สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานโครงการวิจัย

งบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี ๒๕๔๘

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

Study on nucleotide sequences of nitrogenase genes in the cyanobacterium *Anabaena siamensis*

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
99.63
ส3ก95

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....64328
วัน,เดือน,ปี.....11 ก.ย. 2549

b.....11624962.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ในธรรมชาติ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ การตรึงไนโตรเจนถูกเร่งโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ (nittrogenase complex) เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการรีดักชันของไนโตรเจนในอากาศไปเป็นแอมโมเนีย และมีโลหะภายในโมเลกุล ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 เอนไซม์ไนโตรจีเนสรีดักเทส ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* ชนิดที่ 2 เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifDK* โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีน *nifDK* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifDK* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *nifD* และ *nifK* พบว่าปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาด 2,300 คู่เบส และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดลองได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 2,473 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับของกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่า NifD ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับ NifD ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7423, *Chlorogloeopsis fritschii*, *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Calothrix desertica* 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NifK ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับ NifK ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7120, *Anabaena variabilis* และ *Fischerella* sp. สายพันธุ์ UTEX 1931 95, 94 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

In nature, some species of cyanobacteria are capable of fixing atmospheric nitrogen. Nitrogen fixation is catalyzed by the enzyme nitrogenase complex. It catalyzes the reduction of atmospheric nitrogen to ammonia and is a metalloenzyme composed of two proteins: nitrogenase reductase encoded by *nifH* and dinitrogenase encoded by *nifDK*. This study aims to clone and characterize the *nifDK* genes from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. In this study, *nifDK* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the *nifD* and *nifK* conserved primers using genomic DNA of *A. siamensis* as a template. One PCR product band with the size of 2,300-bp was found and PCR product was ligated to plasmid pDrive and transformed into the competent cells *E. coli* DH5α. White transformants were selected on the kanamycin containing LB agar. Plasmid DNA was isolated and sequenced. Their amino acid sequences were compared to other amino acid sequences reported in GenBank. It was found that the 2,473-bp PCR product was sequenced. NifD of *A. siamensis* showed 94% similarity to the dinitrogenase molybdenum-iron NifD subunit of the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7423, *Chlorogloeopsis fritschii*, *Nostoc* sp. PCC 7120 and *Calothrix desertica* whereas NifK of *A. siamensis* showed 95%, 94%, 94% similarity to the dinitrogenase molybdenum-iron NifK subunit of the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis,* and *Fischerella* sp. UTEX 1931, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดีโดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2548 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณนางสาวชุติมา ภาพสิงห์ นักศึกษาปริญญาโทที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และช่วยในการทำโครงการวิจัยนี้

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญรูป	VI
สารบัญตาราง	VII
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 ปุ๋ยชีวภาพ	4
2.2 เอนไซม์ไนโตรจีเนส	5
2.3 ไซยาโนแบคทีเรีย	7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	15
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	15
3.2 สารเคมี	15
3.3 อุปกรณ์	17
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	18
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
4.1 ผลการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*	25
4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *nif*D	26
4.3 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *nif*K	26
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

4.5 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล 30

4.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pDrive และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 31

4.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง 31

4.8 การตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 31

4.9 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCP7.5 32

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 36

เอกสารอ้างอิง 37

ภาคผนวก ก 39

ภาคผนวก ข 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส	5
2.2 โครงสร้างของ *nif* regulon ใน *Klebsiella pneumoniae*	7
2.3 รูปร่างของ *Anabaena siamensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 3,500 เท่า	12
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล0.8 เปอร์เซ็นต์	25
4.2 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nif*D	27
4.3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nif*K	28
4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ที่อุณหภูมิของการจับตัวต่างๆ	29
4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป	30
4.6 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	32
4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCP7.5	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	20
4.1 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCP7.5 กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การพัฒนากระบวนการผลิตและการเพิ่มผลิตผลทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัย ปุ๋ยชีวภาพจัดเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการเพิ่มผลผลิตโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะทำให้ลดความต้องการในการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนที่เติมลงในดิน ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ (Richmond, 1986) ในทางการเกษตรมีการนำเอาไซยาโนแบคทีเรียมาใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยไซยาโนแบคทีเรียจะให้แหล่งอาหารไนโตรเจนแก่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เช่น ข้าว ซึ่งทำรายได้ให้แก่ประเทศปีละประมาณ 23,000 ล้านบาท เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติพิเศษในการเจริญเติบโตได้ดีในน้ำหรือที่ชื้นแฉะ มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศโดยเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปสารประกอบแอมโมเนียด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส แอมโมเนียที่ผลิตขึ้นนี้จะเป็นอาหารสำหรับพืชต่อไป และยังสร้างวิตามิน B12, ออกซิน และ กรดแอสคอบิก แล้วปลดปล่อยลงสู่ดินส่งผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าว นอกจากนี้ เมื่อไซยาโนแบคทีเรียตายลงยังเป็นแหล่งแร่ธาตุให้แก่ดิน ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำนาได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น

ในช่วงกว่า 10 ปีที่ผ่านมาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้ผลิตปุ๋ยชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียโดยตั้งชื่อว่า "อัลจินัว" ซึ่งประกอบด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนทั้งสิ้น ได้แก่ *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Hapalosiphon* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp. และ *Tolypothrix* sp. ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นเซลล์ประเภทโปรคาริโอต ไม่มีแฟลกเจลลา มีการเคลื่อนไหวแบบรอบแกนหมุน (gliding) มีรงควัตถุที่สำคัญ เช่น คลอโรฟิลล์ เบต้าแคโรทีน ไฟโคไซยานิน และไฟโคอิริทริน ฯลฯ เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างลักษณะที่ต่างกันได้หลายรูปแบบ เช่น เซลล์เดียวกลมรี หลายเซลล์ต่อกันเป็นเส้นสาย เป็นต้น ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นสายต่อกัน เรียกว่า filament โดยในแต่ละเส้นสายจะประกอบด้วยเซลล์ปกติ (vegetative cell) เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และอะคินีต (akinete) เฮเทอโรซิสต์จะเป็นเซลล์ที่เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนขึ้นภายใน โดยในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศนั้น ไนโตรเจนจากอากาศจะถูกรีดิวซ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พร้อมกับปฏิกิริยาควบคู่ของการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นไฮโดรเจน ทำให้ในปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ดังสมการ

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ \xrightarrow[\text{nitrogenase}]{} 2NH_3 + H_2$$

เอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ (nitrogenase complex) ทำหน้าเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เอนไซม์ไนโตรจีเนสรีดักเทส (nitrogenase reductase) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) และส่วนที่ 2 เอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ประกอบด้วยโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและธาตุโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ ได้มีรายงานวิจัยศึกษากลไกการตรึงไนโตรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ อย่างกว้างขวาง (Bone, 1971; Smith and Evans, 1971; Weare and Benemann, 1973; Gaur and Singh, 1990) Mevarech และคณะ (1980) และ Mazur และ Chui (1982) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 Anterikanonda (1986) ได้ศึกษาชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่พบในดินนารอบๆ กรุงเทพมหานคร พบว่าสามารถจำแนกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง 5 สายพันธุ์ คือ *Anabaena*, *Nostoc*, *Gloeotrichia*, *Calothrix* และ *Fisherella* จากการเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในนาข้าวพบว่า *Anabaena siamensis* เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด มีอัตราการแบ่งเซลล์ 3 ถึง 4 ชั่วโมงต่อครั้ง และมีอัตราการตรึงไนโตรเจน 10 กรัมไนโตรเจนต่อกรัม (โปรตีนสาหร่าย) ต่อวัน

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูงสำหรับการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ และสามารถนำไปใช้เพิ่มผลผลิตข้าวหรือผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แทนการใช้ปุ๋ยเคมี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ในสูตรอาหาร BG11 เก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับศึกษายีนไดไนโตรจีเนสไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไดไนโตรจีเนสที่มีขนาดตามที่ต้องการมาโคลนลงในพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany) และทำการทรานฟอร์มเข้าสู่เซลล์ผู้ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG ที่สามารถเจริญบนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนที่ใส่เข้าไปโดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีในนาข้าวประเทศไทย และตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูง และเพื่อนำไปใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่ และให้ผู้สนใจนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้อ้างอิงต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางเริ่มต้นในการพัฒนาสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้ตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูงอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปุ๋ยชีวภาพ

ปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer) หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่บรรจุด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตหรือส่วนของเซลล์ที่ยังมีชีวิต สามารถก่อให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงหรือสร้างสารประกอบของธาตุอาหารพืชหรืออยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ปุ๋ยชีวภาพประกอบด้วยกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixing microorganism) กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ให้ธาตุฟอสฟอรัสซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืช (phosphate solubilizing microorganism) และกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสของพืช (cellulolytic microorganism)

กระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation) เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายในจุลินทรีย์บางชนิด เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศรวมกับไฮโดรเจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบแอมโมเนีย ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้น ปุ๋ยชีวภาพจึงมีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับปุ๋ยไนโตรเจนที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนสามารถจัดจำแนกตามชนิดของจุลินทรีย์ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิสต์ ถ้านำมาจัดจำแนกโดยใช้ความสัมพันธ์กับพืชจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพาอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotic nitrogen fixing microorganism) และ กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free living nitrogen fixing microorganism) พวกที่อาศัยร่วมกับพืชมีทั้งแบคทีเรียได้แก่ ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว ไซยาโนแบคทีเรียกับแหนแดงและปรง แอคติโนมัยซิสต์กับไม้ยืนต้นบางชนิด เช่น สนประดิพัทธ์ และสนทะเล

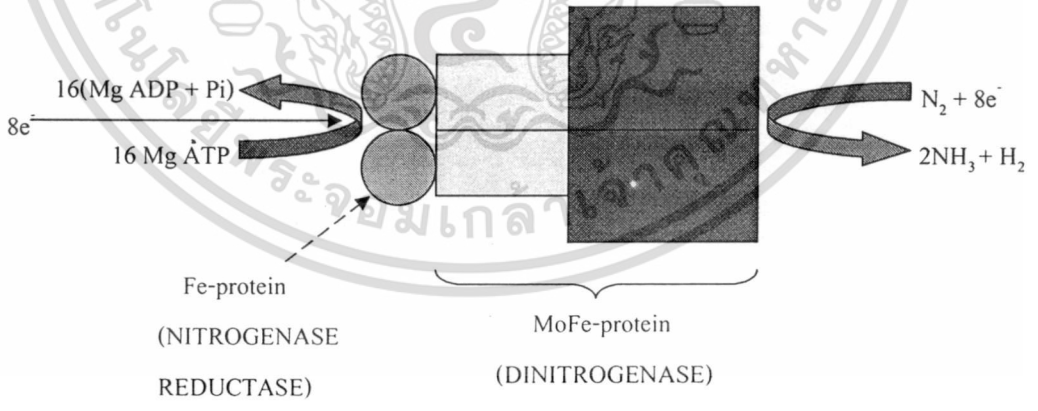
จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้เพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ ในนาข้าว เกษตรกรมักนิยมนำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากในนาข้าวมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น สภาพของแสง น้ำ อุณหภูมิ และธาตุอาหารที่เหมาะสม ทำให้พบไซยาโนแบคทีเรียตามธรรมชาติในนาข้าวมากกว่าในดินที่ทำการปลูกพืชชนิดอื่น และเมื่อเริ่มทำการปลูกข้าว สภาพดินที่เริ่มมีพีเอชต่ำ ความเข้มแสงสูง และระดับของคาร์บอนไดออกไซด์สูง จะเหมาะสมกับการเจริญของสาหร่ายสีเขียวมากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย แต่เมื่อข้าวเจริญเติบโตขึ้น ความเข้มแสงที่ส่องลงมาในน้ำลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และดินมีค่าพีเอชสูงขึ้น จะพบว่าไซยาโนแบคทีเรียจะกลายเป็นตัวเด่นขึ้นมาแทน (Venkataraman, 1986) ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพจึงมีศักยภาพสูงในการเพิ่มไนโตรเจนให้แก่นาข้าว

2.2 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ไนโตรเจนจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นสารประกอบแอมโมเนียและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ กระบวนการรีดักชันจะถูกเร่งโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ส่วน (รูปที่ 2.1) ส่วนที่ 1 คือเอนไซม์ไนโตรจีเนสรีดักเทส (nitrogenase reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย มีขนาดประมาณ 32-40 กิโลดาลตัน (Howard and Rees, 2000) โปรตีนนี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* (nif มาจาก nitrogen fixation) ส่วนที่ 2 คือเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* เอนไซม์นี้ประกอบด้วยธาตุเหล็กและโมลิบดินัม (MoFe-protein) ดังนั้น จึงอาจเรียกชื่อเอนไซม์ชนิดนี้ว่าโมลิบดินัมไนโตรจีเนส เอนไซม์นี้ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีขนาดประมาณ 250 กิโลดาลตัน (Howard and Rees, 2000) เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสส่วนแรกประกอบด้วยสองหน่วยย่อยที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนและสลาย ATP เพื่อผลักดันอิเล็กตรอนให้แก่ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 2 ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งจะทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนีย ในเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสจะมีโค-แฟกเตอร์ FeMo-co โดยการรีดิวซ์ไนโตรเจนจะเกิดขึ้นภายในศูนย์กลางของ Fe-Mo ซึ่ง Fe-Mo มีโครงสร้างเป็น $MoFe_7S_9$ และ FeMo-co จะมีสองชุดต่อ1 โมเลกุลของเอนไซม์ไนโตรจีเนส



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส
ที่มา : มนตรี (2542)

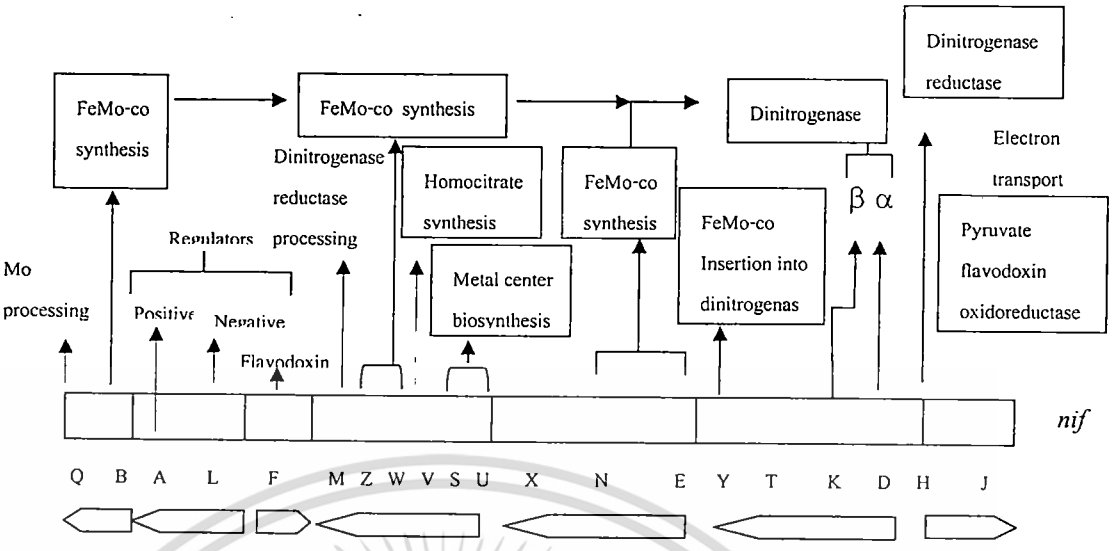
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนบางสายพันธุ์มีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ไม่มีโมลิบดินัมเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์นี้ถูกเรียกว่า Alternative nitrogenase ซึ่งมีวาเนเดียมและเหล็กและมีโคแฟกเตอร์ที่คล้ายกับ FeMo-co เอนไซม์ไนโตรจีเนสชนิดนี้อาจมีเพียงเหล็กอยู่ในองค์ประกอบเท่านั้น โดยจะไม่มีโมลิบดินัม และวาเนเดียมเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ Alternative nitrogenase จะไม่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อมีโมลิบดินัมที่เพียงพอ แต่จะช่วยส่งเสริมกลไกการตรึงไนโตรเจนอย่างต่อเนื่องเมื่อมีโมลิบดินัมที่จำกัด

ใน *Klebsiella pneumoniae* ยีนไนโตรจีเนสรีดักเทสและยีนไดไนโตรจีเนสจะอยู่รวมกันเป็น complex regulon เรียก *nif regulon* (รูปที่ 2.2) *nif* regulon ของ *Klebsiella pneumoniae* มีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน 20 ชนิด จัดเรียงตัวใน Transciptional unit ต่างๆ โดย FeMo-co จะเป็นยีนที่ควบคุมการขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งจะเกิดขึ้นใน *nif* regulon และ FeMo-co จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจะผ่านยีนหลายๆ ยีนซึ่งจะประกอบด้วย *nifN, nifV, nifZ, nifW, nifE* และ *nifB* รวมถึง *nifQ* ซึ่งจะควบคุมเฉพาะโมลิบดินัมเท่านั้น *nifA* เป็นโปรตีนที่ควบคุมทางด้านเชิงบวกที่ช่วยกระตุ้นการถอดรหัสของยีน *nif* อื่นๆ เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีการควบคุมการแสดงออกอย่างเข้มงวด การตรึงไนโตรเจนจะถูกจำกัดโดยออกซิเจนและไนโตรเจนที่ถูกตรึงรวมถึงแอมโมเนียและกรดอะมิโน ในขณะที่มีการถอดรหัสของยีน *nif* โครงสร้างยีนจะถูกกระตุ้นโดยโปรตีน NifA การกระตุ้นนี้จะถูกจำกัดโดยโปรตีน NifL

