

รายงานโครงการวิจัย
งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๕

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซิเบิล
ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

Study of nucleotide sequences and expression of the reversible hydrogenase
genes in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*

RCH
QR
99-63
ส 349ก

เลขหมู่.....**117442**
เลขทะเบียน.....**-5 ส.ค. 2554**
วันเดือนปี.....

b. 1253649x
i.

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *A. halophytica* โดยวิธี Southern Blot Hybridization และเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรส (PCR) เริ่มจากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และสกัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยวิธีด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม จากนั้นนำจีโนมดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำแผ่นเจลไปทำการบลอตกับเมมเบรนเพื่อให้ดีเอ็นเอย้ายไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน และนำเมมเบรนไปบ่มกับตัวติดตามที่ได้จากชิ้นส่วนของยีน *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime จากการทดลองพบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอเมื่อใช้ชิ้นส่วนของยีน *hoxH* เป็นตัวติดตามในจีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* จากนั้น นำจีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* มาเพิ่มปริมาณยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์อนุรักษ์นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนีสีขาวและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิด pRhyd1.2 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างเวกเตอร์ pGEM-T Easy และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 จากการศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสของ *Arthrospira platensis* และ *Spirulina subsalsa* ถึง 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ของ *A. halophytica* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* สูงสุด คือ การชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน การเติมเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำและสภาวะปกติ พบว่าเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีการชักนำเท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของ RT-PCR ของยีน *hoxH*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

In cyanobacteria, hydrogenase enzymes can be divided into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Another enzyme, reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of latter enzyme is encoded by *hoxH*. This work aims to search and study nucleotide sequence of reversible hydrogenase in the halophilic cyanobacterium *A. halophytica* by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction (PCR) technique. *A. halophytica* was cultivated in BG11 containing Turk Island Salt solution medium. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform extraction method, digested with restriction enzyme *HindIII* and analyzed by agarose gel electrophoresis. Agarose gel was blotted on the nylon membrane in order that DNA was transferred to the membrane. Membrane was incubated with DIG-labeled *hoxH* probes of *Anabaena siamensis*. It was found that signal DNA of *A. halophytica* was found with *hoxH* probe. The *hoxH* gene was amplified by polymerase chain reaction with the conserved primers. Then the PCR product of *hoxH* *A. halophytica* was ligated to plasmid pGEM-T Easy and the recombinant plasmid was transformed to the competent cell *E. coli* DH5 α . Transformants were selected on ampicillin containing LB agar and based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNA was isolated from a white colony and digested by restriction enzyme *EcoRI*. The result showed that pRhyd1.2 is a recombinant plasmid of pGEM-T Easy vector and *hoxH* PCR product of *A. halophytica*. The Nucleotide sequence was analyzed and its amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by blast server. It was shown that HoxH of *A. halophytica* had the similarity to the reversible hydrogenase of *Arthrospira platensis* (89%) and *Spirulina subsalsa* (88%). In addition, transcriptional analysis of *A. halophytica* *hoxH* was studied by RT-PCR. It was found that optimal induction condition of *hoxH* transcription level were purging with nitrogen gas, adding iron and nickel to the final concentration of 50 nM and 1 μ M, respectively. The PCR product of RT-PCR reaction of *hoxH* was found in cells grown under the induction condition but not under normal growth condition.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สทรานสคริปติสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica* ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัยจนประสบผลสำเร็จด้วยดี นี้

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 พลังงานไฮโดรเจน.....	5
2.2 ไบโอดีไฮโดรเจน.....	6
2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	7
2.4 เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส.....	9
2.5 ไฮยาโนแบคทีเรีย.....	12
2.6 ไฮยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece halophytica</i>	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	18
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	18
3.2 สารเคมี.....	18
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ.....	18
3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม.....	19
3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	19
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์.....	19
3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการถ่ายโอนยีน (transformation) และตรวจสอบการมี ผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.7 ชุดทดสอบ (kit)	20
3.3 อุปกรณ์.....	20
3.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย.....	20
3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i>	20
3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย	21
3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน <i>A. halophytica</i>	21
3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. halophytica</i>	21
3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส.....	21
3.5.3 การศึกษาการมียีนไฮโดรจีเนสใน <i>A. halophytica</i> ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	22
3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	24
3.5.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล	25
3.5.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (Ligation)	26
3.5.7 การเตรียม Competent cell	26
3.5.8 การทรานสฟอร์มเมชัน.....	26
3.5.9 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม.....	27
3.5.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)	27
3.5.11 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	27
3.5.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	28
3.6 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิค RT-PCR.....	28
3.6.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i> ภายใต้สภาวะการชักนำ แบบต่างๆ.....	28
3.6.2 การสกัด total RNA ของ <i>A. halophytica</i>	29
3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA	30
3.6.4 การย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI.....	30
3.6.5 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.6.6 การสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ด้วย เอนไซม์ Reverse Transcriptase	32
3.6.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	33
3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools..	35
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ในไซยาโนแบคทีเรียที่เรียกว่า <i>A. halophytica</i>	36
4.1.1 ผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. halophytica</i>	36
4.1.2 ผลการศึกษาจีโนมรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโน แบคทีเรียที่เรียกว่า <i>A. halophytica</i> โดยใช้วิธี Southern blot hybridization ...	38
4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	41
4.1.4 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล	42
4.1.5 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และ ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	42
4.1.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis)	43
4.1.7 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.1.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRhyd1.2	45
4.2 ผลการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิค RT-PCR	50
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> เมื่อชักนำด้วยก๊าซ ชนิดต่างๆ	50
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> เมื่อชักนำด้วยนิกเกิล ความเข้มข้นต่างๆ	56
4.2.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> เมื่อชักนำด้วยเหล็ก ความเข้มข้นต่างๆ	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> เมื่อทำการชักนำ หลายสภาวะร่วมกันเปรียบเทียบกับภาวะเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ	70
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	77
5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>A. halophytica</i>	77
5.2 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิค RT-PCR	78
บรรณานุกรม	79
ภาคผนวก.....	82



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary.....	15
2.2 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้.....	16
3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์.....	24
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์.....	25
3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA ด้วยเอนไซม์ DnaseI	31
3.4 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์.....	31
3.5 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์.....	32
3.6 ส่วนประกอบของสารละลาย total RNA และไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน	33
3.7 สารละลายต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน	33
3.8 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA.....	34
3.9 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์	34
3.10 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>hoxH</i>	35
3.11 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์.....	35
4.1 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>A. halophytica</i> กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน	49
4.2 ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของเอนไซม์รีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>A. halophytica</i> กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.3 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ	50
4.4 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิล ความเข้มข้นต่างๆ.....	57
4.5 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ	64
4.6 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติ และเซลล์ที่ถูกชักนำ.....	71

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายขนาดเล็ก (A) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (B).....	7
2.2 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Alcaligenes eutrophus</i>	10
2.3 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803, <i>Anacytis nidulans</i> และ <i>Anabaena variabilis</i>	11
2.4 ระดับของการถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> ใน <i>N. muscorum</i> เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสถานะการเพาะเลี้ยงจากสถานะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนให้เป็นสถานะที่มีการตรึงไนโตรเจน.....	12
2.5 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกคอคคอยด์ (coccooid form).....	13
2.6 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกเส้นสาย (filamentous form).....	13
2.7 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน <i>Aphanothece</i> sp.....	17
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. halophytica</i> จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์.....	37
4.2 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอพลาสมิด pRVA1.1.....	39
4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. halophytica</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	40
4.4 ผลการตรวจสอบยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> เป็นตัวติดตาม.....	40
4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. halophytica</i> เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ.....	41
4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป.....	42
4.7 พลาสมิด pRhyd1.2 ที่สกัดด้วยค่าง.....	43
4.8 ผลการตัดพลาสมิด pRhyd1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.9 โครมาโตแกรมของการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มาจากพลาสมิด pRhyd1.2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7.....	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่ของ <i>A. halophytica</i>	48
4.11 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	52
4.12 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	53
4.13 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	54
4.14 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ.....	55
4.15 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จาก เทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ.....	56
4.16 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	58
4.17 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	60
4.18 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	61
4.19 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกิลความเข้มข้นต่างๆ	62
4.20 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จาก เทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกิลความเข้มข้นต่างๆ	63
4.21 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	65
4.22 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	67
4.23 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ.....	69
4.25 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ.....	70
4.26 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	72
4.27 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	74
4.28 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ.....	75
4.29 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่มีการชักนำ.....	76
4.30 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่มีการชักนำ.....	76

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ในปัจจุบัน โลกมีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการประดิษฐ์คิดค้นอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ขึ้นมากมาย เพื่อใช้อำนวยความสะดวกและใช้ในการดำรงชีวิต ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้มีการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ พลังงานดังกล่าวมีอยู่อย่างจำกัดและจะหมดไปในอนาคต หากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากนี้เชื้อเพลิงเหล่านี้จะให้พลังงานแล้ว ยังมีผลกระทบที่ตามมาจากการใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้ อันได้แก่ ปัญหามลพิษ ความร้อน ภาวะเรือนกระจก และฝนกรด เป็นต้น จากความเป็นมาดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลก หันมาให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัย พัฒนา และผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม พลังงานจากน้ำพุร้อน และพลังงานความร้อนจากใต้พิภพ ในหลายประเทศ มีการรณรงค์ให้ลดการใช้และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่นมีการนำพลังงานนิวเคลียร์มาใช้มากขึ้นและยังมีการวิจัยศึกษาพลังงานรูปแบบใหม่ๆ โดยนำแสงอาทิตย์มาใช้เป็นแหล่งพลังงาน สำหรับประเทศไทยได้มีการคิดหาพลังงานทางเลือกใหม่มาใช้แทนน้ำมัน เช่น พลังงานจากโซลาร์เซลล์ หรือจากการผลิตไบโอดีเซลจากพืช เพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานเพื่อลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศ จะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและในการขับเคลื่อนยานอวกาศ ในประเทศเยอรมนี มีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน นอกจากนี้ ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พลังงานไฮโดรเจนที่ผลิตจาก

สิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียสามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มวลชีวภาพและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการ

การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 “unidirectional” หรือ อัพเทคไฮโดรจีเนส “uptake” hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน และ ชนิดที่ 2 “bidirectional” หรือ รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส “reversible” hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้เฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและมีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็กในบริเวณเร่ง เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนสไปเป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน ปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่หรือ *hupL* และหน่วยย่อยเล็กหรือ *hupS* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120, *Nostoc* sp. PCC 73102 และ *Anabaena variabilis* เอนไซม์ชนิดที่ 2 รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสพบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป จัดเป็นชนิดที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นกัน แอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับสถานะในการเจริญเติบโต โดยสามารถวัดแอคติวิตีได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Aphanocapsa* sp., *Synechococcus* sp. และ *Synechocystis* sp. ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดเป็นเส้นสาย ได้แก่ *Spirulina* sp. และ *Oscillatoria* sp. และในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. ในปัจจุบันมีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ทั้งหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) และหน่วยย่อยเล็ก (*hoxY*) ใน *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Prochlorothrix hollandica* เป็นต้น

Aphanothece halophytica เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดี่ยว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนา ลักษณะที่สำคัญคือ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์ โดยมีการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของเกลือที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เหี่ยวและทำให้ขบวนการเมแทบอลิซึมหยุดชะงัก จากการที่ *A. halophytica* สามารถเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดต้องการนำเอกสารนี้ไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในที่ที่มีความเค็มสูงนี้ จึงมีความมุ่งหวังในการนำไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิตพลังงานไฮโดรเจน โดยสามารถใช้น้ำทะเลมาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ยังมีเซลล์เดี่ยว ทำให้การศึกษาคุณลักษณะของยีน รวมถึงการแสดงออกของยีนทำได้ไม่ยากนัก ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงได้มีความสนใจในการโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน *hoxH* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. halophytica* เพื่อนำไปใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่และเป็นแนวทางในการประยุกต์นำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ผลิตพลังงานไฮโดรเจนต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxH* ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece halophytica*
2. ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxH* และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ได้รายงานแล้วในธนาคารยีน
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *hoxH* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. halophytica* ในอาหาร BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยง นำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมดีเอ็นเอ นำจีโนมดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำจีโนมดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล นำแผ่นเจลไปทำการ blot กับเมมเบรนเพื่อให้จีโนมดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยย้ายไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปไฮบริไดซ์กับตัวติดตามของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ที่เตรียมจากเชื้อ *Anabaena siamensis* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime เพื่อตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *A. halophytica* ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG นำทรานสฟอร์มแมนท์มาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน นอกจากนี้ ยังศึกษา ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* และยีน 16S rRNA ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสถานะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ ได้แก่ สถานะการชักนำด้วยอากาศ ก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอน สถานะการชักนำด้วยนิกเกิลและเหล็กปริมาณต่างๆ โดยเริ่มจากการสกัด total RNA นำ total RNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยาสร้างสาย cDNA ของยีน *hoxH* และยีน 16S rRNA ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase เพิ่มปริมาณยีน *hoxH* และยีน 16S rRNA จากสาย cDNA ที่ได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของยีน *hoxH* มาเปรียบเทียบกับระดับการถอดรหัสของยีน 16S rRNA

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *A. halophytica* เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่ และให้ผู้สนใจนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้อ้างอิงต่อไป นอกจากนี้ ยังเป็นแนวทางเริ่มต้นในการพัฒนาสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ น้ำทะเลเป็นอาหาร เพื่อการผลิตไฮโดรเจนพลังงานใหม่สำหรับอนาคต สำหรับรองรับและแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพลังงาน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ประเทศต่างๆ ทั่วโลกมีการใช้ทรัพยากรพลังงานอย่างมากมาทั้งในด้านการผลิตและการบริโภคไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ พลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่จำกัด และคาดว่าแหล่งพลังงานดังกล่าวจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก การใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังทำให้เกิดผลเสียตามมาคือ ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการเผาผลาญเชื้อเพลิงเหล่านี้นำไปสู่การเกิดมลพิษ ความร้อน ฝนกรด และภาวะเรือนกระจก ฯลฯ ซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ ด้วยเหตุนี้หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกจึงได้มีความพยายามในการค้นหาและศึกษาพลังงานทดแทน เช่น พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานนิวเคลียร์ (คูสิต เครื่องาม, 2540) ประเทศญี่ปุ่นเป็นประเทศที่มีนโยบายลดการพึ่งพาพลังงานน้ำมันจากต่างประเทศ เพิ่มการใช้พลังงานนิวเคลียร์และจัดหาพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ โดยจัดตั้งองค์กรเพื่อพัฒนาพลังงานรูปแบบใหม่และเทคโนโลยีทางอุตสาหกรรม (The New Energy and Industrial Technology Development Organization : NEDO) ขึ้นในปี พ.ศ. 2523 [NEDO เป็นองค์กรกึ่งรัฐบาลที่ดำเนินการพัฒนาพลังงานรูปแบบใหม่โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการส่งเสริมการพัฒนาทางเทคโนโลยีของประเทศญี่ปุ่น โดยอยู่ภายใต้การดูแลของกระทรวงการค้าและอุตสาหกรรม] รัฐบาลญี่ปุ่นได้คาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2553 ญี่ปุ่นจะใช้น้ำมันเป็นแหล่งเชื้อเพลิงลดลงเหลือร้อยละ 47 พลังงานนิวเคลียร์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 17 และพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพิ่มเป็นร้อยละ 3 (กองบรรณาธิการ, 2540) และขณะนี้ยังมีโครงการพัฒนาความร่วมมือการผลิตพลังงานจากแสงอาทิตย์ โดยจะสามารถผลิตพลังงานได้ถึง 1,000,000 กิโลวัตต์ต่อวินาที ในปี พ.ศ. 2583

