รายงานโครงงานวิจัย

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2545

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

Sequencing of *hup* gene in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*

ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
99.63
.T34 S3
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 48857
วัน, เดือน, ปี 24 S.A. 2546

.b.11348924X.....
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

เอนไซม์ uptake hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup*L โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hup*L ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน uptake hydrogenase (*hup*L) และทำการเพาะเลี้ยง *Anabaena siamensis* ในอาหารเหลว BG11 หลังจากนั้นแตกเซลล์ด้วยวิธีทางกล และสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hup*L ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,300 คู่เบสซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดไว้ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาโคลนลงในพลาสมิด pGEM-T easy และทรานสฟอร์มเข้าไปยังแบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากการเกิดสีของปฏิกิริยากับสาร X-gal และ IPTG นำโคลนที่เจริญและเป็นสีขาวมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี dideoxy enzymatic chain termination พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,343 คู่เบส เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ uptake hydrogenase ของ *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 ถึงร้อยละ 84, 82 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. It is composed of 2 subunits. Large subunit is encoded by *hup*L. This study aims to sequence *hup*L gene of nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Degenerated primers of *hup*L gene were designed. *Anabaena siamensis* was cultivated in BG11 medium and cells were broken by mechanical method. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform method. PCR product of *hup*L gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method. It was found that PCR product with 1,300 bp that corresponds to expected size, was obtained. This PCR product was cloned into plasmid pGEM-T easy and transformed to *E. coli*. Transformants were selected on ampicilin containing LB agar and from color reaction with X-gal and IPTG. Plasmid DNA was extracted from white colonies and sequenced by dideoxy enzymatic chain termination method. A 1,343 bp of PCR product was sequenced. Their amino acid sequences were compared with other amino acid sequences reported in Genbank by Blast server and they showed high similarity to uptake hydrogenase of *Nostoc punctiforme* (84%), *Anabaena variabilis* (82%) and *Nostoc* sp. PCC 7120 (81%).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hup* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ได้ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดีโดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2545 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นางสาวชมาภรณ์ ธงเพ็ง นักศึกษาปริญญาโทที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และช่วยในการทำโครงการวิจัยนี้

ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญรูป	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	4
2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส	5
2.3 เอมไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสและยีน *hup*	6
2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย	7
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	13
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	13
3.2 สารเคมี	13
3.3 อุปกรณ์	14
3.4 วิธีวิจัย	15
บทที่ 4 ผลลัพธ์และอภิปรายผล	22
4.1 การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate technique	22
4.2 การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*	23
4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่	24
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hypL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	24
4.5 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มใน *E. coli*	26
4.6 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	27
4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม pUTA	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1. การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย	5
2. รูปร่างของ *Anabaena siamensis*	10
3. ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* บนอาหารแข็ง BG11	22
4. จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์	23
5. การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของอัพเทคไฮโดรจีเนสโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena siamensis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102	25
6. ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 ที่อุณหภูมิของการจับตัว (annealing temperature) ต่างๆ	26
7. การตัดพลาสมิคดีเอ็นเอ pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	28
8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ในปัจจุบัน โลกมีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการประดิษฐ์คิดค้นอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ขึ้นมากมาย เพื่อใช้อำนวยความสะดวกและใช้ในการดำรงชีวิต ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้มีการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรด้านพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ พลังงานดังกล่าวมีอยู่อย่างจำกัดและจะหมดไปในอนาคตหากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากเชื้อเพลิงเหล่านี้จะให้พลังงานแล้ว ผลกระทบที่ตามมาจากการใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้ ได้แก่ ปัญหามลพิษ ความร้อน ภาวะเรือนกระจก และ ฝนกรด เป็นต้น จากความเป็นมาดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกหันมาให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัยพัฒนาและผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม น้ำพุร้อน และพลังงานความร้อนใต้พิภพ ในหลายประเทศมีการรณรงค์ให้ลดการใช้และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่นมีการนำพลังงานนิวเคลียร์มาใช้ทดแทนน้ำมันและยังมีการจัดหาพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ โดยนำพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้เป็นพลังงาน สำหรับประเทศไทยได้มีการคิดหาพลังงานทางเลือกใหม่มาใช้แทนน้ำมัน โดยรัฐบาลสนับสนุนการผลิตแอลกอฮอล์จากพืช เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงซึ่งอาจช่วยลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและในการขับดันยานอวกาศ ในประเทศเยอรมนีมีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน นอกจากนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่เกิดจากการแปรพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ (Schulz, 1996)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ทุกชนิดและไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวบางชนิดที่ไม่ตรึงไนโตรเจน เช่น *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a; 1979b) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทุกชนิดมีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Ni-Fe hydrogenase) Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7210 และอธิบายโปรแกรมการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (programmed DNA rearrangement) ที่เกิดขึ้นในยีนหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของอัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1998) และในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* (Happe *et al.*, 2000) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่สอง คือ เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป เอนไซม์ชนิดนี้มีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับชนิดแรกและทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Synechocystis* sp. (Frenkel *et al.*, 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายแต่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Oscillatoria* sp. และไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (Lambert and Smith, 1980) จนกระทั่งปัจจุบัน มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *A. variabilis* (Schmitz *et al.*, 1995) *Anacystis nidulans* (Boison *et al.*, 1996) *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996) และ *Prochlorothrix hollandica* (unpublished result)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อที่จะนำไปสู่การสร้างไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตและสะสมไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูงสำหรับผลิตพลังงานไฮโดรเจนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ในอาหารสูตร BG11 เก็บเซลล์ นำมาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส จากนั้นออกแบบไพรเมอร์สำหรับศึกษายีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนสที่มีขนาดตามที่ต้องการมาโคลนลงในพลาสมิด pGEM-T Easy จากนั้นตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งสูตร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และนำเชื้อมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ทดสอบขนาดของชิ้นส่วนที่ใส่เข้าไปโดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะเป็นยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินนาในประเทศไทย และสามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการผลิตไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ผลิตและสะสมไฮโดรเจนได้ในปริมาณมาก เพื่อประโยชน์ในการผลิตพลังงานสะอาดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