แอมโมเนียที่ถูกผลิตโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะไม่กดดันเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น แต่ถ้าแอมโมเนียมีมากเกินไป (ในสภาวะแวดล้อมที่มีแอมโมเนียสูง) จะกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการสูญเสียพลังงาน ATP โดยไม่สร้างผลิตภัณฑ์ขึ้นเมื่อมีไนโตรเจนที่เพียงพอ ในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกควบคุมโดยแอมโมเนีย เรียกแอมโมเนียนี้ว่า "ตัวปิด" (switch–off) แอมโมเนียที่มีมากเกินไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะโควาเลนต์ของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส เมื่อมีแอมโมเนียที่จำกัดโปรตีนนี้จะกลับมาทำงานอีกครั้ง แอมโมเนีย ตัวปิด (switch–off) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและผันกลับได้โดยเอนไซม์ไนไตรจีเนส (Madigan et al., 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ *nif* regulon ใน *Klebsiella pneumoniae*
ที่มา : Madigan et al. (1997)

2.3 ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta คลาส Cyanophyceae สาหร่ายในดิวิชันนี้จัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรีย คือ ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน จึงสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนสีเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบไซยาโนแบคทีเรียเจริญร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้

ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรียมีดังนี้ (ลัดดา, 2542)

2.3.1 สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย

2.3.1.1 คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ

2.3.1.2 แคโรทีนอยด์ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) ลูเทอีน (lutein) ฟลาวิซิน (flavicin) อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และอะฟานิซิน (aphanicin)

2.3.1.3 ไฟโคบิลิน ในไซยาโนแบคทีเรียมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ซีไฟโคไซยานิน (c-phycocyanin) ซีอัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) ไฟโคอิริโทรไซยานิน (phycoerythro cyanin) และซีไฟโคอิรีทริน (c-phycoerythrin)

2.3.2 ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) ค่อนข้างหนาและฉีกขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยสารประเภทเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีผนังเซลล์เหมือนแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเมมเบรนชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีรงควัตถุเรียกว่า โปรโตพลาสซึม (protoplasm) และส่วนที่มีสารพันธุกรรมเรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) ซึ่งอยู่ใจกลางของเซลล์ (กาญจนภาชน์, 2527)

2.3.3 แฟลกเจลลา (flagella) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะต้องเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gilding movement)

2.3.4 ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) เป็นสารจำพวกแป้ง ชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเรียกว่าไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งแป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่น คือเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง

2.3.5 ลักษณะพิเศษประจำดิวิชันไซยาโนไฟตา คือเป็นพืชชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง รูปร่างของสาหร่ายที่พบมีอยู่หลายรูปแบบ อาจเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) หรือหลายเซลล์ก็ได้ บางครั้งอาจอยู่แบบเป็นกลุ่ม (colonial form) อยู่รวมกันแบบเส้นสาย (filamentous form) ที่อาจมีการแตกแขนงแท้ เทียม หรือไม่แตกแขนงก็ได้

2.3.6 การสืบพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียใช้วิธีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือการแบ่งเซลล์โดยการเพิ่มจำนวนทวีคูณ พวกเซลล์เดี่ยวที่มีชีทหุ้มเมื่อมีการแบ่งเซลล์หลายครั้ง จะพบกลุ่มเซลล์อยู่รวมกันภายในชีทอันเดียวกัน หลังจากนั้นจึงหลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่เซลล์ที่อยู่กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกลุ่ม (colony) เมื่อแบ่งเซลล์ทำให้กลุ่มเซลล์ขยายใหญ่ ต่อมาจึงหลุดเป็นเซลล์ย่อย ในกลุ่มที่เป็นเส้นสาย (filament) การแบ่งเซลล์ทำให้ยืดยาวออกไป เมื่อถูกกระทบกระเทือนเกิดการขาดท่อน แต่ละท่อนสามารถเจริญเป็นเซลล์ใหม่ได้ ในพวกที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ การขาดท่อนจะเกิดที่รอยต่อระหว่างเฮเทอโรซิสต์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน แต่ในพวกที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ อาจมีเซลล์ตายหรือ separation disc เกิดขึ้นในสายซึ่งเป็นจุดอ่อนในการขาดท่อน ถ้าเซลล์มีชีทหนาและเหนียวหุ้มอยู่ เมื่อเซลล์ตายมากๆ เกิดกลุ่มเซลล์ท่อนสั้นๆ ที่เรียกว่า ฮอร์โมโกน (hormogone) หรือฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) ภายในชีทมากมาย และฮอร์โมโกเนียเหล่านี้จะถูกผลักดันให้หลุดจากชีท และสามารถงอกเป็นเส้นสายใหม่ได้ อีกวิธีหนึ่งคือการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเกิดจากการแบ่งโปรโตพลาสซึมออกเป็น 2 ส่วนหรือหลายๆ ส่วน แต่ละส่วนหลุดออกไปสร้างเป็นต้นใหม่ได้ และเอกโซสปอร์ (exospore) ซึ่งเป็นสปอร์เกิดจากการตัดแบ่งส่วนปลายของเซลล์ออกมา พบน้อยมาก

2.3.7 ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด

2.3.7.1 เซลล์ปกติ (vegetative cell) คือเซลล์ทั่วไปประกอบด้วยผนังเซลล์ ภายในเป็นที่อยู่ของโปรโตพลาสซึม และนิวเคลียสที่ไม่มีผนังหุ้ม มีรงควัตถุต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์แสงและสร้างอาหาร บางชนิดก็มีการสะสมอาหาร

2.3.7.2 เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) เป็นเซลล์พิเศษที่พบในไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบางชนิดเท่านั้น เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์ปกติ โดยผนังเซลล์จะหนา และภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ เนื่องจากขาดรงควัตถุสังเคราะห์แสงเหลือเฉพาะแต่พวกคาโรทีน การเกิดเฮเทอโรซิสต์เกิดขึ้นโดยเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง ในสายจะสะสมอาหารไว้มากทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์เดิมซึ่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมจะเปลี่ยนเป็นกลมขึ้น หลังจากนั้น ไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้ซีดลง และมีกรานูล (granule) เล็กๆ มาปิดรูไว้เรียกโพลาร์นอตซ์ (polar notch) หรือโพลาร์โนดูล (polar nodule) และข้อแตกต่างระหว่างเซลล์ปกติกับเฮเทอโรซิสต์คือมีผนังเซลล์หนา 3 ชั้น คือ inner laminate layer central homogenous layer และ outer fibrous layer โดย inner laminate layer เป็นชั้นที่มีการสะสมของไกลโคไลปิด (glycolipid) ซึ่งกั้นไม่ให้ออกซิเจนผ่านเข้าไป

ตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์เกิดได้ 2 แห่ง คือ อินเทอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (intercalary heterocyst) ที่เกิดระหว่างเซลล์ภายในเส้นสาย เช่น *Nostoc* และเทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (terminal heterocyst) เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้างมี 3 ชนิด คือ เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (basal hetercyst) พบในเส้นสายของเซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ส่วนมากมักเกิดตรงโคนติดกับเซลล์ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด เช่น *Calothrix* เพดิเซลเลตเฮเทอโรซิสต์ (pedicellate heterocyst) เกิดที่ปลายของแขนงสั้นๆ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 1-3 เซลล์ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nostochopsis และแลทเทอรัลเฮเทอโรซิสต์ (lateral hetercyst) เกิดข้างๆ เส้นสาย โดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสายนั้นๆ ดังนั้นจึงพบว่าในพวกอินเทอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์จะมีโพลาร์นอดซ์ 2 อันอยู่ตรงกันข้าม ส่วนในพวกเทอร์มินอลเฮเทอโรซิสต์นั้นจะมีเพียงอันเดียวอยู่ติดกับเซลล์ข้างเคียง นอกจากนี้ ยังพบว่าโดยปกติแล้วเฮเทอโรซิสต์มักเกิดเดี่ยวๆ ในแต่ละจุด แต่ในบางชนิดก็เกิดติดกันเป็นคู่ และในแต่ละสายอาจมีเฮเทอโรซิสต์เกิดเพียง 1 หรือมากกว่าก็ได้

