COP* (chlamyopsin) รวมทั้งส่วนโพรโมเตอร์โดยโคลนในทิศทางปกติ ตามด้วย cDNA ของยีนนี้ในทิศทางกลับ (genomic-sense/cDNA antisense) ซึ่งการทำ RNAi ในลักษณะนี้ประสบผลสำเร็จมาแล้วในพืช (Smith *et al*., 2000) ผลที่ได้คือการแสดงออกของยีนลดลงถึง 98% ทำให้มีผู้นำวิธีนี้ไปใช้อย่างแพร่หลาย และยังได้รับการปรับปรุงหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนจำนวนของเอกซอนและอินทรอนที่ใช้ในการสร้าง inverted repeat construct (Huang and Beck, 2003; Koblenz *et al*., 2003; Pan *et al*., 2004) การใช้โพรโมเตอร์ *PSAD* (PsaD subunit of photosystem I) ร่วมกับยีน *aphIII* ซึ่งเป็นยีนต้านยาปฏิชีวนะ paromomycin ในการคัดเลือก (Pollock *et al*., 2004) การเติมลำดับเบสระหว่างส่วน genomic sense และ cDNA antisense (Ermilova *et al*., 2004) หรือการใช้ cDNA sense/cDNA antisense (Sineshchekov *et al*., 2002) และท้ายที่สุดคือการปรับปรุงการคัดเลือกโดยการโคลนยีน *MAA7* (tryptophan synthase β-subunit) เข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของ construct ซึ่งยีน *MAA7* นี้สร้างเอนไซม์ tryptophan synthase ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโทเฟน และใช้สาร

5-fluoroindole ในการคัดเลือก โดยทริปโทเฟนสามารถทำปฏิกิริยากับ 5-fluoroindole เกิดเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ *MAA7* น้อย จะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มี 5-fluroindole (Rohr *et al*., 2004) การคัดเลือกจากการแสดงออกที่ลดลงของยีน *MAA7* นี้ ทำให้สามารถคัดเอาสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกลดลงของยีนที่ต้องการด้วยได้ในเวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตาม วิธีทั้งหมดที่กล่าวมานี้ก็ยังมีข้อเสีย กล่าวคือ การโคลนยีนที่มี inverted repeat อาจเกิด rearrangement ใน *E. coli* (Lovett, 2004) และ 5-fluoroindole มีความไวต่อแสงมาก ทำให้บางครั้งไม่สะดวกในการคัดเลือก อีกทั้งการแสดงออกของยีนที่ลดลงก็ยังไม่มีความเสถียรพอ

ในปี ค.ศ. 2007 ทีมวิจัย 2 กลุ่มค้นพบว่าแคลมิโดโมแนสมีระบบ microRNA (miRNA) ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (Monar *et al*., 2007; Zhao *et al*., 2007) ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการใช้ miRNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยทั้งสองกลุ่มได้รายงานการใช้เทคนิคนี้ในวารสาร The Plant Journal ในฉบับเดียวกัน (Monar *et al*., 2009; Zhao *et al*., 2009) การค้นพบนี้ถือว่ามีความสำคัญมากในการศึกษาแบบ reverse genetics ในแคลมิโดโมแนส เนื่องจากการใช้ miRNA ได้ผลดีกว่าการใช้ inverted repeat โดยชิ้น small interfering RNA (siRNA) ที่ได้จาก inverted repeat จะแตกต่างกันขึ้นกับตำแหน่งการตัดโดยโปรตีน dicer จึงอาจทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ แต่ชิ้น miRNA ที่ได้จะเหมือนกันทุกสาย ทำให้มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการ อีกทั้ง miRNA ยังไม่มีปัญหาในเรื่องความเสถียรของฟีโนไทป์ เนื่องจากการทำ inverted repeat เป็นการถ่ายยีนที่เป็นสายยาวเข้าสู่เซลล์ ซึ่งง่ายต่อการเกิด transcriptional silencing แต่ miRNA ไม่ถูกยับยั้งโดยวิธีนี้ ในปัจจุบันได้มีการทดลองกับยีนทั้งหมดแล้ว 6 ยีน คือ *COX90* (cytochrome c oxidase subunit) *PSY* (phytoene synthase) *DCL1* (dicer-like nuclease 1) *MAA7* (tryptophan synthase β-subunit) *RBCS1/2* (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase) จากรายงานการพัฒนาเทคนิคนี้ และอีกหนึ่งยีนคือ *HSF1* (heat shock factor 1) ซึ่งเป็นรายงานแรกในการนำเทคนิคนี้ไปใช้ (Schmollinger *et al*., 2010)