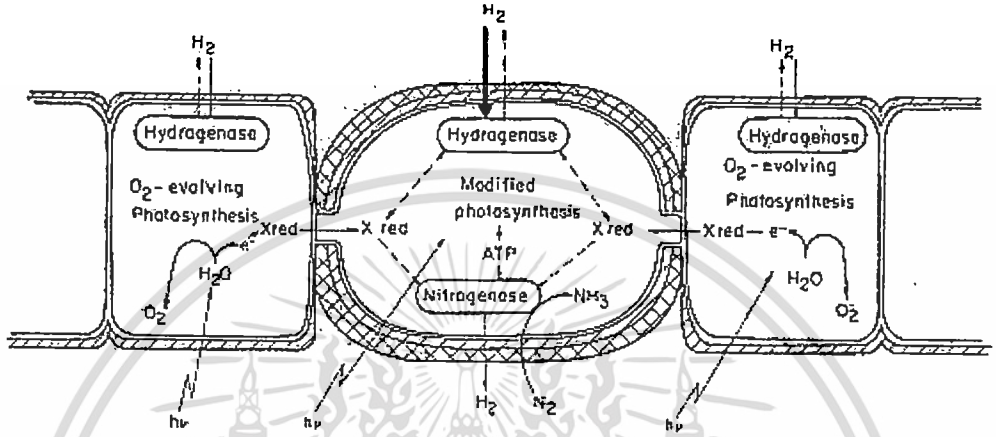
2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเมื่อเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะให้พลังงานสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ นอกจากนี้ก๊าซไฮโดรเจนยังมีน้ำหนักเบาจึงใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนจรวดและยานอวกาศ ในธรรมชาติไฮโดรเจนอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และเป็นส่วนประกอบของน้ำ การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ในประเทศสหรัฐอเมริกา ไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการสตรีมรีฟอร์มมิง (stream reforming) หรือเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการปิโตรเลียมและกระบวนการทางเคมี กระบวนการสตรีมรีฟอร์มมิงใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล โดยขั้นแรกของปฏิกิริยา เชื้อเพลิงถูกสลายไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อโดยเปลี่ยนคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 392 องศาฟาเรนไฮต์ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้คือ การแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrolysis) โดยที่อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้น้ำเกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการสลายพันธะเคมีระหว่างไฮโดรเจนกับออกซิเจน 1.24 โวลต์ และใช้ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยเหตุที่วิธีการผลิตพลังงานไฮโดรเจนดังกล่าว ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) โดยเฉพาะจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ในการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย พลังงานแสงจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีของแสง (photoelectrochemical process) และได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

ในไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถพบได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์และในเซลล์ปกติ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนสพบในเฮเทอโรซิสต์ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย โดยปฏิกิริยาดังกล่าวต้องอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงาน ATP และรีดิวซิงพาวเวอร์ (reducing power) ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้ไฮโดรเจนเกิดขึ้น ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในเซลล์ปกติ จะเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็คตรอนจากน้ำไปยังตัวรับอิเล็คตรอนและผ่านเข้าสู่เฮเทอโรซิสต์ จากนั้นอิเล็คตรอนจะถูกส่งต่อให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อทำหน้าที่สร้างไฮโดรเจน (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย
ที่มา : Tel-Or *et al.*, 1978

2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา 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 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_2 \xleftrightarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^-$$

ในปี ค.ศ. 1931 Stephenson และ Stickland บัญญัติศัพท์คำว่า "ไฮโดรจีเนส" ขึ้นเป็นครั้งแรก ภายหลังจากพบการสร้างและสลายไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมธิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็คตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความไว (sensitive) ต่อออกซิเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

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

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น

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

2.3 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสและยีน *hup*

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ในระยะแรกมีการศึกษาเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* (Adams *et al.*, 1981) โดยพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจน ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ *Azotobacter* sp. (Smith *et al.*, 1976) *Rhizobium* sp. (Dixon, 1972) และ *Rhodopseudomonas capsulata* (Colbeau *et al,* 1980) เป็นต้น นอกจากมีการค้นพบในแบคทีเรียแล้ว สามารถพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ทุกชนิดและในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจน เช่น *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a; 1979b) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์ (Eisbrenner *et al.*, 1978) และในเซลล์ปกติ (Houchins and Burris, 1981a; Lindblad and Sellstedt, 1990; Rai *et al.*, 1992) โดยระดับกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ของการเกิดเฮเทอโรซิสต์ ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 เอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจนและความร้อน นอกจากนี้ ยังพบปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน ได้แก่ แสง นิคเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอน (Oxelfelt *et al.*, 1995) เมื่อเปรียบเทียบระดับกิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะอากาศที่มีไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศสูงกว่าเดิม 5 ถึง 10 เท่า (Eisbrenner *et al.*, 1978)

ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอริคเอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 2 หน่วยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL (Hup มาจาก Hydrogen uptake) มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตันและถอดรหัสมาจากยีน *hupL* ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตันและถอดรหัสมาจากยีน *hupS* (Carrasco *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 2000; Lindberg *et al.*, 2000; Lindblad and Sellstedt, 1990; Oxelfelt *et al.*, 1998; Tamagnini *et al.*, 1995) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองชนิดในไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (Tamagnini *et al.*, 2002) ใน ปี ค.ศ. 1995 Carrasco และคณะ ได้อธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนอัพเทคไฮโดร-จีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์เป็นครั้งแรก ต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hupS* และ *hupL* ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 (www.kazusa.or.jp) *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1998) และ *Anabaena variabilis* (Happe *et al.*, 2000)

