

การค้นหายีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย
ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่



นางสาว กรกาญจน์ เอกจิตต์

นางสาว ยุภาพร สุราช

นางสาว ศิริประภา ตรีเดช

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหม.....

เลขทะเบียน 39884

วัน, เดือน, ปี 1 1 0 0 2544

b.....

i.....

ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ให้มีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การค้นหายนีเพนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย
 ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่

โดย นางสาวกรกาญจน์ เอกจิตต์ รหัส 40053001
 นางสาวยุภาพร สุราช รหัส 40053054
 นางสาวศิริประภา ตรีเดช รหัส 40053059

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

นพพล นพ

(ผศ.ดร. นพพล นพ ธีระทอง)

หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

มาลินี ตันติยาภรณ์

(รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

ประธานกรรมการ

สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

(ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์)

กรรมการ

ดวงใจ ไชยกุล

(ผศ. ดวงใจ ไชยกุล)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Searching for betaine aldehyde dehydrogenase gene in cyanobacteria by method
of Polymerase Chain Reaction (PCR)



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การค้นหายีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียด้วยวิธี ปฏิกิริยาลูกโซ่	
นักศึกษา	นางสาวกรกาญจน์	เอกจิตต์
	นางสาวยุภาพร	สุราช
	นางสาวศิริประภา	ตรีเดช
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2543	

บทคัดย่อ

ความเค็มหรือแรงดันออสโมติกเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีกลไกการรักษาแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน สารไกลซีนบีเทนเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนไกลซีน และทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติกในเซลล์โดยผลิตจากเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *betB* การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการค้นหายีนจากไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่าง โดยเฉพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 และอาหารสูตรเฉพาะ (สำหรับ *Aphanothece halophytica*) นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) จากไพรเมอร์ 4 ชนิด (*BetB1*, *BetB2*, *BetB3* และ *BetB4*) และตรวจผลด้วยอะการโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม กลุ่มแรก *Aphanothece halophytica* สามารถเจริญในอาหารสูตรเฉพาะที่มีเกลียวโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตรเนื่องจากมียีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส กลุ่มที่ 2 *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร BG11 ที่มีเกลียวโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการทำ PCR คือไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *betB* กลุ่มที่ 3 *Hapalosiphon delicatulas* และ *Spirulina* sp. Turpin สามารถเจริญได้ในอาหารทั้งที่มีและไม่มีเกลียวโซเดียมคลอไรด์ และพบแถบจางๆของผลิตภัณฑ์ PCR ใน *Hapalosiphon* จึงคาดว่า อาจมียีน *betB* ที่สร้างสารไกลซีนบีเทนเพื่อควบคุมแรงดันออสโมติก ส่วน *Spirulina* sp. Turpin อาจมีกลไกอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับยีน *betB*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Searching for betaine aldehyde dehydrogenase gene in cyanobacteria by method of Polymerase Chain Reaction (PCR)	
Name	Miss Kornkarn	Akkajit
	Miss Yupaporn	Surach
	Miss Siraprapa	Threedeach
Special Project Advisor	Dr. Saranya	Phunpruch
Department	Applied Biotechnology	
Academic Year	2000	

Abstract

Salinity or osmotic pressure is a factor affecting growth of algae and cyanobacteria. Each cyanobacteria has different osmoregulations. Glycinebetaine is a derivative of amino acid glycine and functions osmotic pressure control in cells that is produced by enzyme betaine aldehyde dehydrogenase encoded by *betB* gene. The aim of study is to search for *betB* gene form cyanobacterial samples. Cyanobacteria were cultivated in BG11 medium and special medium (only for *Aphanothece halophytica*). Genomic DNA was isolated and amplified by PCR from 4 types of primer (BetB1, BetB2, BetB3 and BetB4) and PCR products were determined by agarose gel electrophoresis. Form the results, cyanobacteria can be classified into 3 groups. Group I *Aphanothece halophytica* can grow in special medium containing 30 g/l of NaCl because of the presence of betaine aldehyde dehydrogenase gene. Group II *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. and *Gloeocapsa* sp. Keutzig can not grow in BG11 medium containing NaCl. This corresponded PCR result that PCR product of *betB* gene was not found. Group III *Hapalosiphon delicatulus* and *Spirulina* sp. Turpin can grow in both BG11 medium and BG11 containing NaCl. Faint band of PCR product was found in *Hapalosiphon delicatulus*. Therefore, it was expected to have a *betB* gene involved glycinebetaine production for controlling osmotic pressure in *Hapalosiphon delicatulus*, *Spirulina* sp. Turpin may have other machanisms which are not involved *betB* gene.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ คณะกรรมการโครงการพิเศษ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์ และ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ยิ่ง ทางคณะผู้จัดทำขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน แม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ พิชมาภรณ์ ธงเพ็ง และ พิวิภาวี แบบประเสริฐ ที่ให้คำปรึกษาและอนุเคราะห์เชื่อเพื่อทำการทดลองและเพื่อนๆ นักศึกษาที่ให้กำลังใจเป็นอย่างดี ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ณ ที่นี้ มีส่วนช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจ กำลังใจตลอดมา จนโครงการพิเศษเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย	2
2.2 ไชยาโนแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษา	8
2.3 สารไกลซีนบีเทน	12
2.4 เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็ม	13
2.5 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับปฏิกิริยาลูกโซ่	13
2.6 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	28
3.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา	28
3.2 วัสดุอุปกรณ์	28
3.3 สารเคมี	29
3.4 วิธีการศึกษา	30
บทที่ 4 ผลการทดลอง	34
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด	34
4.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR	35
4.3 การเพิ่มปริมาณยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี PCR	39
4.4 การเจริญเติบโตของไชยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆใน สภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากความเค็ม	42

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	46
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	51
เอกสารอ้างอิง	53



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สภาวะที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	20
2	จำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่ไปกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้น	24
3	สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	33
4	ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และขนาดของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้	39



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	<i>Aphanothece halophytica</i>	8
2	<i>Anabaena</i> sp.	9
3	<i>Calothrix</i> sp.	10
4	<i>Gloeocapsa</i> sp.	10
5	<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	11
6	<i>Spirulina</i> sp.	11
7	สูตรโครงสร้างไกลซีน	12
8	วิธีการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนจากสารตั้งต้น	12
9	primer extension	15
10	ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ	34
11	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในยูคาริโอต และโปรคาริโอต	37
12	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในยูคาริโอต	38
13	แถบดีเอ็นเอของยีนไกลซีนบีเทนอัลติไฮโดรจีเนสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1 กับ BetB4	40
14	แถบดีเอ็นเอของยีนไกลซีนบีเทนอัลติไฮโดรจีเนสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB2 กับ BetB3	41
15	การเจริญเติบโตของ <i>Aphanothece halophytica</i> ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ในสภาวะที่มีและไม่มีไซโตไคนคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร	43
16	การเจริญเติบโตของ <i>Anabaena siamensis</i> , <i>Calothrix</i> sp. และ <i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ในสภาวะที่มีและไม่มีไซโตไคนคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร	44
17	การเจริญเติบโตของ <i>Hapalosiphon delicatulus</i> และ <i>Spirulina</i> sp. Turpin ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ในสภาวะที่มีและไม่มีไซโตไคนคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร	45

บทที่ 1

บทนำ

การเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเป็นสำคัญ ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งนับวันจะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียคือ ความเค็มหรือการควบคุมแรงดันออสโมติก ซึ่งในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเจริญเติบโตและทนเค็มแตกต่างกัน ขึ้นกับกระบวนการควบคุมแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดผลิตสารไกลซีนบีเทน (glycine betaine) ขึ้นเพื่อควบคุมกลไกการรักษาแรงดันออสโมติกและเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สำคัญอื่นๆ ในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบสารไกลซีนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้แก่ แบคทีเรียหลายชนิด พืชและสัตว์ สารไกลซีนบีเทนสังเคราะห์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน 2 ขั้นตอนของสารตั้งต้นโคลีนโดยมีเอนไซม์ บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์หลักซึ่งได้จากการถอดและแปลรหัสของยีน *betB* ใน *E. coli* มีรายงานการพบ ยีน *betA*, *betB*, *betT* และยีน *betI* ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของการสร้างสารไกลซีนบีเทน ในโครงการพิเศษนี้ได้ทำการศึกษากลไกการรักษาแรงดันออสโมติกในไซยาโนแบคทีเรียโดยการค้นหายีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) และดูผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) เพื่อเป็นแนวทางเริ่มต้นในการศึกษากลไกการปรับตัวต่อความเค็มเพื่อการอยู่รอดของไซยาโนแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

ค้นหายีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่างด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไชยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

ไชยาโนแบคทีเรียจัดเป็น โปรคาริโอท (procaryote) ที่สามารถขึ้นอยู่ได้ทั่วทุกแห่งในโลก ทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล และน้ำพุร้อน ไชยาโนแบคทีเรียอาจอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ทั้งพืช และสัตว์ มีคลอโรฟิลล์ เอ เป็นรงควัตถุใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และได้ออกซิเจนเป็นผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสง มีการนำไชยาโนแบคทีเรียบางชนิดมาทำปุ๋ยชีวภาพ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ทำให้เพิ่มไนโตรเจนแก่พืช ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์มาก

2.1.1 แหล่งที่อยู่

พบไชยาโนแบคทีเรียอยู่ในแหล่งน้ำทุกชนิดทั่วโลก อาจจำแนกแหล่งที่พบได้ดังนี้

1. น้ำจืด

ไชยาโนแบคทีเรียประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นชนิดที่อาศัยในแหล่งน้ำจืด โดยทั่วไปมักพบพวกที่เป็นเส้นสายไม่มีสีหรือพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว มักพบในน้ำนิ่ง ส่วนพวกที่มีสีทึบมักพบในน้ำไหล

2. ทะเลหรือแหล่งน้ำเค็ม

ไชยาโนแบคทีเรียประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ พบในทะเลหรือแหล่งน้ำเค็ม โดยจะพบในบริเวณที่น้ำทะเลขึ้นถึง และมีเพียงไม่กี่ชนิดที่เป็นแพลงก์ตอน เช่น *Oscillatoria erythraea*, *Oscillatoria thiebautii*, *Oscillatoria tambi*, *Oscillatoria brevis*, *Oscillatoria kuetszingiana*, *Phormidium faveolum*, *Phormidium fragile*, *Phormidium amphibiguum*, *Phormidium tenue*, *Spirulina major*, *Spirulina subsalsa*, *Merismopedia glauca*, *Chroococcus turgidus*, *Anabaena turgidusa*, *Anabaenocapsa pulchosa*, *Aphanocapsa pulchra*, *Aphanocapsa littoralis*, *Aphanothece halophytica*, *Microcoleus chthonoplastes*

2.1.2 ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย

1. สารสีสำหรับการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigments) ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ และแคโรทีนอยด์ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) ส่วนแคโรทีนอยด์ประเภทแซนโทฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin), มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll), ออสซิลลาแซนทิน (Oscillaxanthin), ซีอาแซนทิน (zeaxanthin), ลูเทอิน (lutein), ฟลาวิซิน (flavicin), อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และ อะฟานิซิน (aphanicin)
2. ผนังเซลล์ (Cell Wall) ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) ที่เรียกว่า มิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ซีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ ซีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสี ไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ
3. แฟลกเจลลา (flagella) ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มี แฟลกเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)
4. ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) ไซยาโนแบคทีเรียมี แป้งเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆกระจายอยู่ทั่วไป เม็ดที่พบ เรียกว่า ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง แทนที่จะได้สีน้ำเงิน
5. ลักษณะพิเศษ เป็นโปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจะแตกต่างจากยูคาริโอต (eucaryote) คือ ผนังเซลล์ไม่ได้อยู่ในพลาสมา แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริง และไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