เฮเทอโรซิสต์เป็นจุดอ่อนที่ทำให้เกิดการขาดท่อน แต่ละท่อนที่ขาดออกมานี้เรียก ฮอร์โมโกเนีย (hormogonia) ซึ่งอาจเป็นสายยาวหรือสายสั้นๆ ประกอบด้วยเซลล์เพียง 2-3 เซลล์ แต่ละท่อนสามารถเจริญเติบโตและให้เส้นสายที่ยาวต่อไปได้ เซลล์เฮเทอโรซิสต์อาจหลุดออกจากสายเซลล์ และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นานกว่าเซลล์ปกติ และจะคงอยู่ในสภาพแวดล้อมจนกว่าสภาพแวดล้อมจะเหมาะสม ก็จะงอกเป็นสายเซลล์ใหม่ได้ นอกจากนี้ เฮเทอโรซิสต์อาจแบ่งตัวเป็นสปอร์ขนาดเล็กเรียกว่า เอนโดสปอร์และงอกเป็นเส้นเซลล์ใหม่ได้หลายสาย นอกจากนี้ เฮเทอโรซิสต์ยังมีหน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ช่วยในการสร้างสปอร์ ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าเซลล์ที่สร้างสปอร์หรืออะคีนีต (akinete) มักอยู่ติดกับเฮเทอโรซิสต์ และได้รับการถ่ายทอดอาหารจากเฮเทอโรซิสต์

รูปร่างของเฮเทอโรซิสต์ที่พบมีหลายลักษณะได้แก่

- กลม (spherical)
- ค่อนข้างกลม (subspherical) ความกว้างและความยาวของเซลล์แตกต่างกันเล็กน้อย
- ครึ่งวงกลม (hemispherical) ด้านที่เรียบจะติดอยู่กับเซลล์เสมอ
- กลมถูกบีบ (compress spherical) มีรอยถูกบีบทั้ง 2 ด้าน
- ทรงกระบอก (cylindrical) มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านตรงข้ามขนานกันตรงมุมทั้ง 4 ด้านอาจจะเป็นมุมฉากหรือกลมมนเล็กน้อย
- สี่เหลี่ยมจัตุรัส (quadrate) ความกว้างและความยาวทั้ง 4 มีขนาดเท่ากัน
- รูปไข่ (oval) รูปร่างกลมรี มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านสองด้านที่เป็นบริเวณที่อยู่ของโพลาโนดูล (polar nodule) จะแคบ
- กระสวย (ellipsoidal) มีลักษณะใกล้เคียงกับแบบรูปไข่แต่จะยาวกว่า หัวท้ายจะแหลมกว่าเล็กน้อย
- กรวยแหลม (conical) ด้านที่อยู่ติดกับเซลล์จะเรียบ หันด้านปลายแหลมออก มุมสองด้านที่อยู่ติดกับเซลล์อาจจะมนเล็กน้อย มุมที่อยู่ส่วนปลายอาจกลมมนหรือแหลม โดยทั่วไปพบว่าความยาวของเซลล์จะยาวกว่าความกว้าง

2.3.7.3 อะคีนีต (akinete) เป็นเซลล์พิเศษที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ปกติ เพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ และมักจะพบในสาหร่ายที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ในบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจอยู่ติดกับเฮเทอโรซิสต์ เป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนามาก มีขนาดใหญ่ รูปร่างตำแหน่งที่เกิดขึ้นสามารถใช้จำแนกชนิดของสาหร่ายชนิดนี้ได้ บางครั้งอาจเกิดเดี่ยว คู่หรือติดกันเป็นสายยาว อะคีนีตสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีมาก จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ในขณะที่มีการสร้างอะคีนีตนั้น ไทลาคอยด์จะขดตัวและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 2 หรือ 3 ปริมาณของไกลโคเจนแกรนูลจะลดลง ส่วนไซยาโนไฟซินแกรนูลจะเพิ่มขึ้น

ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนมีประมาณ 32 สกุล 152 ชนิด แบ่งออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (Venkataraman, 1986)

1. กลุ่มที่มีเฮเทอโรซิสต์ สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Nostoc, Anabaena, Oscillatoria, Cylindrospermen, Mastigocladus, Tolypothrix*

2. ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวหรือไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่อยู่รวมกันเป็นโคโลนีที่สามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Gloecopsa*

3. ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนในสภาพที่มีไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น *Oscillatoria, Phormidium*

4. ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ แต่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้ในสภาพที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Trichodesmium*

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เนื่องจากเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย และมีรายงานพบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้สูง

ตามหลักอนุกรมวิธานจัดจำแนก *Anabaena siamensis* อยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

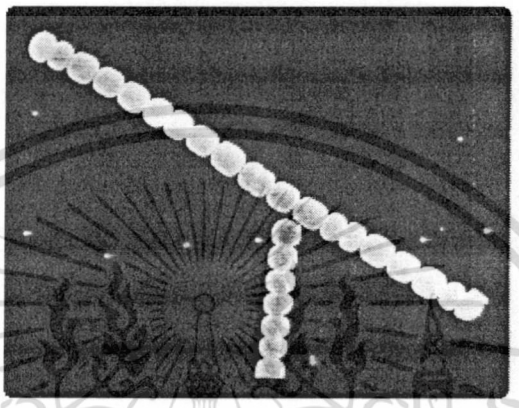
Family Nostocaceae

Genus Anabaena

Specie *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของ *Anabaena siamensis* มีรูปร่างเป็นแบบถังเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยมจตุรัส ทรงกระบอกขนาดสม่ำเสมอ เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่าเฮเทอโรซิสต์ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ตำแหน่งของการเกิดเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณตอนปลายด้านหัวท้ายของเซลล์ (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 รูปร่างของ *Anabaena siamensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 3,500 เท่า

ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย และแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท จากนั้นพืชจะดูดซึมไนไตรท์ ไนเตรท และแอมโมเนียมเข้ามาเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอื่นๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเต็มที่และตายไปจะให้อินทรียวัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำนาได้ผลดี

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mevarech และคณะ (1980) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ในเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสของเชื้อแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* พบว่า ทั้งสามสายพันธุ์มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนซิสเทอีนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรงกัน 5 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ทางด้านปลายอะมิโนอิสระของสายเปปไทด์ และลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณซิสเทอีนทั้ง 5 ตำแหน่งจะเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง

Kallas และคณะ (1983) ศึกษายีน *nif* ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ตรึงไนโตรเจน *Gloeothece* sp. PCC 6909 และไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย *Calothrix* sp. PCC 7601 ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมได้จากยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ายีน *nif* ของ *Gloeothece* sp. PCC 6909 มีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มและคล้ายคลึงกับยีน *nif* ของแบคทีเรียในกลุ่มไดอะโซโทรพ (diazotroph) เช่น *A. vinelandii* ส่วนยีน *nif* ของ *Calothrix* sp. PCC 7601 จะมีการจัดเรียงตัวคล้ายคลึงกับการจัดเรียงตัวใน *Anabuena* sp. PCC 7120

Chen และคณะ (1996) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ที่มีขนาด 5 กิโลเบสของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. R-1 พบว่า *Synechococcus* sp. R-1 มีลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 76.7, 77.3 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสด้วยวิธี Primer extension ทำให้ทราบว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสจะอยู่หน้าจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของยีน *nifH* 247 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาด 405 คู่เบสที่อยู่หน้าบริเวณจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสของยีน *nifH* มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120

Dominic และคณะ (1998) ศึกษายีน *nifUHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Trichodesmium* sp. IMS101 พบว่า *Trichodesmium* sp. IMS101 มีลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 79, 66 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาการถอดรหัสพบว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสจะอยู่หน้าจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของยีน *nifH* 212 คู่เบส สำหรับการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค Northern hybridization ใน *Trichodesmium* sp. IMS101 จะพบการถอดรหัสของยีน *nifH*, *nifHD* และ *nifHDK* นอกจากนี้ ไนเตรทที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และออกซิเจนที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่กดดันการถอดรหัสของยีน *nifHDK* ซึ่งจะตรงกันข้ามกับแอมโมเนียและยูเรียที่ยับยั้งการถอดรหัสของยีน *nifHDK*

Huang และคณะ (1999) ศึกษาการจัดระเบียบ และการแสดงออกของยีนในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* sp. RF-1 ด้วยเทคนิค Northern hybridization และ Primer extension พบว่ายีน *nif* และยีนที่เกี่ยวข้องมีการจัดเรียงเป็นกลุ่มที่ติดต่อกัน มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 18 กิโลเบส และมี 7 โอเปอรอน โดยมี 2 โอเปอรอนตั้งอยู่หน้าจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของโอเปอรอนยีน *nifH* (*nifH-nifD-nifK*) ซึ่งมีการเรียงลำดับดังนี้ *nifP,nifB-fdxN-nifS -nifU* และ 4 โอเปอรอนที่ตั้งอยู่ถัดจากจุดสิ้นสุดการแปลรหัสของยีน *nifK* มีการจัดเรียงตัวดังนี้ *nifE-nifN,-nifX-orf,-nifW-hesA-hesB,-'fdx'* ซึ่งมีขนาดประมาณ 7 กิโลเบส สำหรับหน้าที่ของ ORF ที่แทรกอยู่ระหว่าง *nifX* และ *nifW* ยังไม่ทราบแน่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 จากสถาบันวิจัยวิทยาสาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (*supE*44 Δ *lacU*169 (ϕ 80 *lacZ* ΔM15) *hsdR* 17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)

