

การค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขที่ 2043
เลขทะเบียน 39882
วัน, เดือน, ปี 11.08.2544

b.....

ให้บริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Searching for hydrogenase genes 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 การค้นหาเอ็นไอโอดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่
โดย นางสาวบงกช ยะกั๊บ
นางสาวปฎิมา เพิ่มพูนพัฒนา
นางสาวปรางประไพ รอดบำเรอ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นำโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

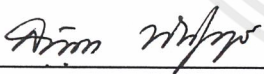

(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงการพิเศษ


(รศ.ดร.พรณี รุติภักดิ์)

ประธานกรรมการ


(ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ์)

กรรมการ


(อาจารย์ชวงค์ เอื้อสุขอารี)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่		
นักศึกษา	นางสาวบงกช	ยะก๊ีบ	รหัส 40053033
	นางสาวปวิมา	เพิ่มพูนพัฒนา	รหัส 40053038
	นางสาวปรางประไพ	รอดบำเรอ	รหัส 40053040
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
ปีการศึกษา	2543		

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีพลังงานอยู่อย่างจำกัด หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกได้ทำการวิจัยและพัฒนาเพื่อผลิตพลังงานทางเลือกใหม่ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียเป็นพลังงานที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนเร่งโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิด คือ Uptake และ Reversible hydrogenase โดยมียีนไฮโดรจีเนสที่แตกต่างกันทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จุดประสงค์ของโครงการพิเศษนี้คือ ค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่าง 5 ชนิด ได้แก่ *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp., *Gloeocapsa* sp. Keutzig, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลว BG 11 หลังจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR) โดยใช้ไพรเมอร์อนุรักษ์ของยีนทั้ง 2 ชนิด จากการทดลองพบว่าใน *Anabaena siamensis* และ *Hapalosiphon delicatulus* พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คำนวณได้ในทางทฤษฎี (1,529 คู่เบส) ใน *Anabaena siamensis*, *Gloeocapsa* sp. Keutzig และ *Spirulina* sp. Turpin พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,200, 1,100 และ 1,100 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คำนวณได้ในทางทฤษฎี (1,191 คู่เบส) ส่วนใน *Calothrix* sp. ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน ทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Searching for hydrogenase genes in cyanobacteria by method of Polymerase Chain Reaction (PCR)

Name Miss Bongkot Yagop
Miss Patima Pempoonpattana
Miss Prangprapai Rodbumrer

Special Project Advisor Dr.Saranya Phunpruch

Department Applied Biology

Academic Year 2000

Abstract

Nowadays energy is limited, several worldwide organizations have done researches and development in order to produce a new alternative energy which does not affect environment. Hydrogen energy from cyanobacteria is a very interesting source because it is produced by photosynthesis. Hydrogen producing reaction is catalyzed by enzyme hydrogenase which can be classified into 2 groups according to the directions of reaction. Uptake and reversible hydrogenases are encoded by different hydrogenase genes. The aim of this study is to search for hydrogenase genes in 5 cyanobacterial samples : *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp., *Gloeocapsa* sp. Keutzig, *Hapalosiphon delicatulus* and *Spirulina* sp. Turpin. Cyanobacteria were cultivated in BG11 medium. Genomic DNA was isolated and amplified by method of PCR using conservative primers of both genes. In *Anabaena siamensis* and *Hapalosiphon delicatulus*, PCR product bands of uptake hydrogenase gene with the approximate size of 1,500 bp (related to the estimated size 1,529 bp) were found. In *Anabaena siamensis*, *Gloeocapsa* sp. Keutzig and *Spirulina* sp. Turpin, PCR product bands of reversible hydrogenase gene with the approximate sizes of 1,200, 1,100 and 1,100 bp (related to the estimated size 1,191 bp) were found. In *Calothrix* sp., PCR product band of both genes was not found.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องมาจากความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์ คณะกรรมการโครงการพิเศษ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต และอาจารย์ ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ยิ่งแก่คณะผู้จัดทำ ด้วยเหตุนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่คอยอำนวยความสะดวกและคอยเอื้อเฟื้อ ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้งานในระหว่างการปฏิบัติงาน คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ พี่พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา พี่วิภาวี แบบประเสริฐ พี่ชมภรณ์ ธงเพ็ง พี่สาทินี ชี้อตรง และ พี่เชษฐ รัตนอาจารย์ ที่ให้ความช่วยเหลือ และแนะนำ เพื่อให้เกิดความถูกต้องในการปฏิบัติงาน นอกจากนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อข้อมูลต่างๆ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ ในระหว่างการดำเนินงานในการทำโครงการพิเศษนี้จนแล้วเสร็จ ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาไทย	I
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
2.1 การผลิตไฮโดรเจน (hydrogen production)	3
2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase)	5
2.3 ไชยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)	5
2.4 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)	13
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	29
3.2 อุปกรณ์	29
3.3 สารเคมี	30
3.4 วิธีการทดลอง	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในไชยาโนแบคทีเรีย	35
4.2 การออกแบบไพรเมอร์	36
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Uptake และ Reversible hydrogenase ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	
5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง	45
5.2 สรุปผลการทดลอง	47
ภาคผนวก	
ภาคผนวก 1	49
ภาคผนวก 2	50
ภาคผนวก 3	51
เอกสารอ้างอิง	52



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR	33
ตารางที่ 2 อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR	34
ตารางที่ 3 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของยีน Uptake hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	42
ตารางที่ 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของยีน Reversible hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	43



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง	3
รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างของ <i>Gloeocapsa</i> sp.	10
รูปที่ 3 ลักษณะรูปร่างของ <i>Spirulina</i> sp.	10
รูปที่ 4 ลักษณะรูปร่างของ <i>Anabaena</i> sp.	11
รูปที่ 5 ลักษณะรูปร่างของ <i>Calothrix</i> sp.	12
รูปที่ 6 ลักษณะรูปร่างของ <i>Hapalosiphon</i> sp.	12
รูปที่ 7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา PCR	15
รูปที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมวุ้นเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิลีคโตรโฟเรซิส	23
รูปที่ 9 ระบบการให้แสงและอุปกรณ์ที่ใช้เพื่อศึกษาแถบของดีเอ็นเอ	28
รูปที่ 10 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด	35
รูปที่ 11 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของ Uptake hydrogenase โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 73102	37
รูปที่ 12 การจัดเรียงลำดับของ Reversible hydrogenase โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ <i>Synechococcus</i> สายพันธุ์ PCC 6301, <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6308, <i>Prochlorothrix hollandica</i> และ <i>Anabaena variabilis</i>	39
รูปที่ 13 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยา PCR ของ Uptake hydrogenase ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิลีคโตรโฟเรซิส ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส	40
รูปที่ 14 ผลิตรหัสบาร์โค้ดปฏิกิริยา PCR ของ Reversible hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิลีคโตรโฟเรซิส ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส	41

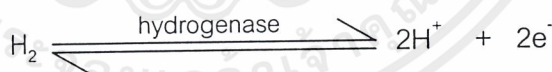
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

เมื่อพิจารณาถึงพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดในปัจจุบัน ได้มีความพยายามจากหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกวิจัยและพัฒนาเพื่อผลิตพลังงานทางเลือกใหม่ๆ ซึ่งจะต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันมีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical techniques) ในสหรัฐอเมริกาและมีการประดิษฐ์รถยนต์ขับเคลื่อนด้วยพลังงานไฮโดรเจนในประเทศเยอรมนี ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยให้ความสนใจพลังงานไฮโดรเจนในสหาร่ายและไซยาโนแบคทีเรียเพิ่มขึ้น เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่เกิดจากการแปรสภาพพลังงานแสงอาทิตย์ ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาทำให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในบริเวณเขตศูนย์สูตรซึ่งเหมาะเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงสหาร่ายและไซยาโนแบคทีเรียตามธรรมชาติและผลิตพลังงานดังกล่าว

ไฮโดรเจนเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอน ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) ปฏิกิริยานี้สามารถผันกลับได้ดังสมการ



ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ได้ 2 ชนิด

1. "Unidirectional" uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. "Bidirectional" reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยศึกษาเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง ไซยาโนแบคทีเรียมีคุณลักษณะเด่นและแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นคือ สามารถหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสังเคราะห์ด้วยแสงได้ออกซิเจนในออร์กาเนลเดียวกัน นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียยังมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายในพืช ในไซยาโนแบคทีเรียเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่มีมากเกินไปในเซลล์ มีรายงานตีพิมพ์เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนและไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย (Kerfin และ Boger, 1982, Houchins, 1984; Boichenko และ Hoffmann, 1994; Schulz, 1996; Appel และ Schulz, 1998) และมีรายงานการนำไบโอไฮโดรเจน (Biohydrogen) ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานสะอาด (Hall และคณะ, 1995; Schulz, 1996)

ในไซยาโนแบคทีเรียจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพียง 2 ชนิด ชนิดแรก Uptake hydrogenase ซึ่งพบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ และในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a, b) Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรก และอธิบายการจัดเรียงของดีเอ็นเอของหน่วยย่อย (Subunit) ใหญ่ของยีน Uptake hydrogenase (*hupL*) เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของ Uptake hydrogenase ใน *Nostoc* (Oxefelt และคณะ, 1998) ชนิดที่ 2 Reversible hydrogenase พบทั่วไปในไซยาโนแบคทีเรีย จนกระทั่งถึงปัจจุบันมีรายงานลำดับเบสของยีนนี้ในไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Anacystis nidulans* (Schmitz และคณะ, 1995; Boison และคณะ, 1996) และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel และ Schulz, 1996)

ไฮโดรเจนเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อค้นหาเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่สนใจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตพลังงานไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานแหล่งใหม่ที่สะอาดในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

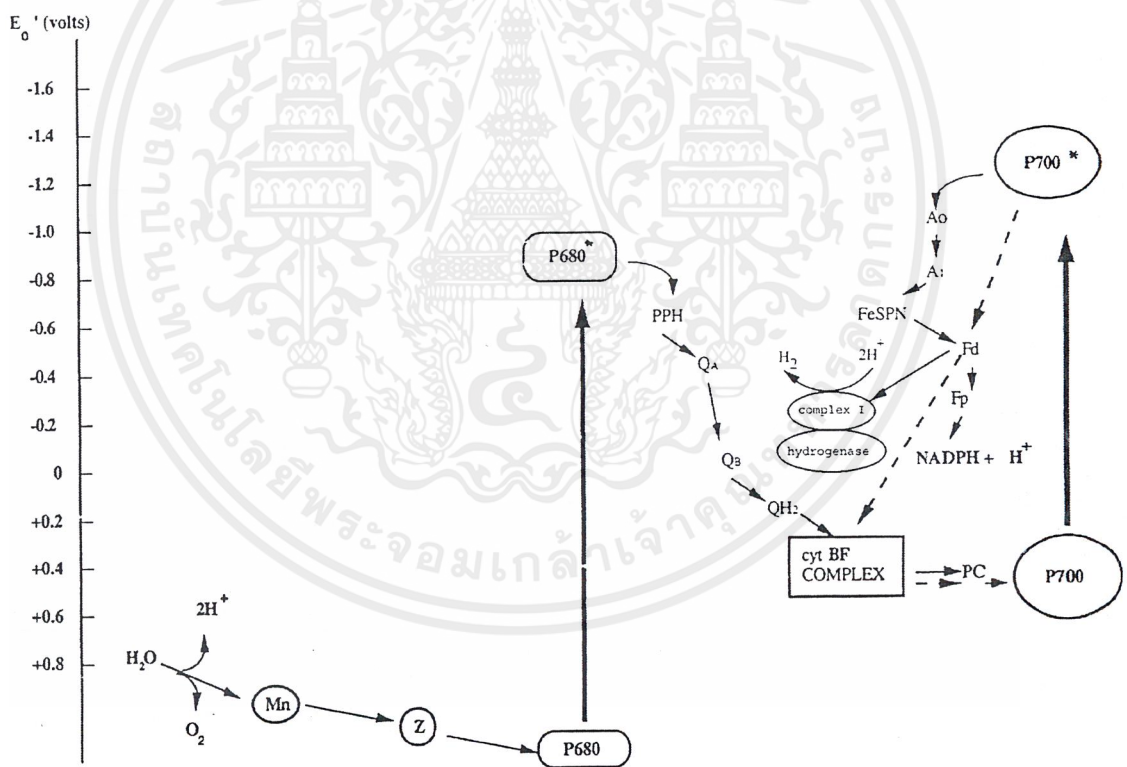
ค้นหาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่างโดยวิธีปฏิกิริยา PCR

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 การผลิตไฮโดรเจน (hydrogen production)

ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ที่เกิดจากการแปรสภาพพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งเมตาบอลิซึมของการเกิดไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก The Microbial physiology & metabolism, 1995

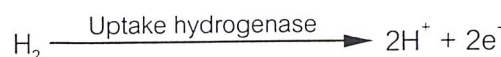
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ระบบแสง I (PS I) สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (P_{700}) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างรีดิวซิงพาวเวอร์ (reducing power) คือ NADPH และการสร้างโปรตอนกราเดียนท์ (proton gradient) ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบ ATP ที่มีพลังงานสูงในวัฏจักรได้อีกด้วย ระบบแสง II (PS II) สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (P_{680}) ระบบนี้จะเกี่ยวข้องกับการสลายโมเลกุลของน้ำ โดยจะมีแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) ร่วมในปฏิกิริยา หน้าที่ของแมงกานีสไอออนคือสะสมประจุของอิเล็กตรอนที่ได้จากการสลายโมเลกุลของน้ำ นอกจากนี้ PS II ยังให้อิเล็กตรอนแก่ PS I และช่วยสร้างโปรตอนกราเดียนท์โดยรีดิวซ์พลาสโตควิโนน (QH_2) การทำงานร่วมกันของ PS I และ PS II เกิดขึ้นโดย P_{680} ดูดกลืนพลังงานแสงทำให้เกิดการกระตุ้นรงควัตถุไปเป็น P_{680}^* ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนแก่ฟีโอไฟทิน (Pheophytin; PPh) ส่งผ่านไปยังโปรตีน Q_A , Q_B และ QH_2 และปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับไซโตโครมพร้อมกับการปลดปล่อยของโปรตอน ไซโตโครม bf ประกอบด้วยโปรตีนที่มีเหล็กซัลเฟอร์ (FeS) อยู่ในองค์ประกอบและไซโตโครม 2 ชนิดคือ ไซโตโครม f และไซโตโครม b หน้าที่ของไซโตโครม b ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซโตโครม bf จะมีความคล้ายคลึงกับไซโตโครม b ของไมโตคอนเดรีย ไซโตโครม bf จะปลดปล่อยอิเล็กตรอนให้กับพลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ด้วยการรีดักชันของพลาสโตไซยานิน (plastocyanin) เกิดขึ้นโดย FeS protein ที่ช่วยขนส่งอิเล็กตรอนจากสารประกอบที่มีอิเล็กตรอน 2 ตัวคือ พลาสโตควิโนนไปยังสารประกอบที่มีอิเล็กตรอน 1 ตัว พลาสโตไซยานินที่ถูกรีดิวซ์จะให้อิเล็กตรอนแก่ P_{700} เพื่อกระตุ้น P_{700} ให้ถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปยังเฟอร์ริดอกซิน (Fd) และฟลาโวโปรตีน (Fp) ทำให้เกิดรีดิวซิงพาวเวอร์คือ NADPH และโปรตอนกราเดียนท์ ส่วนอิเล็กตรอนที่มากเกินไปจะถูกส่งกลับจากเฟอร์ริดอกซินกลับไปยัง complex I ซึ่งเชื่อมติด (coupling) อยู่กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และให้ผลผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจน

2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase)

ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ได้ดังนี้

2.2.1 “Unidirectional” uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน



2.2.2 “Bidirectional” reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน



2.3 ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไชยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta (Carr และ Whitton, 1973) ไชยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไปคือ ไชยาโนแบคทีเรียมีคลอโรฟิลล์เอจึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในพวกแบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ บางชนิดสามารถเปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถเจริญได้ทุกแห่งในน้ำจืด ทะเล น้ำพุร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าไชยาโนแบคทีเรียอาจเจริญรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์

2.3.1 ลักษณะสำคัญของดิวิชัน

1. รงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a), แคโรทีนอยด์ (carotenoid) ประเภทแคโรทีน (carotene) ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ส่วนแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) หลายชนิด ได้แก่ มีโซแซนทิน (myxoxanthin), มีโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll), ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin), ซีอาแซนทิน (zeaxanthin), ลูเตอิน (lutein), ฟลาวิน (flavicin), ไฟโคบิลิโปรตีน ได้แก่

ซีไฟโคไซยานิน (C-phycoyanin), ซีอัลโลไฟโคไซยานิน (C-allophycocyanin)

2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ซีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ ซึ่งมีความหนาบางต่างกัน อาจมีสี ไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ
3. แฟล็กเจลลา (flagella) ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ ไม่มีแฟล็กเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล
4. ผลผลิตของการสังเคราะห์แสง (photosynthetic product) เป็นสารพวกแป้ง ชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟเซอิน มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เรียกว่า ไซยาโนไฟซิเกรนูล แป้งไซยาโนไฟซิเกรนูลนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้เป็นสีน้ำเงิน
5. ลักษณะพิเศษประจำดิวิชันคือ เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต ได้แก่ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด (plastid) แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียส และไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

2.3.2 โครงสร้างของเซลล์

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างลักษณะ 2 แบบด้วยกันคือ (1) เป็นเซลล์ที่ไม่มีแฟล็กเจลลาที่เรียกว่า คอคคอยด์ (coccoïd) ซึ่งพบทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ (unicellular) โคโลนี (colony) และแบบพาลเมลลา (palmella) และ (2) แบบเส้นสาย (filamentous)

พวกเส้นสายที่มีลักษณะง่ายที่สุดได้แก่ *Oscillatoria* มีลักษณะเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถวเรียกว่า ทริยโคม *Spirulina* เป็นสกุลที่มีลักษณะทริยโคมแบบง่าย ๆ เส้นสายจะบิดเป็นเกลียว บางสปีชีส์จะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังหนา ภายในเซลล์ใส เป็นสีเหลืองจางๆ เกิดระหว่างเซลล์ปกติในเส้นสาย เช่น *Anabaena* sp. ซึ่งเรียกตำแหน่งเฮเทอโรซิสต์แบบนี้ว่า อินเทอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (intercalary heterocyst) และอีกแบบหนึ่งที่เฮเทอโรซิสต์เกิดตรงปลายด้านใดด้านหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้างเรียกตำแหน่งเฮเทอโรซิสต์แบบนี้ว่า เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (terminal heterocyst) ถ้าเฮเทอโรซิสต์