2.1.3 รูปร่างของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบด้วยกัน คือ เป็นเซลล์ที่ไม่มีแฟลกเจลลาที่เรียกว่า คอคคอยด์ (coccoïd form) ซึ่งพบทั้งที่เป็นแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) แบบโคโลนี (colony) และแบบระฆังคว่ำ (palmella form) และอีกลักษณะหนึ่งเป็นแบบเส้นสาย (filamentous form)

พวกคอคคอยด์จะมีรูปร่างได้หลายแบบตั้งแต่กลม ทรงกระบอก กระสวย และอื่นๆ การแบ่งเซลล์อาจจะแบ่งในทิศทางเดียวหรือ 2-3 ทิศทาง เซลล์ส่วนใหญ่จะห่อหุ้มด้วยชีทหรือสารเมือก เซลล์ของสกุล *Merismopedia* มีการเรียงตัวของกลุ่มเซลล์ที่แน่นอนคือมีลักษณะเป็นแผ่นแบนๆ ส่วนกลุ่มเซลล์ *Eucapsis* จะเรียงตัวกันเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์

พวกเส้นสายที่มีลักษณะแบบง่ายที่สุด ได้แก่ *Oscillatoria* ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถวเรียกว่า ทริชโอม (trichome) *Spirulina* มีลักษณะของทริชโอมแบบง่ายๆแต่มีเส้นสายบิดเป็นเกลียว (spiral) *Lyngbya* มีลักษณะเป็นเส้นสายที่มีสารเมือกออกมาคลุมเซลล์ เรียกว่า ฟิลาเมนต์ (filament) แต่ในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดจะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) เป็นเซลล์ที่มีผนังหนา มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน เช่น ใน *Anabaena* ตำแหน่งของเฮเทอโรซิสต์จะอยู่ตรงกึ่งกลางของเซลล์ (intercalary heterocyst) และอีกแบบหนึ่งมีเฮเทอโรซิสต์เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้าง (terminal heterocyst) เช่น *Anabaenopsis* ถ้าเฮเทอโรซิสต์อยู่พื้นฐานของสายเซลล์ (basal heterocyst) ซึ่งเซลล์ปกติมีขนาดไม่เท่ากันทั้งสาย เช่น *Gloeotrichia*

2.1.4 โครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรีย ประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น และมีชีท ซึ่งเป็นสารเมือกห่อหุ้มอยู่ ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อบางๆเรียกว่า เยื่อพลาสมา (plasma membrane) ทำหน้าที่ห่อหุ้มไซโตพลาสซึมไว้ มีการพบรงควัตถุกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์ จึงเรียกบริเวณนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียสจึงเรียกบริเวณนี้ว่า เซนโดพลาสซึม เนื่องจากบริเวณนี้ไม่มีผนังหุ้มจึงถือว่าไม่ใช่ นิวเคลียสที่แท้จริง ในส่วนของโครโมพลาสซึมจะมีไซยาโนไฟซินกรานูลมีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กๆและใช้เป็นอาหารสะสมพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซิน นอกจากนี้ไซยาโนไฟซินกรานูลแล้ว เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังมีพบแก๊สแคววโอล (gas vacuole) ที่ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในโครโมพลาสซึม แก๊สแคววโอลนี้ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (40 เท่า) จะเห็นเป็นเม็ดสีดำ แต่เมื่อใช้กำลังขยายสูงๆ (ตั้งแต่ 100 เท่าขึ้นไป) จะเห็นเป็นเม็ดสีแดงเนื่องจากการสะท้อนแสง โดยทั่วไปแก๊สแคววโอลมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจมีลักษณะเป็นถุงกลม เช่นใน *Oscillatoria* ถุงนี้มีเยื่อบางๆหุ้ม เยื่อนี้ประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนซึ่งสามารถให้ออกซิเจนซึมผ่านได้เพื่อใช้ประโยชน์ในการหายใจ ส่วนแก๊สที่บรรจุภายในถุงคาดว่าเป็นแก๊สไนโตรเจนหรือสารประกอบของไนโตรเจนจำพวกเอมีน (amine)

แพลงก์ตอนบางชนิดไม่พบแก๊สแคววโอลเมื่ออยู่ในที่มืดหรือในที่สลัวๆ และจะพบแก๊สแคววโอลเมื่ออยู่ในที่มีแสงจัด ทำให้คาดว่าแก๊สแคววโอลทำหน้าที่เป็นตัวกรองแสงในไซยาโนแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการบลูมของน้ำ (water bloom) แก๊สแคววโอลจะช่วยให้เซลล์ลอยน้ำ ตอนแรกเซลล์จะอยู่ตามพื้นหรือระดับที่ต่ำกว่าผิวน้ำ เมื่อสร้างแก๊สแคววโอลแล้วจะลอยขึ้นมาที่ผิวน้ำพอได้รับแสงจะสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้เซลล์มีความดันเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันเมื่อไม่ได้รับแสงเซลล์จะผลิตแก๊สแคววโอลจะลดลงจนหมดไปในที่สุด และเซลล์ก็จะจมลง

ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายพบเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ อยู่ระหว่างเซลล์ปกติ หรืออยู่ที่ปลายของเส้นสาย เฮเทอโรซิสต์เกิดขึ้นโดยเซลล์ใดเซลล์หนึ่งในสาย สะสมอาหารไว้มากจนทำให้เซลล์มีลักษณะกลมและมีขนาดใหญ่ขึ้น ไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านลงรูเล็กๆของเฮเทอโรซิสต์ และจะมีกรานูล (granule) มาปิดรูไว้ ทำให้เห็นเป็นลักษณะเม็ดกลมๆ เรียกว่า โพลาร์โนตช์ (polar notch) หรือโพลาร์โนดูล (polar nodule) ดังนั้นพวกเฮเทอโรซิสต์ที่อยู่ระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสายจะมีโพลาร์โนดูล 2 อัน อยู่ตรงข้ามกัน ส่วนในพวกเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายจะมีโพลาร์โนดูลเพียงข้างเดียวที่อยู่ติดกับเซลล์ข้างเคียง โดยปกติเฮเทอโรซิสต์จะมีเฮเทอโรซิสต์เพียง 1 เซลล์ หรือมากกว่าในแต่ละสายได้ แต่ในบางชนิดจะเกิดติดกันเป็นคู่ๆ หน้าที่ของเฮเทอโรซิสต์ที่สำคัญคือ ช่วยในการสร้างสปอร์ เนื่องจากพบว่า เซลล์ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่าอะคีนิต (akinite) หรือโกนีเดีย (gonedia) มักอยู่ติดกับเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้เฮเทอโรซิสต์เป็นจุดที่ทำให้เส้นสายเกิดการขาดเป็นท่อน แต่ละท่อนที่ขาดออกมาเรียกว่าฮอริโมโกน (homogone) หรือ ฮอริโมโกเนีย (homogonia) ซึ่งมีความยาวมากน้อยต่างกัน ท่อนใหม่แต่ละท่อนสามารถแบ่งเซลล์ให้เป็นเส้นสายที่ยาวต่อไปได้

2.1.5 ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย

1. การเคลื่อนที่

ไซยาโนแบคทีเรียเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement) การเคลื่อนไหวนี้อาจเป็นแบบถอยหลัง (backward and forward gliding) หรือเป็นแบบแกว่งไปข้างซ้ายและข้างขวาสลับกัน โดยเคลื่อนไหวเฉพาะปลายเส้นสาย เคลื่อนไหวเป็นแบบคลื่น (waving movement) และแบบหมุนเป็นเกลียวแบบควงสว่าน (spiral movement)

สาเหตุการเคลื่อนไหวทั้ง 4 แบบ เกิดขึ้นได้ดังนี้

- ก. เกิดจากการผลิตสารเมือกแล้วปล่อยออกทางรูเล็กบนผนังเซลล์ ซึ่งจะทำให้เกิดการผลักดันของสารเมือกกับน้ำที่อยู่รอบๆ เส้นสายจึงเคลื่อนที่ไปได้
- ข. เกิดจากการยึดหดตัวของเซลล์ภายในเส้นสาย ซึ่งการยึดหดนี้เกิดได้ไม่เท่ากันทุกเซลล์ โดยบางเซลล์ยืด บางเซลล์หด ทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบเป็นคลื่น
- ค. เกิดจากการแลกเปลี่ยนน้ำกับสารละลายภายในเซลล์ ซึ่งมีไม่เท่ากันตลอดทั้งสายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแรงตึงผิว (surface tension) เส้นสายจึงเคลื่อนไหวได้
- ง. สภาวะแวดล้อม ได้แก่ แสงและอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนไหวของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น ถ้าแสงมากขึ้น การเคลื่อนที่ก็จะมากขึ้น หรือถ้าอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นการเคลื่อนไหวก็น่าจะเพิ่มมากขึ้น

2. การดัดแปลงสี (chromatic adaptation)

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถดัดแปลงสี เพื่อให้สัมพันธ์กับความยาวของคลื่นแสง (wave length) Gaidukov เป็นคนแรกที่ได้ตั้งสมมติฐานนี้ขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1902 เรียกว่า "Gaidukov phenomenon" ปรากฏการณ์เปลี่ยนสีพบบ่อยในพวกไซยาโนแบคทีเรีย ในวงศ์ Oscillatoriaceae และ Nostocaceae แต่จะพบเพียงบางชนิดเท่านั้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการดัดแปลงสีของไซยาโนแบคทีเรีย

- 1 ความเข้มของแสง เป็นปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการดัดแปลงสีของไซยาโนแบคทีเรีย คือถ้าเลี้ยงในที่ที่ความเข้มของแสงมาก สีของเส้นสายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แต่ถ้าความเข้มของแสงน้อยจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2 ปริมาณธาตุอาหาร เช่น การขาดธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเหล็ก มีผลทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือซีดลง หรือเกิดการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation)

การตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่อยู่เป็นอิสระหรือในสภาวะที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น *Rhichelia intracellularis* ที่ขึ้นอยู่ในเซลล์ของไดอะตอมทะเล *Rhizosolenia* sp. และ *Anabaena azollae* ที่ขึ้นอยู่ในแหนแดง เป็นต้น การตรึงไนโตรเจนนี้สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดปี แต่จะมีประสิทธิภาพสูงสุดในฤดูฝน

ปัจจุบันพบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้งชนิดที่มีเฮเทอโรซิสต์และชนิดที่ไม่มีเฮเทอโรซิสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ไม่ว่าจะเป็นชนิดเซลล์เดี่ยวๆ เช่น *Gloeocapsa* ชนิดเป็นกลุ่มเซลล์ เช่น *Aphanothece* ชนิดที่เป็นเส้นสาย เช่น *Anabaena* โดยทั่วไปการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่มี *Synechococcus* 3 สายพันธุ์ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน

ผลที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน คือ แอมโมเนียจะเปลี่ยนรูปเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นต้น เมื่อปริมาณแอมโมเนียสูงขึ้นการเกิดเฮเทอโรซิสต์จะลดลง แต่ถ้าปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจะไม่มีผลต่อการเกิดเฮเทอโรซิสต์

2.1.6 การอยู่ร่วมกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ (symbiosis)

มีไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในเซลล์ของสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนสัตว์ ชนิดที่พบบ่อยในตัวอย่างแพลงก์ตอน เช่น *Rhichelia intracellularis* อยู่ในเซลล์ของไดอะตอมทะเล *Rhizosolenia* sp. หรือเกาะอยู่บนเส้นสายของ *Charoceros* sp. มีรายงานว่า *Lyngbya*, *Calothrix* และ *Phormidium* อาศัยร่วมกับสาหร่ายชนิดอื่น โดยฝังตัวอยู่ในเมือกที่หุ้มโคโลนีหรือสายเซลล์ ไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพืชชนิดอื่น เช่น *Anabaena* อยู่ในแหนแดง (*Azolla*) นอกจากนี้ยังพบไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น *Phormidium mucicola* ขึ้นอยู่ในเมือกที่สร้างขึ้นเป็นปลอกหุ้มโรติเฟอร์ชนิด *Floscularis mutabilis* และ *Conochilus unicornis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ทางด้านระหว่างสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดที่อยู่ร่วมกันนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่า มีสารบางอย่างถูกสร้างขึ้นมาจากการอยู่ร่วมกัน แต่จะไม่สามารถสร้างสารนี้ขึ้นมาได้ถ้าอยู่กันตามลำพัง