3.3.2.2 เม็ดแก้ว (Glass bead)

3.3.2.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (SLS) 10 เปอร์เซ็นต์

3.3.2.5 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE saturated phenol)

3.3.2.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)
(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)

3.3.2.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอร์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)

3.3.2.8 ไลโซไซม์ (Lysozyme)

3.3.2.9 โซเดียมอะซีเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.10 เอทานอล (Ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.3.2.11 เอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.3.1 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Promega, USA)

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

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

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

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

3.2.3.7 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ซูโครสหรือกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโมฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, Tris-boric-EDTA 1 เท่า)

3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.4.1 แลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) (Promega, USA)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์

3.2.5.1 เอนไซม์ T4 ดีเอ็นเอไลเกส (Invitrogen, USA)

3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดลูกผสม

3.2.6.1 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside)

3.2.6.2 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) (Promega, USA)

3.2.6.3 ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.7.1 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany)

3.2.7.2 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวคเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) (Hermle Z383K, Germany)

3.3.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.4 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gellenkamp T490188, UK)

3.3.5 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion Binder, Thailand)

3.3.6 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.7 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock) (Biosan TDB-120, Thailand)

3.3.8 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) (Data Laboratory 1375FX, thailand)

3.3.9 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance)(Scientific Promotion Sartorios BP2215, Thailand)

3.3.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Cyberscan 2000, Singapore)

3.3.11 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer sanyo, Japan)

3.3.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) (Shimadzu UV-1601, Japan)

3.3.13 คิวเวต (Semimicro rectangular 10 mm) (Hellma, USA)

3.3.14 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer DNA thermal cycler 480, USA)

3.3.15 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Power supply) (EC570-90 E-C Apparatus Corparation)

3.3.16 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech GNA 100, Sweden)

3.3.17 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene MD1 1019, Japan)

3.3.18 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.19 เครื่องแก้ว (Glasswares)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

64328

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

3.4.1.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka *et al*., 1979) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน

3.4.1.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli*

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนีในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินนั้น จะเติมกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.4.2 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ โดยนำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเม็ดแก้วประมาณ 100-200ไมโครลิตร โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซีน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่สกัดด้วยฟีนอล- คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งและละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

นำจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.2 มาวิเคราะห์ปริมาณบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติม Gel star ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วจึงเทลงในถาดที่มีแผ่นรองเจลและหวีเสียบอยู่ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที ดึงหวีออก นำแผ่นรองเจลมาวางใน chamber ที่มีบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า จากนั้น นำจีโนมิคดีเอ็นเอมาผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ แล้วหยอดลงในช่องเจล (well) และใช้ฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.4.4 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสที่ถอดรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรียที่รายงานไว้ในธนาคารยีน (GenBank) มาทำการเปรียบเทียบ (multiple aligment) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylidrica* สายพันธุ์ PCC 7122 และของยีน *nifK* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp., *Anabaena variabilis* จากนั้นทำการเลือกบริเวณที่คาดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์มาใช้สร้างไพรเมอร์ คำนวณค่า Tm (melting temperature) และความเป็นไปได้ในการเข้าจับกันของไพรเมอร์ จากนั้นนำไพรเมอร์ทั้งสองไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifD* และ *nifK* ของ *A. siamensis* โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 25 มิลลิโมลาร์	3	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1(upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1(downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมิคดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งในโปรแกรมที่ใช้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ(°C)และเวลา	
1	denaturation	94	5 นาที
2	denaturation	94	30 วินาที
	annealing (30 รอบ)	40-55	1 นาที
	extension	72	2 นาที
3	final extension	72	10 นาที

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟ เรซิส ตามข้อ 3.4.3 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตร-โฟเรซิส แล้วทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าเจลละลายหมด ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.3 เก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.7 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่เวคเตอร์ (Ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.4.6 มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข) โดยใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เท่ากับ 10 : 1 ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคำนวณได้จากสูตร

$$\frac{\text{นาโนกรัมของเวคเตอร์} \times \text{ขนาดของดีเอ็นเอ (กิโลเบส)}}{\text{ขนาดของเวคเตอร์ (กิโลเบส)}} \times \frac{10}{1}$$

ปฏิกิริยาการเชื่อม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต pDrive 50 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์ PCR และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8 การเตรียม competent cell สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน

ปิเปตเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.1.2 ในอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1 : 250 (0.4 มิลลิลิตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ประมาณ 3-4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2-0.4 จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วย RF1 1/3 ของปริมาตร SOB ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วย RF1 1/25 ของปริมาตร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสหรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

3.4.9 การทรานสฟอร์มเมชัน

ปิเปต competent cell 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย ligation (หัวข้อ 3.4.7) ผสมให้เข้ากัน วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลิตร และ IPTG 0.5 มิลลิโมลาร์ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.4.10 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pDrive ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิด pDrive หลังจากที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.11 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)

นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.4.10 มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตรที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที กระจายเซลล์ด้วยสารละลาย Solution I ที่ประกอบด้วยซูโครส 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.0 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา ตั้งหลอดทิ้งไว้บนน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Solution III ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ 60 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ที่อุณหภูมิห้องที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายในบัฟเฟอร์ TE 1เท่า (Tris-EDTA) พีเอช 8.0 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.12 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.11 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 15 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าบนเจลปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดสูงกว่าขนาด 23.1 กิโลเบส และมีความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.1)

รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

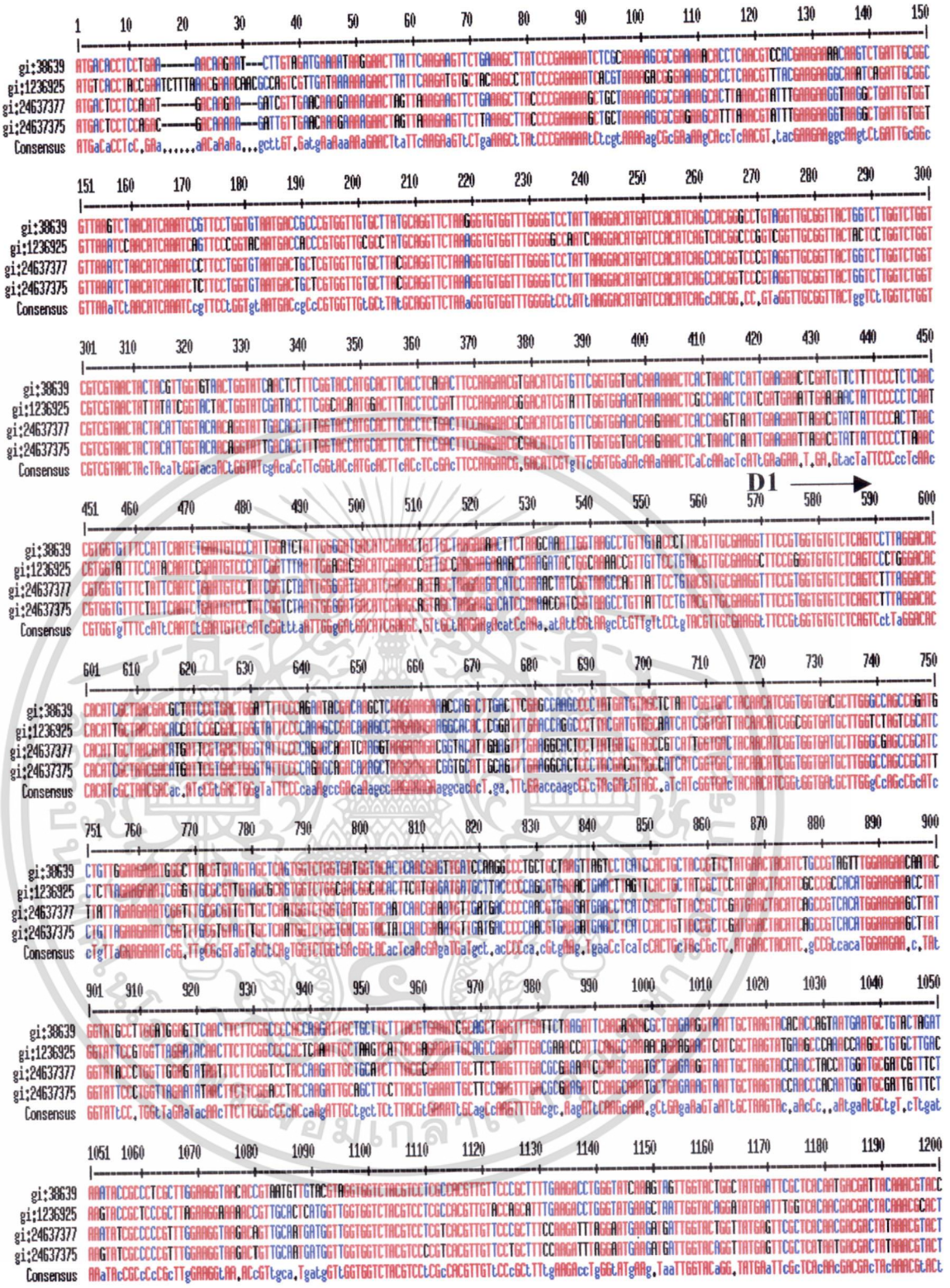
4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *nifD*