อยู่ตำแหน่งที่ฐานของสายเซลล์ ซึ่งเซลล์ปกติมีขนาดไม่เท่ากันทั้งสายเรียกว่า เบซิลเฮเทอโรซิสต์ (basal heterocyst)

2.3.3 ส่วนประกอบของเซลล์

เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น และรอบนอกมีซีท (สารเมือก) หุ้มอยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อบางๆ เรียกว่า เยื่อพลาสมา (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีรงควัตถุกระจายอยู่จำนวนมากฉะนั้นจึงเรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm)

ไซยาโนแบคทีเรียพวกเส้นสายจะพบเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ อยู่ระหว่างเซลล์ปกติหรืออยู่ที่ปลายของเส้นสาย เฮเทอโรซิสต์เกิดขึ้นโดยเซลล์หนึ่งในสายสะสมอาหารไว้มาก จนทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้นทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นรูปกลม หลังจากนั้นไซโตพลาสซึมจะไหลผ่านรูเล็กๆ ที่ผนังเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้สีของเซลล์เดิมซีดลง รูเล็กๆ นี้มีแกรนูลมาปิดรูไว้ทำให้เห็นเป็นลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ

2.3.4 แหล่งที่อยู่

ไซยาโนแบคทีเรียพบในแหล่งน้ำทุกชนิดทั่วโลก อาจจำแนกตามแหล่งที่พบได้ดังนี้

1. น้ำจืด ประมาณร้อยละ 80 ของชนิดไซยาโนแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด โดยทั่วไปพวกที่เป็นเส้นสายที่ไม่มีซีทหุ้มหรือพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยว มักพบในน้ำนิ่ง ส่วนพวกที่มีซีทหุ้มมักพบในน้ำไหล
2. ทะเลหรือแหล่งน้ำเค็ม มีประมาณร้อยละ 20 ที่พบในทะเลหรือแหล่งน้ำเค็ม เช่น ทะเลสาบ น้ำเค็มชนิดที่พบในแหล่งน้ำประพານนี้ ส่วนใหญ่จะพบบริเวณที่น้ำทะเลขึ้นถึงเช่น *Spirulina sp.*, *Oscillatoria erythraea*

2.3.5 การตรึงไนโตรเจน

ในปี ค.ศ.1971 (Stewart และคณะ) มีหลักฐานกล่าวว่าไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดนั้นมีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนได้ แต่การวิเคราะห์ไนโตรเจนที่ตรึงได้นั้นทำได้ยาก เพราะไซยาโนแบคทีเรียนั้นมีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

ที่ทำการเลี้ยงร่วมกันในอาหารชนิดเดียวกัน และในปี ค.ศ.1970 ลักษณะการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียก็ถูกสนใจมากขึ้น พบว่าไนโตรเจนนั้นจะถูกตรึงอยู่ในเซลล์ในบริเวณที่มีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซีสต์

เฮเทอโรซีสต์เป็นบริเวณที่เกิดการตรึงไนโตรเจนในจุลินทรีย์ และไซยาโนแบคทีเรีย โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งมีความไวต่อออกซิเจนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตออกซิเจนจากการสังเคราะห์ด้วยแสง พบว่าเฮเทอโรซีสต์นั้นจะมีระบบแสง I (Photosystem I) เพียงระบบเดียว (Fay และคณะ, 1968)

เฮเทอโรซีสต์อิสระสามารถตรึงไนโตรเจนได้ สามารถแยกเฮเทอโรซีสต์อิสระได้จากการสกัดออกมาจากเซลล์ปกติโดยใช้การอัดด้วยความดัน (French press) (Fay และ Walsby, 1966) และใช้การสั่นด้วยความถี่สูง (sonication) (Fay และ Lany, 1971) นอกจากนั้นยังใช้วิธีการสกัดด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) เฮเทอโรซีสต์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยต้องมีการเติมสารพลังงานสูง (ATP) และมีสารไดไทโอไนท์ (Dithionite) เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและไม่มีแสงสว่าง (Stewart และคณะ, 1969) แต่อย่างไรก็ตามลักษณะการตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจะมีความแตกต่างกันตามสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยง (Stewart และคณะ, 1987)

2.3.6 การจัดจำแนกหมู่ (Classification)

การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียมีหลายระบบ แต่ในที่นี้จะจัดตามระบบของ Desikachary ดังนี้ (Desikachary, 1959)

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order 1 Chroococcales

เซลล์มีลักษณะเป็นแบบเซลล์เดี่ยวหรืออยู่กันเป็นโคโลนี สืบพันธุ์โดยสร้างเอนโดสปอร์ซึ่งไม่อยู่ในสปอร์แรงเจียม (sporangium) ไม่มีการสร้างเอกซสปอร์ (exospore) มี 1 แฟมมิลี ดังนี้

Family Chroococcaceae ได้แก่ *Anacystis*, *Chroococcus*,
Gloeocapsa, *Coelosphaerium*, *Merismopedia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Order 2 Chamaesiphonales

เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เกาะอยู่กับวัตถุต่างๆ แบ่งเป็นส่วนฐานและส่วนยอด สืบพันธุ์โดยการสร้างเอนโดสปอร์หรือเอกโซสปอร์

Order 3 Pleurocapsales

มีลักษณะคล้ายเส้นสาย มักเกาะอยู่กับวัตถุต่างๆ ประกอบด้วยส่วนฐานที่เป็นแผ่น และส่วนที่เป็นเส้นสาย ไม่มีเฮเทอโรซิสต์ สืบพันธุ์โดยการสร้างเอนโดสปอร์

Order 4 Nostocales

มีทั้งที่เป็นเส้นสายที่แตกแขนงและไม่แตกแขนง ถ้าเป็นแบบแตกแขนงจะเป็นแขนงเทียม บางชนิดมีเฮเทอโรซิสต์ สืบพันธุ์โดยวิธีขาดท่อน สร้างฮอริโมโกนหรือสร้างอะคินีต

Family1 Oscillatoriaceae ได้แก่ *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Phomodium*, *Lyngbya*

Family2 Nostocaceae ได้แก่ *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermum*, *Richelia*, *Raphidiopsis*

Family3 Scytonemataceae ได้แก่ *Topothrix*, *Scytonema*

Family4 Rivulariaceae ได้แก่ *Calothrix*, *Gloeotrichia*, *Rivularia*

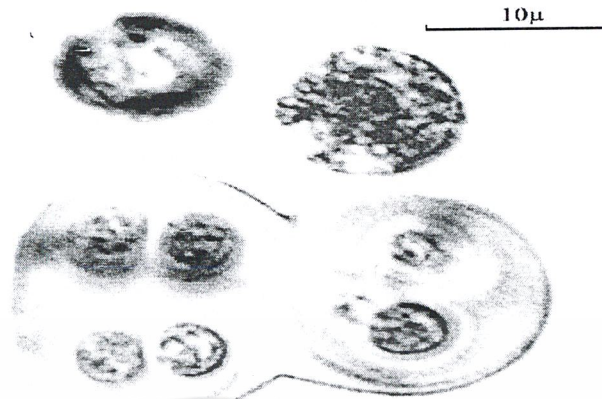
Order 5 Stigonematales

เป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ และหลายทิศทางมีทั้งแขนงแท้และแขนงเทียมสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ ซึ่งอาจมีตุ่ม (polar notch) ถึง 3 อัน ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์และฮอริโมโกน ได้แก่ *Hapalosiphon* sp.

2.3.7 ลักษณะต่างๆ ของสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองทั้ง 5 ชนิด ดังนี้

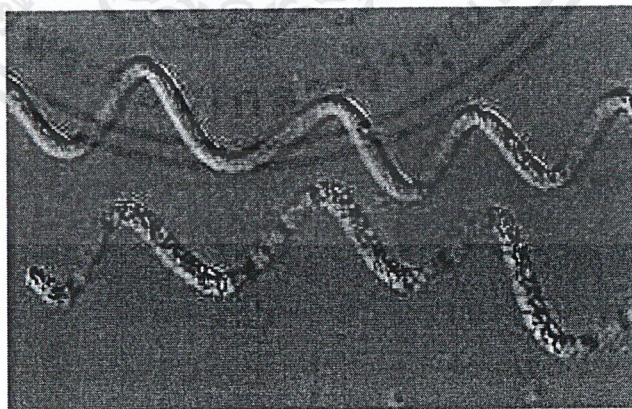
Gloeocapsa sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ใน Order Chroococcales ซึ่งมีลักษณะปกติเป็นเซลล์เดี่ยวๆ อาจพบอยู่เป็นกลุ่ม มีจำนวน 2 ถึง 4 เซลล์ แต่ไม่เกิน 16 เซลล์ เนื่องจากเมื่อแบ่งเซลล์แล้วไม่แยกออกจากกันเพราะมีสารเมือกหนาหุ้ม เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี สารเมือกอาจใสหรือไม่มีสีโดยมีซีทหุ้มแต่ละเซลล์และหุ้มทั้งกลุ่มรวมกัน ซีทที่หุ้มหนาจะแบ่งเป็นชั้นๆ และมีสีต่างๆ (Drouet และ Daily, 1966) มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างของ *Gloeocapsa* sp.

Spirulina sp. มีลักษณะทริยโคมทเป็นเกลียวไม่มีซีทหุ้ม เกลียวอาจแน่นหรือห่างแล้วแต่ชนิด เดิมเชื่อกันว่ามีลักษณะเป็นเส้นสายสายเดี่ยวที่ไม่มีผนังกัน (Holmgren และคณะ, 1962) ได้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า *Spirulina* มีผนังบางๆ กันเซลล์เหมือนลักษณะของ *Arthrospira* นอกจากนี้ยังเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีโปรตีนสูง 50 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีอัตราการสังเคราะห์แสงค่อนข้างสูง พบมากในทะเลสาบแชด (Chad) ในบริเวณตะวันออกของทวีปแอฟริกา ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมโดยผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะรูปร่างของ *Spirulina* sp.