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) จัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน จึงสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ออกซิเจนเป็นผลผลิต ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจน บางชนิดสามารถเปลี่ยนสีเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียเจริญร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542) ได้แก่

2.4.1 สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย

- คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ

-แคโรทีนอยด์ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) ลูเทอีน (lutein) ฟลาวิซิน (flavicin) อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และอะฟานิซิน (aphanicin)

-ไฟโคบิลิโปรตีน จากรายงานของ Sze (1986) กล่าวว่าไฟโคบิลิโปรตีนในไซยาโน-แบคทีเรียมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phycocyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) ไฟโคอิริโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซี-ไฟโคอีรีทริน (c-phycoerythrin)

2.4.2 ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) ค่อนข้างหนาและฉีกขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยสารประเภทเปปติโดไกแคน (peptidoglycan) มีองค์ประกอบเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเมมเบรนชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่มีรงควัตถุเรียกว่าโปรโตพลาสซึม (protoplasm) และส่วนที่มีสารพันธุกรรมเรียกว่าเซ็นโตรพลาสซึม (centroplasm) ซึ่งอยู่ใจกลางของเซลล์ (กาญจนภาชน์, 2527)

2.4.3 แฟลกเจลลา (flagella) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

2.4.4 ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) เป็นสารจำพวกแป้งชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเรียกว่า ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งแป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่น คือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 ลักษณะพิเศษประจำดิวิชันไซยาโนไฟตา คือ เป็นพืชชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง และสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดียวและชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย บางชนิดสามารถสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ Watanabe และคณะ (1951) ได้ทำการแยกไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และ แอฟริกา พบว่าไซยาโน-แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนพบเฉพาะในบางบริเวณเท่านั้น และในอินเดียพบเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างดินเท่านั้นที่มีไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ยกตัวอย่างเช่น *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Aulosira* sp., *Plectonema* sp., *Hapalosiphon* sp., *Scytonema* sp. และ *Cylindrospermum* sp.

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทยและเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีแสงจำกัด เมื่อจำแนก *A. siamensis* ตามหลักอนุกรมวิธาน พบว่า *A. siamensis* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

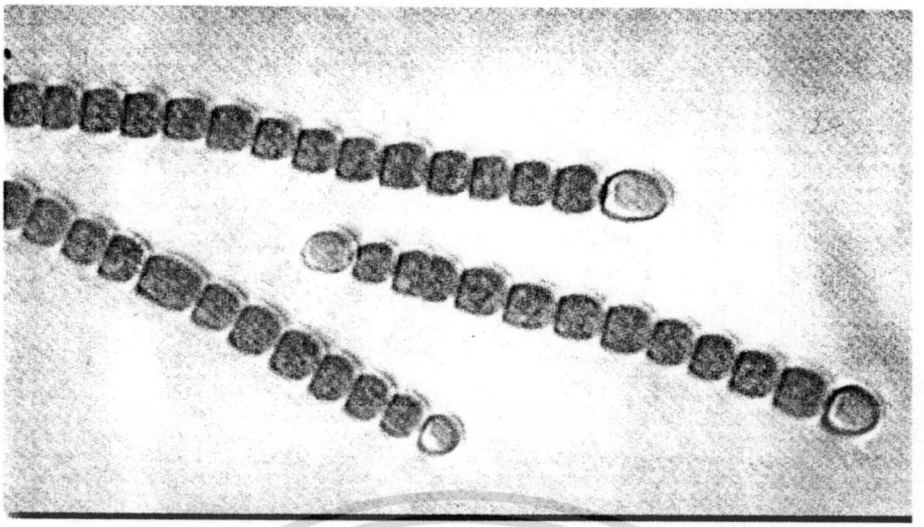
Family Nostocaceae

Genus Anabaena

Specie *Anabaena siamensis*

เซลล์ของ *A. siamensis* มีรูปร่างเป็นแบบถังเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยมจตุรัสทรงกระบอก ขนาดสม่ำเสมอ เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่าเฮเทอโรซิสต์ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ตำแหน่งของการเกิดเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณตอนปลายด้านหัวท้ายของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 รูปร่างของ *Anabaena siamensis*

ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สูง โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมและแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท จากนั้นพืชจะดูดซึมไนไตรท์ ไนเตรท และแอมโมเนียมเข้ามาเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเต็มที่และตายไปจะให้อินทรีย์วัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำนาได้ผลดี จากประโยชน์ของ *A. siamensis* ดังที่ได้กล่าวมา *A. siamensis* จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตในการเพาะปลูกข้าวในปัจจุบัน(Antarikanonda, 1982a; 1982b)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Daday และคณะ (1979) ศึกษาวิธีการวัดการผลิตไฮโดรเจนภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* พบว่า เมื่อเติมเมทิลไวโอโลเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1-10 มิลลิโมลาร์) แก่เชื้อที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะทำให้มีการผลิตไฮโดรเจน แต่สภาวะนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นใน *A. cylindrica* จึงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์และถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อยโดยอะเซทิลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Houchins และ Burris (1981a) ศึกษาบริเวณของการพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่แตกต่างกัน 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในเซลล์ปกติและเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์นี้ไม่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมไฮโดรเจนในเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยง สำหรับเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสพบเฉพาะในเฮเทอโรซิสต์ของเชื้อที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีอากาศ แต่กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติของเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerobic condition) และมีไฮโดรเจน 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Houchins และ Burris (1981b) ยังศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่แตกต่างกันทั้ง 2 ชนิดของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสไม่สามารถผันกลับได้ แต่การทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถผันกลับได้ นอกจากนี้เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสยังมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสลายไฮโดรเจนโดยรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส คือ พีเอช 6 และ 9 ตามลำดับ