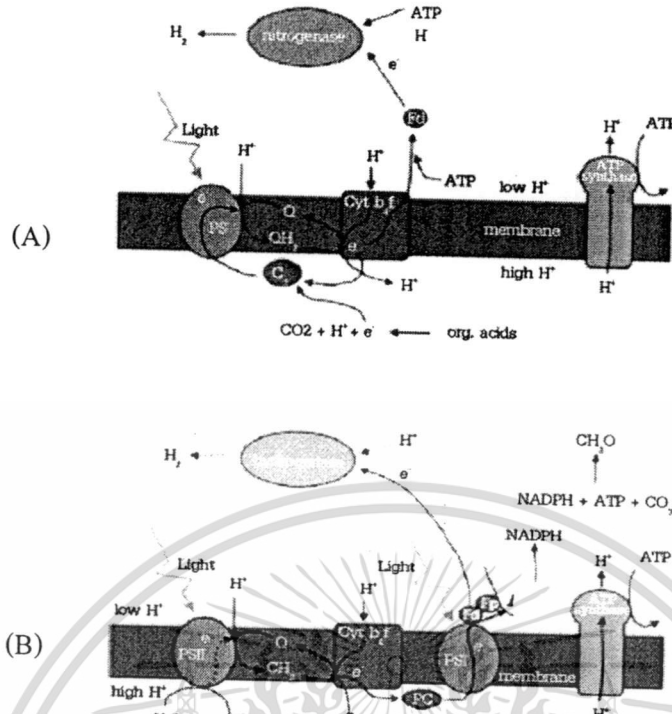
พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน (H_2) เป็นพลังงานที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน—ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส มีพลังงานสะสม 52,000 บีทียูต่อปอนด์ (British Thermal Units per pound) หรือ 120.7 กิโลจูลต่อกรัม (Kilojoules per gram) เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงขับเคลื่อนจรวดและใช้ในการขับเคลื่อนยานอวกาศ ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการ steam reforming ซึ่งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณใช้เอกสารนี้เป็นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นผลพลอยได้จากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและจากกระบวนการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis process) นอกจากนี้ ในหลายประเทศทั่วโลก ได้มีการผลิตรถยนต์ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจน ในการขับเคลื่อน อย่างไรก็ตาม ค่าใช้จ่ายในการผลิตมีราคาค่อนข้างสูง ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลก จึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

2.2 ไบโอไฮโดรเจน

ไบโอไฮโดรเจน คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต เช่น แบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย และสาหร่าย เป็นต้น งานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพในช่วงที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่า สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณมากจากทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด เช่น แสงแดด น้ำ รวมทั้งจากกากของเสียที่เป็นชีวมวล (biomass) หรือจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ดังนั้น การผลิตไบโอไฮโดรเจนจึงเป็นการช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม และเรียกการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพว่าเป็นเทคโนโลยีสีเขียว (green technology) สำหรับอนาคต

สิ่งมีชีวิตที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก คือสิ่งมีชีวิตที่ใช้กระบวนการสังเคราะห์แสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (photosynthesis-light process) ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ซึ่งใช้กระบวนการสังเคราะห์แสงแยกโปรตอนและออกซิเจนจากน้ำแล้วนำไฮโดรเจนอะตอม (proton, H^+) ที่ได้ไปสังเคราะห์เป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) (รูปที่ 2.1 A) อีกชนิดหนึ่งคือแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria) แยกไฮโดรเจนจากสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารโดยอาศัยกระบวนการหมัก ซึ่งจะย่อยสลายสารอินทรีย์อย่างสมบูรณ์ให้กลายเป็นโปรตอนและคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใช้พลังงาน ATP ส่วนหนึ่งจากกระบวนการสังเคราะห์แสงมาช่วยเอนไซม์ไนโตรจีเนสในการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน (รูปที่ 2.1 B) กลุ่มที่ 2 คือสิ่งมีชีวิตที่ใช้กระบวนการหมักในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (fermentation dark process) ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) นอกจากนี้ยังมี nitrogen-fixing aerobic bacteria บางชนิดกับโปรโตซัวบางชนิดที่สามารถสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนได้เช่นเดียวกัน แต่ยังไม่ถูกนำมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน



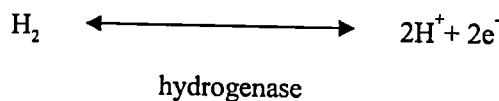
รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงในสาหร่ายขนาดเล็ก (A) และแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง (B)

ที่มา : <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent>

2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ถูกค้นพบในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 และในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยจำนวนมากศึกษาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ใช้มีเทน (methanogenic bacteria) แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ซัลเฟต (sulfate-reducing bacteria) แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจน (H_2 -oxidizing bacteria) แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (nitrogen-fixing bacteria) สาหร่ายสีเขียว (green algae) และไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ในปี ค.ศ. 1931 Stephenson และ Stickland บัญญัติศัพท์คำว่า “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นเป็นครั้งแรก ภายหลังจากพบการสร้างและสลายไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความไว (sensitive) ต่อออกซิเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

1. อัปเดตไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เร่งทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้น ได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

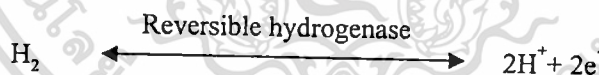
1. ไฮโดรจีเนสที่ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็ก (NiFe-hydrogenase)
2. ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กอยู่ในโมเลกุลเท่านั้น (Fe-hydrogenase)
3. ไฮโดรจีเนสชนิดที่ไม่มีโลหะเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล (Metal-free hydrogenase)

ในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา มีนักวิจัยจำนวนมากศึกษาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เริ่มตั้งแต่แบคทีเรียโบราณ เช่น แบคทีเรียที่ผลิตมีเทน (methanogenic bacteria) ได้แก่ *Methanococcus vannielii* และ *Methanococcus voltae* แบคทีเรีย *Escherichia coli* แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ซัลเฟต เช่น แบคทีเรียในสกุล *Desulfovibrio* แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจน เช่น *Alcaligenes* sp. แบคทีเรียสีม่วง เช่น *Rhodobacter* sp. แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เช่น *Rhizobium* sp. เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตและการใช้ไฮโดรเจนในสถานะที่มีตัวให้หรือตัวรับอิเล็กตรอนที่เหมาะสม สิ่งมีชีวิตต่างๆ ใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในการควบคุมสมดุลของพลังงาน การใช้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำให้เซลล์ผลิตตัวรีดิวซ์สำหรับปฏิกิริยาการสร้างสารโมเลกุลใหญ่ หรือใช้ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน หรือเพื่อสังเคราะห์สารพลังงาน ATP ในทางตรงกันข้าม การผลิตไฮโดรเจนจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสช่วยกำจัดตัวรีดิวซ์ที่มีมากเกินไป ทั้งนี้เมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนยังขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดของเอนไซม์

ในไซยาโนแบคทีเรียพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดข้างต้น คือ อัฟเทคและรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส โดยเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน หรือที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a; 1979b) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสทุกชนิดที่พบในไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยนิกเกิลและเหล็ก ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งผลิตมาจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) อิเล็กตรอนที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสจะถูกถ่ายทอดไปยังลูโคไซนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์แสงและหายใจ Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนส (*hupL*) ที่สังเคราะห์หน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรกในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7210 ระยะที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาผลของนิกเกิล ไฮโดรเจนและไนโตรเจนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1995) และมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของเอนไซม์นี้ใน *Nostoc* สายพันธุ์ดังกล่าว (Oxelfelt *et al.*, 1998)

2.4 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการ



รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน (Hansel and Lindblad, 1998; Kentemich *et al.*, 1989; 1991; Lindblad and Tamagnini, 2001; Serebriakova *et al.*, 1994) โดยก่อนหน้านี้นี้มีรายงานการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (Frenkel *et al.*, 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* (Llama *et al.*, 1979) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or *et al.*, 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris, 1981a; 1981b) เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Serebryakova *et al.*, 1996) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส (diaphorase) (รูปที่ 2.2) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ (*hox* มาจาก *hydrogen oxidation*) ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส α และ γ ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NAD(P)^+



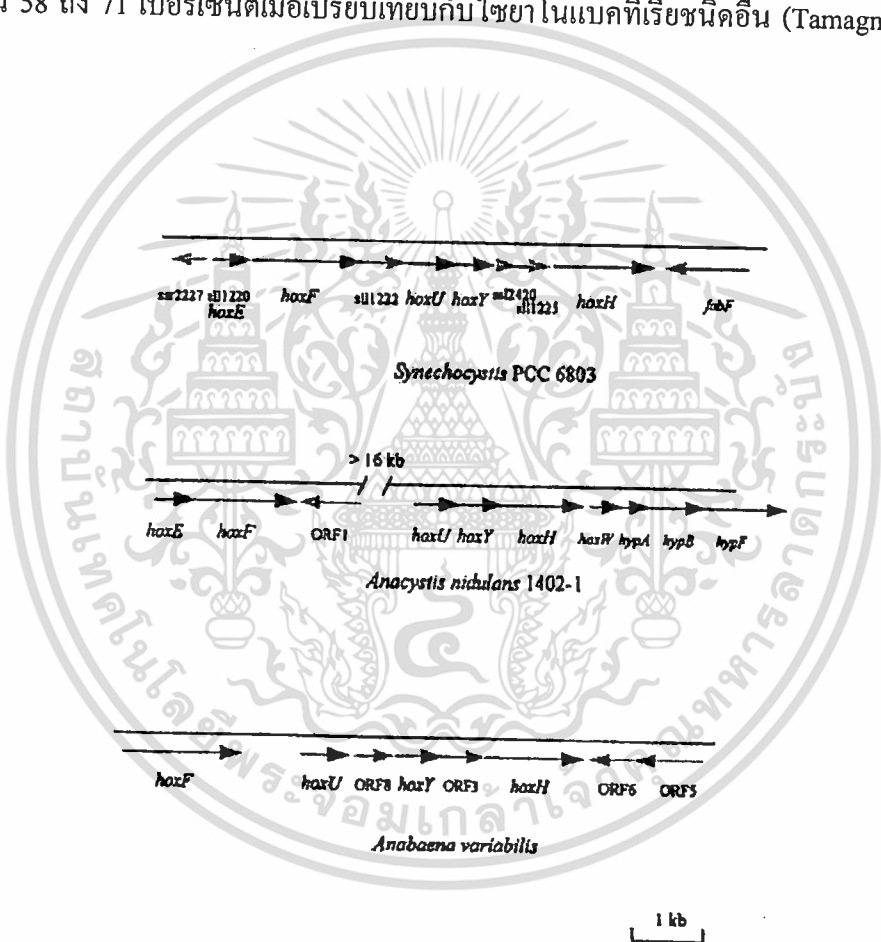
รูปที่ 2.2 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Alcaligenes eutrophus*

ที่มา : Friedrich และ Schwartz, 1993

จนกระทั่งปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* (Ewart *et al.*, 1990), *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 (Schmitz *et al.*, 1995), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel และ Schulz, 1996) และ *Anabaena nidulans* (Boison *et al.*, 1996) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่เรียกว่าแบคทีเรียอื่นๆ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NAD^+ -reducing hydrogenase ของ *Alcaligenes eutrophus* และยีน methylviologen-reducing hydrogenase ของ *Methanococcus voltae* (Schmitz *et al.*, 1995) เป็นที่น่าสนใจว่า นอกจากยีน *hoxFUYH* แล้ว ยังมีการพบยีน *hoxE* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anacystis nidulans* อีกด้วย ยีน *hoxE* สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังไดอะฟอเรส ดังนั้นจึงจัดยีน *hoxE* เป็นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ห้ามมิให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งในกลุ่มของยีน *hox* กลุ่มของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนของ *Anabaena variabilis* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มียีน *hoxFUYPH* ที่เรียงต่อกันและแทรกด้วย open reading frame สำหรับ *Anabaena nidulans* ยีน *hoxEF* จะแยกจากยีน *hoxUYH* เป็นระยะทางถึง 16 กิโลเบส ทำให้การถอดรหัสของยีน *hoxEF* แยกจากการถอดรหัสของยีน *hoxUYH* (รูปที่ 2.3) (Boison *et al.*, 1998) จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากยีนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนสใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413, *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120, *Anabaena nidulans* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่าระหว่าง *Anabaena* ด้วยกันจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และ *Anabaena* ทั้งสองชนิดจะมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน 58 ถึง 71 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น (Tamagnini *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.3 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนสใน *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803, *Anacystis nidulans* และ *Anabaena variabilis*
ที่มา : Boison *et al.*, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ. 2002 Axelsson และคณะได้ศึกษาาระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ใน *Nostoc muscorum* โดยวัดระดับกิจกรรมของโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่งของยีน *hoxH* พบว่ายีน *hoxH* พบว่ามีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยงจากสภาวะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนให้เป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน (รูปที่ 2.4) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2000 Boison และคณะยังได้มีการศึกษาาระดับการถอดรหัสของยีน *hox* ใน *A. variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) พบว่ายีนที่เป็นโครงสร้างของยีน *hox* มีการถอดรหัสร่วมกันเป็น 1 หน่วย แต่ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 ยีน *hox* มีการถอดรหัสร่วมกัน 2 ชุด คือ *hoxEF* และ *hoxUYHWhypAB*

M 0 14 24 41 61 (h)



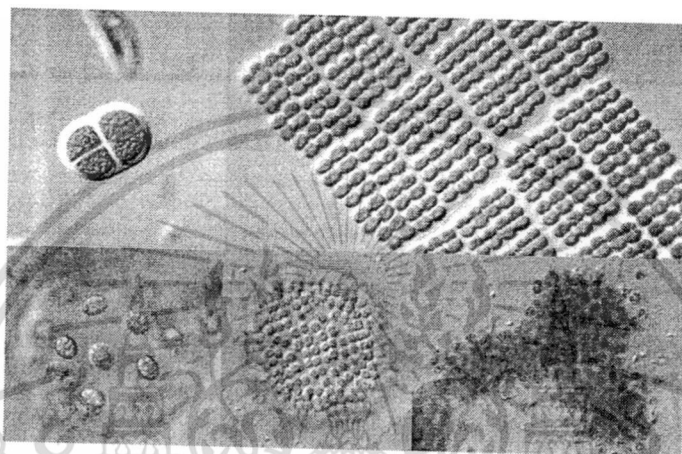
รูปที่ 2.4 ระดับของการถอดรหัสของยีน *hoxH* ใน *N. muscorum* เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยงจากสภาวะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนให้เป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยแสดงระดับการถอดรหัสในชั่วโมงที่ 0, 14, 24, 41 และ 61 หลังจากเปลี่ยนให้เป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน

ที่มา : Axelsson *et.al.*, 2002

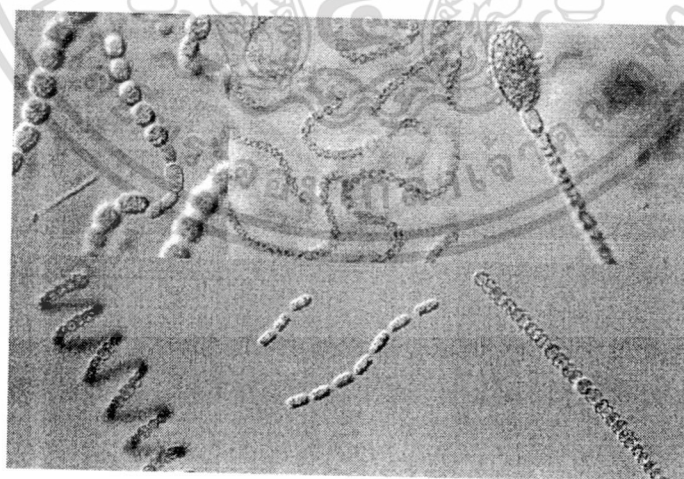
2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือที่เรารู้จักกันในชื่อ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) เป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลผลิต เนื่องจากมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเซลล์ทำให้ทราบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบด้วยกัน พวกแรกคือ พวกคอคคอยด์ (coccooid form) พบว่ามีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปร่างกลม ทรงกระบอก กระจวย เป็นต้น พบได้ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) และอยู่รวมกัน โดยเซลล์มักจะมียีหรือสารเมือกหุ้ม (รูปที่ 2.5) พวกที่สองเป็นพวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

form) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถว มีทั้งที่ไม่สร้างกิ่งแขนง (unbranched filament) และสร้างกิ่งแขนง (branched filament) (รูปที่ 2.6) (ลัดดา, 2542) นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีลักษณะเป็นเส้นสายและยังสามารถสร้างเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ผนังหนา ภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ ในสภาพธรรมชาติสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่ร่วมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ



รูปที่ 2.5 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกคอคอยด์ (coccoid form)
ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>



รูปที่ 2.6 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกเส้นสาย (filamentous form)
ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรียมีดังนี้ (ลัดดา, 2542)

1. สารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย
 - 1.1 กลอโรฟิลล์ ได้แก่ กลอโรฟิลล์ เอ
 - 1.2 แคโรทีนอยด์ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) ลูเทอีน (lutein) ฟลาวิซิน (flavicin) อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และอะฟานิซิน (aphanycin)
 - 1.3 ไฟโคบิลิโปรตีน ในไซยาโนแบคทีเรียมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phycoyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycoyanin) ไฟโคอีริโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin)
2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) ค่อนข้างหนาและนิ่มกว่าได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยสารประเภทเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีองค์ประกอบเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเมมเบรนชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีรงควัตถุเรียกว่า โปรโตพลาสซึม (protoplasm) และส่วนที่มีสารพันธุกรรมเรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) ซึ่งอยู่ใจกลางของเซลล์ (กาญจนภาชน์, 2527)
3. แฟล็กเจลลา (flagella) เซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดไม่มีแฟล็กเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)
4. ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) เป็นสารจำพวกแป้ง ไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เรียกเม็ดเล็กๆ ว่า ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งแป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง
5. ลักษณะพิเศษประจำควิซันไซยาโนไฟตา คือ เป็นพืชชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริงและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวและชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสายบางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างเฮเทอโรซีสต์ได้ ดังนั้นจึงได้มีการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียมีหลายระบบ แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ระบบของ Desikachary (1959) ได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 5 อันดับ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary (1959)

Division	Class	Order	Family
Cyanophyta	Cyanophyceae	Chroococcales	Chroococcaceae
		Chamaesiphonales	
		Pleurocapsales	
		Nostocales	Oscillatoriaceae
			Nostocaceae
			Scytonemataceae
			Rivulariaceae
		Stigonematales	

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดย Watanabe และคณะ (1951) ได้ทำการแยกไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกา พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีในเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ในประเทศอินเดียพบไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน 33 เพอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่แยกได้จากดิน ไซยาโนแบคทีเรียที่พบ ยกตัวอย่างเช่น *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Aulosira* sp., *Plectonema* sp., *Hapalosiphon* sp., *Scytonema* sp. และ *Cylindrospermum* sp. นอกจากนี้ Kaplan และคณะ (1986) ได้จัดหมวดหมู่ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยใช้รูปร่างเป็นเกณฑ์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีทั้งหมด 26 สกุล (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

Group	Genus
Chroococcacean	<i>Aphanothece</i>
	<i>Gloeothece</i>
	<i>Synechococcus</i>
Pleurocapsalean	<i>Dermocarpa</i>
	<i>Xenococcus</i>
	<i>Myxosarcina</i>
	<i>Chroococciopsis</i>
	<i>Pleurocapsa</i>
Nonheterocystous Filamentous forms	<i>Oscillatoria</i>
	<i>Pseudoanabaena</i>
Heterocystous Filamentous forms	<i>Lyngbya-plectonema</i>
	<i>Phormidium</i>
	<i>Anabaena</i>
	<i>Anabaenopsis</i>
	<i>Aulosira</i>
	<i>Calothrix</i>
	<i>Cylindrospermum</i>
	<i>Fischerella</i>
	<i>Hapalosiphon</i>
	<i>Mastigocladus</i>
<i>Nostoc</i>	
<i>Scytonema</i>	
<i>Stigonema</i>	
<i>Tolypothrix</i>	
<i>Westiella</i>	
<i>Westiellopsis</i>	

ที่มา : Kaplan *et al.*, 1986

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica*

ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *A. halophytica* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Chlorococcales

Family Chroococcaceae

Genus *Aphanothece*

Aphanothece sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนเค็มเซลล์เดี่ยว มีลักษณะเซลล์เป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนาที่มีลักษณะเป็นรูปร่างโป่งแสงหุ้มเซลล์อยู่ (ลัดดา, 2542) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aphanothece* sp.

ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>

ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. สามารถเจริญได้ในที่มีสภาวะที่มีค่าความเข้มข้นของเกลือได้หลายค่าด้วยกัน โดยอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ถึง 4.0 โมลาร์ (Wutipraditkul *et al.*, 2005) ซึ่ง *Aphanothece* sp. มักเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นเกลือ 3.3 โมลาร์และเซลล์จะถูกย่อยเมื่อเซลล์อยู่ในน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Turk Island Salt Solution
- 3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

- 3.2.2.1 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.2.2 เม็ดแก้ว (Glass bead)
- 3.2.2.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.4 โซเดียมลอริลซัลโฟเนต (SLS) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.5 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE saturated phenol)
- 3.2.2.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.8 ไลโซไซม์ (Lysozyme)
- 3.2.2.9 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.2.2.10 ลิเทียมคลอไรด์ 5 โมลาร์
- 3.2.2.11 Break buffer (บัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 100 มิลลิโมลาร์ ที่มี TritonX-100 0.47 เปอร์เซ็นต์, SDS 0.38 เปอร์เซ็นต์ และ SLS 0.38 เปอร์เซ็นต์)
- 3.2.2.12 เอทานอล (Ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.13 เอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.14 ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Diethylpyrocarbonate)

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.3.1 คีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) (Promega, USA)

3.2.3.3 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) (Promega, USA)

3.2.3.4 DNaseI (Promega, USA)

3.2.3.5 Ribonuclease inhibitor (Fermentas, USA)

3.2.3.6 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, USA)

3.2.3.7 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Application, USA)

3.2.3.8 เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Application, USA)

3.2.3.9 บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

3.2.3.10 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ซูโครสหรือกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโม-ฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 1 เท่า)

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.4.1 ฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (λ /*Hind*III) (Invitrogen, USA)

3.2.4.2 100 bp Ladder (Promega, USA)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

3.2.5.1 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA)

3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการถ่ายโอนยีน (transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม

3.2.6.1 สารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก)

3.2.6.2 สารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก)

3.2.6.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Promega, USA)

3.2.6.4 X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside) (Promega, USA)

3.2.6.5 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Promega, USA)

3.2.6.6 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.2.7.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.2 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Exyraction Kit (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.3 ชุด DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
- 3.3.5 ตู้อบไอร้อน (hot air oven)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
- 3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance)
- 3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)
- 3.3.9 เครื่องเพิ่มปริมาณพันธุกรรม (PCR machine)
- 3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply)
- 3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment)
- 3.3.12 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo block)
- 3.3.15 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.3.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.3.17 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (glass wares)

3.4 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย

3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7-10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีของการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดต้านทานยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน ใช้แอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน *A. halophytica*

3.5.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* บนอาหารแข็งตามวิธีในข้อ 3.4.2 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ที่ ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 100-200 ไมโครลิตร โซเดียมโอดีเคทิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และ สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วย ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอน ดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติม เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะโรส 0.16 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนของอะโรส เขย่าเบาๆ แล้วเทลงในถาดที่มีแผ่นรองเจลและหิวเสียบ รอให้เจลแข็งตัว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นหน้าไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 20 นาที ดึงหัวออก นำแผ่นรองเจลมาวางใน chamber ที่มีบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ แล้วหยอดลงในช่องเจล (well) โดยใช้ฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* หรือ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำแผ่นเจลที่ได้ไป ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.5.3 การศึกษาการมียีนไฮโดรจีเนสใน *A. halophytica* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

เทคนิค Southern blot hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดและบ่งชี้การมีอยู่ของยีนที่สนใจโดยใช้โพรบที่จำเพาะเป็นตัวติดตามหาตำแหน่งของยีนที่อยู่บนจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยโพรบที่ใช้ถูกออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ซึ่งนำมาใช้ในการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* นำโพรบมาติดฉลากด้วย DIG-High Prime และตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก จากนั้นนำโพรบไปใช้เป็นตัวติดตามจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ขั้นตอนการทำเทคนิค Southern blot hybridization มีดังนี้

3.5.3.1 การติดฉลากตัวติดตาม

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนยีน *hoxH* ของ *Anabaena siamensis* (ชมาภรณ์ ชงเพ็ง, 2547) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 3.5.11 วิเคราะห์ปริมาณและขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 400 คู่เบสเพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับยีน *hoxH* ทำการติดฉลาก Dioxygenin ที่ปลายของดีเอ็นเอ โดยเปิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* 1 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ และปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 16 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่น้ำแข็งทันที เติม DIG-High Prime ปริมาตร 4 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม EDTA 0.2 โมลาร์ พีเอช 8 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3.5.3.2 การตรวจสอบตัวติดตาม

เจือจางดีเอ็นเอที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} แล้วเปิดดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจางละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรนโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต 3 นาที นำแผ่นเมมเบรนไปแช่บัฟเฟอร์มาเลอิก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นประโยชน์ในการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเมมเบรน 2 ครั้งด้วย สารละลายสำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween20 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.5 ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมไนโตรบลูเตรอะโซเดียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิลฟอสเฟต (BCIP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มีครอจอนกระทั่งมีแถบสีดำปรากฏขึ้นจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยน้ำกลั่น

3.5.3.3 การทำ Southern Blot hybridization

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้วิธีในข้อ 3.5.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* 10 เท่า และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่เจลใน Denaturation solution ที่ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และนำแผ่นเจลไปแช่ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.5 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ต่อมาทำการ blot เพื่อให้ดีเอ็นเอย้ายไปอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) จากนั้นตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 3 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปบ่มในบัฟเฟอร์ Prehybridization ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวติดตามที่เตรียมสำหรับยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส บ่มซ้ำมคืน แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ โซเดียมซิเตรต 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 0.1 เปอร์เซ็นต์อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween20 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ล้างเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง เติม Blocking solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำแผ่นเมมเบรนไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อมาเติมแอนติบอดี (Antibody solution) ลงในสารละลาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนอีก 2 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เติมในโตรบลูเตตระโซเดียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิลฟอสเฟต (BCTP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด รอจนกระทั่งมีแถบสีดำปรากฏขึ้นแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยน้ำกลั่น

3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโครจีนเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นแม่แบบ องค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5 ไมโครลิตร
ปริมาณสุทธิ	50 ไมโครลิตร

และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal Cycler) ซึ่งตั้งโปรแกรมให้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ-
เมอร์เรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation Annealing Extension	94°C 50°C 72°C	30 วินาที 1 นาที 90 วินาที
	} 30 รอบ		
3	Final Extension	72°C	10 นาที

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ตามข้อ 3.5.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.5.5 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกกันอย่างชัดเจน ทำการตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลและนำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลแบบสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) โดยนำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์แล้ว บีบหลอดใส่ลงใน spin column ที่วางอยู่ในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน Spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์และตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสตามวิธีในข้อ 3.5.2

3.5.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (Ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่มีขนาดตรงตามต้องการและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อ 3.5.5 มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (ภาคผนวก ง) ใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เป็น 10:1 ปฏิบัติการเชื่อม (ligation) 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัพเฟอร์ ligation 1 เท่า เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต ผลิตภัณฑ์ PCR และเวกเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม ผสมให้เข้ากัน และนำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

3.5.7 การเตรียม competent cell

เปิดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.2 ในอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1 : 250 (0.4 มิลลิลิตร) ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SOB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ประมาณ 3 ถึง 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าระหว่าง 0.4-0.6 จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก) 1/3 ของปริมาตร SOB จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก) 1/25 ของปริมาตร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

3.5.8 การทรานสฟอร์มเมชัน

เปิด competent cell 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย ligation ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.5.6 ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

3.5.9 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิตไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) จากคุณสมบัติการต้านทานปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.5.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)

นำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.5.9 มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายใน Solution I ที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาและวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร กลูเซออะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมา 10 วินาที และวางบนน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรที่ได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตากให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.5.11 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.5.10 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

3.5.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) จาก BigDye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer

3.6 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.6.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้สภาวะการชักนำแบบต่างๆ

3.6.1.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญจึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซนต์ริฟิวจ์จำนวน 3 หลอด นำหลอดเซนต์ริฟิวจ์ทั้ง 3 หลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายในหลอดทั้ง 3 หลอดไปชักนำด้วยก๊าซต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยหลอดที่ 1, 2 และ 3 พ่นอากาศ ก๊าซไนโตรเจนและอาร์กอน ตามลำดับ ต่อมานำหลอดเซนต์ริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซนต์ริฟิวจ์เพื่อนำไป total RNA ต่อไป

3.6.1.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยธาตุเหล็ก

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญจึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซนต์ริฟิวจ์ นำหลอดเซนต์ริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution (ที่ปราศจากเหล็ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution (ที่ปราศจากเหล็ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ลงในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution (ที่ปราศจากเหล็ก) โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.05 เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายเหล็กให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ นำเซลล์ไป

เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

3.6.1.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยนิกเกิล

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซ็นทริฟิวจ์ นำหลอดเซ็นทริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ลงในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.05 เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเติมสารละลายนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

3.6.2 การสกัด total RNA ของ *A. halophytica*

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำต่างๆ มาเติมเม็ดแก้วลงในหลอดประมาณ 500 ไมโครลิตร Break buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนบนใสหลอดใหม่สกัดต่ออีก 2 ครั้ง ด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน total RNA ด้วยลิเทียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน total RNA ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ผ่านการอนุญาตจากเจ้าของเอกสารถือเป็นการละเมิดลิขสิทธิ์

ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอน total RNA ให้แห้งและละลายอาร์เอ็นเอในน้ำที่มีไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (DEPC) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยเจือจางสารละลาย total RNA ลงในคิวเวตควอตซ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลาย total RNA ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยสารละลาย total RNA ที่มีความบริสุทธิ์ จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.8-2.0

3.6.4 การย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA อาจทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เป็นผลจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมิใช่ผลจากอาร์เอ็นเอที่ผ่านการเปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอ จึงต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA ให้หมดก่อน โดยนำ total RNA ปริมาณ 10 ไมโครกรัม มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNaseI องค์ประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.3 และเติมน้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์ จนมีปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปตรวจสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI

สารละลาย	ปริมาณ
total RNA	10 ไมโครกรัม
บัฟเฟอร์ 10 เท่า	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ RNase Inhibitor (4 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2 ไมโครลิตร
เอนไซม์ DNaseI (1ยูนิตต่อไมโครลิตร)	3 ไมโครลิตร

3.6.5 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการตรวจสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ DNaseI มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวมีปริมาณมาก ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม องค์ประกอบและสภาวะที่ใช้สำหรับการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสดังแสดงในตารางที่ 3.4 และตารางที่ 3.5 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Ana16 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ AnaR (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
สารละลาย total RNA ที่ผ่านการย่อย	1 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบของสารละลาย total RNA และไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน

สารละลาย	ปริมาณ(ไมโครลิตร)
total RNA/DNase I	8
น้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์	1
ไพรเมอร์ AnaR 5 มิลลิโมลาร์	1
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha3 5 มิลลิโมลาร์	1
ปริมาตรสุทธิ	11

3.6.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ส่วนประกอบและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA แสดงดังตารางที่ 3.8 และตารางที่ 3.9 ตามลำดับ และส่วนประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* แสดงดังตารางที่ 3.10 และตารางที่ 3.11 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ปฏิกิริยาจะใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดควบคุม (positive control)

ตารางที่ 3.7 สารละลายต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน

ส่วนประกอบ	หลอดที่เกิดปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	หลอดควบคุม (ไมโครลิตร)
สารละลายผสม total RNA และไพรเมอร์	5	5
MMuLV RT 10x buffer	2	2
RNase Inhibitor 4 ยูนิตต่อไมโครลิตร	1	1
dNTPs 10 มิลลิโมลาร์	1	1
MMuLV RT 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร	1	-
น้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์	-	1
ปริมาตรสุทธิ	10	10

ตารางที่ 3.8 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Ana16 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ AnaR (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
cDNA	1 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.9 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส์

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	55°C	30 วินาที
	Extension	72°C	15 วินาที
3	Final Extension	72°C	10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.10 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน *hoxH*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha1 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha2 (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
สารละลาย total RNA ที่ผ่านการย่อย	1 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.11 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที	
2	Denaturation Annealing Extension	45 รอบ	94°C	30 วินาที
			50°C	30 วินาที
			72°C	30 วินาที
3	Final Extension	72°C	10 นาที	

3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

นำรูปอะกาโรสเจลที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอที่แน่นอน สำหรับการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* จะนำปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีนทั้งสองกับปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA เพื่อใช้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *hoxH* ซึ่งถูกชักนำด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica* เริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ในอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่วิเคราะห์ได้มาทำการศึกษานิคยีนไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization หลังจากนั้น จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน *hoxH* ที่ได้ทำการออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิด pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมแล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxH* มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน นอกจากนี้ ยังศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) ในสภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ ได้แก่ สภาวะการชักนำด้วยอากาศ ก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอน สภาวะการชักนำด้วยนิกเกิลและเหล็กปริมาณต่างๆ โดยทำการสกัด total RNA นำ total RNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA จากสาย 16S rRNA และสาย *hoxH* mRNA ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* จากสาย cDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเปรียบเทียบกับระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* กับระดับการถอดรหัสของยีน 16S rRNA เพื่อบ่งชี้สภาวะที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในปริมาณสูง

4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน

ไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* บนอาหารแข็ง BG11 ที่เสริมด้วย Turk Island Salt Solution เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน แล้วจึงนำเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้ว (glass bead) และสกัดด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร แล้วนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากการเปรียบเทียบแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ของ *A. halophytica* กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 4.1) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้กับปริมาณของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *A. halophytica*

จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แสดงให้เห็นว่าวิธีการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้วและสกัดด้วยฟีนอลอิมตัวด้วยบัพเฟอร์ TE เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก เพราะสามารถใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีความบริสุทธิ์ เพราะปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase รวมถึงปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีปริมาณมาก ซึ่งปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่นำมาสกัด จากนั้น จึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในการศึกษายีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วย

ย่อยใหญ่ด้วยวิธี Southern blot hybridization ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาอีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* โดยวิธี Southern blot hybridization

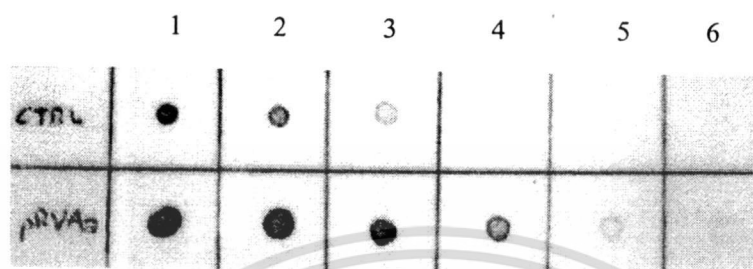
4.1.2.1 ผลการติดฉลากตัวติดตามและการตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการศึกษายีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเตรียมได้จากการนำพลาสมิด pRVA1.1 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตัดแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) และทำการติดฉลากที่ปลายของดีเอ็นเอด้วย Dioxygenin-11-dUTP จากนั้น เจือจางดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากที่ระดับความเจือจางต่างๆ และนำมาหยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ตามรูปที่ 4.2 ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ติดฉลากกับ DIG-High Prime ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.2) พบว่าประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอนั้นเกิดขึ้นได้ดี เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ทำให้โมเลกุลเกิดจุดสีดำบนแผ่นเมมเบรนได้อย่างชัดเจนและดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่ติดฉลากมีปริมาณ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

4.1.2.2 ผลการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

จากการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยนำ *A. halophytica* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้ววิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* สามารถย่อยจีโนมิกของ *A. halophytica* ได้ จากนั้น ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากอะกาโรสเจลไปที่แผ่นเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ของ *A. halophytica* มา blot บนไนลอนเมมเบรนด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) แล้วตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* ขนาด 400 คู่เบสที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime ดังแสดงในหัวข้อ 4.2 จากการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองพบแถบสีดำที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-Digoxigenin AP conjugate กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา NBT และ BCIP ที่เกิดขึ้นในเลนของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* (รูปที่ 4.4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

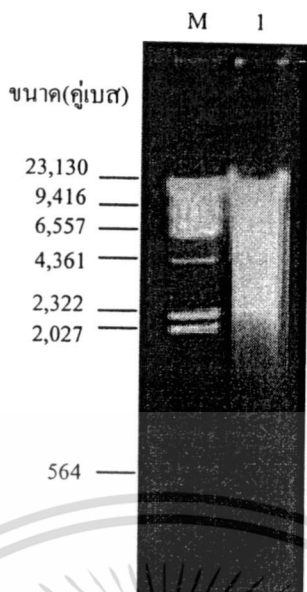


รูปที่ 4.2 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอพลาสมิด pRVA1.1

CTRL คือ ดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลาก (DIG-labeled DNA control) ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

pRVA คือ ดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่ติดฉลาก

- 1 ดีเอ็นเอเริ่มต้นติดฉลาก 10^0
- 2 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}
- 3 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}
- 4 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}
- 5 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}
- 6 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}



รูปที่ 4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 I จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III



รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้
 ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* เป็นตัวติดตาม
 M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III
 I จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 และใช้อุณหภูมิในช่วงการปรับตัว (annealing) ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.5) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,189 คู่เบส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความจำเพาะสูงต่อไพรเมอร์ที่ใช้ เนื่องจากไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica* ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



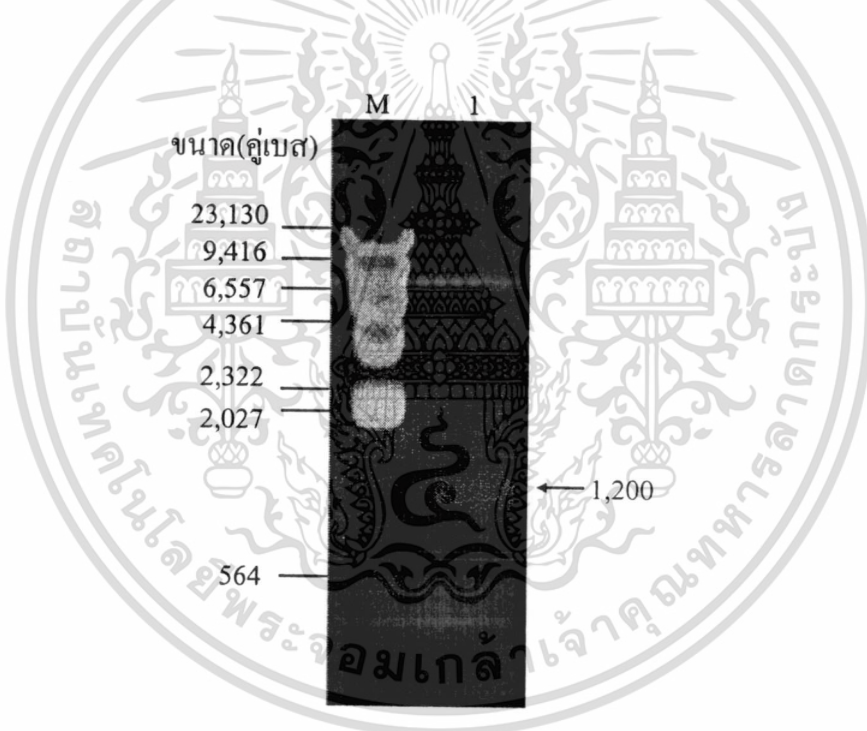
รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

I ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 50 องศาเซลเซียส

4.1.4 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (ข้อ 4.1.3) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร และเปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฝางแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.6) ซึ่งขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.5) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปริมาณดีเอ็นเอ 6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝางแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

4.1.5 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

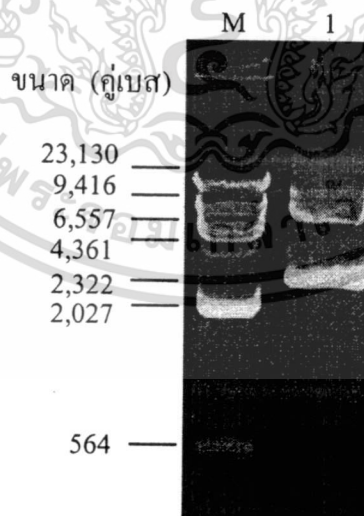
ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมกับเวกเตอร์ดีเอ็นเอ pGEM-T Easy ซึ่งตรง

เอกลำนี้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของห้องปฏิบัติการชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณบริเวณปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วน ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งเซลล์ให้อาศัยมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficiency) เท่ากับ 1.6×10^5 CFU ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหาร แข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดถูกผสมจะมีสีขาว เนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ ที่มีสีน้ำเงิน จากการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 1 โคโลนี

4.1.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis)

นำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ไปเลี้ยงใน อาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเซลล์ แล้วนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่างและตั้งชื่อพลาสมิดถูกผสมว่า pRhyd1.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRhyd1.2 จะปรากฏแถบดีเอ็น เอ 2 แถบ (รูปที่ 4.7) จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 มาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ยีนรีเวอร์สทรานสคริปติสโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



รูปที่ 4.7 พลาสมิด pRhyd1.2 ที่สกัดด้วยด่าง

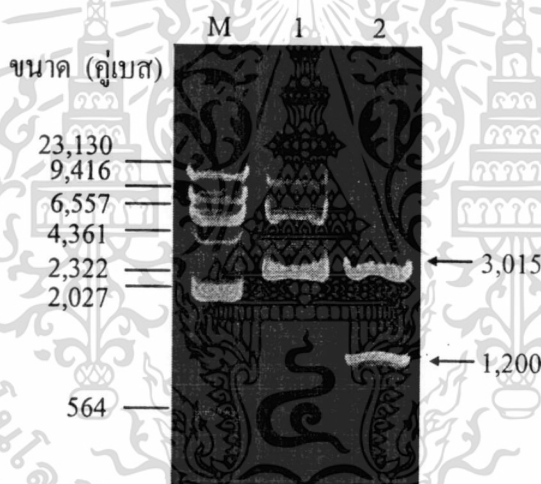
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 โดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pRhyd1.2 ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.6 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pRhyd1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (รูปที่ 4.8 เลนที่ 2) แถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนสุดขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส เป็นเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอด้านล่างขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ซึ่งมีขนาด 1,200 คู่เบส ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าพลาสมิด pRhyd1.2 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pGEM-T Easy เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3



รูปที่ 4.8 ผลการตัดพลาสมิด pRhyd1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2
- 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

4.1.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRhyd1.2

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 ที่ผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีของ BigDye Terminator Reaction และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PIRSM^R 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ T7 โครมาโตแกรมแสดงดังรูปที่ 4.9 สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ 756 คู่เบส และเมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่าได้กรดอะมิโนจำนวน 252 ตัว (รูปที่ 4.10) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนรีเวอร์สซิทิลไฮโดรจินเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ *Arthrospira platensis* สายพันธุ์ FACHB439 89 เปอร์เซ็นต์ และ *Spirulina subsalsa* สายพันธุ์ FACHB351 88 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2



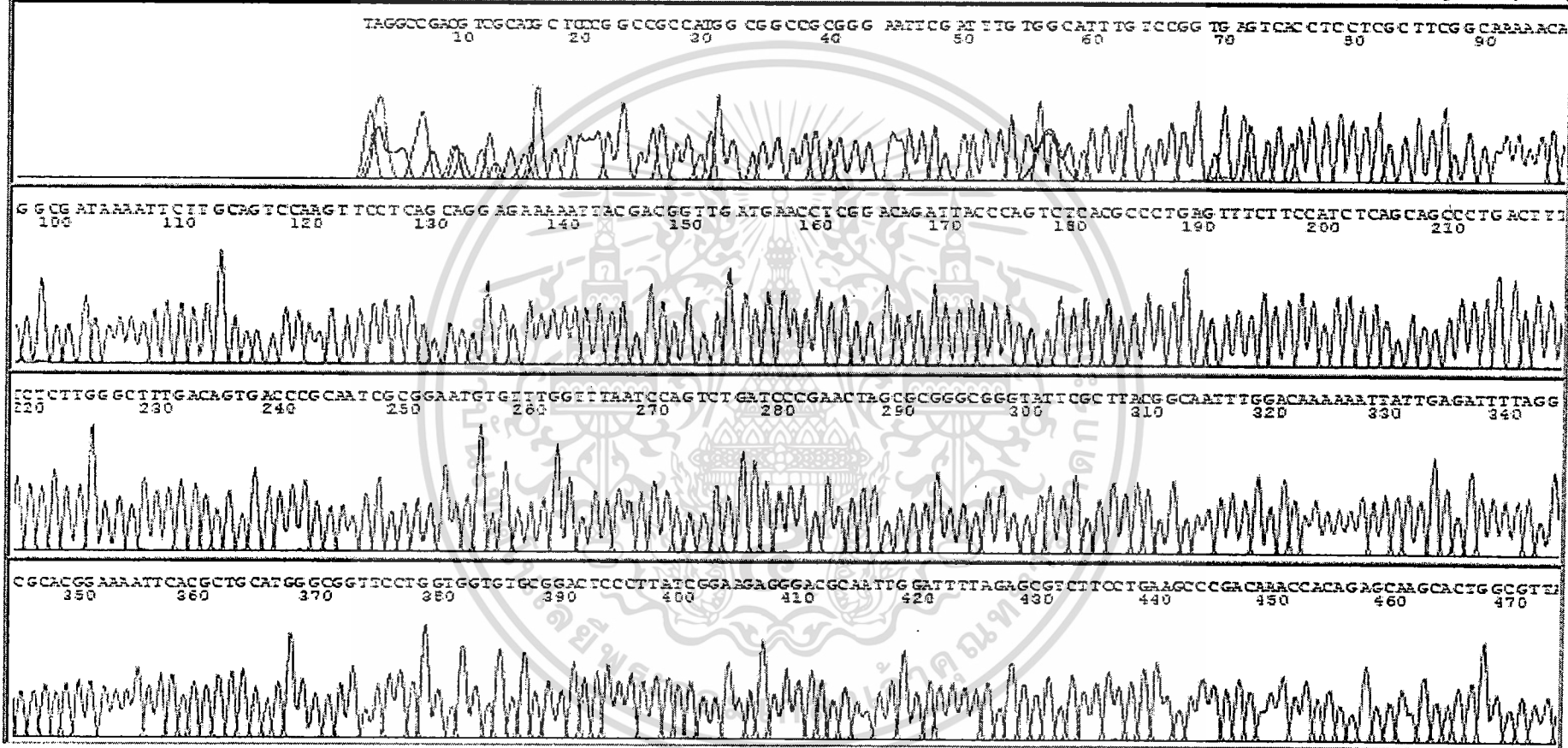


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP4_pRhyd_T7
BC 1.5.0.0 Cap 16