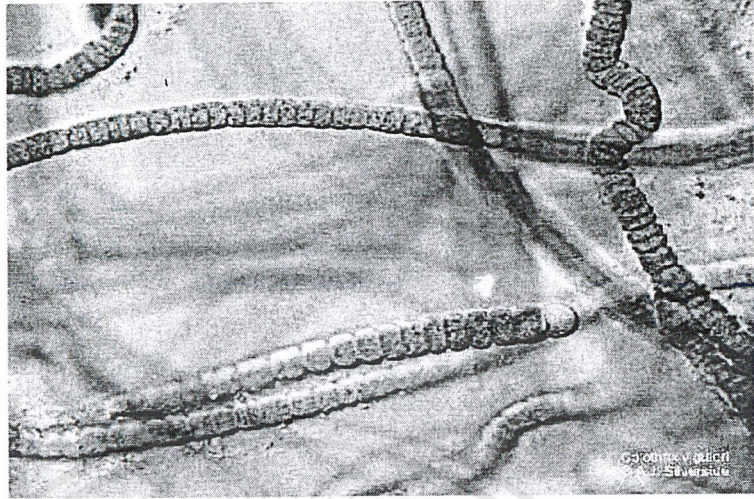
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anabaena sp. ลักษณะทริโคมชนิดเดี่ยวๆ มีซีทหุ้ม เส้นสายตรงหรือม้วน เป็นวงหรืออาจบิดเป็นเกลียว ในบางชนิดเซลล์มีรูปร่างแบบถังเบียร์ กลม หรือรูปสี่เหลี่ยม มีเฮเทอโรซีสต์ระหว่างเซลล์ปกติ สืบพันธุ์โดยการสร้างอะคีนีต่ออยู่ภายในเส้นสาย ไชยาโนแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแพลงตอนน้ำจืด มักทำให้เกิดการบลูมเป็นครั้งคราว บางชนิดผลิตสารพิษที่เรียกว่า แอนาโทกซิน (anatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษประเภทนิวโรโทกซิน (neurotoxin) พิษนี้มีผลต่อสัตว์เลี้ยงที่กินน้ำที่มี ไชยาโนแบคทีเรียเข้าไปถึงตายได้ มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4



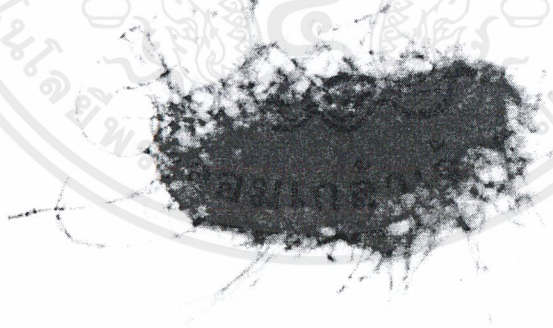
รูปที่ 4 ลักษณะรูปร่างของ *Anabaena* sp.

Calothrix sp. ลักษณะทริโคมอยู่เดี่ยวๆ เป็นเส้นสายที่มีความกว้างของเซลล์ไม่เท่ากันทั้งเส้นสาย เซลล์ตรงโคนมีขนาดใหญ่ เรียวเล็กตรงปลาย เซลล์ตรงปลายอาจมนหรือเรียวแหลม เป็นเส้นไม่แตกแขนงหรือแตกแขนงเทียม ถ้าแตกแขนงเทียมแขนงใหม่จะเป็นอิสระจากเส้นสายเดิมมีซีทหุ้มแต่ละทริโคม ซีทอาจใสหรือมีสี เฮเทอโรซีสต์ส่วนมากมักพบอยู่ที่บริเวณปลายสุดของทริโคมที่เรียกว่า เบซัลเฮเทอโรซีสต์ แต่บางครั้งพบอยู่กลางทริโคม อะคีนีตจะเกิดติดกับเฮเทอโรซีสต์ ส่วนใหญ่มักเจริญอยู่บนก้อนหิน กิ่งไม้ หรือใบไม้ที่จมน้ำ หรือขึ้นบนพื้นน้ำอื่นๆ พบทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ลักษณะรูปร่างของ *Calothrix* sp.

Hapalosiphon sp. เจริญอยู่ในธรรมชาติที่มีความเป็นกรดเจือจางเล็กน้อย เซลล์จะมีลักษณะสั้น เป็นทรงกระบอก เมื่อกที่หุ้มจะเป็น hyalin มีเฮเทอโรซีสต์ และอะคีนิต โดยปกติจะสืบพันธุ์โดยการแตกตามแนวขนานหรือเป็นแบบแขนงเดี่ยว (unilaterally) หรือแขนงคู่ (bilaterally) แล้วแต่สปีชีส์ ซึ่งมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ลักษณะรูปร่างของ *Hapalosiphon* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานวิทยาศาสตร์หลายสาขา ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่คิดค้นโดย Kary Mullis แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Cooperation) สหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ.1983 ต่อมา Randall Saike และ Henry Erlich ได้นำเทคนิคนี้มาใช้และรายงานเป็นครั้งแรกในวารสาร Science ในปี ค.ศ. 1985 หลังจากนั้นได้มีผู้สนใจนำเทคนิคนี้มาใช้มากขึ้นจนสามารถพัฒนาเทคนิคให้เป็นวิธีการที่ใช้เป็นเครื่องอัตโนมัติได้ (thermal cycle)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการหรือต้นแบบซึ่งปรากฏอยู่ในจีโนม (genome) โดยใช้วิธีการในหลอดทดลองซึ่งเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นเมื่อจะมีการแบ่งตัวของเซลล์ ต่างกันที่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR นี้ทำในหลอดทดลองซึ่งสามารถกำหนดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้และสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ

2.4.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในเทคนิค PCR

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (target DNA)

เป็นดีเอ็นเอสายคู่และจะต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ถูกต้อง

2. ไพรมเมอร์

เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ส่วนใหญ่นิยมขนาด 20 ถึง 30 เบส และมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3. ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส

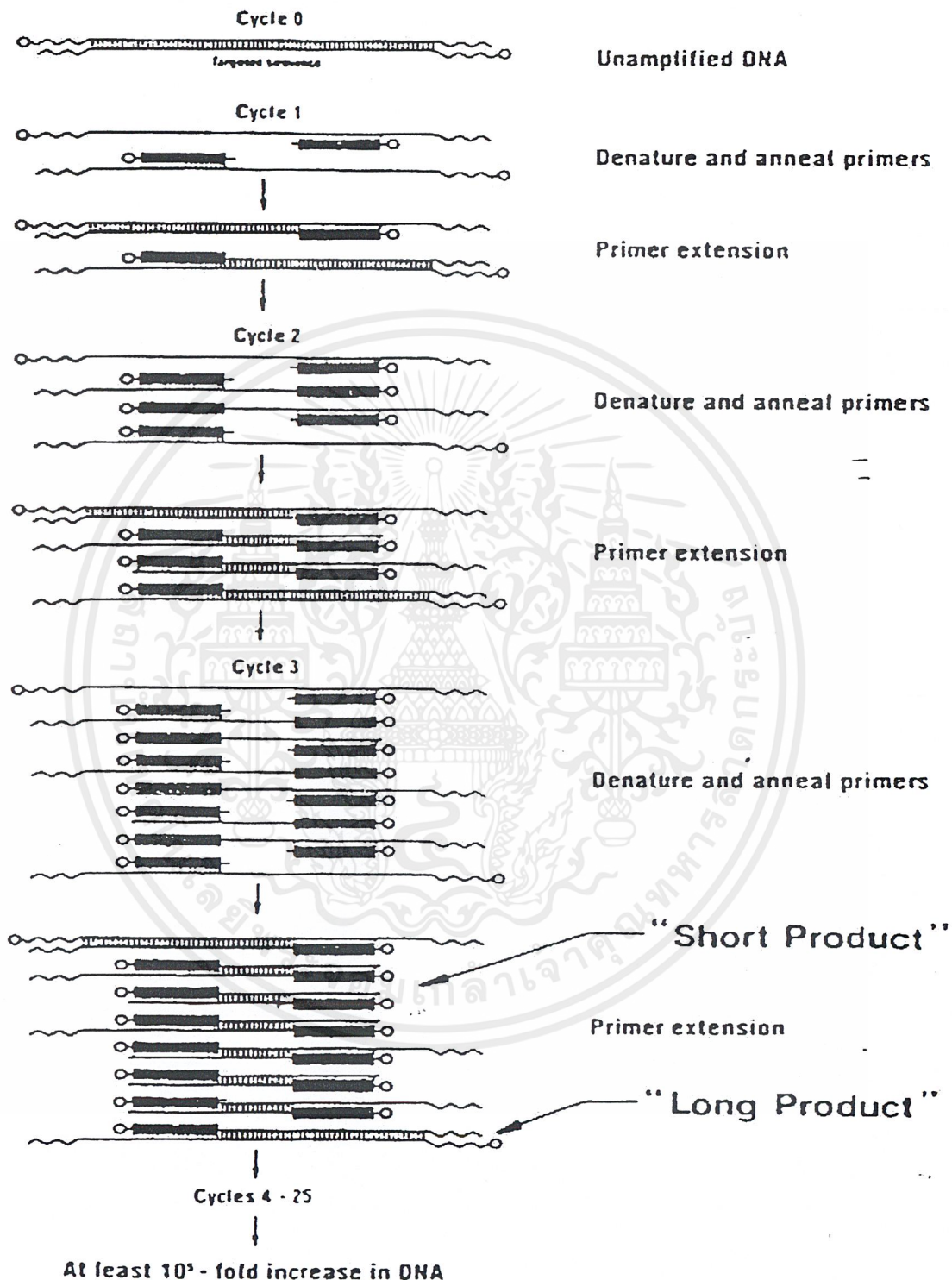
ในเทคนิค PCR จะใช้ *Taq* DNA polymerase ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้แยกได้จากเชื้อ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นพวกแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูง (thermophilic bacterium)

4. ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs)
ประกอบด้วย ดีโออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (dATP), ดีโออกซีกวานูซีนไตรฟอสเฟต (dGTP), ดีโออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟต (dCTP) และดีออกซีไทมิดีนไตรฟอสเฟต (dTTP)
5. บัฟเฟอร์
ประกอบด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), Tris-hydrochloric (Tris-HCl), เจลาติน (Gelatin)
6. เกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ (Salt-MgCl₂)
เป็นตัวควบคุมการเกิด primer-annealing และการเกิดปฏิกิริยาโดยรวม

2.4.2 ขั้นตอนการทำ PCR (พรغام ลิมตระกูล, 2541)

เทคนิค PCR เป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิต มีหลักการที่สำคัญอยู่ 3 ขั้นตอน (รูปที่ 7)

1. การทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (denaturation)
เป็นการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนที่จับกันอยู่ระหว่างเบสแต่ละคู่ นิยมใช้อุณหภูมิ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 60 วินาที
2. การกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (annealing หรือ renaturation)
จะมีการเติมไพรเมอร์นิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 สายลงไป ในปฏิกิริยา ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแต่ละสายตามกฎการจับคู่ของเบส ความยาวของไพรเมอร์ประมาณ 20 ถึง 40 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับเบสที่เป็นคู่จำเพาะทั้งทางด้าน 5' (ด้านซ้าย) หรือ 3' (ด้านขวา) กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน อุณหภูมิที่นิยมใช้คือ ช่วง 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 60 วินาที
3. การสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension)
จะทำการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5' → 3' โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวแต่ละสายเป็นแม่แบบ นิยมทำที่อุณหภูมิ 70 ถึง 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ถึง 2 นาที



รูปที่ 7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา PCR

ที่มา : พรงาม ลิ้มตระกูล, 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่าในแต่ละรอบของ PCR ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังกล่าว ทุกๆ รอบจะมีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจเป็นสองเท่า ซึ่งถ้าทำ 30 รอบ จะมีการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจถึงพันล้านเท่า ทำให้ได้ปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ ในระดับโมเลกุลต่อไป

อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR ที่พัฒนาได้ในช่วงเริ่มต้นแม้ว่าจะมีข้อดีสามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ง่ายและรวดเร็ว แต่เทคนิค PCR ในช่วงต้นก็มีข้อด้อยที่สำคัญหลายประการ ดังนี้

1. เอนไซม์ Klenow fragment ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไม่ทนต่อความร้อน ดังนั้นในทุกขั้นตอนของ denaturation ที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงไปในช่วง primer extension ในทุกรอบของปฏิกิริยา PCR เป็นผลให้ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และยังสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเอนไซม์ Klenow fragment มีราคาแพงและใช้ปริมาณมาก นอกจากนี้การเติมเอนไซม์ใหม่ในทุกรอบของปฏิกิริยา PCR เป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการทำให้เป็นวิธีอัตโนมัติ
2. การควบคุมอุณหภูมิของ 3 ขั้นตอนในปฏิกิริยา PCR นั้น เริ่มแรกใช้วิธีการทำด้วยมือโดยใช้อ่างน้ำ (water bath) หรือใช้กล่องที่ให้ความร้อน (heat block) 3 เครื่อง เพื่อตั้ง 3 อุณหภูมิตามที่กำหนดในแต่ละขั้นตอน และจะต้องมีคนคอยหยิบหลอดปฏิกิริยาให้เปลี่ยนตามอุณหภูมิ ซึ่งเป็นการเสียเวลา
3. ดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา PCR จะต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องเพื่อจะได้ใช้ข้อมูลมาออกแบบคู่ไพรมเมอร์ที่เหมาะสม ฉะนั้นจะไม่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอที่ไม่ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้
4. มีอุปสรรคในการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแม่แบบที่มีโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งต้องการสภาวะที่เหมาะสมในช่วง denaturation ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น จึงต้องการเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ทนความร้อนสูงมากๆ ได้
5. การออกแบบคู่ไพรมเมอร์ เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน
6. เพิ่มขยายจำนวนได้เฉพาะดีเอ็นเอ แต่ไม่สามารถขยายเพิ่มจำนวนอาร์เอ็นเอ (RNA) ได้ ทำให้มีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ไม่สามารถขยายจำนวนดีเอ็นเอพร้อมกันของหลายดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา PCR เดียวกัน
8. ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ มีข้อจำกัดในกรณีที่มีดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้นจำนวน copies น้อย ๆ
9. มีปัญหาต่อการเพิ่มขยายดีเอ็นเอแม่แบบที่มีโครงสร้างแบบ hairpin loop, base compressions และดีเอ็นเอแม่แบบที่มีปริมาณความหนาแน่นของการลอยตัวสูง (ปริมาณ G+C)
10. ปัญหาการปนเปื้อนมักเกิดขึ้นเสมอในปฏิกิริยา PCR ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ง่าย

2.4.3 ประโยชน์ของเทคนิค PCR

1. ในงานวิจัย (research application) อาทิเช่น DNA sequencing, Molecular cloning, DNase I Footprinting, Genome mapping, Evolutionary analysis ฯลฯ
2. ทางการแพทย์และนิติเวชวิทยา (diagnostic and forensic application) ใช้ในการชันสูตรโรค และพิสูจน์หลักฐานในการดำเนินคดี

2.4.4 หลักการและขั้นตอนของ PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธี PCR เริ่มต้นใช้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ การสังเคราะห์สายใหม่เกิดขึ้นจากการแยกสลายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ทั้งสองเส้นออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้ทำให้เกิดขึ้นโดยอาศัยความร้อน สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่ และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์คู่สมที่สามารถจะจับเข้าคู่กับสายเดิมได้ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 อย่างคือ (1) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สองสายซึ่งใช้สำหรับตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ไพรเมอร์จะจับได้อย่างจำเพาะกับปลาย 3' ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นคู่ของมัน (2) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส และ (3) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดคือ ดิออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (dATP), ดิออกซีกวาโนซีนไตรฟอสเฟต (dGTP), ดิออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(dCTP), และดีออกซีไทมีดินไตรฟอสเฟต (dTTP) ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วประกอบที่สำคัญอื่นๆ อีก เช่น เกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และบัฟเฟอร์

2.4.5 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขั้นพื้นฐาน

วิธีการตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR กระทำได้หลายวิธี เทคนิคที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 เทคนิคใหญ่ๆ คือ

1. วิธีเจลอิลีคโตรโฟรีซิส

วิธีนี้เป็นวิธีการดูผลผลิตผลิตภัณฑ์ PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากผ่านกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทราบขนาดแน่นอนและได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงชนิดเดียวหรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลในการตรวจหา

2. วิธีนิวคลีอิกแอซิดไฮบริไดเซชัน

คือวิธีการตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการในกรณีที่การดูผลจากเจลไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีการนี้ต้องใช้ตัวติดตามที่มีเบสคู่สมกับผลิตภัณฑ์ PCR และจะจับเบสคู่สมกันในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอก็ได้ แต่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารปลดปล่อยสี ซึ่งมีการตรวจหาตัวติดตามนั้นอีกครั้งหนึ่ง

2.4.6 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

วิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเออาศัยหลักการพื้นฐานที่ว่าดีเอ็นเอโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ในทิศทางจากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวทำให้สามารถใช้กระแสไฟฟ้าในการแยกดีเอ็นเอหรือวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยผ่านตัวกลางคือวุ้น ซึ่งตัวกลางที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) (มักใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล ในกรณีที่มีดีเอ็นเอขนาดเล็กมากๆ กล่าวคือเล็กกว่า 500 คู่เบส)

ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถของดีเอ็นเอในการเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางคือ

1. ขนาดของดีเอ็นเอ ถ้าดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็กทำให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่
2. รูปร่างของดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงเกลียวมักจะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอื่น
3. ความเข้มข้นของตัวกลาง (gel concentration) กล่าวคือ ตัวกลางที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีช่องว่างภายใน (porous) น้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่ากรณีที่ตัวกลางมีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์ของขนาดดีเอ็นเอกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้นเป็นดังสมการ

$$\log u = \log u_0 / K_y T$$

โดย u เป็นระยะที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจล

u_0 เป็นระยะที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ได้ในสารละลายอิสระปราศจากตัวกลาง

K_y เป็นค่าสัมประสิทธิ์ด้านการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นค่าคงที่ของความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติของเจลกับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ

T เป็นความเข้มข้นของเจล

จากสมการดังกล่าว พบว่าถ้าค่าความเข้มข้นของอะกาโรสเจลคงที่ ระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้จะมีความสัมพันธ์ในเชิงผกผันกับค่า \log ของน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้นเอง และหากเราเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของอะกาโรสเจลจะทำให้เราสามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอได้ดีในช่วงต่างๆ กัน