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสใน *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica* PCC 7122 และ *Anabaena* sp. PCC 7180 มาทำการเปรียบเทียบ และคัดเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 1 บริเวณ (ลูกศรในรูปที่ 4.2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 5′ ไปยัง 3′ อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 574 ถึง 590 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5′-CG(T/G)GGTGTGTCTCAGTC-3′ ให้ชื่อไพรเมอร์ของยีน *nifD* เป็น D1

4.3 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *nifK*

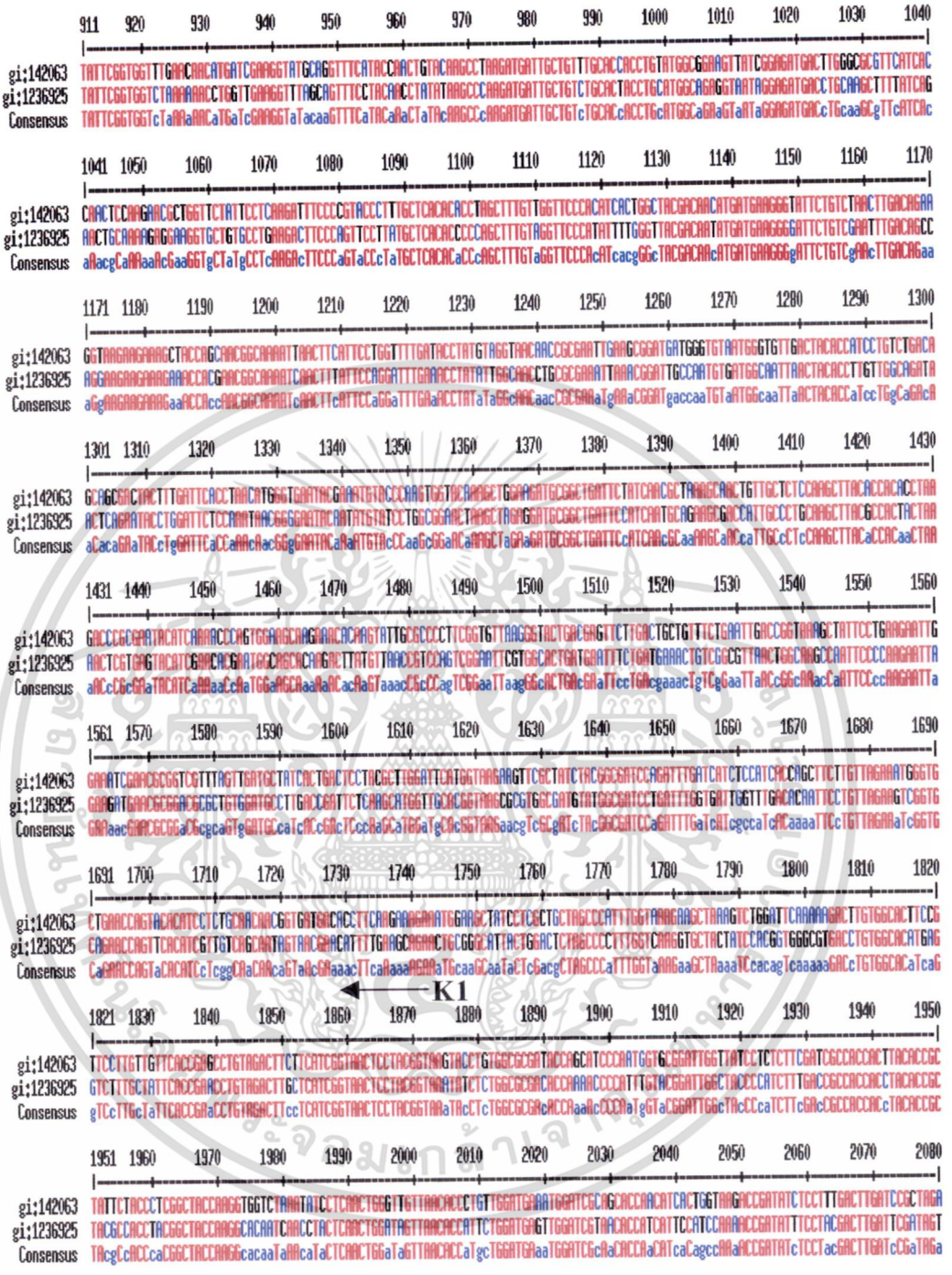
นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสใน *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena variabilis* มาทำการเปรียบเทียบ และคัดเลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 1 บริเวณ (ลูกศรในรูปที่ 4.3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 5′ ไปยัง 3′ อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 1,858 ถึง 1,874 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5′-GGTAACTCCTACGGTAA-3′ ให้ชื่อไพรเมอร์ของยีน *nifK* เป็น K1 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 เป็น 2,308 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica* PCC 7122 และ *Anabaena* sp. PCC 7180 อักษรสีแดงแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน อักษรสีน้ำเงินแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน และอักษรสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

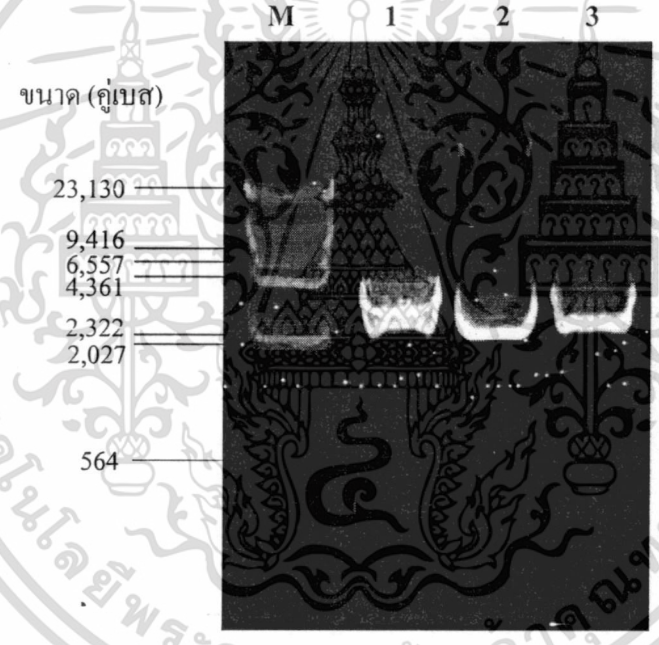


รูปที่ 4.3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena variabilis* อักษรสีแดงแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน อักษรสีน้ำเงินแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน และอักษรสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* มาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ D1 และ K1 โดยเลือกโปรแกรมที่กำหนดไว้และปรับเปลี่ยนเฉพาะอุณหภูมิของการจับตัว (annealing) เป็น 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เพียง 1 แถบ ที่ทุกอุณหภูมิของการจับตัวที่ทำการทดลอง โดยมีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.4) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการ คือ 2,308 คู่เบส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ที่ได้ทำการออกแบบสามารถจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอ *Anabaena siamensis* ได้ และมีความจำเพาะสูงโดยให้ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใกล้เคียงกับขนาดที่ต้องการ จากนั้น จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไดไนโตรจีเนสมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ที่อุณหภูมิของการจับตัวต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 45°C