Troshina และคณะ (1996) ศึกษาผลของไฮโดรเจนและสารอินทรีย์ตั้งต้นต่อการชักนำการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ไนโตรจีเนสใน *A. variabilis* ATCC 29413 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสมีปริมาณน้อย (2-7 ไมโครโมลของไฮโดรเจน ต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ต่อชั่วโมง) ในเชื้อที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนไม่มีผลกระตุ้นการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ที่เกิดในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์

Boison และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anacystis nidulans* และ *Anabaena variabilis* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *A. nidulans* กลุ่มของยีน *hox* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ยีน *hoxEF* และยีน *hoxUYHWhypAB* โดยถอดรหัสแยกกัน ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *A. variabilis* ยีน *hox* จะอยู่เรียงต่อกันเป็นกลุ่มโดย ORF8 และ ORF3 จะแทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxU* กับ *hoxY* และ *hoxY* กับ *hoxH* ตามลำดับ และมีการถอดรหัสของยีน *hoxFUYH* ร่วมกัน สำหรับการถอดรหัสของยีน *hupL* ของ *A. variabilis* สามารถพบได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์และพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Happe และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสและการกลายพันธุ์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern hybridization พบว่ายีน *hupSL* ถอดรหัสได้ชิ้นส่วนที่มีขนาด 2.7 กิโลเบสและพบการถอดรหัสในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตและสะสมไฮโดรเจนมากกว่าสายพันธุ์แท้ถึง 3 เท่า

Masukawa และคณะ (2002) ศึกษาการเพิ่มการผลิตไฮโดรเจนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120, สายพันธุ์กลาย *hupL*$^-$, *hoxH*$^-$ และ *hupL*$^-$/ *hoxH*$^-$ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *hupL*$^-$ ผลิตไฮโดรเจนได้มากกว่าสายพันธุ์แท้ 4 ถึง 7 เท่า สายพันธุ์กลาย *hoxH*$^-$ ผลิตไฮโดรเจนได้น้อยกว่าและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสต่ำกว่าสายพันธุ์แท้ สำหรับเชื้อสายพันธุ์กลายที่ไม่มียีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิด จะผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำกว่าหรือเท่ากับเชื้อสายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *hupL*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก 1)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก 2)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 เม็ดแก้ว (Glass bead)

3.2.2.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer)

3.2.2.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate)

3.2.2.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauroyl sarcosine)

3.2.2.5 ฟีนอล (Phenol)

3.2.2.6 คลอโรฟอร์ม (Chloroform)

3.2.2.7 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol)

3.2.2.8 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)

3.2.2.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% ethanol)

3.2.2.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.3.1 dNTPs (Deoxynucleotidetriphosphate)

3.2.3.2 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase)

3.2.3.3 อะกาโรส (Agarose)

3.2.3.4 เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

3.2.3.5 บัฟเฟอร์ TBE (Tris Borate–EDTA buffer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์

3.2.4.1 เอนไซม์ T4 ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน

3.2.5.1 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)

3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์เชื้อที่ได้รับการถ่ายยีน

3.2.6.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

3.2.6.2 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside)

3.2.6.3 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside)

3.2.6.4 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin)

3.2.7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.7.1 แลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII)

3.2.7.2 Bioladder 200

3.2.7.3 Marker 6

3.2.8 ชุดทดสอบ (Kit)

3.2.8.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวคเตอร์ pGEM-T Easy

3.2.8.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.2.8.3 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

3.3.3 ตู้เพาะเลี้ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (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 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.3.9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine)

3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Power supply)

3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.12 กล้องถ่ายรูปอะกาโรสเจล (Gel documentation)

3.3.13 เครื่องผสมสาร (Vortex)

3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock)

3.3.15 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.16 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glassware)

3.4 วิธีวิจัย

3.4.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

3.4.1.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนี มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร LB (Luria–Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีของการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สามารถคัดเลือกเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลินเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.4.1.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka *et al.*, 1979) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

3.4.2 การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate technique

การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำที่เขี่ยเชื้อ (loop) ไปลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น นำที่เขี่ยเชื้อไปเขี่ยเชื้อไซยาโนแบคทีเรียมา streak บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 จากนั้นปิดขอบจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน เมื่อเซลล์เจริญจึงทำซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว BG11 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์ TE พีเอช 7.5 ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเม็ดแก้ว (glass bead) 200 ไมโครลิตร โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซีน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ เขย่าอย่างแรง (vortex) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเออยู่มาสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิล-แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร นำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนโดยเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร ตามด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.3 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาวางในถาดที่มีบัฟเฟอร์ TBE จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลท์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ แล้วนำแผ่นเจลที่ย้อมแล้วไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สำหรับการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ใช้ Bioladder 200 ที่มีขนาด 800, 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800 และ 2,000 คู่เบสเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน และ Marker 6 ที่มีขนาด 400, 900, 1,490, 1,880, 2,690, 3,470, 4,260, 6,220, 7,740 และ 19,330 คู่เบสเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.4.5 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสและเอนไซม์รีเวอร์ส-ซิเบิลไฮโดรจีเนสที่ได้รับการบันทึกใน www.ncbi.nlm.nih.gov มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่จากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 จากนั้นเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันโดยคาดว่าจะเป็นบริเวณอนุรักษ์มาเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ คำนวณค่า T_m (melting temperature) และความเป็นไปได้ในการเข้าจับกันของไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ทั้งสองไปใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR 1 เท่าที่มีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ที่เข้าจับบริเวณส่วนปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอ (upstream primer) 0.25 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ที่เข้าจับบริเวณส่วนปลายด้าน 5' ของดีเอ็นเอ (downstream primer) 0.25 มิลลิโมลาร์, จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้ตามข้อ 3.4.3 ปริมาณ 50 ถึง 100 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยมีขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงนี้ ขั้นตอนแรก initial denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่สองจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นจำนวน 30 รอบ โดยแต่ละรอบแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่สอง annealing ใช้อุณหภูมิ 40 ถึง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นสุดท้าย extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่ 3 คือ final extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