4. กระแสไฟฟ้า และแรงเคลื่อนไฟฟ้า โดยปกติค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกขนาดที่แตกต่างของดีเอ็นเอนั้นควรต่ำกว่า 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร

2.4.7 เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสของดีเอ็นเอ

การทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของดีเอ็นเอสามารถใช้ได้กับอะกาโรสเจล หรือโพลีอะครีลาไมด์อย่างใดอย่างหนึ่ง วิธีที่นิยมทำมากที่สุดคือ การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่พีเอชเป็นกลาง ที่สภาวะพีเอชที่เป็นกลางนี้จะทำให้ดีเอ็นเอมีประจุลบทำให้ต้องหยอดสารตัวอย่างในหลุมที่ปลายเจลด้านขั้วลบ เพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านเจลไปหาขั้วบวก การเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ (oligonucleotide) จะขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และไม่ขึ้นกับส่วนประกอบของเบสหรือลำดับการเรียงตัวของเบสในดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ เช่น อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาด 70 คู่เบส และอะกาโรสเจล 0.1 เปอร์เซ็นต์ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดถึง 800,000 คู่เบส ถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่า 50,000 คู่เบส ต้องใช้การแยกด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ "Pulsed Field" หรือ PFGE

สำหรับโพลีอะครีลาไมด์เจล ความเข้มข้นที่เหมาะสมใช้แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน เช่น อะครีลาไมด์ 20 เปอร์เซ็นต์ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาด 6 คู่เบส และอะครีลาไมด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส

2.4.8 บัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ

สำหรับโพลีอะครีลาไมด์เจล จะใช้บัฟเฟอร์ Tris-borate 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 หรือ 1 เท่าของบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) นอกจากนี้บอเรตบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กับอะกาโรสเจลด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม อะกาโรสบางชนิดอาจเกิดคอมเพลกซ์ระหว่างบอเรตกับอะกาโรสขึ้นได้ ซึ่งจะส่งผลทำให้เจลเสียได้ นอกจากนี้อะซิเตตบัฟเฟอร์ก็มีการใช้อย่างแพร่หลายเช่นเดียวกัน โดยที่อะซิเตตจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นคาร์บอเนตในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสทำให้ค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้น ทริสเบส (Tris base) สามารถถูกออกซิไดส์ไปเป็นสารประกอบที่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ในขณะที่บัฟเฟอร์ที่มีคลอไรด์จะเกิดเป็น

คลอรีนขึ้นได้ ไม่ว่าจะใช้บัฟเฟอร์ชนิดใดต้องใส่ EDTA 1 ถึง 5 มิลลิโมลาร์ ลงในบัฟเฟอร์ เพื่อคีเลตไดวาเลนท์แคตไอออนและต้องตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์เป็นช่วงๆ ตลอดการทำอิเล็กโตรไฟเรซิส

2.4.9 บัฟเฟอร์ที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหายธรรมชาติ

สารที่ทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติมีหลายชนิดเช่น ยูเรีย ต่างฟอร์มามิดและเมทิลเมอร์คิวริกไฮดรอกไซด์ การเลือกใช้สารเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเจล ตัวอย่างเช่น ไม่ใช้ฟอร์มามิดกับอะกาโรสเจลเพราะไม่สามารถทำให้เตรียมอะกาโรสเจลได้ ในขณะที่ต่างสามารถทำปฏิกิริยาดิอะมิเนชันกับโพลีอะคริลาไมด์และเมทิลเมอร์คิวริกไฮดรอกไซด์สามารถยับยั้งปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชันได้

2.4.10 ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลือกระบบบัฟเฟอร์สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

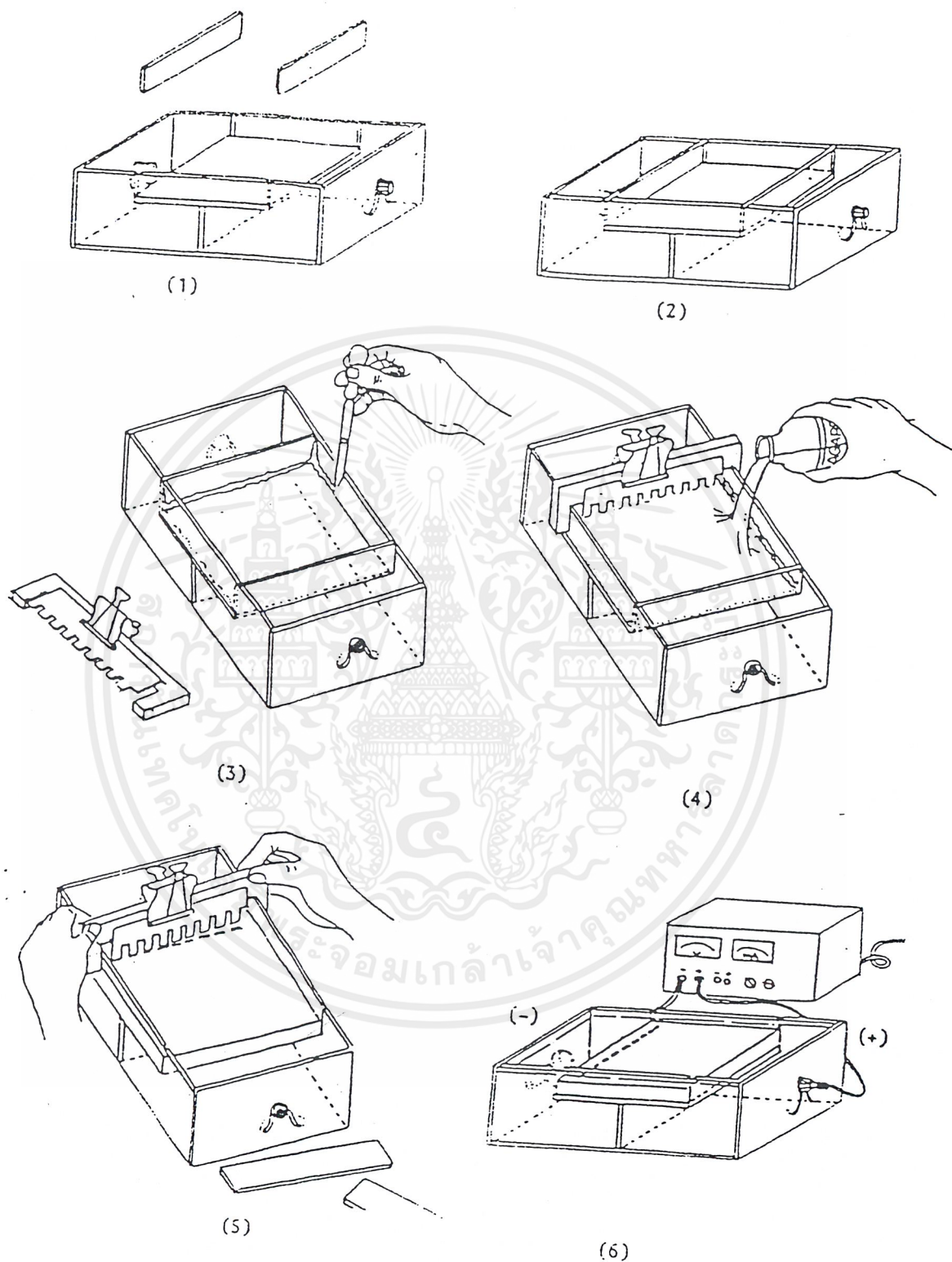
1. ถ้าต้องการหามวลโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยที่ไม่ต้องการให้โครงสร้างทุติยภูมิเข้ามาเกี่ยวข้องให้ใช้เมทิลเมอร์คิวริกไฮดรอกไซด์เป็นสารที่ทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ
2. เมทิลเมอร์คิวริกไฮดรอกไซด์ไม่สามารถใช้กับโพลีอะคริลาไมด์ได้ จึงต้องใช้ระบบอื่นเพื่อศึกษาชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก เมทิลเมอร์คิวริกไฮดรอกไซด์เป็นพิษมาก จึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ
3. ถ้าใช้ยูเรีย 7 โมลาร์ ยูเรียเป็นส่วนประกอบในบัฟเฟอร์จะมีผลต่อการเตรียมอะกาโรสเจลแต่ไม่มีผลต่อโพลีอะคริลาไมด์เจล
4. สำหรับอะกาโรสเจลวิธีที่ง่ายที่สุดคือ ใช้ต่าง โดยนำอะกาโรสมาละลายน้ำ ทำให้อุ่นมีอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์และ EDTA ลงไปในสารละลายจนมีความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์ และ EDTA เท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ ถ้าใช้ต่างกับ โพลีอะคริลาไมด์เจลจะยุ่งยากมากกว่า เนื่องจากปฏิกิริยาดิอะมิเนชันของโพลีอะคริลาไมด์เจลจะทำให้เจลเสียหายได้

2.4.11 การเตรียมเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้มีความหนาอย่างน้อยประมาณ 3 มิลลิเมตร เจลที่บางกว่านี้ จะทำให้เตรียมยาก สำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลโดยทั่วไปใช้เจลหนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตร เจลที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกันเตรียมได้โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของ อะคริลาไมด์ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของบิส (bis) มีผลต่อขนาดของรูพรุน ด้วย นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความชุ่มชื้นและความเปราะบางของเจล ถ้าเป็น เจลที่ไม่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพธรรมชาติ เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ที่มีอะคริลาไมด์ 12 เปอร์เซ็นต์ บิส 0.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาด 10 ถึง 100 นิวคลีโอไทด์ และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร นาน 18 ชั่วโมง ถ้าต้องใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้นต่ำจะทำให้เจลที่เตรียมอ่อน มากจึงต้องเติมอะกาโรสผสมลงไปด้วย