เวปไซต์และฐานข้อมูลที่สำคัญ

เวปไซต์ http://www.chlamy.org/ เป็นแหล่งรวมความรู้ทั่วไปที่เกี่ยวเนื่องกับการทำงานวิจัยที่ใช้แคลมิโดโมแนส โดยมีข้อมูลของเทคนิคที่ใช้กับสาหร่ายชนิดนี้ ไม่ว่าจะเป็นวิธีการผสมพันธุ์ การถ่ายยีน การเก็บรักษาเชื้อ การสกัดดีเอ็นเอ ฯลฯ และสามารถสั่งซื้อสายพันธุ์ที่ต้องการ รวมไปถึงชุดสำเร็จ (kit) เช่น ชุดการติดตามการถ่ายทอดลักษณะทางเดียว การสร้างพลังงานไฮโดรเจน การเคลื่อนที่เข้าหาแสง การทำงานของฟลาเจลลา ฯลฯ อีกทั้งยังเป็นที่ประกาศข่าวสาร เช่น ข่าวการประชุมวิชาการแคลมิโดโมแนส ซึ่งจัดขึ้นทุกๆ 2 ปี หรือการประชุมเชิงปฏิบัติการเพื่อให้ความรู้ด้านต่างๆ รวมไปถึงข่าวสารเกี่ยวกับฐานข้อมูลจีโนม จากเวปไซต์นี้มีลิงค์ไปยังเวปไซต์อื่นๆ ที่มีประโยชน์ในงานวิจัย เช่น

http://www.phytozome.net/chlamy
จีโนมนิวเคลียสของแคลมิโดโมแนส
http://www.chlamy.org/chloro.html
จีโนมคลอโรพลาสต์
http://www.chlamy.org/search.html
ฐานข้อมูล EST
http://www.chlamy.org/libraries.html
cDNA และ BAC library
http://www.chlamy.org/kit.html
เครื่องหมายดีเอ็นเอ

สรุป

การพัฒนาเทคนิคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านพันธุศาสตร์ ชีวเคมี หรือชีววิทยาระดับเซลล์ รวมไปถึงลำดับเบสของ EST และจีโนม ทำให้สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวแคลมิโดโมแนส ได้ก้าวขึ้นมาจากการเป็นเพียงสิ่งมีชีวิตต้นแบบ เพื่อการศึกษาวิทยาศาสตร์

พื้นฐานเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง และกลไกการทำงานของฟลาเจลลา มาเป็นต้นแบบของการศึกษากลไกทางชีววิทยาด้านอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันได้เป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในทางอุตสาหกรรมและการแพทย์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตพลังงานจากไฮโดรเจน การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอดีเซล และการผลิตวัคซีนรักษาโรคในมนุษย์ เทคนิคใหม่ๆ ที่กำลังได้รับการพัฒนาจะทำให้การทำงานวิจัยโดยใช้สาหร่ายชนิดนี้ เป็นที่นิยมมากขึ้นและมีบทบาทสำคัญมากยิ่งขึ้นไปอีกในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Azamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H. and Tabata, S. 1999. A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Generation of 3,433 non-redundant expressed sequenced tags. *DNA Res* 6: 369-373.

Azamizu, E., Miura, K., Sucho, K., Inoue, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K., Nakamura, Y. and Tabata, S. 2000. Generation of expressed sequence tags from low CO_2 and high-CO_2 adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *DNA Res* 7: 305-307.

Boynton, J.E., Harris, E.H., Burkhart, B.D., Lamerson, P.M. and Gillham, N.W. 1987. Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2391-2395.

Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B. and Sanford, J.C. 1988. Chlorplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.

Cardol, P. and Remacle, C. 2009. The mitochondrial genome. *In*: D. Stern, G.B Witman., and E.H. Harris (eds.). *The Chlamydomonas Sourcebook*, vol 2. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 445-467.

Chen, H.C. and Melis, A. 2004. Localization and function of SulP, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 220: 198-210.

Colin, M., Dorthu, M.P., Duby, F., Remacle, C., Dinant, M., Wolwertx, M.R., Duyckaerts, C., Sluse, F. and Matagne, R.F. 1995. Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* 249: 179-184.

Debuchy, R., Purton, S. and Rochaix, J-D. 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the *ARG7* locus. *EMBO J* 8: 2803-2809.

Dent, R.M., Haglund, C.M., Chin, B.L., Kobayashi, M.C. and Niyogi, K.K. 2005. Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137: 545-556.

Depege, N., Bellafiore, S. and Rochaix, J-D. 2003. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299: 1572–1575.

Dorthu, M.P., Remy, S., Michel-Wolwertz, M.R., Colleaux, L., Breyer, D., Beckers, M.C., Englebert, S., Duyckaerts, C., Sluse, F.E. and Matagne, R.F. 1992. Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 18: 759-772.

Ermilova, E.V., Zalutskaya, Z.M., Huang, K. and Beck, C.F. 2004. Phototropin plays a crucial role in controlling changes in chemotaxis during the initial phase of the sexual life cycle in *Chlamydomonas*. *Planta* 219: 420-427.

Fernٰndez, E., Schnell, R., Ranum, L.P.W., Hussey, S.C., Silflow, C.D. and Lefebvre, P.A. 1989. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6449 -6453.

Fɔrster, B., Osmond, C.B., Boynton, J.E. and Gillham, N.W. 1999. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* resistant to very high light. *J Photochem Photobiol B: Biol* 48: 127-135.

Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E., Rank, S. and Hegemann. 2001. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci* 114: 3857-2863.

Goldschmidt-Clarmont, M. 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* 19: 4083-4089.

Goodenough, U.W. 1992. Green yeast. *Cell* 70: 533-538.

Grant, D. and Chiang, K.S. 1980. Physical mapping and characterization of *Chlamydomonas* mitochondrial DNA molecules: their unique ends, sequence homogeneity, and conservation. *Plasmid* 4: 82-96.

Harris, E.H., Burkhart, B.D., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. 1989. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics* 123: 281-292.

Harris, E.H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 363-406.

Higgs, D.C. 2009. The chloroplast genome. *In*: D. Stern, G. B Witman., and E. H. Harris (eds.). *The Chlamydomonas Sourcebook*, vol 2. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 871-891.

Huang, K. and Beck, C.F. 2003. Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6269-6274.

Kakeko, T. and Tabata, S. 1997. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* 38: 1171-1176.

Kathir, P., LaVoie, M., Brazelton, W.J., Haas, N.A., Lefebvre, P.A. and Silflow, C.D. 2003. Molecular map of the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear genome. *Eukaryotic Cell* 2: 362-379.

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

Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernٰndes, E. and Lefebvre, P.A. 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol* 109: 2589-2601.

Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. and Lechtreck, K.F. 2003. Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J Cell Sci* 116: 2635-2646.

Kumar, S.V., Misquitta, R.W., Reddy, V.S., Rao, B.J. and Rajam, M.V. 2004. Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 166: 731-738.

Lumbreras, V., Stevens, D.R. and Purton, S. 1998. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by an endogenous intron. *Plant J* 14: 441–447.

Lovett, S.T. 2004. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol Microbiol* 52: 1243-1253.

MaCarthy, S.S., Kobayashi, M.C. and Niyogi, K.K. 2004. White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase. *Genetics* 168: 1249-1257.

Matagne, R.F., Michel-Wolwertz, M.R., Munaut, C., Duyckaerts, C. and Sluse, F. 1989. Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 108: 1221-1226.

Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphillis, C.W., Miller, W., Harris, E.H. and Stern, D.B. 2002. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in sea of repeats. *Plant Cell* 14: 2659-2679.

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L. Marshall, W.F., Qu, L-H., Nelson, D.R., Snaderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lovanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J-P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern. D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W.C.A., Otillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. and Grossman, A.R. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.

Michaelis, G., Vahrenholz, C. and Pratje, E. 1990. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Mol Gen Genet* 223: 211-216.

Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C. and Baulcombe, D.C. 2007. miRNAs control gene expression in the

single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447: 1126-1129.

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

Pan, J., Wang, Q. and Snell, W.J. 2004. An aurora kinase is essential for flagella disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev Cell* 6: 445-451.

Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lamaire, S.D. and Moroney, J.V. 2004. The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth, but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO_2 environment. *Plant Mol Biol* 56: 125-132.

Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M. and Bonnefoy, N. 2006. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4771-4776.

Rochaix, J-D. 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Ann Rev Genet* 29: 209-30.

Rohr, J., Sarkar, N., Balenger, S., Jeong, B.R. and Cerutti, H. 2004. Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant J* 40: 611-621.

Rymarquis, L.A., Handley, J.M., Thomas, M. and Stern, D.B. 2005. Beyond complementation. Map-based cloning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137: 557-566.

Sager, R. 1954. Mendelian and non-Mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 40: 356-363.

Schmidt, G.W., Martin, K.S. and Chua, N.H. 1977. A rapid method for selective enrichment of photosynthetic electron transport mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 610-614.

Schmollinger, S., Strenkert, D. and Schroda, M. 2010. An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr Genet* 56: 383-389.

Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F–A. and Beck, C.F. 1999. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11: 1165-1178.

Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A.R. and Usuda, H. 1998. High frequency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148: 1821-1828.

Shrager, J., Hauser, C., Chang, C-W., Harris, E.H., Davies, J., McDermott, J., Tamse, R., Zhang, Z. and Grossman, A.R. 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* Genome Project. A Guide to the Generation and Use of the cDNA Information. *Plant Physiol* 131: 401-408.

Simpson, C.L. and Stern, D.B. 2002. The treasure trove of algal chloroplast genomes: surprises in architecture and gene content and their functional implications. *Plant Physiol* 129: 957-966.

Sineshchekov, O.V., Jung, K–H. and Spudich, J.L. 2002. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8689-8694.

Smigrodzki, R., Parks, J. and Parker, D.W. 2004. High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and *aging*. *Neurobiol Aging* 25: 1273-1281.

Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Gene* 277: 221-229.

Spreitzer, R.J. and Mets, L. 1981. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. *Plant Physiol* 67: 565-569.

Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G.J., Wang, X.J. and Qi, Y. 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21: 1190-1203.

Zhao, T., Wang, W., Bai, X. and Qi, Y. 2009. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J* 58: 157-164.