48857

เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้งหมดทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ตามข้อ 3.4.4

3.4.7 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการแยกขนาดในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลท์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ตัดดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการจากแผ่นเจลและนำมาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ ลงในหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากที่เจลละลายเป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์แล้ว เติมไอโซโพรพานอลปริมาณ 1 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายใส่ใน Spin column ที่วางอยู่บน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน Spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ3.4.4

3.4.8 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดตามต้องการหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.7 มาเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy โดยใน ligation mixture 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ ligation 2 เท่าที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ในปริมาณที่เหมาะสม, พลาสมิด pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม และเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต นำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

3.4.9 การเตรียมเซลล์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (competent cell)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์และแคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตรและกลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่ง competent cell ใส่หลอดและเก็บที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

3.4.10 การทรานสฟอร์มเมชัน

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.9 หรือที่เตรียมได้ในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง ปิเปตเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี ligation mixture ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.8 จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก หลังจากนั้น นำไปวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

3.4.11 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pGEM-T Easy ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวเนื่องจากพลาสมิด pGEM-T Easy หลังจากได้รับยีนจะเสียคุณสมบัติของการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase activity) ในการย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินจึงทำให้ได้โคโลนีสีขาว จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลินเป็น 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีแตกเซลล์ด้วยด่าง

3.4.12 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีแตกเซลล์ด้วยด่าง (Alkali lysis)

เก็บเซลล์จากข้อ 3.4.11 โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 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 ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาและวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution III ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร กลาเชียลอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 วินาที และวางบนน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรที่ได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ตากให้แห้งและละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.4.13 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในปริมาณมากพอที่จะทำให้การเกิดตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

3.4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธี dideoxy enzymatic chain termination ของ Sanger และคณะ (1977) โดยใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

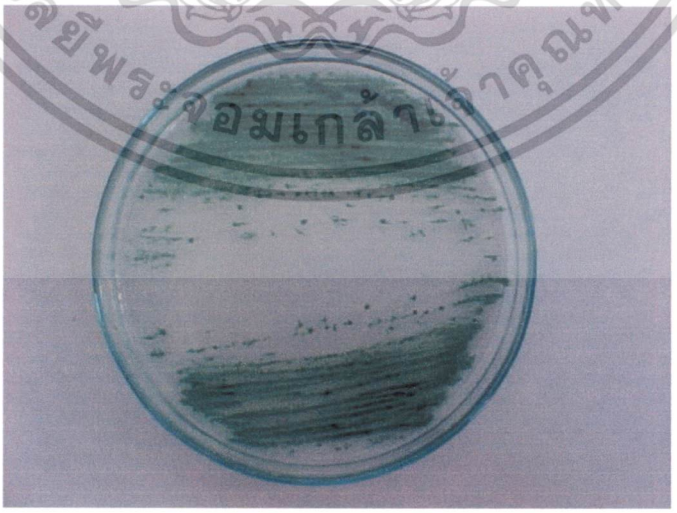
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลลัพธ์และอภิปรายผล

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hupL* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ทำได้โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. siamensis* ที่แยกได้โดยวิธี Streak plate technique มาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ จากนั้นนำจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และทำการทรานสฟอร์มใน *E. coli* หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมและนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1 การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate technique

ทำไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยให้ปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยนำมา streak บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 นำจานไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้แสงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากเลี้ยงเชื้อไปประมาณ 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบกลุ่มเซลล์สีเขียวของ *A. siamensis* เจริญแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และนำมาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอต่อไป



รูปที่ 3 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* บนจานอาหารแข็ง BG11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็ง BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ นำจีโนมิคที่สกัดได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร หลังจากนั้นส่องเจลภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าได้แถบจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* อยู่ประมาณแถบของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII ที่มีขนาด 23.1 กิโลเบส และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณของจีโนมิคดีอ็นเอจะขึ้นกับปริมาณของเชื้อที่นำมาสกัด

รูปที่ 4 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Hin*dIII

1, 2 จีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *A.siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