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมพิมพ์สำหรับเทอะกาโรส โดยการต่อชิ้นส่วนต่างๆ ของอุปกรณ์ดังขั้นตอน ที่ (1), (2), และ (3) ในรูปที่ 8
2. เตรียมวุ้นเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) โดยต้มวุ้นจนละลายหมด จากนั้นเทวุ้นขณะกำลังอุ่นๆ (อุณหภูมิ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ลงในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้ ดังขั้นตอนที่ (4) ในรูปที่ 8 ทิ้งไว้รอให้เจลแข็งเกาะออกจากแม่พิมพ์ระวังอย่าให้เจลแตก หรือ เสียสภาพ ดังขั้นตอนที่ (5) ในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมวุ้นเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ที่มา : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์, 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำเจลที่เตรียมไว้ใส่ลงใน Chamber ที่มีบัฟเฟอร์ TBE โดยต้องทำการเทบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจลที่ใส่ลงไป เพื่อให้กระแสไฟฟ้าสามารถวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวกได้ ดังขั้นตอนที่ (6) ในรูปที่ 8
 4. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับ Chamber ให้ด้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบ ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 50 โวลต์ ประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง สีน้ำเงินของ loading dye จะวิ่งไปอยู่ริมด้านตรงกันข้าม และหยุดการให้กระแสไฟฟ้า
 5. นำวุ้นออกจาก Chamber แซะในสารละลายเอทีเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น
 6. ตรวจสอบแถบสีดีเอ็นเอ โดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ
- ** เอทีเดียมโบรไมด์ เป็นสารก่อมะเร็ง ควรสวมถุงมือทุกครั้งในขณะทำการทดลอง

2.4.12 การเตรียมสารตัวอย่างและการหยุดสารตัวอย่าง

ปริมาณดีเอ็นเอที่มากที่สุดที่สามารถหยุดได้บนเจล หรือความจุของเจลขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้คือ

1. ขนาดของช่องหรือหลุมสำหรับหยุดสารตัวอย่าง ความจุของเจลเป็นสัดส่วนกับพื้นที่ของฐานหลุมหรือช่องในเครื่องมือแบบสแล็บ (slab) เจลในแนวตั้ง
2. ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความจุของเจลจะลดลงเมื่อขนาดของชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อขนาดของชิ้นส่วนสูงกว่า 2,000 ถึง 3,000 คู่เบส
3. ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงขึ้นจะทำให้ผลการแยกต่ำลงด้วยเหตุนี้จึงต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ขึ้น
4. การกระจายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความจุของเจลจะสูงสุดเมื่อขนาดชิ้นส่วนมีการกระจายที่สม่ำเสมอ ถึงแม้จะเป็นการกระจายในช่วงกว้างปริมาณของชิ้นส่วนที่มากที่สุดสำหรับสารตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *EcoR* I หรือ *Hind* III คือ 50 ไมโครกรัมต่อตารางเมตรของพื้นที่ฐานหลุมหรือช่องหยุดสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างดีเอ็นเอ เตรียมในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำและที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ใช้ไฟคอลล์ (Ficoll) แทนซูโครสหรือ

กลีเซอรอล เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของสารตัวอย่างไม่ให้ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ ใช้ Orange G เดิมในสารตัวอย่าง เพื่อเป็น marker หรือ tracking-dye ความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้คือ 0.025 เปอร์เซ็นต์ การเติม EDTA ในสารตัวอย่างเพื่อไปคีเลตไดวาเลนท์แคทไอออน สารละลายที่ใส่เพื่อทำการหยุดการสลายตัวของดีเอ็นเอ (stop mix) คือ ฟิคอลล์ 30 เปอร์เซ็นต์ Orange G 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 250 มิลลิโมลาร์ เติม stop mix 1 ใน 10 ของปริมาณลงในสารตัวอย่าง เพื่อหยุดการสลายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วสามารถหยุดสารตัวอย่างลงบนเจลได้ทันที สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางชิ้นต้องการให้สูญเสียสภาพธรรมชาติตรงปลาย (sticky) ทำได้โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

2.4.13 ขนาดของ Marker สำหรับเจล

ใช้สีย้อม เช่น Orange G และโบรโมฟินอลบลูเป็น marker สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก ถ้าจะให้ได้ค่าขนาดที่แน่นอนต้องใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทราบขนาด โดยการใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ใช้สารละลาย marker ที่มีประมาณดีเอ็นเอ 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของสารตัวอย่าง และปริมาณที่ใช้หยอดลงบนเจลคือ 2 ถึง 3 ไมโครลิตร จะให้แถบที่เห็นได้จากการย้อมสี

2.4.14 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจะทำที่อุณหภูมิห้อง ถ้าทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิร้อนจนเกินไปจะทำให้แถบดีเอ็นเอเกิดการบิดเบี้ยวได้ โดยพบว่าหลังจากที่ไม่มีการต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าความร้อนจะเพิ่มขึ้นเหนือเจลแม่พิมพ์ ดังนั้นต้องนำเจลแช่ลงในบัฟเฟอร์ซึ่งเป็นตัวช่วยในการถ่ายเทความร้อนทำให้เจลเย็นขึ้นเพื่อไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิมากนัก ซึ่งจะเป็นผลต่อแถบของดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้น

2.4.15 การวิเคราะห์เจลหลังการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

การย้อมสีเจล

นำเจลออกจาก Chamber ที่ทำการวิเคราะห์ไว้ นิยมเติมเอทีเดียมโบรไมด์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนเตรียมเจล ความเข้มข้นของเอทีเดียมโบรไมด์ที่ใช้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร หรือเติม 5 ไมโครลิตรของสารละลาย 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเติมเอทีเดียมโบรไมด์ลงในบัฟเฟอร์สีย้อมนี้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แต่ระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสสามารถเห็นเจลได้โดยตรง และเมื่อทำเสร็จแล้วสามารถนำเจลออกมาส่องดูแถบของดีเอ็นเอโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-transilluminator) ได้โดยตรง โดยเฉพาะเมื่ออ่างที่ใช้เตรียมเจลเป็นอ่างเดียวกับที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟเรซิส และทำด้วยพลาสติก หรือแก้วที่ยอมให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านได้

เอทีเดียมโบรไมด์สามารถสร้างเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 302 นาโนเมตร เวลาใช้เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตต้องสวมหน้ากากหรือแว่นตา ถ้าผิวหนังถูกรังสีอัลตราไวโอเล็ตนานเกินไปจะไหม้ได้ ไอโซนซึ่งเป็นพิษเกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตต้องถูกระบายออกไปด้วย

การส่องดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)

สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอทีเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอสามารถส่องให้เห็นได้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร ดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อทำให้เกิดการเรืองแสง ในการให้แสงฟลูออเรสเซนส์กับดีเอ็นเอและเอทีเดียมโบรไมด์ โดยที่เอทีเดียมโบรไมด์ในเจลจะทำหน้าที่เป็นสารเรืองแสงในขณะที่ทำการส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ระบบแสงที่ทำให้เกิดแถบของดีเอ็นเอนั้นมี 2 ระบบ ที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไปมีดังนี้

1. Incident light illumination system เป็นระบบแสงที่การทำงานไม่มีการใช้ตัวกรองที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยตัวกรองจะทำการวางอยู่ข้างพื้นที่

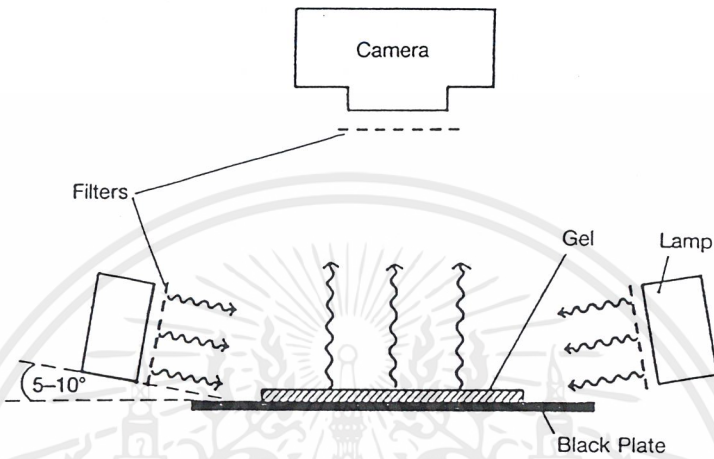
ทำการวางตัวอย่างและมีตัวกล้องวางอยู่เหนือพื้นที่ทำการวางตัวอย่าง ดังแสดง
ในรูปที่ 9A

2. Transillumination system เป็นระบบที่มีการทำงานโดยให้แสงผ่านตัวกรองแสง
ที่มีความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร โดยที่เจลสามารถทำการวางบนพื้นที่
มีการให้แสงอยู่ด้านล่าง ดังแสดงในรูปที่ 9B