2.2 ไชยาโนแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ไชยาโนแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งหมดมี 6 ชนิด จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

แต่ต่างกันใน Order และ Family ดังนี้

1. *Aphanothece halophytica* อยู่ใน Order Chroococcales Family Chroococcaceae มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลมหรือรีหรือมีรูปร่างไม่แน่นอน มีการแบ่งตัวตามขวาง ส่วนใหญ่เซลล์จะมีสีทึบหรือมีสีฟ้าเข้ม มีลักษณะเป็นวง โปร่งแสง สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ มีการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลระหว่างความเข้มข้นของเกลือที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ ลักษณะของ *Aphanothece halophytica* แสดงดังรูปที่ 1



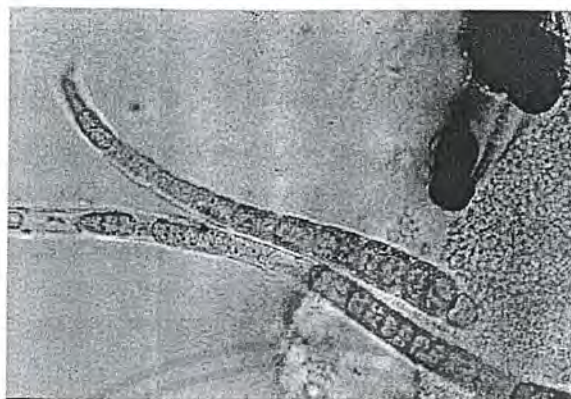
รูปที่ 1 *Aphanothece halophytica*

2. *Anabaena siamensis* อยู่ใน Order Nostocales Family Nostocales มีลักษณะเหมือน *Nostoc* มาก แตกต่างตรงที่ *Anabaena* มีทั้งเฮเทอโรซิสต์ และสปอร์อยู่ภายในสาย มีเอกสารเป็นเอกสารทสวทสวไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีย์โคมชนิดเดี่ยวๆ มีซีทหุ้ม เป็นเส้นสายตรง หรือม้วนเป็นวงบิดเป็นเกลียว บางชนิดเซลล์มีรูปร่างแบบถังเบียร์ กลม หรือรูปสี่เหลี่ยม มีเฮเทอโรซิสต์อยู่ระหว่างเซลล์ปกติ สืบพันธุ์โดยการสร้างอะคีนีตอยู่ภายในเส้นสาย *Anabaena* เป็นแพลงก์ตอนในน้ำจืด มักทำให้เกิดการบลูมเป็นครั้งคราว บางชนิดผลิตสารพิษที่เรียกว่า แอนาโทกซิน (anatoxin) ซึ่งเป็นพิษประเภท Neurotoxin ลักษณะของ *Anabaena* แสดงดังรูปที่ 2

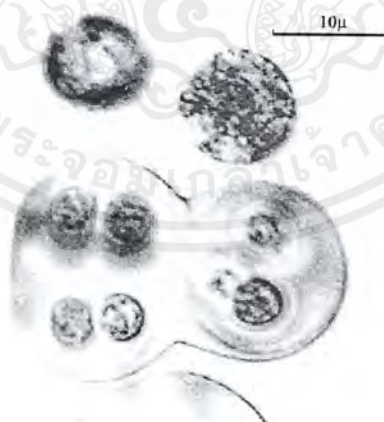


3. *Calothrix* sp. อยู่ใน Order Nostocales Family Rivulariaceae มีลักษณะเป็นเส้นสายที่มีความกว้างของเซลล์ไม่เท่ากันทั้งสาย เซลล์ตรงโคนมีขนาดใหญ่และเรียวเล็กตรงปลาย เซลล์ตรงปลายอาจมน หรือเรียวแหลมเป็นเส้นสาย เซลล์ไม่แตกแขนง หรือแตกแขนงเทียม มีซีทหุ้มแต่ละทรีย์โคม ซีทอาจมีสี หรือใส เฮเทอโรซิสต์ส่วนมากอยู่ปลายสุดของทรีย์โคมที่เรียกว่า เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (basal heterocyst) เป็นแพลงก์ตอนชั่วคราว มักขึ้นอยู่บนก้อนหิน กิ่งไม้ หรือใบไม้ที่จมน้ำ หรือบนพืชน้ำอื่นๆ พบทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ลักษณะของ *Calothrix* sp. แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 *Calothrix* sp.

4. *Gloeocapsa* sp. Keutzig อยู่ใน Order Chroococcales Family Chroococcaceae มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีรูปร่างรีๆ มักพบอยู่เป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี มีซีทห่อหุ้มแต่ละเซลล์และห่อหุ้มทั้งกลุ่มรวมกัน ซีทที่ห่อหุ้มซึ่งแบ่งเป็นชั้นๆ และมีสีต่างๆ พบตามก้อนหินเปียกๆ ที่ขึ้นแฉะ เวลา รวมกันมีลักษณะคล้ายแผ่นเจล เพราะแต่ละตัวฝังอยู่ใน gelatin ลักษณะของ *Gloeocapsa* sp. แสดงดังรูปที่ 4

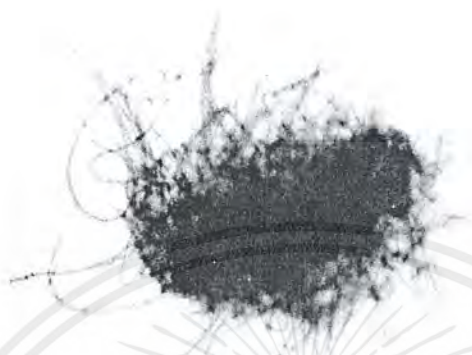


รูปที่ 4 *Gloeocapsa* sp.

5. *Hapalosiphon delicatulus* อยู่ใน Order Stigonematales มีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ และหลายทิศทาง มีทั้งแขนงแท้และแขนงเทียม สร้างเฮเทอโรซิสต์ได้

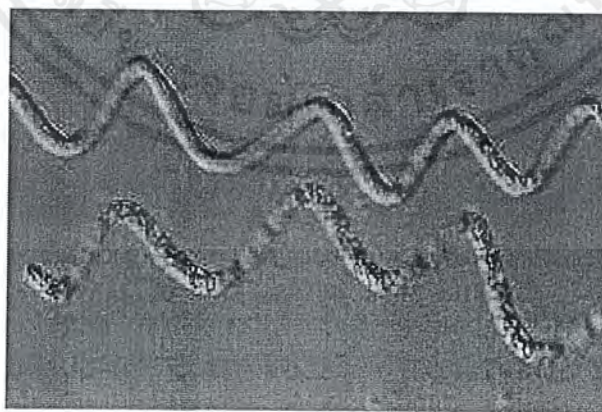
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งอาจมีตุ่ม (polar notch) ถึง 3 อัน ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์ ลักษณะของ *Hapalosiphon delicatulus* แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 *Hapalosiphon delicatulus*

6. *Spirulina* sp. Turpin อยู่ใน Order Nostocales Family Oscillatoriaceae มีลักษณะทรียโคมขดเป็นเกลียว เกลียวอาจแน่น หรือห่างแล้วแต่ชนิด ไม่มีซีทหุ้ม เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีโปรตีนสูงถึง 50-70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีอัตราการเจริญค่อนข้างสูง ลักษณะของ *Spirulina* sp. แสดงดังรูปที่ 6

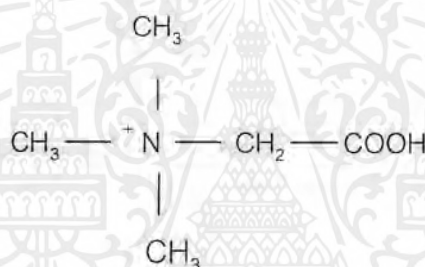


รูปที่ 6 *Spirulina* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

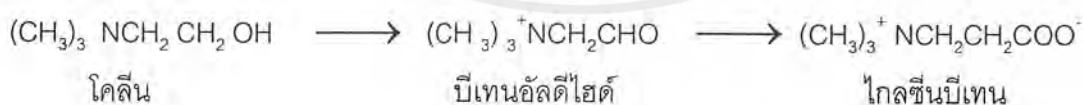
2.3 สารไกลซีนบีเทน

สารไกลซีนบีเทน (glycine betaine ; N,N-trimethylglycine) เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ไกลซีน (รูปที่ 7) และเป็นสารควบคุมแรงดันออสโมติกที่สำคัญชนิดหนึ่ง พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียในลำไส้ (enteric bacteria) (Koo *et al.*, 1991) แบคทีเรียในดิน (soil bacteria) (Peter *et al.*, 1996) แบคทีเรียทนเค็ม (halophilic bacteria) (Galinski and Truper, 1982) แบคทีเรียที่สามารถผลิตมีเทน (methanogenic archaeobacteria) (Robertson *et al.*, 1990) ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) (Incharoensakdi *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1987; Gabbay – Azaria *et al.*, 1988) สัตว์และพืชชั้นสูง (Rhodes and Hanson, 1993)



รูปที่ 7 สูตรโครงสร้างไกลซีน

พืชหลายสกุลเช่น Amaranthacea และ Chenopodaceae สังเคราะห์ไกลซีนบีเทนจากสารตั้งต้นโคลีนโดยกระบวนการออกซิเดชัน 2 ขั้นตอน โดยมีบีเทนอัลดีไฮด์เป็นสารตัวกลาง (รูปที่ 8) (Smith *et al.*, 1988)



รูปที่ 8 วิธีการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนจากสารตั้งต้นโคลีน

ในขั้นตอนแรกปฏิกิริยาเร่งด้วยเอนไซม์โคลีนโมโนออกซีจีเนสที่ขึ้นกับเฟอร์ริดอกซิน (ferredoxin dependent choline monooxygenase) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้พบในคลอโรพลาสต์ ในขั้นตอนที่สองปฏิกิริยาเร่งด้วยเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่เกี่ยวข้องกับไพริดีนนิวคลีโอไทด์ (pyridine nucleotide dependent betaine aldehyde dehydrogenase, EC 1.2.1.8) ซึ่งเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่ควรนำเนื้อหาไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีเทนอัลดีไฮด์ไปเป็นไกลซีนบีเทน และพบเอนไซม์ชนิดนี้ในไซโตพลาสซึม โดยที่เอนไซม์ชนิดนี้มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 7.5 และ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Incharoensakdi and Kum-Arb, 1998) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจุลินทรีย์บางชนิดการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนจะแตกต่างจากในพืช ในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาเร่งด้วยเอนไซม์โคไลน์ดีไฮโดรจีเนส (EC1.1.99.1) ที่พบบนเมมเบรนในการเปลี่ยนโคไลน์ไปเป็นบีเทนอัลดีไฮด์ (Phusi, 1998)

2.4 เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทนเค็ม

เอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการควบคุมการสังเคราะห์สารไกลซีนบีเทน ได้จากการถอดและแปลรหัสของยีน *betB* ในแบคทีเรีย *E. coli* มีรายงานการพบยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นโคไลน์ดีไฮโดรจีเนส (*betA*) บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*betB*) ระบบการขนส่งโคไลน์เข้าเซลล์ที่ต้องใช้พลังงาน (*betT*) และ โปรตีนควบคุม (*betI*) ในซันดีเอ็นเอขนาด 9 กิโลเบส (Andresen *et al.*, 1988; Lamark *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานลำดับเบสของยีน *betB* ในแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1996) *Rhizobium meliloti* (Pocard *et al.*, 1997) และในพืชบางชนิด เช่น ผักขม (Weretilnyk and Hanson, 1990) หัวบีท (McCue and Hanson, 1992) ข้าวบาร์เลย์ (Ishitani *et al.*, 1995) และ ข้าวฟ่าง (Wood *et al.*, 1996)