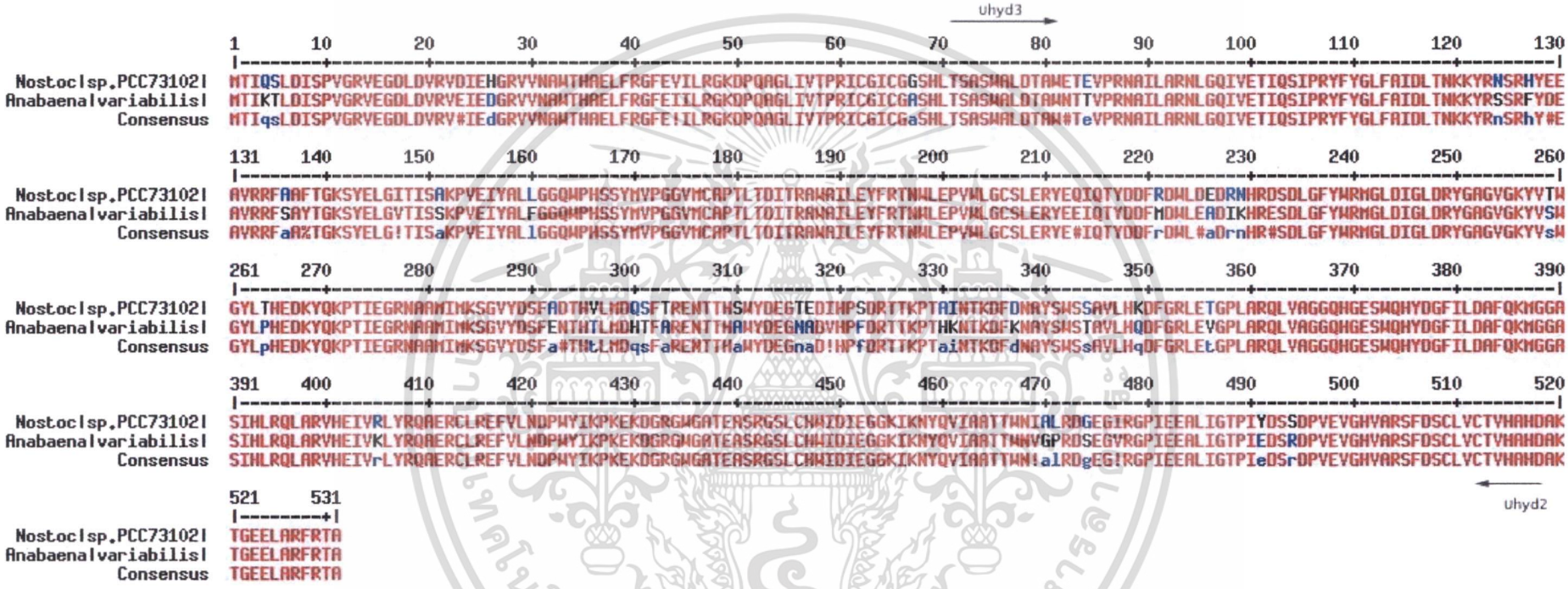
4.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

การออกแบบไพรเมอร์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทำได้โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน 2 บริเวณ คือช่วงต้นและช่วงท้าย (ลูกศรในรูปที่ 5) ลำดับกรดอะมิโนในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 5' คือ ลำดับกรดอะมิโนในช่วงตำแหน่งที่ 71 ถึง 81 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น TSASWALDTAW และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACATCTGCA TC(CT)TGGGCATTAGATACAGC-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Uhyd3 สำหรับลำดับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 3' คือ ลำดับกรดอะมิโนในช่วงตำแหน่งที่ 518 ถึง 512 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น DHAHVTC และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ATCATGGGCGTG(GA)AC(TA)GTACA-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Uhyd2 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 ในการทำ PCR จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ควรจะมีขนาด 1,343 คู่เบส

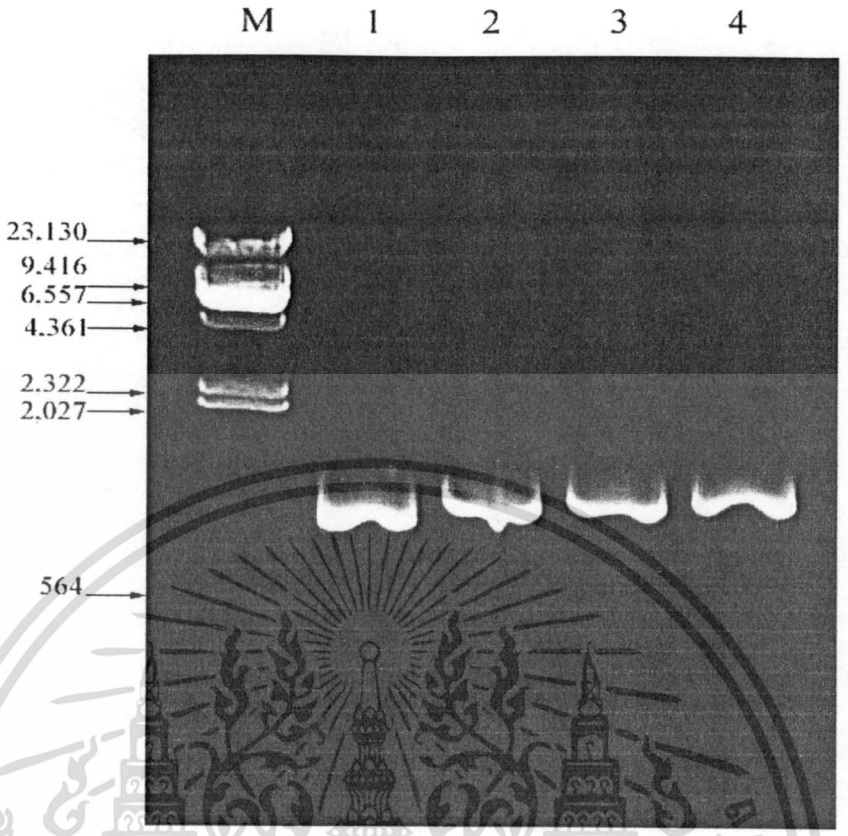
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่พิมพ์และใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 ที่อุณหภูมิของการจับตัว (annealing) 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่าที่อุณหภูมิของการจับตัวตั้งแต่ 40 ถึง 55 องศาเซลเซียส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบสเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์ตัดตำเพาะ *Hin*dIII (รูปที่ 6) ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นี้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่คาดว่าจะได้รับ (1,343 คู่เบส) หลังจากนั้นจึงทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลและทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ kit สำเร็จรูป ก่อนนำไปเชื่อมกับเวคเตอร์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของอัพเทคไฮโดรจีเนสโดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102



รูปที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 ที่อุณหภูมิของการจับตัว (annealing temperature) ต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐานแลมบ์ดาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4.5 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มใน *E. coli*

หลังจากนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3 กับ Uhyd2 ที่อุณหภูมิการจับตัว (annealing) 50 องศาเซลเซียส (ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส) มาทำให้บริสุทธิ์แล้ว จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่มีขนาด 3,015 คู่เบส โดยใช้ T4 DNA ligase และอัตราส่วนปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เท่ากับ 10:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำดีเอ็นเอลูกผสมจากการทำ ligation ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าเรือนเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอลูกผสม และคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มจากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactoside) และ IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาว เนื่องจากเวคเตอร์ pGEM-T Easy ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ซึ่งมีบริเวณ multiple cloning site อยู่บนยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ (α peptide) ของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เมื่อเชื่อมยีนของผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site ยีนดังกล่าวจะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ในการย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสีน้ำเงิน

4.6 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

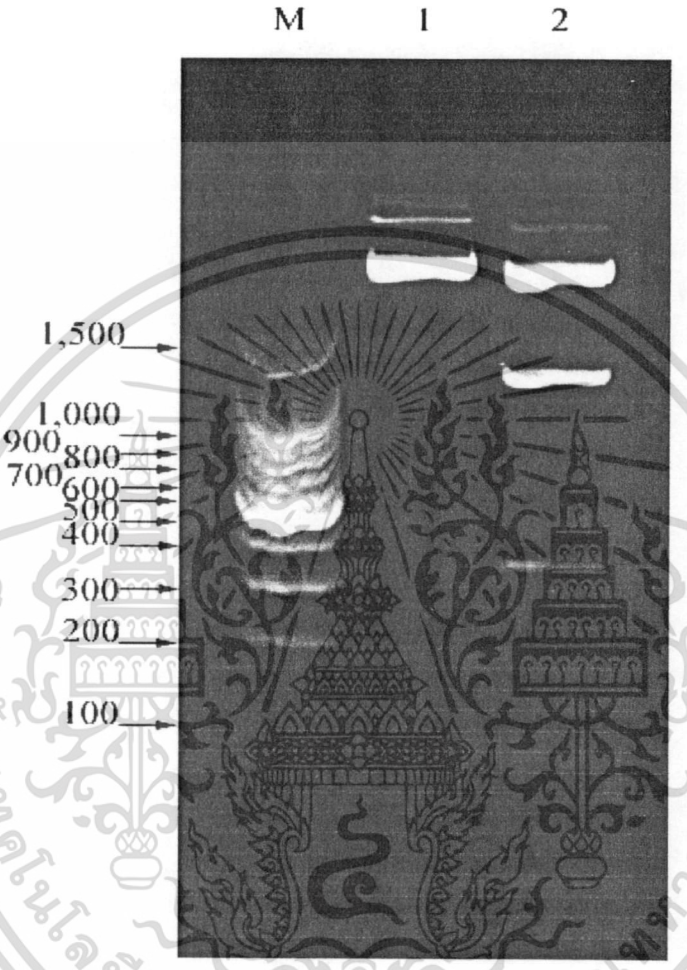
นำโคโลนีที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ด้วยการใช้ด่าง (alkali lysis) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR และนำไปวิเคราะห์ขนาดในอะกาโรสเจลโดยเปรียบเทียบระหว่างขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวและขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โคลนเข้าไป ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 จากการนำโคลน pUTA ที่ได้จากการทำทรานสฟอร์มพลาสมิด pGEM-T Easy ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า เมื่อตัดพลาสมิด pUTA ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบสและ 1,100 คู่เบส (รูปที่ 7) แสดงว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI มีบริเวณจดจำ 1 ตำแหน่งภายในผลิตภัณฑ์ PCR ที่โคลนเข้าไป