19-2-50_H08_pRhyd_T7_16.ab1

Signal G:489 A:380 T:358 C:405
DT3100POP4(BDv3)w1.mob
BSU_3100
Points 1200 to 15000 Pk 1 Loc: 1200

Page 1 of 3
Tue, Feb 20, 2007 8:28 AM
Mon, Feb 19, 2007 8:10 PM
Spacing: 16.00(16.00)



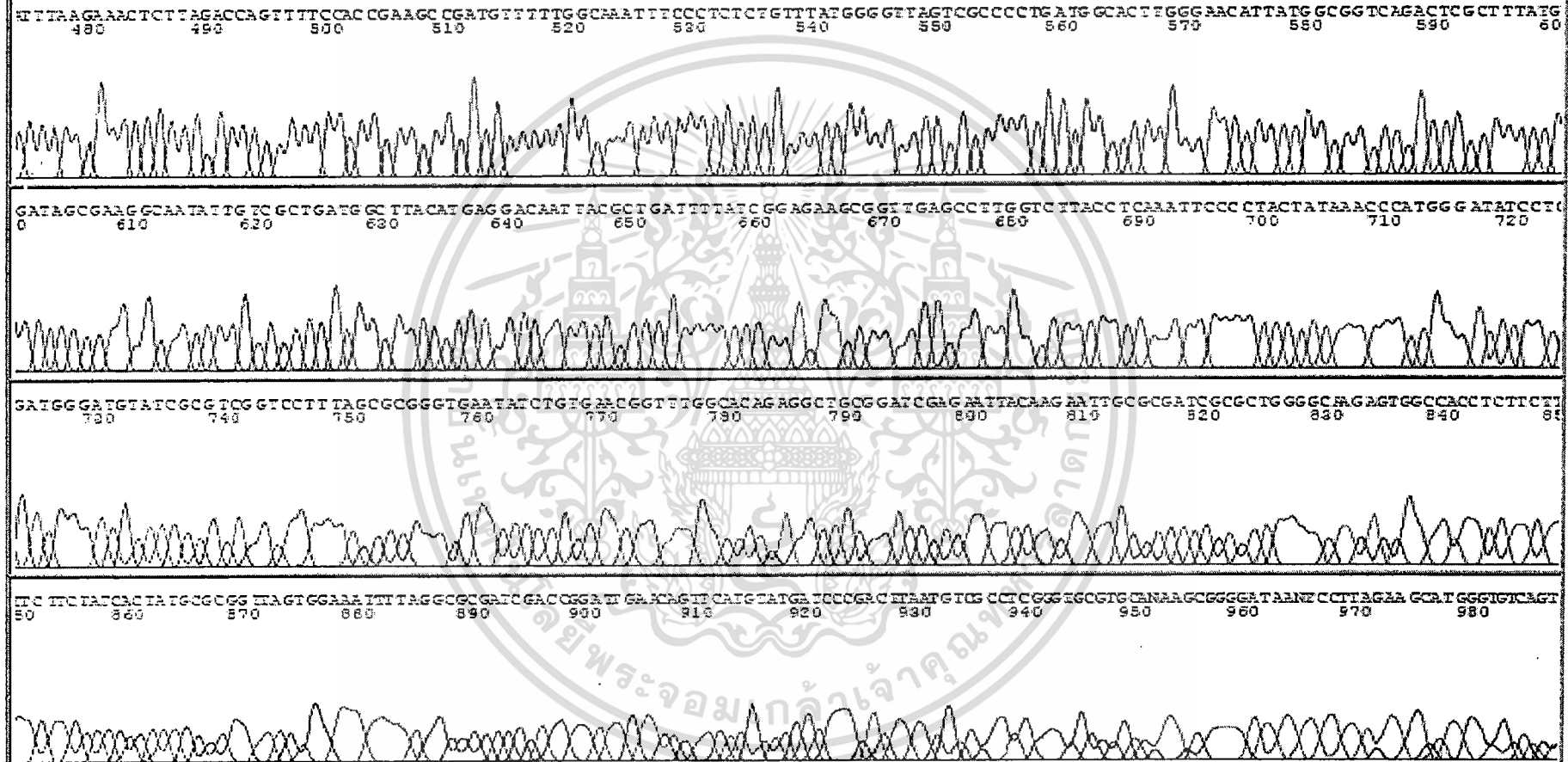
รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมของการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มาจากพลาสมิด pRhyd1.2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP4_pRhyd_T7
BC 1.5.0.0 Cap 16

Signal G:489 A:360 T:356 C:405
DT3100POP4{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 1200 to 15000 Pk 1 Loc: 1200

Page 2 of 3
Tue, Feb 20, 2007 8:28 AM
Mon, Feb 19, 2007 6:10 PM
Spacing: 16.00{16.00}



รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมของการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มาจากพลาสมิด pRhyd1.2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7 (ต่อ)

1	AGTCACCTCC S H L L	TCGCTTCGGC A S A	AAAAACAGGC K T G	GATAAAATTC D K I L	TTGCAGTCAA A V K	50
51	GGTTTCCTCA V S S	GCAGGAGAAA A G E K	AATTACGACG L R R	GTTGATGAAC L M N	CTCGGACAGA L G Q I	100
101	TTACCCAGTC T Q S	TCACGCCCTG H A L	AGTTTCTTCC S F F H	ATCTCAGCAG L S S	CCCTGACTTT P D F	150
151	CTCTTGGGCT L L G F	TTGACAGTGA D S D	CCCGCAATCG P Q S	CGGAATGTGT R N V F	TTGGTTTAAT G L I	200
201	CCAGTCTGAT Q S D	CCCGAACTAG P E L A	CGCGGGCGGG R A G	TATTCGCTTA I R L	CGGCAATTTG R Q F G	250
251	GACAAAAAAT Q K I	TATTGAGATT I E I	TTAGGCGCAC L G A R	GGAAAATTCA K I H	CGCTGCATGG A A W	300
301	CGCGTTCCTG A V P G	GTGGTGTGCG G V R	GACTCCCTTA T P L	TCGGAAGAGG S E E G	GACGCAATTG R N W	350
351	GATTTTAGAG I L E	CGTCTTCCTG R L P E	AAGCCCGACA A R Q	AACCACAGAG T T E	CAAGCACTGG Q A L A	400
401	CGTTATTTAA L F K	GAAACTCTTA K L L	GACCAGTTTT D Q F S	CCACCGAAGC T E A	CGATGTTTTT D V F	450
451	GGCAAATTC G K F P	CCTCTCTGTT S L F	TATGGGGTTA M G L	GTCGCCCTG V A P D	ATGGCACTTG G T W	500
501	GGAACATTAT E H Y	GGCGGTCAGA G G Q T	CTCGCTTTAT R F M	GGATAGCGAA D S E	GGCAATATTG G N I V	550
551	TCGCTGATGG A D G	CTTACATGAG L H E	GACAATTACG D N Y A	CTGATTTTAT D F I	CGGAGAAGCG G E A	600
601	GTTGACCCTT V E P W	GGTCTTACCT S Y L	CAAATTCCCC K F P	TACTATAAAC Y Y K P	CCATGGGATA M G Y	650
651	TCCTGATGGG P D G	ATGTATCGCG M Y R V	TCGGTCCTTT G P L	AGCGCGGGTG A R V	AATATCTGTG N I C E	700
701	AACGGTTTGG R F G	CACAGAGGCT T E A	GCGGATCGAG A D R E	AATTACAAGA L Q E	ATTGCGCGAT L R D	750
751	CGCGCT 756 R A					

รูปที่ 4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB351	49%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB439	33%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB341	31%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB791	31%
<i>Arthrospira maxima</i> FACHBSM	31%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHBOUQDS6	31%
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	29%
<i>Gloeocapsa alpicola</i> str. CALU 743	25%
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 DNA	25%

ตารางที่ 4.2 ความเหมือนและความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica* กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
HoxH <i>Spirulina subsalsa</i> FACHB351	79	88
HoxH <i>Arthrospira platensis</i> FACHB439	78	89
HoxH <i>Arthrospira platensis</i> FACHB791	78	89
HoxH <i>Arthrospira maxima</i> FACHBSM	78	89
HoxH <i>Arthrospira platensis</i> FACHBOUQDS6	78	89
hydrogenase large subunit <i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	78	86
HoxH <i>Arthrospira platensis</i> FACHB341	77	89
bidirectional hydrogenase large subunit <i>Lyngbya majuscula</i> CCAP	77	87
hydrogenase large subunit <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	76	86
HoxH <i>Arthrospira platensis</i> FACHB440	76	86

4.2 ผลการศึกษาาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิค RT-PCR

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. halophytica* ด้วยอาหารเหลวสูตร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ภาคผนวก ค) พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันแล้วนำไปชักนำด้วยการพ่นก๊าซชนิดต่างๆ ได้แก่ อากาศ ก๊าซไนโตรเจน และ ก๊าซอาร์กอน ตามลำดับ โดยพ่นก๊าซลงในสารละลายเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อทำการสกัด total RNA แล้วจึงนำสารละลาย total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ต่อไป

4.2.1.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ total RNA พบว่าสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะมีปริมาณ total RNA ดังแสดงในตารางที่ 4.3 นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลาย total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะมีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 (ตารางที่ 4.3) ซึ่งยอมรับได้ว่ามีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย จึงนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

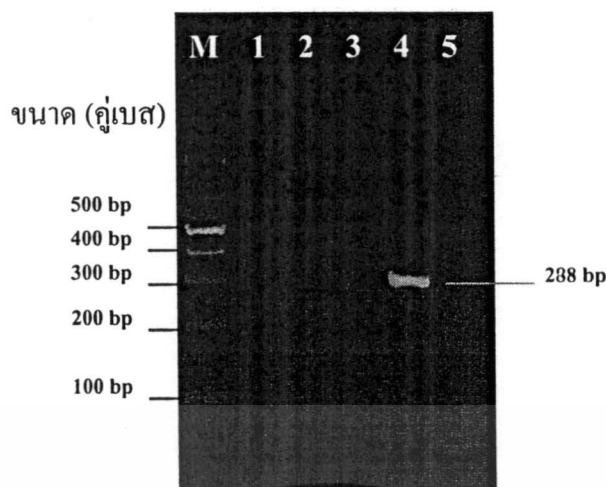
ชนิดของก๊าซที่ใช้ในการชักนำ	total RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	A260/A280
อากาศ	2.88	1.89
ไนโตรเจน	2.00	1.92
อาร์กอน	2.16	1.93

4.2.1.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในหัวข้อที่ 3.6.4 จากนั้น นำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* และนำแทนสารละลาย total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR เพียง 1 แถบเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาด 288 คู่เบส (รูปที่ 4.11) จากรูปแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป แต่ถ้ามียผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นแสดงว่าการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด

4.2.1.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

เมื่อนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากัน คือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส และแต่ละแถบมีความเข้มค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 เท่านั้นและไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, และ 6 (รูปที่ 4.12) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase



รูปที่ 4.11 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยอากาศ
- 2 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 3 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน
- 4 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 5 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ ถ้าพบว่ามีผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นในหลอดควบคุมปฏิกิริยาแสดงว่า สารละลาย total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลลัพธ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลลัพธ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



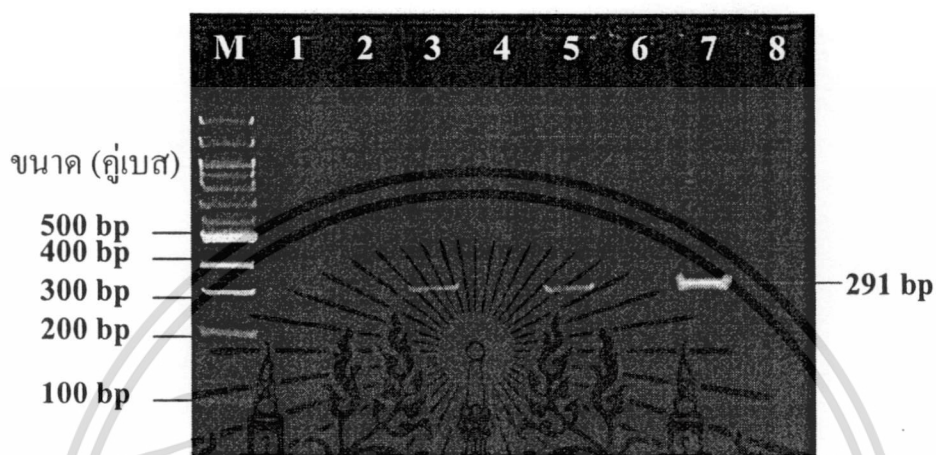
รูปที่ 4.12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน
- 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ ก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

จากการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากัน คือมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 เท่านั้น (รูปที่ 4.13) และแต่ละแถบมีความเข้มแตกต่างกัน โดยในเลนที่ 1 จะมีความเข้มน้อยกว่าเลนที่ 3 และ 5 ซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอของสถานะที่มีการชักนำด้วย อากาศ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซอาร์กอนตามลำดับ ส่วนเลนที่ 7 คือผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4 และ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา จากผลการทดลองจึงสามารถนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.13 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ

3 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน

5 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน

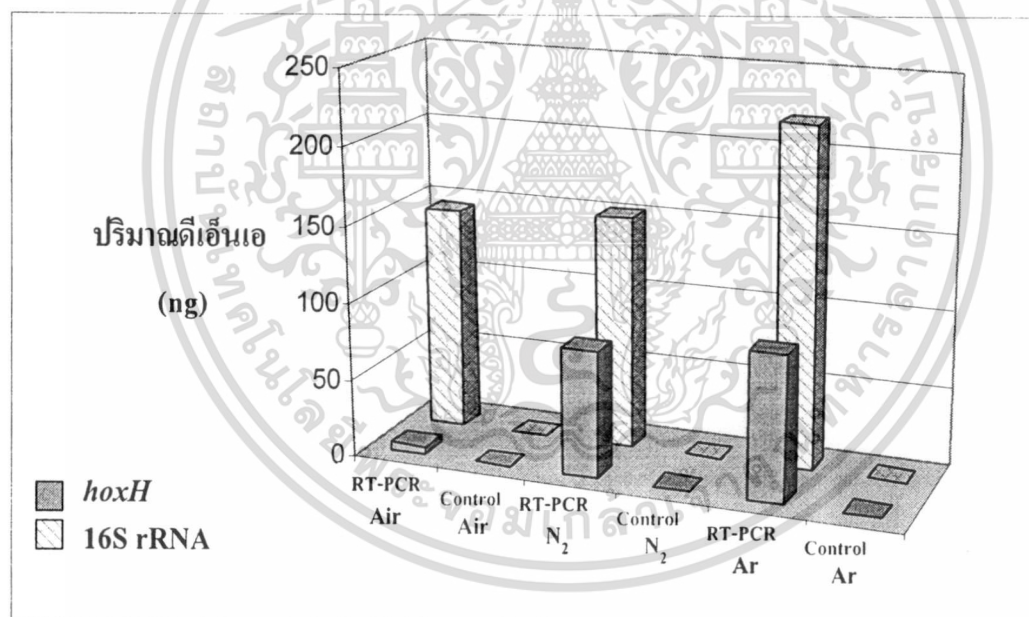
7 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)