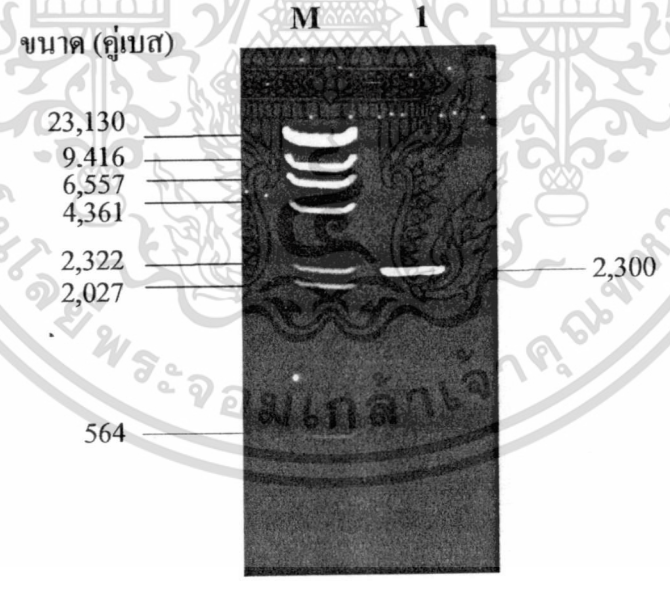
2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 55°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลเป็นวิธีการกำจัดสารเคมีที่ปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีความบริสุทธิ์และปราศจากสารเคมีที่จะรบกวนปฏิกิริยาต่อไป การทำให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพร์เมอร์คู่ D1 และ K1 ที่มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส จากข้อ 4.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) จากนั้น นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร และเปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 จำนวน 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.5 เลน1) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR มีปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pDrive และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมกับเวคเตอร์ pDrive โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์ เท่ากับ 10 : 1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีสีขาวเนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้โคโลนีผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง

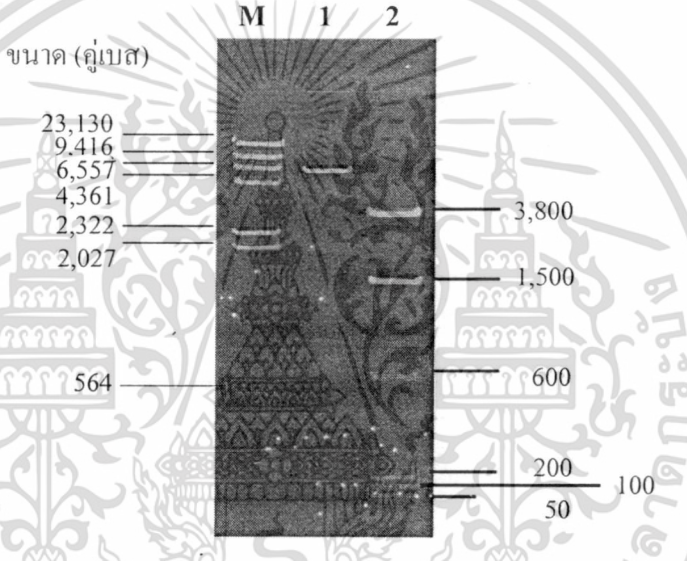
นำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น ทำการเก็บเซลล์และนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis) ตามวิธีในข้อ 3.4.11 ตั้งชื่อพลาสมิดลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ว่า pCP7.5 จากนั้นนำ pCP7.5 ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าปรากฏแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 จำนวน 1 แถบ (รูปที่ 4.6 เลน1) จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 มาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

4.8 การตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 ที่สกัดได้จากข้อ 4.7 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อตัดพลาสมิด pCP7.5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 6 แถบ ที่มีขนาด 3,800, 1,500, 600, 200, 100 และ 50 คู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบส (รูปที่4.6 เลน2) โดยแถบบนสุดที่มีขนาด 3,800 คู่เบสจะเป็นแถบของเวคเตอร์ pDrive ที่ไม่มี insert เนื่องจาก pDrive มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในบริเวณ multicloning site ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิด pCP7.5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ก็จะได้เวคเตอร์ pDrive ที่ไม่มี insert ขนาด 3,850 คู่เบส โดยแถบที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ที่มีขนาด 1,500, 600, 200, 100 และ 50 คู่เบส ตามลำดับ คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป อาจเนื่องจากในผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI อยู่ 4 บริเวณ เมื่อนำขนาดของแถบทั้ง 5 มารวมกันจะได้ขนาด 2,450 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไปที่มีขนาด 2,473 คู่เบส จึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pCP7.5 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 และภายในมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 4 บริเวณ



รูปที่ 4.6 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 ที่ได้จากการสกัดด้วยด่าง

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

4.9 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pCP7.5 ที่ผ่านการตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Reactions และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PRISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ที่อยู่บริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรโมเตอร์ T7 และ SP6 ของเวคเตอร์ pDrive ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pCP7.5 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ต่อกับปลาย U ของเวคเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ T7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 583 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับปลาย U ของเวคเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ SP6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 398 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสองมารวมกัน พบว่ายังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนตรงกลางที่ทำให้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ของเวคเตอร์ pDrive เชื่อมต่อกัน ดั้งนั้น จึงทำการออกแบบ forward primer ใหม่จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้านไพรเมอร์ SP6 ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า D3 และ D5 และออกแบบ reverse primer จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้านไพรเมอร์ T7 ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า K2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 ที่อยู่ในพลาสมิด pCP7.5 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2,473 คู่เบส (รูปที่ 4.7) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่ามีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 4 บริเวณ (รูปที่ 4.7) ซึ่งเมื่อนำพลาสมิด pCP7.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 1,454, 576, 222, 128 และ93 คู่เบส โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการตัดพลาสมิด pCP7.5 ในข้อ 4.8 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCP7.5 ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BLAST server พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifD* ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifD* ของไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7423 *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 *Calothrix desertica Chlorogloeopsis fritschii* ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifK* ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 สูงที่สุด คือ 95 เปอร์เซ็นต์ และคล้ายคลึงกับลำดับกรดอมิโนใน *Fisherella* sp. UTEX 1931 และ *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1	TTGGGTCACC	ACATTGCTAA	CGACGCTATC	CGTGACTGGA	TTTTCCCTCA	50
51	ATTCGACAAA	GCTAAGAAAG	ACAACAAACT	CACCATTGAA	CCCGGCCCCT	100
101	ACGATGTAGC	CTTAATCGGT	GACTATAACA	TCGGTGGTGA	CGCATGGGCT	150
151	AGCGTATGCT	CTTAGAAGAA	ATGGGCTTAC	GTGTTGTTGC	TCAATGGTCT	200
201	GGTGACGGTA	CTTTAAACGA	ATTAATTCAA	GGACCTGCTG	CTAAATTAAT	250
251	TCTGATCCAC	TGCTACCGTT	CCATGAACTA	CATTTGTCGT	TCTTTGGAAG	300
301	AATCTTACGG	CTTGCCTTGG	ATGGAGTTCA	ACTTCTTTGG	TCCTACCAAG	350
351	ATTGCTGAAT	CTCTCCGTGA	AATTGCTGCC	CGCTTCGACG	ACAAGATCAA	400
401	AGCAAACGCA	GAGAAAGTAA	TCGCCAAGTA	CACTCCAGTA	ATGAACAAGG	450
451	TACTTGAGAA	GTATCGTCCT	CGCGTTGAAG	GTAACACCGT	AATGTTGTAC	500
501	GTAGGTGGTC	TACGTCCTCG	TCACGTTGTT	CCTGCTTTCG	CTGACTTGGG	550
551	TATCACAGTA	TTGGGTACAG	GTTACGAATT	CGCTCACAAC	GACGACTATA	600
601	AACGTACTAC	CCACTACATT	GACAACGCTA	CCGTTATTTA	CGACGACGTA	650
651	ACTGCTTACG	AATTTGAAGA	ATTCACCAAG	CAACTTAAGC	CTGACTTGAT	700
701	TGCTTCAGGT	ATTAAGGAAA	AATACGTCTT	CCAAAAGATG	GGCTTACCCT	750
751	TCCGTCAAAT	GCACTCCTGG	GATTACTCCG	GTCCTTATCA	CGGATACGAC	800
801	GGATTTGCTA	TCTTCGCTCG	CGACATGGAT	TTAGCTCTCA	ACAGCCCAAC	850
851	CTGGGGATTA	ATCGGCGCTC	CCTGGAAAAA	GACTGCTGCT	AAGAGCAAGG	900
901	CTAAAGTTGC	TTAATTAGCA	TTCGCTTCAT	CTCATGGGAA	AACCTGGGGT	950
951	AGAAGCCCCA	GGAACAAAGG	GAAGAATGAT	GAATGTTGAA	TGGTGCGATG	1000
1001	AATAGGGTTT	TCATTCATTA	TTCATCATTC	ATCGCTCGTC	ACTCCCTCAG	1050
1051	CCGAAGACAA	CCCCCAGGTT	TTCACTAAGG	CGGGGTAAAC	CCCGCCCCTA	1100
1101	CCCAAACCAC	CTCTTCATTC	GCCACATCAA	ACTAAACAAG	TAACAGAGAG	1150
1151	TAACGAGAAA	TGCCACAGAA	TCCAGAGAGA	ATTGTAGACC	ACGTTGATCT	1200
1201	ATTCAAACAG	CCAGAGTACA	AACAACTGTT	TGAAAACAAG	AGAAAAGAAT	1250
1251	TTGAAGGCGC	ACACAGCGCT	GAAGAGGTTG	AGCGGGTAGC	TGAATGGACA	1300
1301	AAATCCTGGG	AATACCGGGA	AAAGAACTTC	GCTCGTGAAG	CTTTAACCGT	1350
1351	TAACCCTGCT	AAAGGTTGTC	AACCTCTGGG	CGCAATGTTT	GCTGCTCTAG	1400
1401	GTTTTGAAGG	TACTCTACCT	TTCGTTCAAG	GTTCTCAAGG	TTGCGTAGCT	1450
1451	TACTTCCGTA	CCCACCTCAG	CCGTCACTAT	AAAGAGCCTT	GCTCTGCTGT	1500
1501	TTCTTCTTCC	ATGACTGAAG	ACGCAGCCGT	GTTCGGTGGT	TTGAACAACA	1550
1551	TGATTGAAGG	CTTGCAAGTT	TCTTATCAAC	TGTACAAGCC	CAAGATGATT	1600
1601	GCTGTTTGCA	CCACCTGTAT	GGCAGAAGTT	ATCGGTGATG	ACTTAGGTGC	1650
1651	ATTCATCACC	AACGCTAAGA	ACGCTGGTTC	CGTTCCTCAA	GATTTACCCG	1700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1701 TACCTTTCGC TCATACTCCT AGCTTCGTTG GTTCTCACAC CACTGGCTAT 1750
1751 GACAACATGA TGAAGGGTAT TCTGTCTAAC TTGACAGAAG GTAAGAAGGG 1800
1801 CAAAGCTAAC GGTAAGGTTA ACTTTATTCC TGGTTTTGAT ACCTATGTTG 1850
1851 GTAACAACCG CGAATTAAAG AGAATCTTAG GCTTGATGGG TATTGACTAC 1900
1901 ACCATCCTGT CTGATACCAG TGATTACTTC GATTCACCTA ACAATGGTGA 1950
1951 ATACGAAATG TATCCCGGTG GAACCAAGCT AGCTGATGCG GCTGATTCTA 2000
2001 TCAACGCCAA AGCTACTGTT ACATTGCAAG CTTACACCAC TGCTAAGACT 2050
2051 CGTGAATATA TCGCTAAGTC TTGGAAGCAA GAAGTTAAGG TTCTACGTCC 2100
2101 CTTTGGTGTT AAGGGTACAG ATGAATTCTT GATGGCGTTG TCAGAATTAA 2150
2151 CTGGTAAGGC AATTCCTGAA GAGTTAGAAA TCGAACGTGG TCGTTTGGTT 2200
2201 GACGCTATCA CTGACTCTTA CGCTTGGTTA CATGGTAAGA AGTTCGCTAT 2250
2251 CTACGGCGAT CCTGACTTAA TCATCTCTGT TACCAGCTTC TTGTTAGAAG 2300
2301 TAGGTGCTGA ACCTGTACAC ATCCTCTGCA ACAACGGTGA TGGAGAATTC 2350
2351 AAGCAAGAAT TGCAAGCTAT CCTAGATGCT AGCCCCTTCG GTAAGGAAGC 2400
2401 TACCATTTGG TTAGGTAAAG ACTTGTGGCA CTTCCGCTCC TTGTTGTTCA 2450
2451 CTGAGCCTGT TGACTTCTTC GTT