2.5 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (*in vitro* DNA amplification) หรือที่นิยมเรียกกันทั่วไปว่า เทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยด้านการโคลนยีน (Gene cloning) เพื่อสร้างและเพิ่มขยายปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

2.5.1 หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบเป็นลูกโซ่ ซึ่งจะใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2539) และจำเป็นต้องมีองค์ประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

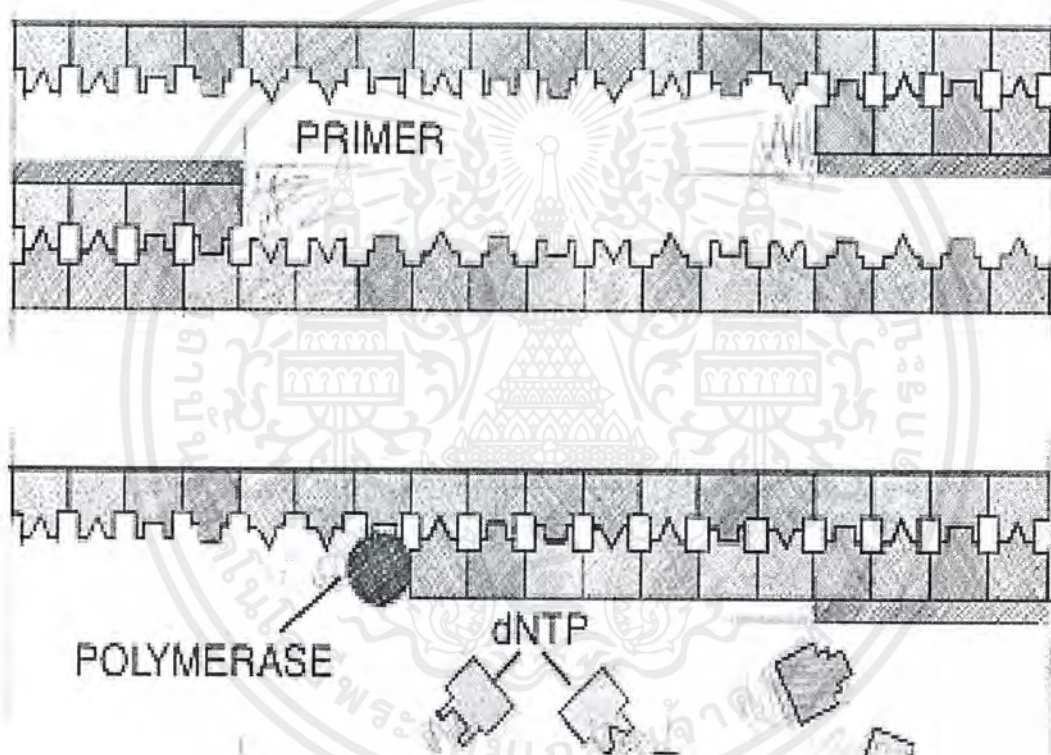
1. ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา
2. ไพรมอร์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ 2 สาย เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary sequence) กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์และใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
3. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปัจจุบันนิยมใช้ *Taq* DNA polymerase
4. ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่
5. อื่นๆ เช่น เกลือ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

2.5.2 ขั้นตอนในการทำ PCR

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ของแม่พิมพ์ที่ต้องการศึกษา ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอไพรมอร์ (DNA primer) ทั้งสองสายเข้าจับกันอย่างจำเพาะ (anneal) กับปลาย 3' ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

3. primer extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (dNTPs) ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งสอง ด้วยดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ไปในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ ของไพรเมอร์ตั้งต้น โดยอาศัยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกันกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นนี้อยู่ในช่วง 70–75 องศาเซลเซียส (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 primer extension

เมื่อปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนเสร็จสิ้นนับเป็น 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เรียกว่า แอมพลิฟด์ (amplified) หรือผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) เกิดขึ้น จากดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 1 คู่จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ในรอบต่อมาดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีอยู่เดิมและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ของการสังเคราะห์รอบใหม่ ดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ (exponential rate) คือได้ 2^n เท่า (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา

PCR มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทางปฏิบัติการสังเคราะห์จะทำซ้ำ 20 – 30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1 – 10 ล้านเท่า

2.5.3 ข้อดีของเทคนิค PCR

1. ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (target DNA) ไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมาก หรือบริสุทธิ์มาก อาจอยู่รวมกันกับดีเอ็นเออื่น และสามารถสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผม 1 เส้น ตัวอสุจิ 1 ตัว หรือ เซลล์ 1 เซลล์ เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณได้
2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้รวดเร็วมาก ประมาณ 1 ล้านเท่า ภายในเวลา 1 ชั่วโมงและสามารถนำดีเอ็นเอนั้นไปศึกษาต่อได้โดยตรง
3. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดยาวตั้งแต่ 50 คู่เบส ถึง 2,000 คู่เบส
4. เป็นปฏิกิริยาในหลอดทดลองจึงไม่ต้องเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้ยุ่งยาก

2.5.4 ข้อจำกัดของเทคนิค PCR

1. ต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา
2. ต้องสังเคราะห์ไพรเมอร์
3. อาจเกิดผลบวกปลอมอันเนื่องจากการปนเปื้อน

2.5.5 ประโยชน์ของ PCR (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2540)

1. ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยไม่ต้องแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาให้บริสุทธิ์ก่อน และไม่ต้องใช้ปริมาณมาก เพียงดีเอ็นเอจากหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งไมโทคอนเดรียของดีเอ็นเอก็สามารถทำได้
2. เพิ่มความไวของเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ และทำให้ตรวจได้ง่ายขึ้น เพราะดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถตรวจดีเอ็นเอจากตัวอย่างปริมาณน้อยมาก ซึ่งไม่เคยทำได้มาก่อน
3. ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเทคนิค PCR แล้ว สามารถนำมาตรวจหรือศึกษาต่อด้วยวิธีต่างๆ เช่น การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) แล้วย้อมดูแถบดีเอ็นเอโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เป็นการโคลนดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์ตามปกติ (cell free molecular cloning) เนื่องจาก PCR สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างจำเพาะและเพิ่มได้มากตามต้องการ
5. มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ใช้ช่วยในการตรวจวิเคราะห์การผ่าเหล่า (mutation) ของยีน อันเป็นสาเหตุของโรคทางพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง และใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม และโรคติดเชื้อจากทั้งไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว รวมทั้งด้านนิติเวชวิทยาเพื่อพิสูจน์ว่ามีดีเอ็นเอตามลำดับเบสที่สงสัยอยู่ในหลักฐานที่เก็บได้ เช่น จากคราบเลือด ขน ผม หรืออสุจิ เป็นต้น

2.5.6 วิวัฒนาการของเทคโนโลยี PCR

วิวัฒนาการของเทคโนโลยี PCR เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในอดีตที่ผ่านมา วิทยาการปัจจุบันของหัวข้อสำคัญๆมีดังต่อไปนี้ (วัชร, 2536)

2.5.6.1

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR ในปัจจุบันมีดังนี้

- Taq DNA polymerase
- Vent DNA polymerase
- Deep Vent DNA polymerase
- RTth DNA polymerase (thermostable reverse transcription DNA polymerase)

2.5.6.2

เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (PCR automation)

ในปัจจุบันเครื่องอัตโนมัติสำหรับควบคุมปฏิกิริยา PCR ที่มีผลผลิตจำหน่ายแบ่งตามระบบการทำงานของเครื่องเป็น 6 ระบบดังนี้

1. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้เครื่อง heater ให้ความร้อน และใช้ระบบ air-compressor ให้ความเย็น ตัวอย่างได้แก่ เครื่องอัตโนมัติ 3 รุ่นที่ผลิตจำหน่ายโดยบริษัท Perkin Elmer Cetus
 - DNA Thermal Cycle
 - DNA Thermal Cycle 480
 - GeneAmp PCR System 9600
2. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ heater ทำความร้อน และระบายอากาศด้วยน้ำประปา (tapwater) หรือมีระบบทำน้ำเย็น (water cooling unit) มาต่อเพิ่มเติมต่างหาก ตัวอย่างได้แก่
 - Microcycler (Eppendorf)
 - Bioexcellence DNA incubation (Bioexcellence)
3. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ระบบ Peltier (Thermoelectric heat pump หรือ Solidstate heating and cooling) ในการควบคุมอุณหภูมิ ตัวอย่างได้แก่
 - Temperature Cycle (Coy)
 - Temperature Cycle (Pharmacia)
 - Gene ATAQ (Pharmacia)
4. เครื่องอัตโนมัติที่มีโครงสร้างการทำงานแบบตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (oven) ตัวอย่างเช่น
 - ISS
 - Pro-Oven
5. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลอดไฟทำความร้อนและระบายความร้อนด้วยพัดลม ตัวอย่างเช่น
 - Thermal Reaction (Hybrid)
6. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้อากาศเป็นตัวส่งผ่านความร้อน และความเย็น ตัวอย่างเช่น
 - 1605 Air Thermo-Cycle (ATC)

2.5.6.3 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer) และตัวติดตาม (Probe)

ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยออกแบบไพรเมอร์และตัวติดตาม ซึ่งสามารถช่วยอำนวยความสะดวก และลดเวลาในการออกแบบและเลือกไพรเมอร์กับตัวติดตามที่ต้องการ โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ใช้คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆที่มีประโยชน์
2. เลือกซอฟต์แวร์ (Software) สำเร็จรูปที่เป็น Automatic primer-probe design program มีจำหน่ายเป็นจำนวนมากให้เลือกใช้ได้

2.5.6.4 การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) และตัวติดตาม

ก่อนปี ค.ศ.1985 การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เนื่องจากเครื่องสังเคราะห์อัตโนมัติมีราคาแพง และค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ (operating costs) ต่อ 1 เบสสูง ในปี ค.ศ.1985 เครื่องสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ยุคที่ 2 ถูกพัฒนาเป็นระบบ streamlined และ solid support synthesis สามารถสังเคราะห์พร้อมกันได้ครั้งละหลายโอลิโกนิวคลีโอไทด์และค่าใช้จ่ายก็ถูกลง

2.5.6.5 เทคนิค PCR

การพัฒนาด้านเทคนิคใน PCR เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็วตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย การดัดแปลงจากเทคนิค PCR พื้นฐานก่อให้เกิดเทคนิคขั้นสูง (Advanced PCR techniques) จำนวนมาก ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ศักยภาพ และลดปัญหาอุปสรรคต่างๆของปฏิกิริยา PCR ยกตัวอย่างเช่น Booster PCR, Asymmetric PCR เป็นต้น แต่ละเทคนิคมีหลักการและประโยชน์ในการประยุกต์ใช้แตกต่างกัน ในปัจจุบันเทคนิคต่างๆเหล่านี้มีประโยชน์ครอบคลุมวัตถุประสงค์ต่างๆ ในงานวิจัยอย่างครบถ้วน

2.5.7 วิธีมาตรฐานของ PCR (Standard PCR Protocol)

วิธีมาตรฐานในการทำ PCR กำหนดให้มีส่วนผสมต่างๆ รวมอยู่ในปริมาตร 50–100 ไมโครลิตร และปิดทับบนผิวบนของส่วนผสมของด้วยน้ำมัน (mineral oil) 75 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ

ส่วนประกอบของสารที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

- บัฟเฟอร์ PCR (buffer PCR) 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
- ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
- genomic DNA 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
- <i>Taq</i> DNA polymerase 2 หน่วยต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมลาร์	1.5 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	35 ไมโครลิตร
- ปริมาตรทั้งหมด	50 ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยาย (amplification) เกิดขึ้นโดยกระบวนการ 3 ขั้นตอน ซึ่งควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามที่กำหนดโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ โดยตั้งเครื่องให้มีสภาวะการทำงานดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้
Denaturation	90 – 95	30 – 60 วินาที
Primer annealing	40 – 60	30 – 60 วินาที
Primer extension	70 – 75	1 – 2 นาที
ทำซ้ำจำนวน 25 – 30 รอบ		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบสุดท้ายทำ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิธีมาตรฐานดังกล่าวสามารถใช้เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่มีขนาดความยาวตั้งแต่ 150–2,951 คู่เบสให้ได้ผลดีและมีความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามในบางกรณีอาจใช้วิธีมาตรฐานไม่ได้ผลดี จำเป็นต้องปรับสภาวะการทำงานให้เหมาะสม เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR เกิดขึ้นสูงสุด ป้องกันปัญหาต่างๆที่อาจเกิดขึ้น เช่น ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR หรือเกิดน้อย หรือเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ เป็นต้น