8 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

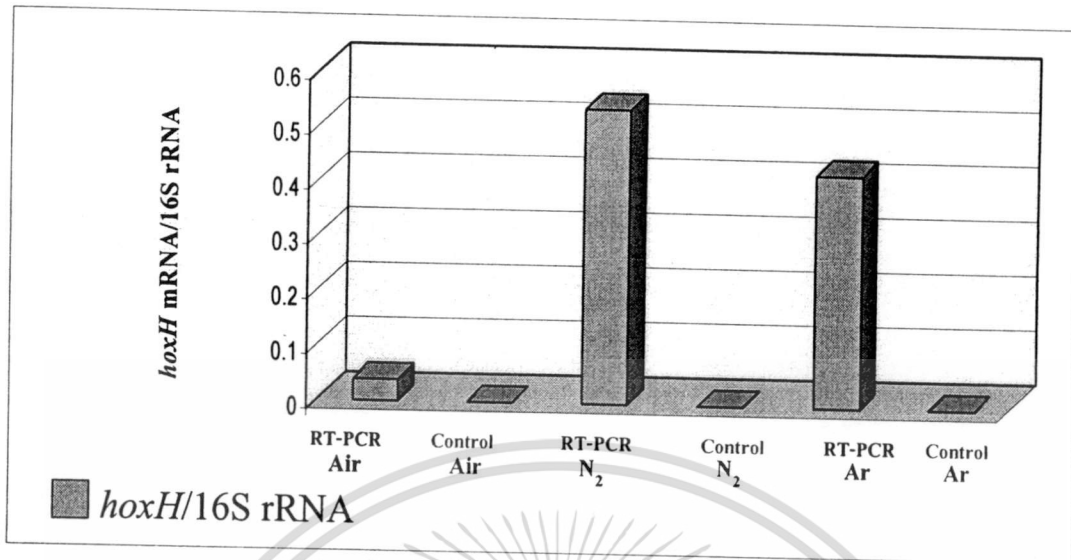
2, 4, 6 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ ก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

4.2.1.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

จากการนำรูปถ่ายอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนที่ถูกชักนำด้วยก๊าซต่างชนิดกันจะมีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.14) และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA แสดงดังรูปที่ 4.15 จากรูป พบว่าในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนจะมีค่าของอัตราส่วนดังกล่าวสูงกว่าสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนและอากาศ ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะการพันก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอนลงในสารละลายเซลล์ ทำให้เกิดสถานะที่ปราศจากออกซิเจน จึงมีผลให้ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน



รูปที่ 4.14 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ



รูปที่ 4.15 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. halophytica* ด้วยอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น แบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 4 ฟลาस्क แล้วนำไปชักนำด้วยนิกเกิลที่ปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเติมนิกเกิลในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นของนิกเกิลในอาหารเป็น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วันแล้ว จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการสกัด total RNA จากนั้น นำสารละลาย total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ต่อไป

4.2.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ total RNA พบว่าสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะมีปริมาณ total RNA ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การชักนำด้วยนิกเกิลอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ หรือการเจือจางที่ไม่ถูกต้องอาจส่งผลต่อความแม่นยำในการวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ นอกจากนี้ การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งเจือปนในสารละลายได้ ดังนั้น การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA

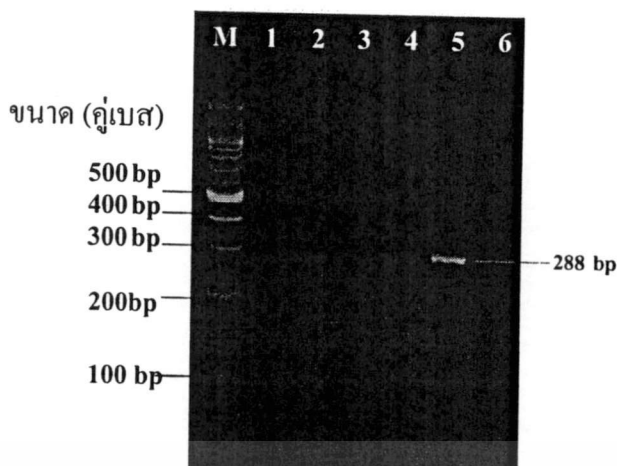
RNA ดังแสดงในตารางที่ 4.4 นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลาย total RNA ที่สกัดได้จากการแปรผันความเข้มข้นของนิกเกิลทั้ง 4 ความเข้มข้นมีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตรอยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 (ตารางที่ 4.4) ซึ่งยอมรับได้ว่ามีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย ดังนั้น จึงสามารถนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของนิกเกิล (ไมโครโมลาร์)	total RNA (ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร)	A260/A280
0	0.810	1.79
1	0.488	1.85
2	0.608	1.85
5	0.800	1.82

4.2.2.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.4 จากนั้น นำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* และนำแทนสารละลาย total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบแต่จะพบเพียง 1 แถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 288 คู่เบส (รูปที่ 4.16) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.16 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

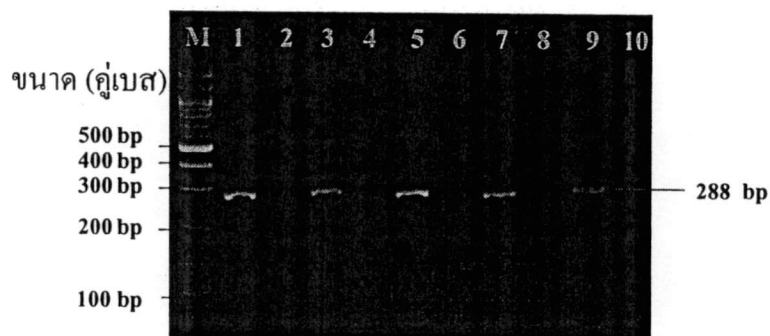
- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์
- 2 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
- 4 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตกัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 6 ผลิตกัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

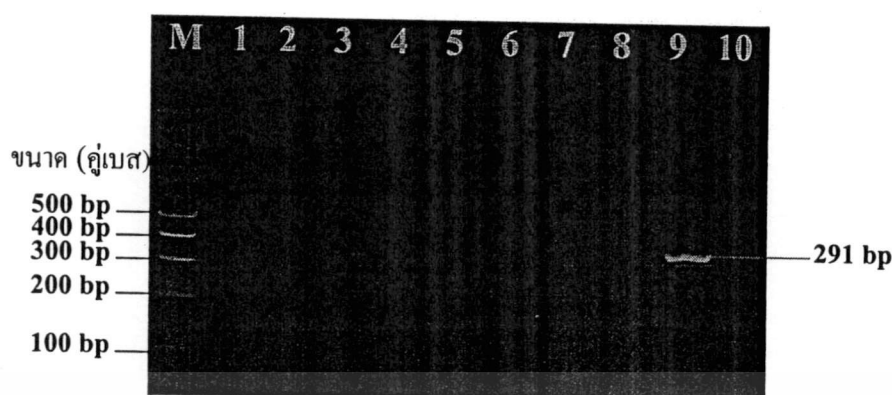
เมื่อนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์ส-ทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน ดังกล่าวโดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดัง แสดงในวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของ ผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสง อัลตราไวโอเลตพบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 1 แถบที่มีขนาดเท่ากัน คือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 เท่านั้น (รูปที่ 4.17) โดยเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 คือดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของสภาวะที่มีการ ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 5 ตามลำดับ ส่วนเลนที่ 9 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6 และ 8 (รูปที่ 4.17) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากใน ปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่ง ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา

จากการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* 1 แถบที่มีขนาด เท่ากันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 3 และเลนที่ 9 เท่านั้น (รูปที่ 4.18) โดยในเลนที่ 3 คือปริมาณดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ส่วนเลนที่ 9 คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6 และ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่ พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase นอกจากนี้ ยังไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ในเลนที่ 1, 5 และ 7 ซึ่งเป็น ผลิตภัณฑ์ PCR จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นจึงนำรูอะกาโรสเจลทั้งสองรูปดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.17 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์
- 2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
- 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์
- 9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 10 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6, 8 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

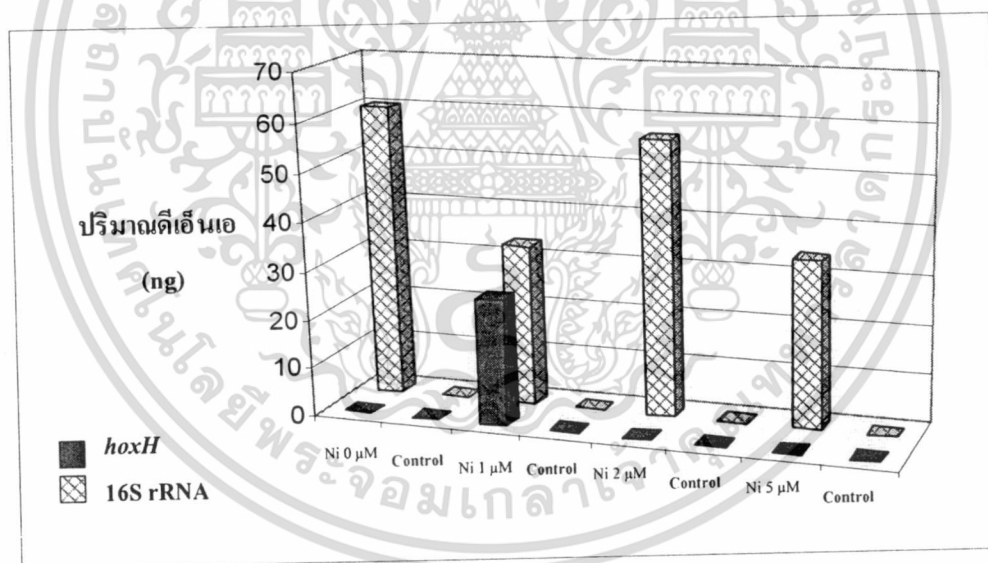


รูปที่ 4.18 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

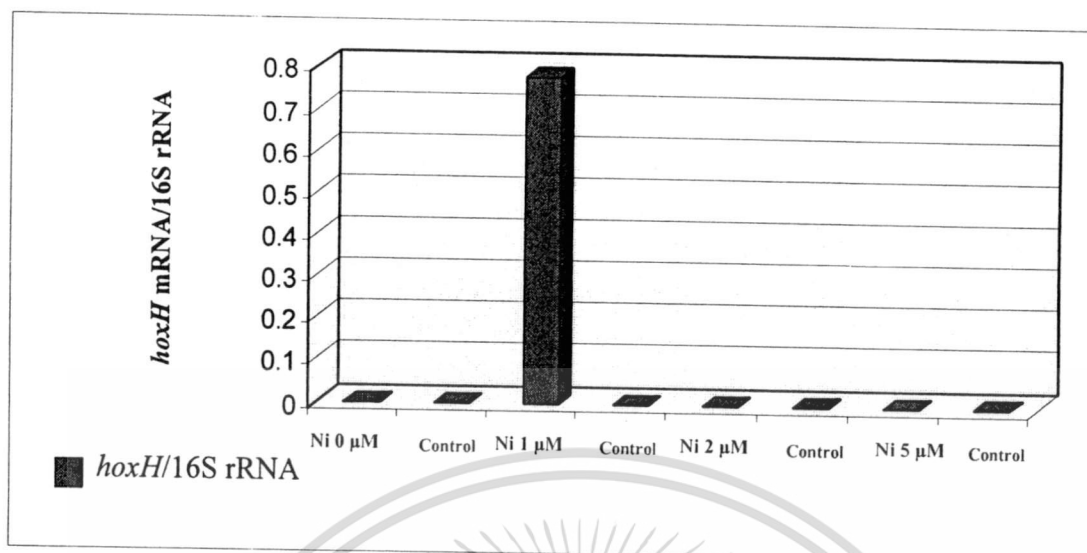
- | | |
|----|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย
นิกเกิลความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ |
| 3 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย
นิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ |
| 5 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย
นิกเกิลความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ |
| 7 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย
นิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ |
| 9 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ
<i>A. halophytica</i> เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 10 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ
(Negative control) |
- 2, 4, 6, 8 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจาก
หลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0, 1, 2
และ 5 ไมโครโมลาร์เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

4.2.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลดด้วยโปรแกรม Gene Tools

จากการนำรูปถ่ายอะกาโรสเจลดของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ในสถานะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เท่านั้น (รูปที่ 4.19) และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ต่อยีน *hoxH* พบว่าในสถานะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าว แต่ในสถานะที่ชักนำด้วยนิกเกิลระดับความเข้มข้น 0, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ (รูปที่ 4.20) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสถานะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นดังกล่าวมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมากหรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน *hoxH*



รูปที่ 4.19 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.20 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. halophytica* ด้วยอาหารเหลวสูตร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ที่ปราศจากเหล็ก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 1.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น แบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 5 ฟลasks แล้วนำไปชักนำโดยเติมสารละลายเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยง โดยให้มีความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเป็น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้น นำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ เพื่อทำการสกัด total RNA ออกจากเซลล์ จากนั้น นำสารละลาย total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรตีนโดยนำสารละลายดังกล่าวมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

4.2.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

จากการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาคำนวณหาปริมาณ total RNA จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลายเอ็กสราเป็นเอ็กสราที่แสงในระหว่างการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ ไม่ต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

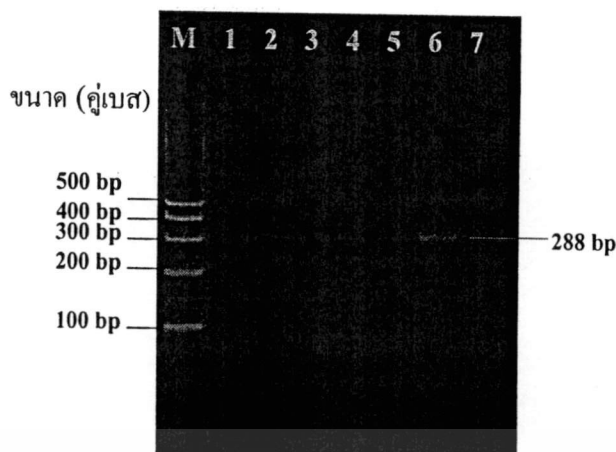
total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะมีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 (ตารางที่ 4.5) ซึ่งยอมรับได้มีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย จึงนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเหล็ก (นาโนโมลาร์)	total RNA (ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร)	A260/A280
0	0.416	1.93
12.5	0.232	2.07
25	0.411	2.06
50	0.704	1.83
100	0.672	1.87