รูปที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCP7.5 ตัวอักษรสีแดงขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pCP7.5 กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ลำดับกรดอะมิโน	ไซยาโนแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึง(เปอร์เซ็นต์)
nifD	*Calothrix desertica*	94
	Chlorogloeopsis fritschii	94
	Nostoc sp. สายพันธุ์ PCC 7423	94
	Nostoc sp. สายพันธุ์ PCC 7120	94
nifK	*Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 7120	95
	Anabaena variabilis ATCC 29413	94
	Fisherella sp. UTEX 1931	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไดไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยใช้ไพรเมอร์คู่ D1 และ K1 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis*

2. จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ได้พลาสมิดลูกผสม pCP 7.5

3. จากการนำพลาสมิดลูกผสม pCP7.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI สรุปได้ว่า ในผลิตภัณฑ์ PCR ภายในพลาสมิดมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 บริเวณ

4. เมื่อนำพลาสมิด pCP7.5 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 2,473 คู่เบส และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่น ในธนาคารยีน พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนไดไนโตรจีเนสจากไซยาโนแบคทีเรียอื่นๆ มากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. 2527. สาหร่าย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2542. การสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน. ในหนังสือชีวเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

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

Antarikanonda, P. 1986. Algal biofertilizer for agriculture in Thailand. J. Sci. Tech. 2

Bone, D.H. 1971 Nitrogenase activity and nitrogen assimilation in *Anabaena flos-aquae* growing in continuous culture. Arch. Mikrobiol. 80(3): 234-241.

Chen, H.M., Huang, T.C., and Chine, C.Y. 1996. Nucleotide sequence of the *nifHDK* operon in the aerobic nitrogen-fixing unicellular *Synechococcus* sp. R-1. Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 99-105.

Dominic, B., Chen, Y.B., and Zehr, P.J. 1998. Cloning and transcriptional analysis of the *nifUHDK* gene of *Trichodesmium* sp. IMS101 reveals stable *nifD*, *nifDK and nifK* transcripts. J. Microbiol. 144: 3359-3368.

Gaur, J.P., and Singh, A.K. 1990. Growth photosynthesis and nitrogen fixation of *anabaena doliolum* exposed to assam crude extract. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44(3): 494-500.

Howard, J.B. and Ress, D.C. 2000. Structure of the nitrogenase protein component. In: E.W Triplett (Ed). Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process, Horizon Scientific Press, Norfolk, p.800.

Huang, T.C., Lin, R.F., Chu, M.K., Chen, H.M. 1999. Organization and expression of nitrogen fixation genes in the aerobic Nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. J. Microbiology. 143: 743-753.

Kallas, T., Rebiere, M.C., Rippka, R., Tandeau, N. 1983. The structural *nif* genes of the cyanobacteria *Gloeothece* sp. and *Calothrix* sp. share homology with those of *Anabaena* sp., but the *Gloeothece* genes have a different arrangement. J. Bacteriol. 155: 427-431.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms 8th edition. Prentice Hall International, Inc. New Jersey, USA

Mazur, B.J., and Chui, F.F. 1982. Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green algae *Anabaena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6782-6786.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mevarech, M. Rice, D. and Haselkorn, R. 1980. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6476-6480.

Richmond, A.E. 1986. Microalgaculture. CRC Critical Review in biotechnology 4(4): 369-438.

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

Smith, R.V., and Evans, M.C. 1971. Nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. J. Bacteriol. 105(3): 913-917.

Venkataraman, L.V. 1986. Blue-green algae as biofertilizer. In Richmond, A. (ed) CRC Handbookof Microalgal Mass Culture, CRC Press, Inc, 445-472.

Weare, N.M., and Benemann, JR. 1973. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. II. Nitrogenase activity during induction and aging of batch cultures. Arch Mikrobiol. 93(2): 101-112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG 11 (Rippka *et al.*, 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า		
กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต($MnCl_2.4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4.2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอล์ (II) ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)2.6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์
ส่วนประกอบ BG 11 100 เท่า		
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	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 (Na2EDTA)	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		
ส่วนประกอบ		
อาหาร BG 11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรต ($FeNH_4$ Citrate) (0.60กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

RF1

ส่วนประกอบ

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

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RF2

ส่วนประกอบ

MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์

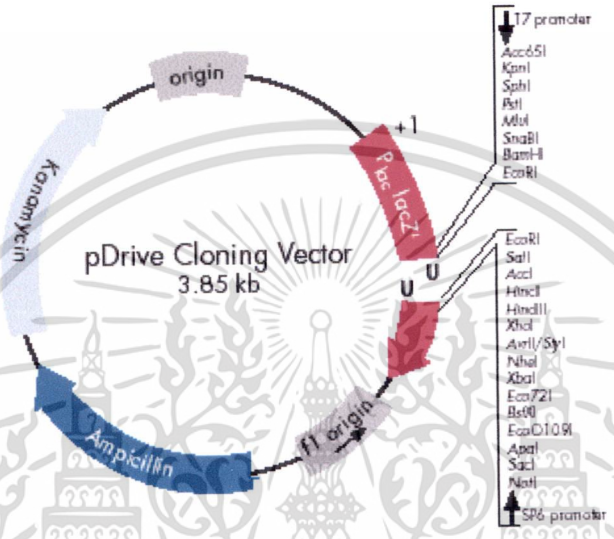
กลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย กรดอะซิตริก แล้วกรองผ่าน filter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้