2.5.8 ปัจจัยในการปรับสภาวะการทำงาน (วัชร, 2536)

2.5.8.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

Taq DNA polymerase เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ซื้อได้จากผู้ผลิตหลายบริษัท ซึ่งอาจมีความแตกต่างในเรื่องของสภาวะที่ทดสอบ (assay condition) และ คำนิยามกำหนดหน่วยวัดแอกติวิตี (unit definitions) ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นใช้ควรทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ซึ่งอยู่ในช่วง ตั้งแต่ 0.5–5 หน่วยต่อ 100 ไมโครลิตรและตรวจผลโดยวิธีการอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในการทำ PCR ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปเป็นผลให้มีการสะสมผลิตภัณฑ์ที่เป็น nonspecific background เกิดขึ้น แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการมีปริมาณน้อย เกณฑ์กำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มาตรฐาน 1–2.5 หน่วยต่อ 100 ไมโครลิตรของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

2.5.8.2 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (Magnesium ion)

ผลของปฏิกิริยา PCR ขึ้นกับความเข้มข้นของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ถ้ามีความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของแมกนีเซียม ซึ่งมีผลต่อการเกิด primer annealing (อุณหภูมิที่ทำให้การแยกจากกันของดีเอ็นเอแม่พิมพ์) การเกิด primer-dimer artifacts และ ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR ต้องการความเข้มข้นของแมกนีเซียม อยู่ในช่วง 0.5–2.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับกรณีที่มีดีออกซีนิวคลีอัสไทรฟอสเฟต (dNTPs) 200 ไมโครโมลาร์ แต่ถ้าในสารละลายของไพรเมอร์หรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์

มี EDTA หรือสาร chelators ชนิดอื่นๆจะมีผลโดยตรงต่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมในปฏิกิริยา PCR

2.8.5.3 ความเข้มข้นของไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphate, dNTPs)

ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ปกติจะมีความเข้มข้นของไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตแต่ละตัวอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมลาร์ โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่พีเอช 7 และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV- spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น stock มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แบ่งเป็น working stock solution ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ แบ่งเป็น aliquots เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส (ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตสามารถจับกับแมกนีเซียม) ปริมาณไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตในปฏิกิริยาจะเป็นตัวกำหนดปริมาณแมกนีเซียม ฉะนั้นถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตมากๆ ควรจะต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมให้เหมาะสมด้วย

ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตทั้ง 4 ชนิด ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาควรจะมีมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดสมดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ปริมาณผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงต่อลำดับคู่สม

2.5.8.4 ความสำคัญขององค์ประกอบอื่นๆในปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์ที่ควรใช้สำหรับ PCR คือ บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 10-15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.3-8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส แต่พีเอชที่แท้จริงในสภาวะของ PCR (thermal cycling condition) เปลี่ยนแปลงจาก Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.3 ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นพีเอช 6.8-7.8 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อเร่ง primer annealing กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ถ้ามีความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ หรือ โซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 50 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์

2.5.8.5 Taq DNA polymerase

เจลาติน (Gelatin) และ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) และ สารทำให้ง่ายต่อการเกิดฟองที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) เช่น ทวิน 20 (Tween 20) หรือ ลอริท 12 (Laureth 12) (0.05–0.1เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์

2.5.8.6 สภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอน Primer extension

เวลาในการเกิด extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย อุณหภูมิที่เลือกใช้ primer extension ตามหลักการปฏิบัติควรทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส อัตราการต่อลำดับเบสที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 35–100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นกับพีเอชของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเกลือ และ ธรรมชาติของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เวลาในการเกิด extension 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่มีความยาวถึง 2 กิโลเบส อย่างไรก็ตามเวลาที่ยาวขึ้นในการเกิด extension ในรอบแรกก็จะมีประโยชน์ถ้ามีความเข้มข้นของสับสเตรทต่ำ และในรอบหลังของ PCR เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงเกินความเข้มข้นของเอนไซม์

2.5.8.7 สภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอน Denaturation

ความล้มเหลวของ PCR ส่วนมากเกิดจากการ denaturation ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target template) และ/หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่สมบูรณ์ สภาวะที่กำหนดสำหรับ denaturation คือ ที่ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที หรือ 97 องศาเซลเซียส 15 วินาที อย่างไรก็ตามอาจกำหนดอุณหภูมิสูงขึ้น การเกิด denaturation ที่ไม่สมบูรณ์เป็นผลให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA strand) เกิด “snapback” ทำให้ได้ผลผลิตลดลง ในทางตรงกันข้ามถ้าขั้นตอน denaturation กำหนดอุณหภูมิสูงเกินไป และ/หรือ เวลานานเกินไป จะนำไปสู่การสูญเสียแอกทิวิตีของเอนไซม์

2.5.8.8 จำนวนรอบ (Cycle number)

จำนวนรอบที่พอเหมาะขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อปรับองค์ประกอบอื่นๆของ PCR ให้เหมาะสมแล้ว ความผิดพลาดที่พบบ่อยคือ ทำจำนวนรอบมากเกินไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นผลให้เกิดปริมาณ และความยุ่งยากของผลิตภัณฑ์เป็น nonspecific background และถ้าทำจำนวนรอบน้อยเกินไปจะสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้น้อย ข้อแนะนำสำหรับจำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้นมีดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 จำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้น

จำนวน ดีเอ็นเอเป้าหมาย	จำนวนรอบ
$\times 10^5$	25 – 30
1.5×10^4	30 – 35
11×10^3	35 – 40
50	40 – 45

2.5.8.9 ปัจจัยอื่นๆ

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดเครื่องแก้ว และภาชนะที่ใช้น้ำที่ใช้ควรสะอาดและปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) เป็นต้น

2.5.9 การปนเปื้อน

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมาก ดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงไม่กี่โมเลกุลสามารถถูกเพิ่มจำนวนเป็นล้านๆ โมเลกุลได้ในเวลา 1–2 ชั่วโมง ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นแม้เพียงเล็กน้อยสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ง่าย (false positive) การปนเปื้อนอาจเกิดจาก

1. การปนเปื้อนระหว่างตรวจตัวอย่าง (cross-contamination) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงการเก็บ การเตรียม หรือ การแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง
2. การปนเปื้อนแบบ carry-over contamination เป็นการปนเปื้อนจาก amplified product จากหลอดหนึ่งเข้าไปอีกหลอดหนึ่ง วิธีการแพร่กระจายเกิดจากละอองลอย (aerosol) เช่น จากการวอเท็กซ์ การเปิดฝาหลอด และการปั่นหลอด การดูดสารละลายโดยใช้ปิเปต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.10 มาตรการในการป้องกันการปนเปื้อน

1. แบ่งพื้นที่ หรือห้องสำหรับงานก่อนและหลังการทำ PCR และจำเป็นต้องแยกวัสดุอุปกรณ์ เครื่องใช้ในการทำงานก่อนและหลังทำ PCR อย่างเด็ดขาด
2. การป้องกันก่อนทำปฏิกิริยา PCR (Pre-PCR sterilization) ซึ่งทำได้หลายวิธี
 - การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV sterilization)
 - การใช้รังสีแกมมา
 - การใช้เอนไซม์ยูราซิลดีเอ็นเอไกลโคซิลเลส (Uracil DNA glycoylase, UDG)
3. การป้องกันหลังการทำ PCR (Post-PCR sterilization) ใช้โดยกระบวนการโฟโตเคมีคอล (photochemical reaction) ไปทำให้ผลผลิตของ PCR สูญเสียสภาพการเป็นแม่พิมพ์
4. การใช้ positive displacement pipette หรือ การใช้ aerosol resistant tip เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก aerosol
5. การแบ่งน้ำยาลงขวดหรือหลอดเล็กๆ
6. การใช้ตัวควบคุมที่เหมาะสมร่วมในการทำ PCR ตัวควบคุมประกอบด้วย ตัวควบคุมชนิดบวก(positive control) และตัวควบคุมชนิดลบ (negative control)
7. การปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง เช่น การสวมและการเปลี่ยนถุงมือ การเปิดปิดหลอดอย่างระมัดระวัง การเช็ดทำความสะอาดบริเวณที่ปฏิบัติงาน

2.6 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

คือ การวิเคราะห์ผลผลิตผลิตภัณฑ์ PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) หลังจากการผ่านกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่สั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรืออะคริลามายด์ (acrylamide) 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอ

เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรืออะครีลาไมด์ (acrylamide) 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอ

2.6.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาด หรือ น้ำหนักโมเลกุลมากๆ ซึ่งไม่สะดวกหรือไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจลได้ ปัจจุบันอะกาโรสเจลเป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในการวิเคราะห์เพราะอะกาโรสเจลลักษณะมีรูตาข่ายของเจลขนาดใหญ่ และการเตรียมก็ง่ายกว่าโพลีอะครีลาไมด์เจล

อะกาโรสเป็นวุ้น (agar) ชนิดหนึ่ง ซึ่งได้จากส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ (cell wall) หรือส่วน intercellular matrix ของสาหร่ายสีแดง (*Rhodophyta*) เมื่อเริ่มแรกมีการนำวุ้นมาใช้เป็นตัวค้ำจุนในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แต่เนื่องจากตัววุ้นมีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟต (sulphate) กลูโคเนต (gluconate) เป็นต้น จึงทำให้เกิดปัญหาของอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นวุ้นที่ปราศจากประจุลบเหล่านี้เรียกว่า อะกาโรส และมีการนำอะกาโรสมาใช้แทนวุ้นในงานวิเคราะห์ต่างๆ มากมาย

2.6.2 หลักการ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสนี้ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) บนเจลจะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วยเอทิดีเอ็มโบรไมด์ ซึ่งจะสอดแทรก (intercalate DNA) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเรืองแสงในช่วงคลื่นของอุลตราไวโอเลต (ค่าความยาวคลื่นที่ 295 นาโนเมตร)

ในการวิเคราะห์จะอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่เคลื่อนในอะกาโรสเจล เช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยขึ้นกับ

1. ขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าขนาดเล็ก
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ที่มีรูปร่างขดเป็นวง จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายเส้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับบัฟเฟอร์ (buffers) ที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ จะใช้บัฟเฟอร์ พีเอช 8 เช่น Tris-acetate, Tris-borate และ Tris-phosphate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความแตกต่างกันคือ

Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ชั่วโมงตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจลยาวๆ หรือนานๆ

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีกรดบอริกเป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์ได้นาน Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่เจนนั้นไปละลายโดยใช้ โปตัสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) หรือโซเดียมเปอร์คลอเรท (sodiumperchlorate)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีลักษณะต่างกันออกจากกันได้ และ ผู้ใช้สามารถปรับรูต่ายของเจล ให้เหมาะสมกับงานโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเจลได้อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้

- *Aphanothece halophytica*
ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรรณ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 - *Anabaena siamensis*
 - *Calothrix* sp.
 - *Gloeocapsa* sp. Keutzig
 - *Hapalosiphon delicatulus*
 - *Spirulina* sp. Turpin
- ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)

3.2 วัสดุอุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Rancho Dominquez รุ่น Harvey Hydroclave MC10 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortechnik รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย
- เครื่องเขย่าเลี้ยงสาหร่าย (Shaker)
- เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries, Inc, Bohemia, N.Y. รุ่น genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) บริษัท Perkin Elmer รุ่น 480 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) บริษัท Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน
- เครื่องแก้ว (Glass equipment)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน
- เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) บริษัท Hoefer scientific Instruments รุ่น mighty bright ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กล้องถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท UVP รุ่น MOD 4912-511010000 ประเทศเยอรมนี