4.2.3.2 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

เมื่อนำสารละลาย total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.4 จากนั้น นำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนแล้วมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* และนำแทนสารละลาย total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อใช้สารละลาย total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบเพียง 1 แถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 288 คู่เบส (รูปที่ 4.21) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย total RNA ดังกล่าว ไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.21 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

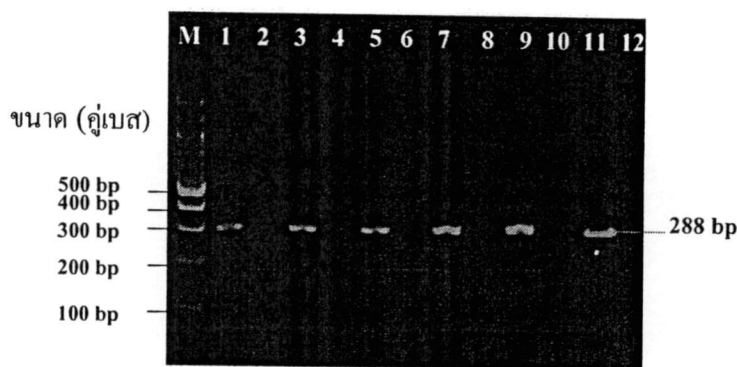
- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0 นาโนโมลาร์
 - 2 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 12.5 นาโนโมลาร์
 - 3 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 25 นาโนโมลาร์
 - 4 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์
 - 5 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสถานะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์
 - 6 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
 - 7 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

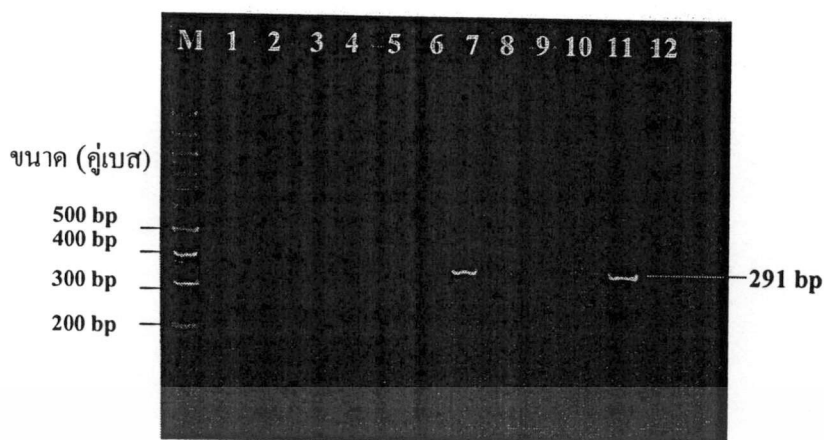
จากการนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์ส-ทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังแสดงในขั้นตอนการทดลองที่ 3.6.7 จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรสของยีน 16S rRNA 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 เท่านั้น (รูปที่ 4.22) โดยเลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 คือดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนเลนที่ 11 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (รูปที่ 4.22) แสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา

จากการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรสของยีน *hoxH* พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรสของยีน *hoxH* ที่มีขนาดเท่ากันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 7 และเลนที่ 11 เท่านั้น (รูปที่ 4.23) โดยในเลนที่ 7 คือดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ ส่วนเลนที่ 11 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 (รูปที่ 4.23) แสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา นอกจากนี้ ยังไม่พบแถบในเลนที่ 1, 3, 5 และ 9 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของสภาวะที่มีชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้น นำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.22 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0 นาโนโมลาร์
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 12.5 นาโนโมลาร์
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 25 นาโนโมลาร์
- 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์
- 9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์
- 11 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6, 8, 10 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ



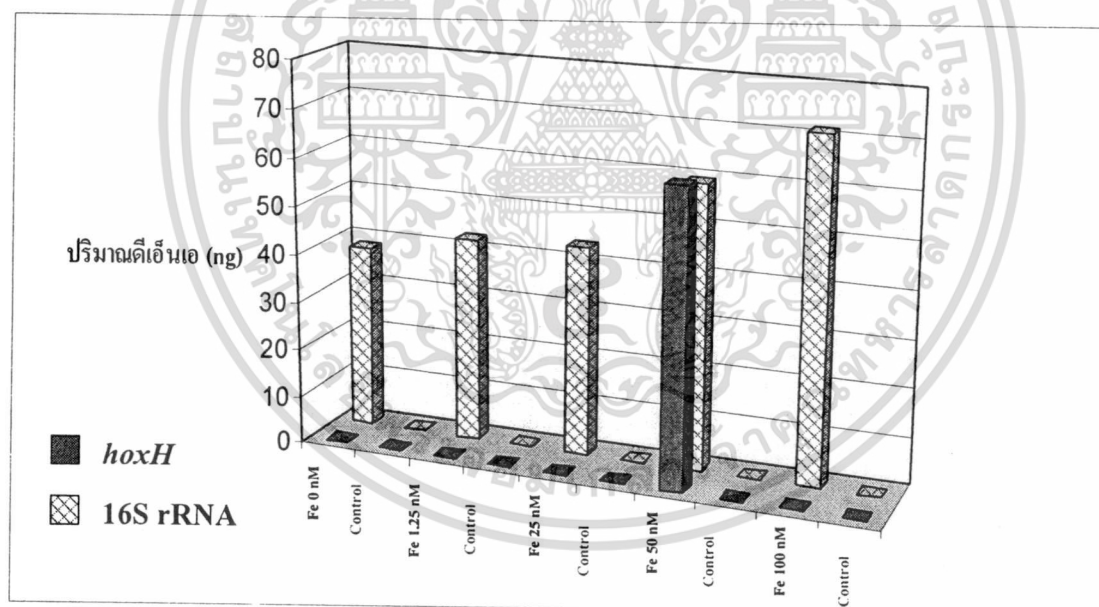
รูปที่ 4.23 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 0 นาโนโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 12.5 นาโนโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 25 นาโนโมลาร์
- 7 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์
- 9 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์
- 11 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 12 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเมื่อใช้แทนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

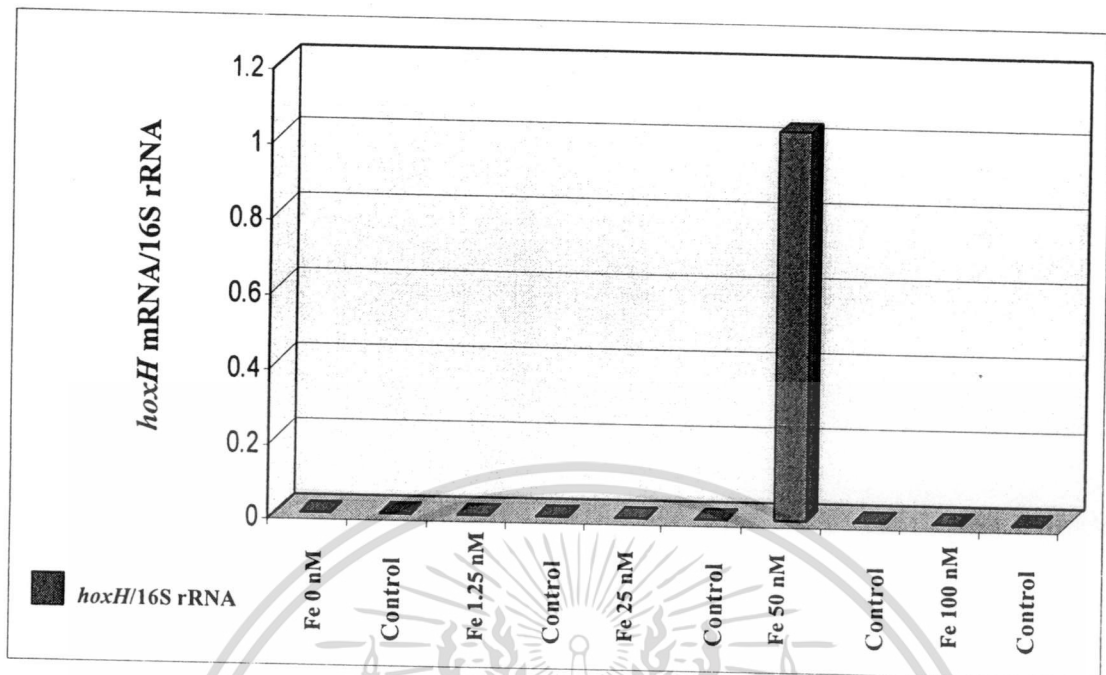
2, 4, 6, 8, 10 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจาก หลอดควบคุมปฏิกิริยาของสภาวะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 5 และ 100 นาโนโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ

4.2.3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

จากการนำรูปถ่ายอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ในสถานะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์เท่านั้น (รูปที่ 4.24) และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA พบว่าในสถานะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าว แต่สถานะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 นาโนโมลาร์ไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ (รูปที่ 4.25) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสถานะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 นาโนโมลาร์มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมากหรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน *hoxH*



รูปที่ 4.24 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.25 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

4.2.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อทำการชักนำหลายสภาวะร่วมกัน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ที่มีชักนำด้วยก๊าซ การชักนำด้วยนิกเกิล และการชักนำด้วยเหล็ก พบว่าก๊าซไนโตรเจน นิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์มีผลทำให้มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เพิ่มสูงขึ้น จึงทำการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ของการเพาะเลี้ยงที่มีการชักนำหลายสภาวะร่วมกัน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ โดยนำสารละลายเซลล์ *A. halophytica* มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้น ทำการเก็บเซลล์และล้างเซลล์ด้วยอาหารที่ปราศจากเหล็ก โดยแบ่งสารละลายเซลล์ออกมาบางส่วนเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 3.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร แล้วจึงเจือจางเซลล์ลงในอาหารใหม่ที่ปราศจากเหล็กแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 นำไปเติมสารละลายเหล็กให้มีความเข้มข้นของเหล็กเป็น 23 นาโนโมลาร์ (เทียบเท่ากับความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ) ส่วนสารละลายเซลล์หลอดที่ 2 นำไปเติมสารละลายเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นของเหล็กและนิกเกิลในอาหารเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้น นำสารละลายเซลล์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้ง 2 หลอดไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้น ทำการเก็บเซลล์หลอดที่ 1 เพื่อนำไปทำการสกัด total RNA ต่อไป ส่วนสารละลายเซลล์หลอดที่ 2 นำไปชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปทำการสกัด total RNA ในขั้นตอนต่อไป

4.2.4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

จากการวิเคราะห์ปริมาณ total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาคำนวณหาปริมาณ total RNA ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากนั้น นำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

ตารางที่ 4.6 ปริมาณ total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติ และเซลล์ที่ถูกชักนำ

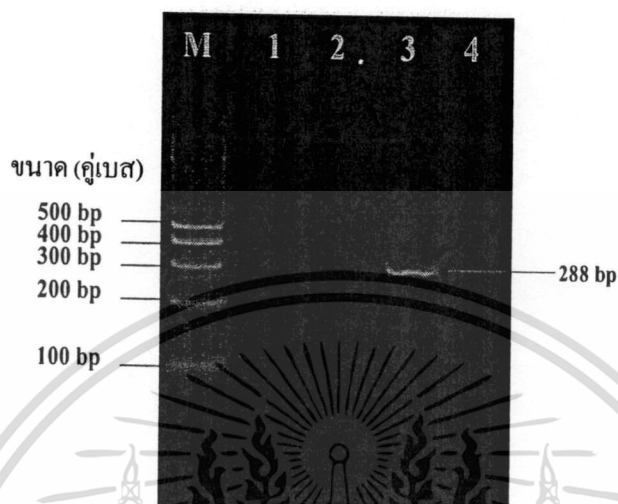
สภาวะ	total RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	A260/A280
สภาวะปกติ	2.40	2.00
สภาวะที่มีการชักนำ	2.64	2.44

4.2.4.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำสารละลาย total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.4 จากนั้น นำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* และนำแทนสารละลาย total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบแถบเพียง 1 แถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาด 288 คู่เบส (รูปที่ 4.26) แสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.26 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

- 1 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติ
- 2 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่มีชักนำ
- 3 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 4 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

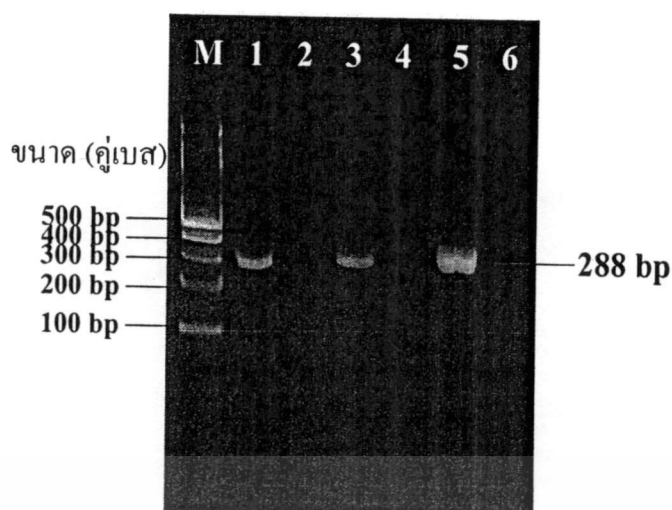
4.2.4.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตรหัส PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

จากการนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังแสดงในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

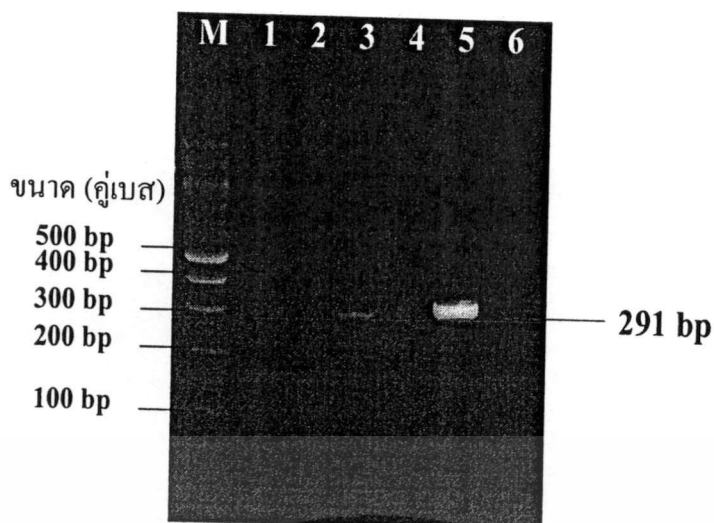
วิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้น นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA ที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3 และ 5 เท่านั้น (รูปที่ 4.27) และไม่พบแถบในเลนที่ 2 และ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา

จากการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน *hoxH* พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน *hoxH* ที่มีระดับเดียวกันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 3 และ 5 เท่านั้น (รูปที่ 4.28) โดยเลนที่ 3 คือปริมาณดีเอ็นเอของสถานะที่มีการชักนำ ส่วนเลนที่ 5 คือผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ส่วนในเลนที่ 2 และ 4 นั้นจะไม่พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงให้เห็นว่าสารละลาย total RNA ไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังไม่พบแถบในเลนที่ 1 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของสถานะที่มีเฉพาะเลี้ยงด้วยสถานะปกติ จากนั้น จึงนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.27 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสถานะปกติ
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะมีการชักนำ
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่เพาะเลี้ยงปกติและสถานะที่มีถูกชักนำ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ



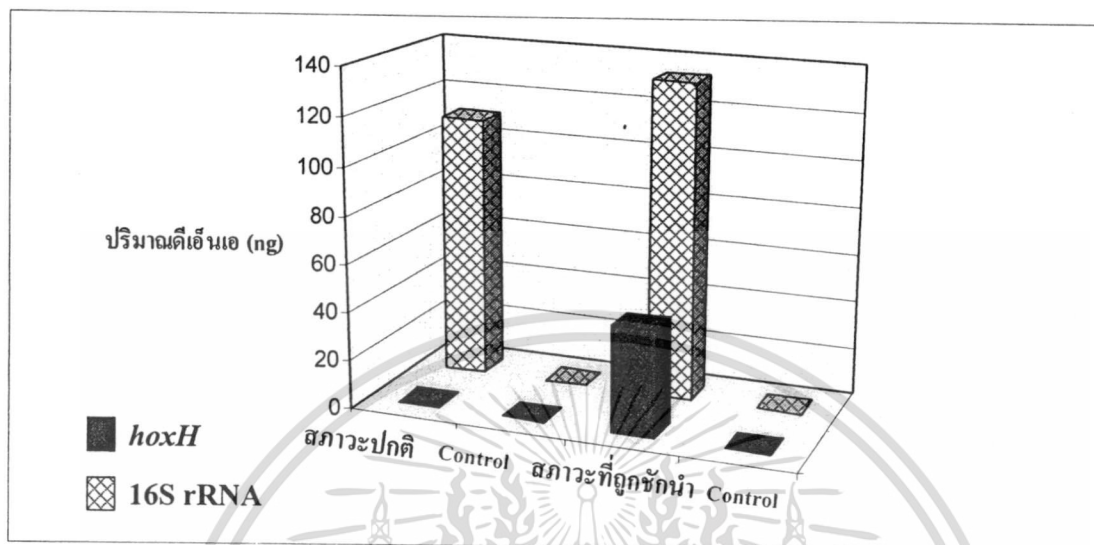
รูปที่ 4.28 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ
- 3 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่มีการชักนำ
- 5 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 6 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4 ผลลัพธ์ PCR จากปฏิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิริยาของสภาวะที่เพาะเลี้ยงปกติและสภาวะที่ถูกชักนำ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ
- 4.2.4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายเจลอะกาโรสด้วยโปรแกรม Gene Tools

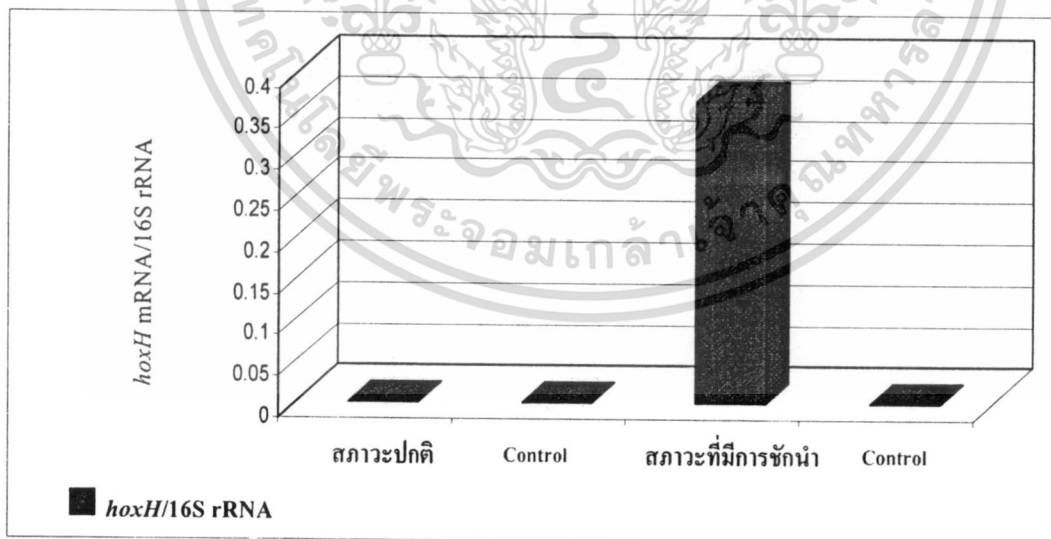
จากการนำรูปถ่ายเจลอะกาโรสของผลลัพธ์จากปฏิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนที่ถูกชักนำด้วยสภาวะที่แตกต่างกันจะมีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.29) และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA จะพบว่าในสภาวะที่มีการชักนำจะมีค่าของอัตราส่วนดังกล่าวสูงกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงปกติ (รูปที่ 4.30) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสภาวะการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงปกติ มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมากหรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน *hoxH*



รูปที่ 4.29 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติกับสภาวะที่มีการชักนำ



รูปที่ 4.30 อัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติกับสภาวะที่มีการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *A. halophytica*

1. จากการนำพลาสมิด pRVA1.1 ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 400 คู่เบส มาทำการติดฉลากด้วย DIG เพื่อใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจสอบการมีรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* สรุปได้ว่าพบรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน *A. halophytica*
2. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. halophytica* เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบมีความจำเพาะสูง และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิด pRhyd1.2 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากการนำพลาสมิดลูกผสม pRhyd1.2 ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 660 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. halophytica* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของไซยาโนแบคทีเรีย *Arthrospira platensis* และ *Spirulina subsalsa* ถึง 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.2 สรุปผลการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนในหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำ total RNA ที่สกัดได้ของ *A. halophytica* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะการชักนำต่างๆ มา วิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอและความบริสุทธิ์ จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI จากนั้นทำการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึมนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase และทำการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึมนำ จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder และนำรูปที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่า *A. halophytica* มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hoxH* สูงสุด เมื่อชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน การเติมเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำและสภาวะปกติ พบว่าเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีการชักนำเท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR ของยีน *hoxH*

บรรณานุกรม

- กองบรรณาธิการ. (2540). แนวโน้มของการผลิตไฟฟ้าโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์. วารสารพลังงาน. 37 : 20-21.
- ชมาภรณ์ ชงเพ็ง. 2547. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดุสิต เครื่องาม. 2540. แหล่งพลังงานทดแทนและแนวโน้มการนำพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้ภายในประเทศ. วารสารพลังงาน. 37:12-15.
- ถัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Appel, J. and Schulz, R. 1996. "Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I)". **Biochim. Biophys. Acta.** 1298 : 141-147.
- Axelsson R., Lindberg P., Lindblad P., Oxelfelt F., Tamagnini P., Oxelfelt F. and Wunschiers R. 2002. "Hydrogenase and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria". **Microbiol.** 66 : 1-20.
- Belkin, S. and Paden, E. 1978. "Sulfide dependent hydrogen evolution in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*". **FEBS Lett.** 94 : 291-294.
- Boison, G., Schmitz, O., Mikheeva, L., Shestakov, S. and Bothe, H. 1996. "Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*". **FEBS Lett.** 394 : 153-158.
- Boison, G., Schmitz, O. and Bothe, H. 1998. "Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR". **Curr. Microbiol.** 40 : 315-321.
- Carrasco, C. D., Buettner, J. A. and Golden, J. W. 1995. "Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92 : 791-795.
- Desikachary, T. V. 1959. **Indian Council of Agariculture Research.** New Delhi.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ewart, G. D., Reed, K. C. and Smith, G. D. 1990. "Soluble hydrogenase of *Anabaena cylindrica* Cloning and sequencing of a potential gene encoding the tritium exchange subunit". **Eur. J. Biochem.** 187 : 215-223.
- Frenkel, A., Gaffron, H. and Battley, E. H. 1950. "Photosynthesis and photoreduction by the blue green alga *Synechococcus elongatus*". **NÄG. Biol. Bull.** 99 : 157-162.
- Friedrich, B. and Schwartz, E. 1993. "Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs". **Annu. Rev. Microbiol.** 47 : 351-383.
- Hansel, A. and Lindblad, P. 1998. "Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 : 153-160.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981a. "Occurrence and localization of two distinct forms of hydrogenase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. 7120". **J. Bacteriol.** 146 : 209-214.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981b. "Comparative characterization of two distinct hydrogenase from *Anabaena* sp. Strain 7120". **J. Bacteriol.** 146 : 215-221.
- Houchins, J. P. 1984. "The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria". **Biochim. Biophys. Acta.** 768 : 227-255.
- Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. and Aarosan, S. 1986. "Algal nutrition Handbook of Microalgal Mass Culture". **CRC Press Inc.** Florida.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. 1980. "Hydrogen metabolism by the filamentous cyanobacteria". **Arch. Biochem. Biophys.** 205 : 36-50.
- Lindblad, P. and Tamagnini, P. 2001. **Cyanobacterial hydrogenases and biohydrogen: Present status and future potential.** In J. Miyake, Matsunga, T. and San Pietro, A.(ed). Biohydrogen II. ElsevierScience Ltd., Oxford, United Kingdom. 143-169.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K., and Hall, D. O. 1979. "Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*". **FEBS. Lett.** 98 : 342-346.
- Oxelfelt, F., Tamagmimi, P., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. "Hydrogen uptake in *Nostoc* strain PCC 73102: Effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen". **Plant Physiol. Biochem.** 33 : 617-623.

- Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Lindblad, P. 1998. "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a *hupSL* homologue". **Arch. Microbiol.** 169 : 267-274.
- Peschek, G. A. 1979a. "Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H₂-dependent photoreduction and related reactions". **Biochim. Biophys. Acta.** 548 : 187-202.
- Peschek, G. A. 1979b. "Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction". **Biochim. Biophys. Acta.** 548 : 203-221.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. 1995. "Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria". **Eur.J.Biochem.** 233 : 266-276.
- Serebryakova, L., Zorin, N. A. and Lindblad, P. 1994. "Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413: presence and localization in non-N₂-fixing cells". **Arch. Microbiol.** 161 : 140-144.
- Serebryakova, T. L., Milagros, M., Nikolay, A. Z., Ivan, N. G. and Richard, C. 1996. "Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres". **FEBS Lett.** 383 : 79-82.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindblad, P., Oxelfelt, F. and Wonschiers, R. 2002. "Hydrogenase and hydrogen metabolism of cyanobacteria". **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 66 : 1-20.
- Tel-Or, E., Luijk, L.W., and Packer, L. 1978. "Hydrogenase in N₂-fixing bacteria". **Arch. Biochem. Biophys.** 185 : 185-194.
- Watanabe, A., Nishigaka, S. and Konishi, C. 1951. "Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants". **Nature.** 168 : 748-749.
- Wutipraditkul, N., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takabe, T. and Takabe, T. 2005. "Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains NapA-Type Na⁺/H⁺ antiporters with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH". **Appl. Environ. Microbiol.** 71 : 4176-4184.

www.kazusa.or.jp

<http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent>

<http://protist.i.hosei.ac.jp/>

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียม โมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบ BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมเอ็ดทีเอ (Na_2EDTA)	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบของอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ($FeNH_4$ Citrate) (0.60กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบของอาหาร Turk Island Salt Solution

Stock A

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.09	โมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.27	โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.10	โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stock B

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.06 โมลาร์

ส่วนประกอบของอาหาร BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution

Stock A	100	มิลลิลิตร
Stock B	100	มิลลิลิตร
อาหาร BG11	13	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	28.16	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร Turk Island Salt Solution ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย RF1

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมอะซิเตรต (CH_3COOK)	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter

สารละลาย RF2

ส่วนประกอบ

MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย กรดอะซิติก แล้วกรองผ่าน filter

ภาคผนวก ข

ส่วนประกอบสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-boric EDTA

Tris	0.89	โมลาร์
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.89	โมลาร์
EDTA	25	มิลลิโมลาร์

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris 107.81 กรัม กรดบอริก 55.03 กรัม และ EDTA 9.31 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีพีเอช 8.3 หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ส่วนประกอบของ Tracking dye

กลีเซอรอล (Glyceral)	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue)	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-boric EDTA 1 เท่า		

วิธีการเตรียม

ชั่งกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟีนอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-boric EDTA 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณ total RNA โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. ใส่น้ำกลั่นลงในคิวเวตควอตซ์ นำคิวเวตควอตซ์ไปใส่ในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร กำหนดค่า blank ให้เป็นศูนย์
2. เทน้ำกลั่นในคิวเวตทิ้ง จากนั้นใส่สารละลาย total RNA ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำคิวเวตไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
3. นำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาคำนวณหาปริมาณ total RNA

การคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง

เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ของสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาณ 40 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร มีค่าเท่ากับ 1 ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากสมการ

$$\text{ปริมาณอาร์เอ็นเอ} = A_{260} \times 40 (\mu\text{g/mL}) \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1. การสกัดคลอโรฟิลล์

- 1.1 ทำการเจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5
- 1.2 นำสารละลายเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- 1.3 เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายส่วนของสารละลายออก
- 1.4 เติมน้ำเมทานอล 1 มิลลิเมตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- 1.5 นำไป vortex เป็นเวลา 5 นาที
- 1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665, 665.5, 666, 666.5 และ 750 นาโนเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

$x =$ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665, 665.5, 666 และ 666.5 นาโนเมตร) – ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

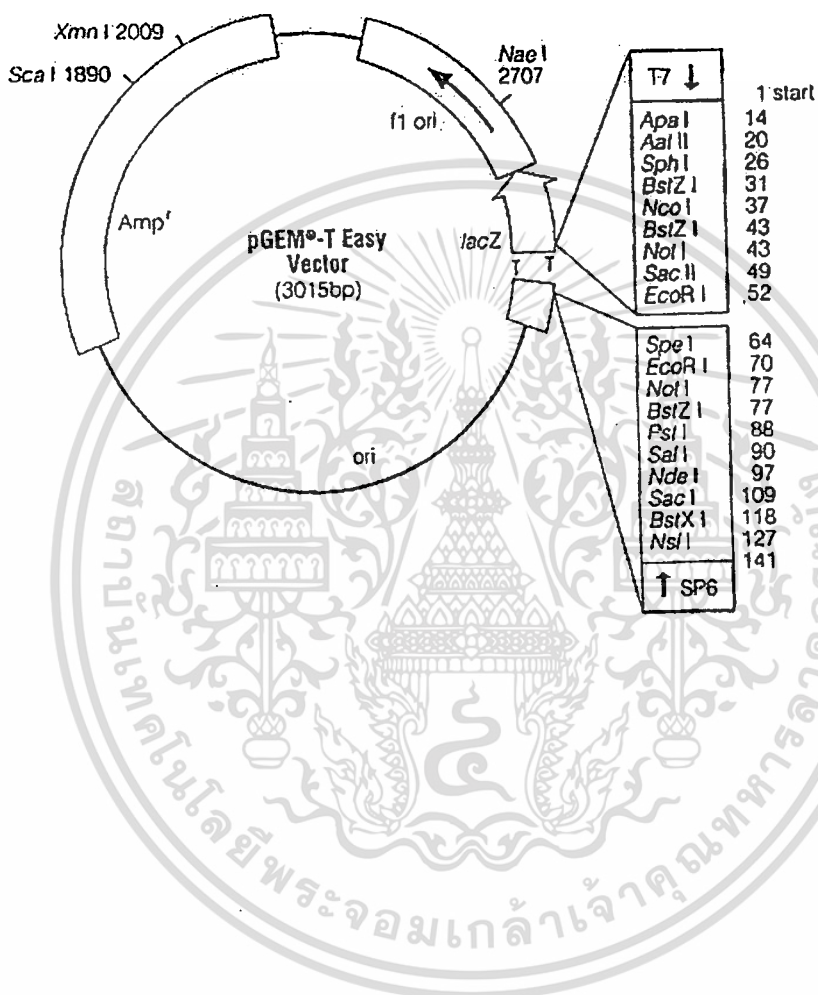
ปริมาณคลอโรฟิลล์ = $X/0.0844$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T-Easy



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้