4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม pUTA

นำพลาสมิด pUTA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี dideoxy enzymatic chain termination ของ Sanger และคณะ (1977) โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 และ SP6 ได้ลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ 1,343 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 8 และได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์นี้แล้วใน GenBank โดยมีหมายเลขเป็น AY152844 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลงเป็นลำดับของกรดอะมิโนแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับของกนดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้มีรายงานไว้แล้วในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR นี้มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับกรดอะมิโนของที่แปล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาจากยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Nostoc punctiforme, Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC7120 ถึง 84, 82 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 7 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
1    ACATCTGCATCTTGGGCATTAGATACAGCTTGGGGTACAGAAGTTCCACG 50
51   CAATGCTATTTTGGCGCGGAATTTAGGTCAAGTTGTGGAAACAATCCAAA 100
101  GCATTCCTCGCTATTTCTATGGATTGTTTGCCATTGATTTAACTAATAAA 150
151  AATTATCGTCGTAGTCATTTCTATGATGAGGCTTGTCGTCGCTTTGCTGC 200
201  TTTCACAGGGAAATCCTATGAGTTAGGTGTGACAATTTCTGCCAAACCTG 250
251  TGGAAATTTACGCTTTATTAGGAGGACAATGGCCTCACAGCAGTTATATG 300
301  GTGCCTGGTGGTGTGATGTGCGCCCCCACTTTGACTGACCATCACCCGCG 350
351  CTTGGGGTATCCTCGAATATTTCCGCACCACTGGTTAGAACCCGTTTGGT 400
401  TGGGTTGTTCTTTGGAAAGATACGAAGAAATCCAAAGCTATGACGACTTT 450
451  ATGAATTGGTTACATGAAGATGTCAAACATCGGGAATCTGATTTAGGTTT 500
501  ATATTGGCGGATGGGTTTGGATATCGGTTTAGAGCGTTTTGGTGCTGGTG 550
551  TAGGTAAATATGTAACTTGGGGATATTTACCCCATGAGGATAGATACAAC 600
601  AAACCCACCATTGAGGGTCGTAACGCTGCGGTAATTATGAAAAGCGGTGT 650
651  TTACGATAGCTTTAGTGATACCCATACTTTGATGGATCAATCTTTTGCCC 700
701  GTGAAAATTTAAGCCATTCTTGGTATGATGAAGGAACTCAAGATTGGCAT 750
751  CCAAGCGATCGCACCACATCACCCACCATCAACAACCAAAAAGACTTTAG 800
801  CGGTGCATATTCCTGGGCAAGTGCCGTTCTCCACAAAGATTTCGGACGTT 850
851  TAGAAGCAGGCCCCTTAGCCCGGCAATTAGTCGCAGGTGGTACACATGGG 900
901  GAGTCTTGGCAGCATTATGACCCCTTCATCTTGGACGTGTTCAAGAAAAT 950
951  GGGTGGCCCAAGCGTTCATGTGCGTCAATTGGCACGAGTTCATGAAATTG 1000
1001 TGAAGCTATACCGTCAAGCAGAACACTGTTTGCGAGAATTCAAATTAAAT 1050
1051 GACCCCTGGTATATCAAACCCAAAGAAAAAGACGGCAAAGGTTGGGGTGC 1100
1101 AACGGAAGCTGCAAGAGGTGCATTGTGTCACTGGGTAGATATTGAAGAAG 1150
1151 GGAAGATTAAACAATACCAAGTTATTGCCCCTGGTACTTGGAATATTGGC 1200
1201 CCCCGTGACGGTGCTGGTCAACGCGGCCCTGTTGAAGAAGCATTAATTGG 1250
1251 TACACCGATTGAAGACCCAACAGACCCGGTAGAAGTGGGTCATGTTGCCC 1300
1301 GTTCTTTCGACTCTTGCTTAGTGTGTACAGTCCACGCCCATGA        1343
```

รูปที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hupL* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* โดยเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 นำเซลล์มาสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอและใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีน *hupL* โคลนผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pGEM-T Easy และนำไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *Escherichia coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีพลาสมิดลูกผสมจากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG นำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบขนาดโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สรุปได้ว่า

1. ไพรเมอร์ Uhyd3 กับ Uhyd2 มีความจำเพาะต่อยีน *hupL* มาก เนื่องจากสามารถให้ผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่ทุกอุณหภูมิของการจับตัว (40 ถึง 55 องศาเซลเซียส) โดยขนาดที่ได้ประมาณ 1,300 คู่เบสซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้ 1,343 คู่เบส

2. จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้น่าจะเป็นยีน *hupL* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับการรายงานมาก่อนหน้า

3. สามารถนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้ในการตัดต่อยีนเพื่อสร้างสายพันธุ์กลายของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adams, M. W. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S. 1981. "Hydrogenase". Biochim. Biophys. Acta. 594 : 105-176.

Antarikanonda, P. 1982a. "Effect of salinity on growth, nitrogen fixation and sodium uptake of rapidly growing N_2-fixing blue-green alga *Anabaena* sp. TA1". Microbios. 34 : 177-184.

Antarikanonda, P. 1982b. "Influence of pretreating the seeds with extract of *Anabaena siamensis* on germination and growth of some rice varieties from Thailand". FAO Internl Commission 31 : 37-39.

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.

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., Hermann, B. and Olives, S. 2000. "Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR". Curr. Microbiol. 40 : 315-321.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lambert, G. R. and Smith, G. D. 1980. "Hydrogen metabolism by filamentous cyanobacteria." Archives of Biochemistry and Biophysics 205 : 36-50.

Lindberg, P., Hansel, A. and Lindblad, P. 2000. "*hupS* and *hupL* constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102". Arch. Microbiol. 174 :.129-133.

Lindblad, P. and Sellstedt, A. 1990. "Occurrence and localization of an uptake hydrogenase in the filamentous heterocystous cyanobacterium *Nostoc* PCC 73102". Protoplasma 159 : 9-15.

Masukawa, H., Mochimaru, M. and Sakurai, H. 2002. "Distruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120". Appl. Microbiol. Biotechnol. 58 : 618-624.

Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Lindblad, P. 1995. "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. 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 *hupSL* homologue". Arch. Microbiol. 169 : 267-274.

Peschek, G. A. 1979a. "Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H_2-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.

Rai, A. N., Borthakur, M., Söderbäck, E. and Bergman, B. 1992. "Immunogold localization of hydrogenase in the cyanobacterial-plant symbioses *Peltigera canina*, *Anthoceros punctatus* and *Gunnera magellanica*". Symbiosis 12 : 131-144.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rippka, R., Duruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". J. Gen. Microbiol. 111 : 1-61.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5463-5467.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. 2nd ed. Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

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.

Schulz, R. 1996. "Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria". J. Mar. Biotechnol. 4 : 16-22.

Smith, L. A., Hill, S. and Yates, M. G. 1976. "Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria". Nature 262 : 209-210.

Stephenson, M. and Stickland, L. H. 1931. Hydrogenase : A bacterial enzyme activating molecular hydrogen I. The properties of the enzyme. Biochem J. 25 :205-214.

Sze, P. 1986. A biology of the algae. WM. C. Brown Publishers. England.

Tamagnini, P., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. "Immunological characterization of hydrogenase in the nitrogen-fixing *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Curr. Microbiol. 31 : 102-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F. and Wünschiers, R. 2002. "Hydrogenase and hydrogen metabolism of cyanobacteria". Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 : 1-20.

Tel-Or, E., Luijk, L. W. and Packer, L. 1978. "Hydrogenase in N_2-fixing cyanobacteria". Archives of Biochemistry and Biophysics 185 : 185-194.

Troshina, O. Y., Larissa, T. S and Peter, L. 1996. "Induction of H_2-uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413: Effects of hydrogen and organic substrate". Current Microbiol. 33 : 11-15.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11</u>

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดตร ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2.6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบของอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ($MgSO_4.6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีดีทีเอ (Na_2.EDTA)	0.279	มิลลิโมลาร์
Trace metal mix 1,000 เท่า	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัมต่อ 100 มล.)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัมต่อ 100 มล.)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4$.citrate) (0.60 กรัมต่อ 100 มล.)	1	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB	
แบคโททริปโตน (Bacto-tryptone)	10 กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10 กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้