3.3 สารเคมี

- บัฟเฟอร์ Tris - EDTA (TE buffer) พีเอช 7.5
- ลูกบิดแก้ว (glass beads)
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) 10 เปอร์เซ็นต์
- โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (sodium lauryl sarcosine, SLS) 10 เปอร์เซ็นต์
- ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris - EDTA (TE saturated phenol)
- ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol-chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)
- คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- บัฟเฟอร์ Tris – buffer EDTA (TBE buffer) พีเอช 8.3 ประกอบด้วย Tris 0.89 โมลาร์ กรดบอริก 0.89 โมลาร์ EDTA 0.25 มิลลิโมลาร์
- อะกาโรส (agarose)
- tracking dye

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 (ดังแสดงส่วนประกอบในภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ขั้นตอนตั้งแต่การเตรียมอาหารจนถึงการเติมเชื้อต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อทุกขั้นตอน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้น 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน ในกรณีของเชื้อ *Aphanothece halophytica* ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 2 สูตร คือ BG11 กับ อาหารสูตรเฉพาะ (Turk Island Salt solution and modified BG11 medium ดังแสดงส่วนประกอบในภาคผนวก ข)

3.4.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากความเค็ม

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียตามวิธีการในข้อ 3.4.1 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร ในอาหาร BG11 หรืออาหารสูตรเฉพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ให้ความเข้มข้น 1,000 ลักซ์ ตลอดเวลา โดยให้ความเข้มข้นของไซยาโนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากัน วัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงโดยปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนผสมที่ดูดเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ TE 400 ไมโครลิตร จากนั้นเติมลูกปัดแก้ว (glass bead) 200 ไมโครลิตร โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium dodecyl sulfate, SDS) 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซีน 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium lauryl sarcosine, SLS) 8 ไมโครลิตร และฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol) 400 ไมโครลิตร แล้วเขย่าอย่างแรง (vortex) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำส่วนใสที่ได้มาสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol-chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) โดยเติมลงไป 1 เท่าของส่วนใสที่ทำการสกัด แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนบนใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ ขั้นตอนมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 2 ครั้ง โดยเติมไป 1 เท่า ของปริมาตร โดยแต่ละครั้งปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ประมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติมเอทานอล (ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้งไป นำตะกอนดีเอ็นเอมาเติมเอทานอล (ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดทดลองรอจนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 ไมโครลิตร

3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

เตรียมเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง อะกาโรส 0.64 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) พีเอช 8.3 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ สารละลายที่ได้มีความใส ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไว้ให้อุ่น เทลงในแม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติม บัฟเฟอร์ Tris-boric EDTA ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสม tracking dye ลงในช่องแรก ช่องถัดไปเป็นดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรีย โดยผสม tracking dye กับดีเอ็นเอก่อนที่จะหยอดลงแผ่นเจล โดยแต่ละช่องใช้ tracking dye 1 มิลลิลิตร

ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง ทำการย้อมเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่น้ำ 30 นาที ดูแถบที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทำการถ่ายรูปเจลเก็บไว้

3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบเป็นลูกโซ่ ซึ่งจะใช้ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และจำเป็นต้องมีส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

ส่วนประกอบของสารที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR

- บัฟเฟอร์ PCR (buffer PCR) 10 เท่า	5 มิลลิลิตร
- ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
- genomic DNA 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
- <i>Taq</i> DNA polymerase 2 หน่วยต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมลาร์	1.5 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	35 ไมโครลิตร
- ปริมาตรทั้งหมด	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ชั้น	อุณหภูมิที่ใช้ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1	94	5
2	94	0.5
	35	1
	72	2
	ชั้น 2 ทำ 35 รอบ	
3	72	10
4	20	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด

สกัดดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10

ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ

แถบที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) ๗ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind III*

แถบที่ 1 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Aphanothece halophytica*

แถบที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Anabaena siamensis*

แถบที่ 3 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Calothrix* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แถบที่ 4	คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก <i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig
แถบที่ 5	คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก <i>Hapalosiphon delicatulus</i>
แถบที่ 6	คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก <i>Spirulina</i> sp. Turpin

จากรูปที่ 10 วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่ทำการศึกษามีประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

4.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR

ในการออกแบบไพรเมอร์นั้น จะเลือกลำดับที่คล้ายคลึงของกรดอะมิโนของเอนไซม์ บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอท และยูคาริโอท ซึ่งเราจะนำบริเวณที่มีความคล้ายคลึงมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ในการทดลองนี้จะใช้โปรคาริโอท 2 ชนิด คือ *Staphylococcus xylosus* และ *Bacillus subtilis* และ ยูคาริโอท 5 ชนิด ที่ใช้ คือ *Sorghum bicolor*, *Beta vulgaris*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Oryza sativa*, *Spinacia oleracea*

ขั้นตอนการทำงานจะใช้คอมพิวเตอร์ช่วย โดยหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของเอนไซม์ บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของโปรคาริโอท และยูคาริโอท จากเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information จากนั้นนำลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มา align โดยใช้เว็บไซต์ของ toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html/>) ก็จะได้บริเวณที่เหมือนกัน (สีแดง) ใกล้เคียงกัน (สีน้ำเงิน) หรือแตกต่างกัน (สีดำ) และนำบริเวณที่เหมือนกันมาใช้ออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ในการทดลองนี้ ทำการ align 2 แบบ คือ แบบแรกนำโปรคาริโอท และ ยูคาริโอทมา align กัน แบบที่สอง คือ นำเฉพาะยูคาริโอทมา align กัน

ในแบบแรกนั้น จากการทำ align (แสดงผลดังรูปที่ 11) และได้ทำการเลือกตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน โดยเลือกกรดอะมิโนช่วงต้นที่เหมือนกันเพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ปลายด้าน 5' พบว่าในช่วงเริ่มต้น (กรดอะมิโนลำดับที่ 1-162) มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันเพียงเล็กน้อย

ลำดับของกรดอะมิโน 7 ตัว (สำหรับทำไพรเมอร์ 20 เบส) ที่คล้ายคลึงกันมาก คือ PWNYPPL (ลูกศรชี้) ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 163-169 นำลำดับของกรดอะมิโน PWNYPPL มาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'- CC(AT)TGGAA(C/T)TA(C/T)CC(AT/G)CT(AG)(C/T)T -3' เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB1 และทำการเลือกกรดอะมิโนช่วงปลายที่เหมือนกันเพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ปลายด้าน 3' พบว่าในช่วงปลาย (กรดอะมิโนลำดับที่ 405-510) มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันเพียงเล็กน้อย ลำดับของกรดอะมิโน 7 ตัว (สำหรับทำไพรเมอร์ 20 เบส) ที่คล้ายคลึงกันมากคือ EEVFGVP (ลูกศรชี้) ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 398-404 นำลำดับของกรดอะมิโน EEVFGVP มาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'- GAC(AT)GG(A/C)CC(A/G)AA(A/G)ACTTC(C/T)T -3' เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB2

ในแบบที่สอง จากการ align ลำดับกรดอะมิโนในยูคาริโอต พบว่ากรดอะมิโนจะมีความคล้ายคลึงกันมากกว่าในแบบแรก (แสดงผลดังรูปที่ 12) (สังเกตจากอักษรสีแดง) ได้ทำการเลือกตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน โดยเลือกกรดอะมิโนช่วงต้นที่เหมือนกันเพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ปลายด้าน 5' ลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันมาก คือ IGDIPA (ลูกศรชี้) ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 38-43 นำลำดับของกรดอะมิโน IGDIPA มาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'- CAT(C/T)GGTG(AT)TATTC(T/G)GC(A/G)C -3' เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB3 และทำการเลือกกรดอะมิโนช่วงปลายที่เหมือนกันเพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ปลายด้าน 3' พบว่าในช่วงปลายลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันมากคือ PWGWYRP (ลูกศรชี้) ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 498-504 นำลำดับของกรดอะมิโน PWGWYRP มาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'- CCCCTACCATGTTCAGAGGA -3' เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB4

[illegible]

รูปที่ 12* การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในยุงคาลิโอบา สำหรับออกแบเป็เฟรมเวิร์ค BetB3 กับ BetB4 ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนช่วง 38-43 คือเฟรมเวิร์ค BetB3 และตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนช่วง 498-504 คือเฟรมเวิร์ค BetB4 (ตามลูกศรชี้)

*หมายเหตุ
รูปที่ 11-12 สีแดง แทน การลดอสมิโนะโทเฮมิกัน สีน้ำเงิน แทน การลดอสมิโนะโทไกลิเคิลเอียงกัน สีดำ แทน การลดอสมิโนะโทแตกต่างกัน

4.3 การเพิ่มปริมาณยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส โดยวิธี PCR

นำดีเอ็นเอไฮยาโนแบคทีเรียที่สกัดได้ มาหาปริมาณยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสโดยการจับคู่กับไพรเมอร์ที่ออกแบบ แล้วทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยนอกจากจะทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1-BetB2 และคู่ BetB3-BetB4 แล้วยังได้ทำการจับคู่ไพรเมอร์ BetB1-BetB4 และ BetB2-BetB3 เนื่องจาก BetB1 และ BetB3 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับจับตำแหน่งด้าน 5' และ BetB2 และ BetB4 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับจับตำแหน่งด้าน 3' โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้จะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ ขนาดของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้

ไพรเมอร์	ขนาดที่ได้ (คู่เบส)
BetB1 – BetB2	720
BetB 1 - BetB4	1114
BetB 2 – BetB3	1020
BetB 2 - BetB4	1414

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่ แล้วทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าไม่พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1 – BetB2 (ผลไม่ได้แสดง) ไพรเมอร์คู่ที่ใช้แล้วพบยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสคือ ไพรเมอร์คู่ BetB1 – BetB4 และไพรเมอร์คู่ BetB2 – BetB3 ซึ่งผลที่ได้แสดงในรูปภาพที่ 13 และ 14 ตามลำดับ

แถบที่

M 1 2 3 4 5 6

2,000 bp
1,800 bp
1,600 bp
1,400 bp
1,200 bp
1,000 bp
800 bp

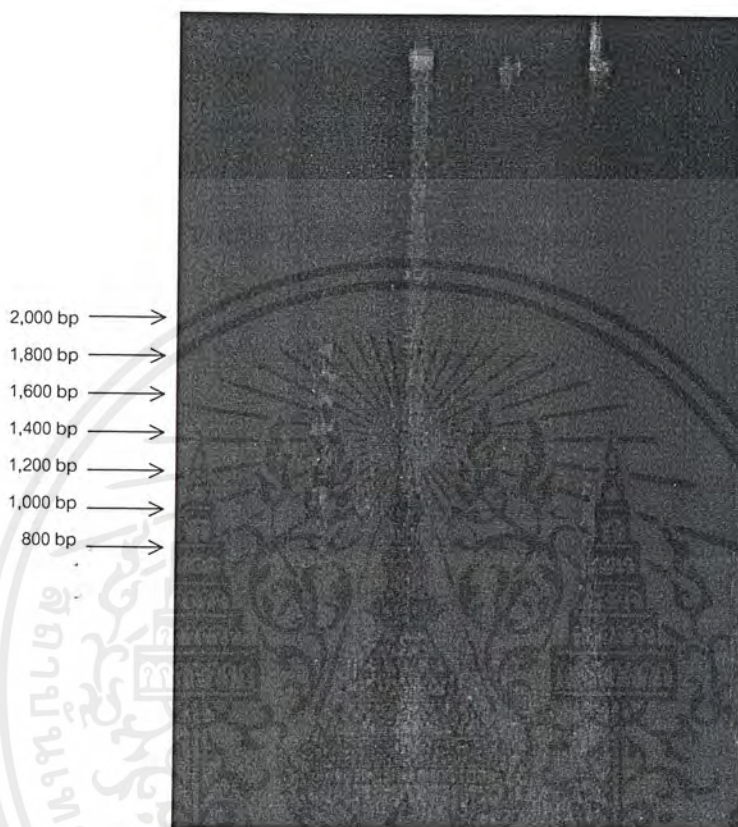


รูปที่ 13 แถบดีเอ็นเอของยีนไกลซีนปีเทินอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB₁ กับ BetB₄ แถบที่ 1 ถึง 6 แสดงแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด

แถบ M	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ Bioladder (800, 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800, 2,000 คู่เบส)
แถบที่ 1	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Aphanothece halophytica</i>
แถบที่ 2	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Anabaena siamensis</i>
แถบที่ 3	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Calothrix</i> sp.
แถบที่ 4	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig
แถบที่ 5	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Hapalosiphon delicatulus</i>
แถบที่ 6	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Spirulina</i> sp. Turpin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แถบที่ M 1 2 3 4 5 6



รูปที่ 14 แถบดีเอ็นเอของยีนไกลซีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB2 – BetB3 แถบที่ 1 ถึง 6 แสดงแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่สกัดมาได้จากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด

แถบ M	คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ Bioladder (800, 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800, 2,000 คู่เบส)
แถบที่ 1	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Aphanothece halophytica</i>
แถบที่ 2	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Anabaena siamensis</i>
แถบที่ 3	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Calothrix</i> sp.
แถบที่ 4	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig
แถบที่ 5	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Hapalosiphon delicatulus</i>
แถบที่ 6	คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>Spirulina</i> sp. Turpin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

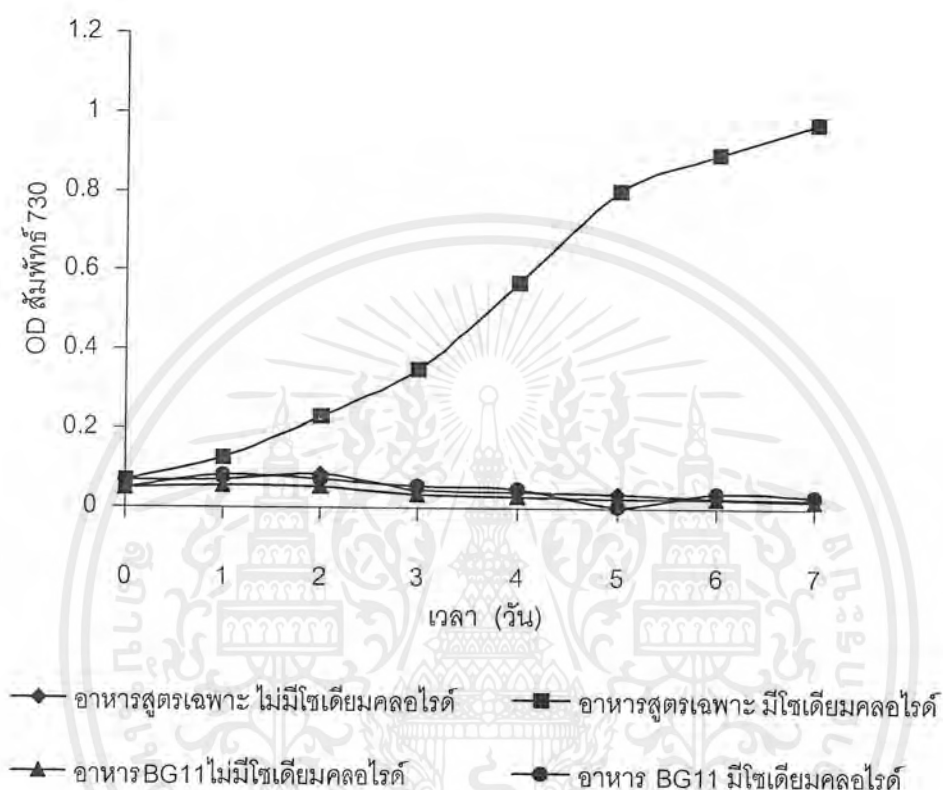
จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1 กับ BetB4 พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *A. halophytica* (แถบที่ 1) โดยพบแถบที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งขนาดที่ได้มีความใกล้เคียงกับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้ คือมีขนาด 1,114 คู่เบส และนอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอจาก ๆ ที่มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบสอีกด้วย จากการทดลองไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis*, *Calothrix* sp., *Gloeocapsa* sp. Keutzig, *H. delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin

จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ BetB2 - BetB3 ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *A. halophytica* (แถบที่ 1) โดยพบแถบที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งขนาดที่ได้มีความใกล้เคียงกับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้ คือมีขนาด 1,020 คู่เบส จากการทดลองไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis*, *Calothrix* sp., *Gloeocapsa* sp. Keutzig, *H. delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin

4.4 การเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆในสภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากความเค็ม

การทดลองนี้ทำเพื่อสนับสนุนผลจากการทำ PCR โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 และอาหารสูตรเฉพาะ (ในกรณีของ *A. halophytica*) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองมาสร้างกราฟโดยให้แกนนอน (แกน x) คือเวลามีหน่วยเป็นวัน และแกนตั้ง (แกน y) คือ ค่าการดูดกลืนแสงสัมพัทธ์ที่ 730 นาโนเมตร พบว่าการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 3 ลักษณะ ดังนี้

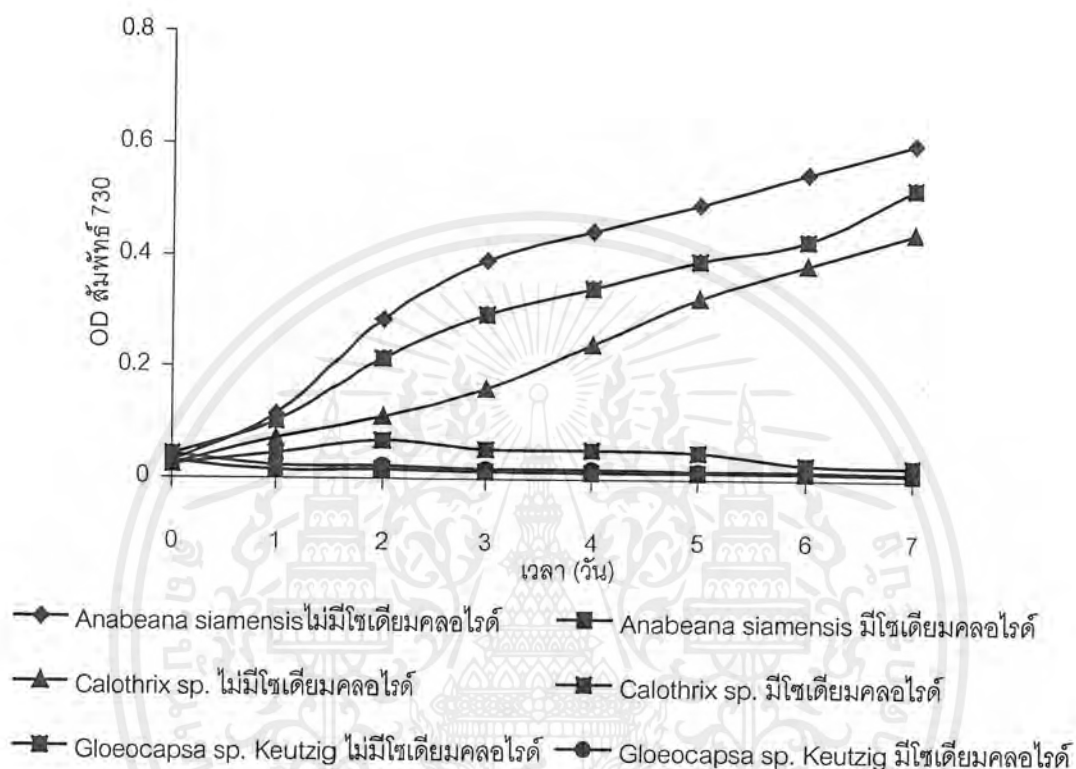
1. การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ในสถานะที่มีและไม่มีไซโตไคนมคลอไรด์



รูปที่ 15 การเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ในสถานะที่มีและไม่มีไซโตไคนมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารสูตรเฉพาะ และอาหาร BG11 ที่มีและไม่มีไซโตไคนมคลอไรด์พบว่า *A. halophytica* เจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตรเฉพาะที่มีไซโตไคนมคลอไรด์เท่านั้น ดังนั้นจากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าอาหาร BG11 ที่มีและไม่มีไซโตไคนมคลอไรด์ และอาหารสูตรเฉพาะที่ไม่ได้เติมไซโตไคนมคลอไรด์เป็นอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *A. halophytica*

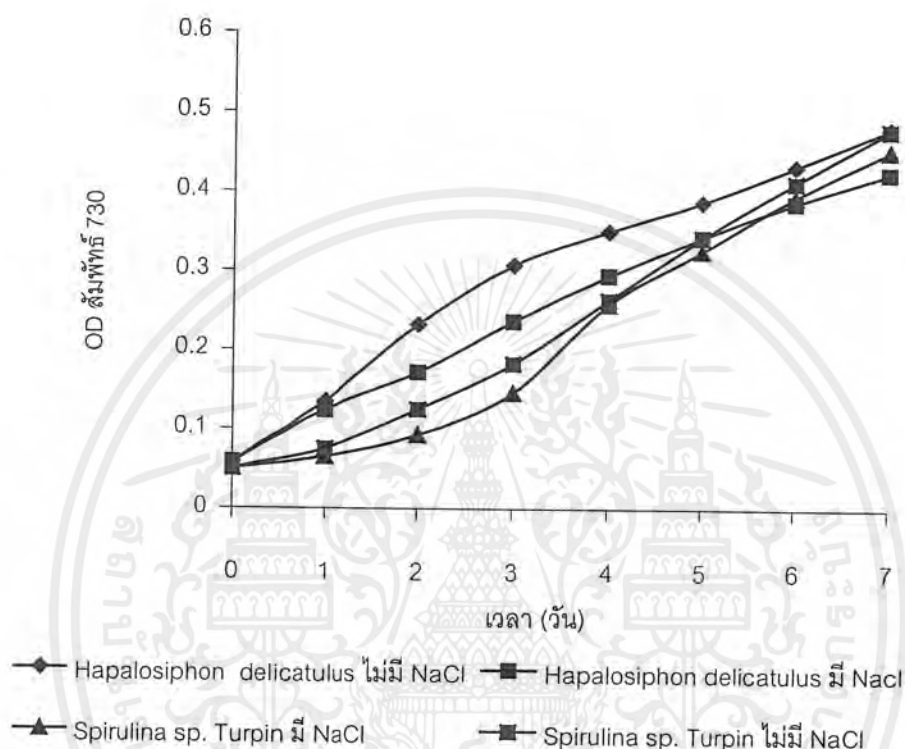
2. การเจริญเติบโตของ *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig ในอาหาร BG11 ในสภาวะที่มีและไม่มีไซโตเคมิคัลไรต์



รูปที่ 16 การเจริญเติบโตของ *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig ในอาหาร BG11 ในสภาวะที่มีและไม่มีไซโตเคมิคัลไรต์ 30 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig ในอาหาร BG11 ที่มีและไม่มีไซโตเคมิคัลไรต์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญเติบโตได้ดีในอาหาร BG11 ที่ไม่มีไซโตเคมิคัลไรต์ แต่ไม่เจริญเติบโตในอาหาร BG11 ที่มีไซโตเคมิคัลไรต์ นอกจากนี้ยังพบว่า *A. siamensis* มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า *Gloeocapsa* sp. Keutzig และ *Calothrix* sp.

3. การเจริญเติบโตของ *Hapalosiphon delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin ในอาหาร BG11 ในสถานะที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 17 การเจริญเติบโตของ *Hapalosiphon delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin ในอาหาร BG11 ในสถานะที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยง *Hapalosiphon delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin ในอาหาร BG11 ที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารทั้งสอง โดยมีการเจริญเติบโตในอาหาร BG11 ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ดีกว่าในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียตัวอย่างได้ 1 สัปดาห์ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะการอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่เท่ากันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากไฮยาโนแบคทีเรียตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมีอัตราการเจริญ อายุของเซลล์เริ่มต้น และองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน ในกรณีที่เซลล์มีผนังหนาการสกัดดีเอ็นเอจะทำได้ยาก นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งปริมาณที่ได้อยู่ระหว่าง 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร การปนเปื้อนจาก DNase จะทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกย่อยสลายโดยมีลักษณะเป็นปื้นอยู่ด้านบนของแถบ หรือไดอาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากซึ่งจะพบเป็นแถบอยู่ด้านล่างของแผ่นเจล อาจพบการปนเปื้อนจากโปรตีนได้เล็กน้อย

ก่อนจะนำดีเอ็นเอไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่ จะต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ก่อน โดยการออกแบบจะทำ 2 ลักษณะ ลักษณะแรกนำกรดอะมิโนของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งได้จากโปรคาริโอท และยูคาริโอทนำมา align กัน และเลือกบริเวณที่คล้ายคลึงกันออกมา 2 บริเวณ โดยบริเวณแรกเป็นช่วงต้น ใช้สำหรับจับที่ปลายด้าน 5' จะได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น PWNYPPL เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB1 และบริเวณช่วงท้ายใช้สำหรับจับปลายด้าน 3' จะได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น EEVFGPV เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB2 ลักษณะที่ 2 จะใช้ลำดับกรดอะมิโนของของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในยูคาริโอทมา align กัน และเลือกบริเวณที่คล้ายคลึงกันออกมา 2 บริเวณ โดยบริเวณแรกเป็นช่วงต้นใช้สำหรับจับที่ปลายด้าน 5' จะได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น IGDIPA เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB3 และบริเวณช่วงท้ายใช้สำหรับจับปลายด้าน 3' จะได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น PYGWYRP เรียกไพรเมอร์นี้ว่า BetB4 นำไพรเมอร์ที่ได้ 4 ตัวมาจับคู่กันเพื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่ เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1-BetB2, BetB1-BetB4, BetB2-BetB3 และคู่ BetB3-BetB4 คาดว่าจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 720, 1,114, 1,020, และ 1,414 คู่เบส ตามลำดับ

จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่และวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซิส พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1-BetB4 และคู่ BetB2-BetB3 จะปรากฏแถบ ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ใน *Aphanothece halophytica* สำหรับไพรเมอร์คู่ BetB1-BetB4 จะพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 1,000 และ 1,600 คู่เบส เมื่อเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (bioladder) ซึ่งใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คำนวณได้ใน ทางทฤษฎีที่มีขนาด 1,114 คู่เบส และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB2-BetB3 ใน *A. halophytica* จะ ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน ซึ่งใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คำนวณได้ในทางทฤษฎี ที่มีขนาด 1,020 คู่เบส ในกรณีของไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาศึกษา เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ จะ ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR สาเหตุที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ บอขนาดได้อย่างคร่าวๆ อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่มีความจำเพาะเจาะจงสูงเมื่อใช้จับคู่กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการทำ ปฏิกิริยา PCR หรือไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้ สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ต้องมีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้เหมาะสม โดยจากการศึกษาในนี้ an annealing ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR แต่เมื่อ ศึกษา ที่สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งการใช้อุณหภูมิต่ำ ไพร-เมอร์จะสามารถจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำๆ เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1- BetB2จะไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์PCRในไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาศึกษา และเมื่อใช้ ไพรเมอร์คู่ BetB3-BetB4 ใน *Hapalosiphon delicatulus* จะพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เป็นแถบจางๆ จนไม่สามารถถ่ายรูปมาแสดงผล

นอกจากนี้ยังศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย เพื่อสนับสนุนผลของปฏิกิริยา PCR ข้างต้น โดยเฉพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะที่มีความเครียดเนื่องจากความเค็ม โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร ในอาหาร BG11 และอาหารสูตรเฉพาะ จากการเพาะ เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย สามารถจัดแบ่งไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกสามารถ เจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เท่านั้น ได้แก่ *A. halophytica* กลุ่มที่สอง สามารถ เจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ ได้แก่ *H. delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin กลุ่มสุดท้ายไม่เจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ได้แก่ *Anabaena* *siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. halophytica เจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตรเฉพาะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำปฏิกิริยา PCR ที่พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR โดยช่วยสนับสนุนว่า *A. halophytica* สามารถสร้างสารไกลซีนบีเทนเพื่อรักษาแรงดันออสโมติกในเซลล์ทำให้ *A. halophytica* เจริญได้เฉพาะอาหารที่มีความเค็มสูง

H. delicatulus และ *Spirulina* sp. Turpin สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ แต่อัตราการเจริญจะแตกต่างกันโดยจะเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ *Spirulina* sp. Turpin เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำเค็ม มีกลไกการควบคุมสมดุลแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ซึ่งอาจเป็นสารอื่นที่ไม่ใช่สารไกลซีนบีเทนเพราะจากการทำปฏิกิริยา PCR ไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ตัวอย่างสารที่ควบคุมแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ เช่น sucrose, trehalose และ glucosyl-glycerol ในกรณีของ *H. delicatulus* เป็นเซลล์ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน มีการเจริญเติบโตแบบช้าๆ ดังนั้นในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์อาจมีกลไกการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดซึ่งดำเนินไปอย่างช้าๆพร้อมกับการเจริญ ซึ่งจากการทำปฏิกิริยา PCR จะเห็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR เป็นแถบจางๆ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. ในอาหาร BG11 ที่มีโซเดียมคลอไรด์พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีการเจริญเติบโต เนื่องจากทั้งสามสายพันธุ์เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด จึงไม่มีกลไกในการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทำปฏิกิริยา PCR แต่ถึงอย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ในอาหารน้อยกว่า 30 กรัมต่อลิตร หรือที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่ำๆ ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อาจเจริญเติบโตได้

จากผลการทดลองและวิจารณ์สามารถสรุปผลรวมได้ดังนี้

1. เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB1-BetB4 และ BetB2-BetB3 จะพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ใน *A. halophytica* และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ BetB3-BetB4 จะพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ใน *H. delicatulus* เป็นแถบจางๆ
2. *A. halophytica* มียีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จึงสามารถเจริญเติบโตในอาหารสูตรเฉพาะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. *H. delicatulus* อาจมียีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และมีกลไกการสร้างสารควบคุมสมดุลออสโมติก จึงสามารถเจริญเติบโตในกรณีอาหาร BG11 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร
4. *Spirulina* sp. Turpin เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำกร่อย สามารถสร้างสารอื่นที่ไม่ใช่สารไกลซีนบีเทนขึ้นมาควบคุมสมดุลออสโมติก จึงสามารถเจริญเติบโตในอาหาร BG11 ที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร
5. *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp. และ *Gloeocapsa* sp. Keutzig เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืด ไม่มียีนบีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จึงไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหาร BG11 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร



ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อยาโนแบคทีเรีย

BG11 Medium (ลัดดา, 2542)

Ingredient	Concentration (g/l)
NaNO_3	1.5
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.036
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_{10}$	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA Na_2	0.001
Na_2CO_3	0.02
Trace element	1 ml
Trace element (g/l)	
H_3BO_3	2.86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.390
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.049

สารละลายอาหารสูตรนี้หลังผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อและทำให้เย็นแล้วปรับพีเอชเป็น 7.4

สูตรอาหารนี้เตรียมได้จาก stock สารละลายของแต่ละสารเคมีไว้ก่อนซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้ที่ยุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส Ferric ammonium citrate ที่ใช้ต้องผ่านการกรองฆ่าเชื้อโดยกรองด้วย Millipore filter ใช้กระดาษกรองขนาด 22 ไมครอน และใส่สารละลายที่กรองแล้วลงในอาหาร BG11 ก่อนนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

Turk Island Salt solution และ Modified BG11 medium

1. Turk Island Salt solution (1 liter)

Stock solution A

KCl	6.66	g
MgCl ₂ .6H ₂ O	55	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	14.66	g

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

Stock solution B

MgSO ₄ .7H ₂ O	74.8	g
--------------------------------------	------	---

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. Composition of modified BG11 medium (BG 11 medium + NaNO₃ solution)

NaNO ₃	150	g/l	10 ml
KH ₂ PO ₄	32	g/l	1 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	60	g/l	1 ml
CaCl ₂	28.8	g/l	1 ml
Na ₂ CO ₃	16	g/l	1 ml
Citric acid	4.8	g/l	1 ml
Na ₂ .EDTA	0.8	g/l	1 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	6	g/l	1 ml
Trace metal mix (ตามภาคผนวก ก)			1 ml

อาหารเลี้ยง *A. halophytica* เตรียมได้โดยใช้ละลายในข้อ 2 โดยการดูด NaNO_3 มา 10 มิลลิลิตร และดูดสารละลายที่เหลืออย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock solution A และ Stock solution B อย่างละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นผสมโซเดียมคลอไรด์ 26.16 กรัม ปรับพีเอช เป็น 7.6 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ



เอกสารอ้างอิง

- ลัดดา วงศ์รัตน์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542. ไซยาโนแบคทีเรีย แพลงก์ตอนพืช
- วัชร อรรถทิพพหลคุณ, มนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536.การออกแบบและปรับสภาพอะพอเหมาะของ PCR ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 154-162, โรงพิมพ์เรือนแก้ว
- วัชร อรรถทิพพหลคุณ, มนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536. วิวัฒนาการของ PCR technology ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 5-10, โรงพิมพ์เรือนแก้ว
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539. เทคนิคการโคลนยีนที่เพิ่มขยายโดยวิธี PCR การประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540. เทคนิค PCR ในการตรวจสอบและแยกจีโนม ประชุมเชิงปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1
- อรอนงค์ รัชตราเซนชัย, 2540. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับ PCR, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 24-33, สำนักพิมพ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- Andresen, P.A., Kaasen, I., Styrvoid, O.B., Bounlnois, G., and Strom, A.R. (1998) molecular cloning, Physical mapping and expression of the *bet* genes governing the osmoregulatory cholineglycine betaine pathway of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbial. 134:1737-1746.
- Boch, j., Kempf, B., Schmid, R., and Bremer, E. (1996) Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis* : Characterization of the *gbsAB* genes. J. Bacteriol. 178:5121-5129.
- Galinski, E.A., and Truper, H.G. (1982) Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. FFMS Microbiol. Lett. 13:357-360.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Incharoensakdi, A., Takabe, T., and Akazawa, T. (1986) Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Aphanothece halophytica*. *Plant Physiol.* 81:1044-1049.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S.Y., and Takabe, T. (1995) Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 27:307-315.
- Koo, S., Higgins, C.F., and Booth, J.R. (1991) Regulation of compatible solute accumulation in *Samanea typhimurium* : evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* 137:2617-2625.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J., and Storm, A.R. (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:1049-1064.
- McCue, K.F., and Hanson, A.D. (1992) Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from Sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18:1-11.
- Moore, D.L., Reed, R.H., and Stewart, W.D.P. (1987) A glycine betaine transport system in *Aphanothece halophytica* and other glycine betaine synthesizing cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 147:395-405.
- Peter, H., Burkovski, A., and Kramer, R. (1996) Isolation, characterization and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J. Bacteriol.* 179:5229-5234.
- Pocard, J.A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C., and Le Rudier, D. (1997) Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Rhizobium meliloti* 102F34. *Microbiol.* 143:1369-1379.
- Rhodes, D., and Hanson, A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:357-384.

- Robertson, D.E., Noll, D., Roberts, J.A., Menaia, G.F., and Boone, D.R. (1990) Detection of the osmoregulator betaine in methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:563-565.
- Weretilnyk, E.A., and Hanson, A.D. (1990) Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaption to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2745-2749.
- Wood, A.J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R.J., and Goldsbrough, P.B. (1996) Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum : molecular cloning and expression of two related genes. *Plant physiol.* 110:1301-1308.