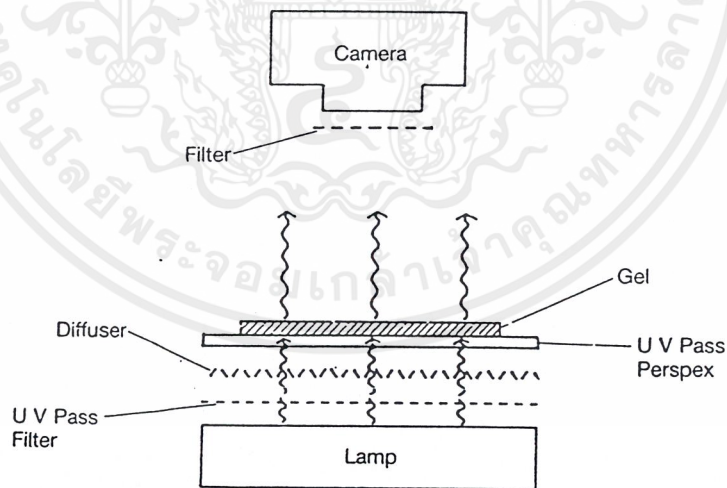
การตรวจวัดแถบที่เกิดขึ้น

ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถคำนวณได้จากกราฟความสัมพันธ์ที่เป็น
เส้นตรงระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอกับขนาดของชิ้นส่วนที่ทราบ
แน่นอน การวัดอย่างหยาบทำได้โดยการวัดโดยตรงจากรูปถ่ายเจล ถ้าต้องการ
ค่าละเอียดต้องใช้เครื่อง Microdensitometer เพื่อขยายสเกลแล้ววัดระยะทาง
การเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดยอดของแต่ละแถบ

A Incident illumination



B Transillumination



รูปที่ 9 ระบบการให้แสงและอุปกรณ์ที่ใช้เพื่อศึกษาแถบของดีเอ็นเอ

A: ระบบแสงแบบ Incident light illumination system

B: ระบบแสงแบบ transillumination system

ที่มา : Rickwood D. and Hames B.D., 1990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิดซึ่งได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN) ดังนี้

3.1.1 *Anabaena siamensis*

3.1.2 *Calothrix* sp.

3.1.3 *Gloeocapsa* sp. Keutzig

3.1.4 *Hapalosiphon delicatulus*

3.1.5 *Spirulina* sp. Turpin

ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เลือกมาศึกษาเป็นตัวแทนของแต่ละลำดับ (order) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทตรวจเอกสาร (2.3.6)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Rancho Dominguez รุ่น Harvey Hydroclave MC10 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortech รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี

3.2.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

3.2.4 เครื่องเขย่าเลี้ยงสาหร่าย (Shaker)

3.2.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries, Inc, Bohemia, N.Y. รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.6 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) บริษัท Perkin Elmer รุ่น 480 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.7 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) บริษัท Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน

3.2.8 เครื่องแก้ว (Glass equipment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน
- 3.2.11 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) บริษัท Hoefer Scientific Instruments รุ่น Migty bright ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.12 กล้องถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท UVP รุ่น MOD 4912-511010000 ประเทศเยอรมนี

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
- 3.3.2 เม็ดแก้ว (Glass bead)
- 3.3.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.3.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauryl sarcosine; SLS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.3.5 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE-buffer saturated phenol)
- 3.3.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Phenol-chloroform-isoamyl alcohol) 25 ต่อ 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)
- 3.3.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
- 3.3.8 โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.3.9 เอทานอล (Ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- 3.3.10 เอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด
- 3.3.11 อะกาโรส (Agarose)
- 3.3.12 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (ภาคผนวก 2)
- 3.3.13 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) (ภาคผนวก 3)
- 3.3.14 เอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)
- 3.3.15 บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า (10X PCR buffer) บริษัท Finnzymes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.16 ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์ บริษัท Finnzymes

3.3.17 เอนไซม์ *Taq* polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร บริษัท Finnzymes

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียข้างต้นในอาหารเหลว BG 11 (ภาคผนวก 1) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่าง 18 ชั่วโมงต่อวัน นาน 7 ถึง 10 วัน

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์มากระจายในบัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 7.5 400 ไมโครลิตร เติมนีเมดแก้ว 200 ไมโครลิตร โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซีน 10 เปอร์เซ็นต์ 8 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ นำไปเขย่าอย่างแรง (vortex) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ สกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนบนที่มีดีเอ็นเอใสหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตต 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ประมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด แล้วปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งและละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 ไมโครลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (Agarose gel electrophoresis)

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA (TBE buffer, ภาคผนวก 2) 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยตู้ไมโครเวฟ (Microwave) แล้วปล่อยให้อะกาโรสมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส และเทใส่แม่พิมพ์ ทิ้งไว้จนแผ่นเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ใส่ในอ่าง (Chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 ไมโครลิตรกับสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye, ภาคผนวก 3) 2 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตรให้เข้ากัน หลังจากนั้นหยอดลงในช่อง (well) ของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้แลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วยเอทีเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ ถ่ายรูปแผ่นเจลและคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.4.4 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รับการตีพิมพ์จาก www.ncbi.nlm.nih.gov มาเปรียบเทียบกัน (Multiple alignment) ใน www.toulouse.inra.fr และเลือกบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณอนุรักษ์คือมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 2 บริเวณคือช่วงต้นและช่วงท้าย เมื่อเลือกบริเวณดังกล่าวได้แล้วเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำมาใช้ในการสร้างไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ทั้งสองไปคำนวณหา

ค่า T_m (melting temperature) และค่าความเป็นไปได้ในการจับตัวกันเองของไพรเมอร์ในส่วนต่างๆ ของไพรเมอร์ โดยคำนวณที่ www.williamstone.com

3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5
dNTPs 10 มิลลิโมลาร์	1
ไพรเมอร์ 1 5 มิลลิโมลาร์	2.5
ไพรเมอร์ 2 5 มิลลิโมลาร์	2.5
จีโนมดีเอ็นเอ (50-100 นาโนกรัม)	2
เอนไซม์ <i>Taq</i> polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	36.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งในโปรแกรมที่ใช้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 2 ปรับอุณหภูมิของ Annealing โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง คือ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิของ Extension คือ 72 องศาเซลเซียส และเวลาในการทำ Extension ขึ้นอยู่กับขนาดของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 2 อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94	30 วินาที
	40-55	1 นาที
	72	2 นาที
3	72	10 นาที
4	20	α



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

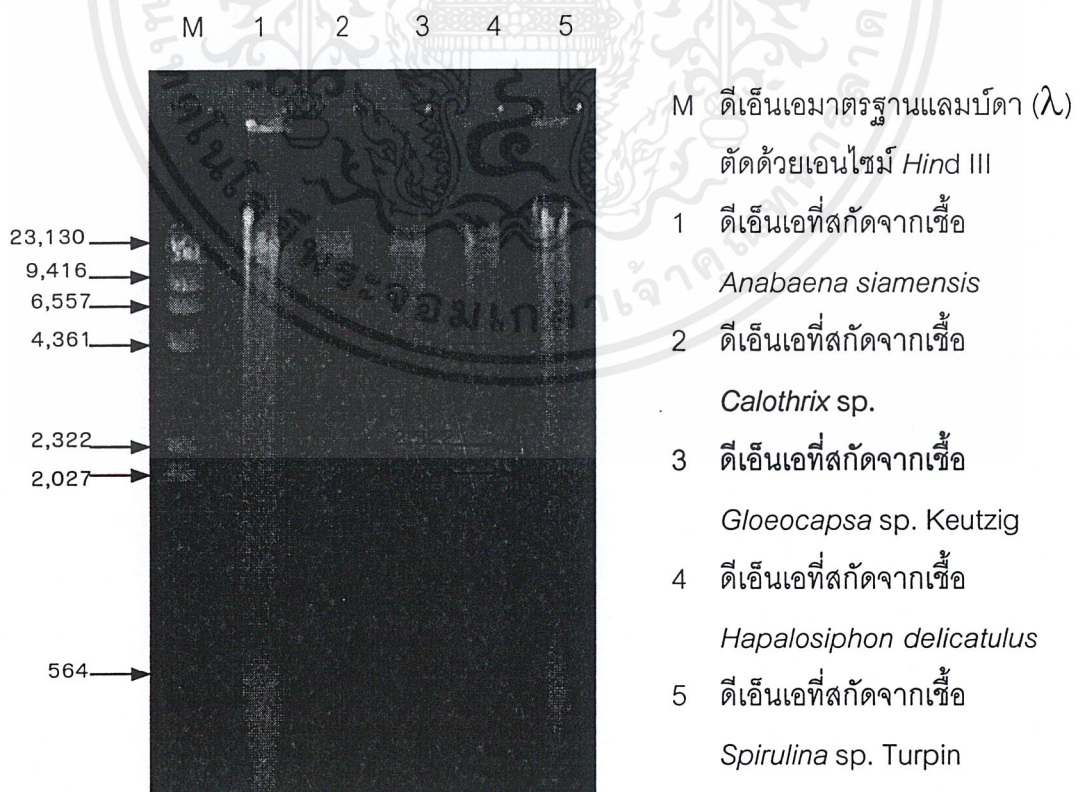
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาขึ้นไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สนใจ โดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่างและนำมาสกัดดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ต่อจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์กับยีน Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

4.1 การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย

จากการสกัดดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยดลงในช่องของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ หลังจากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วยเอทีเดียมโบรไมด์ แล้วส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียคือ *Anabaena siamensis*, *Calothrix* sp., *Gloeocapsa* sp. Keutzig, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Spirulina* sp. Turpin ซึ่งคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจะได้รับความเข้มข้นประมาณ 100, 50, 50, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

4.2 การออกแบบไพรเมอร์

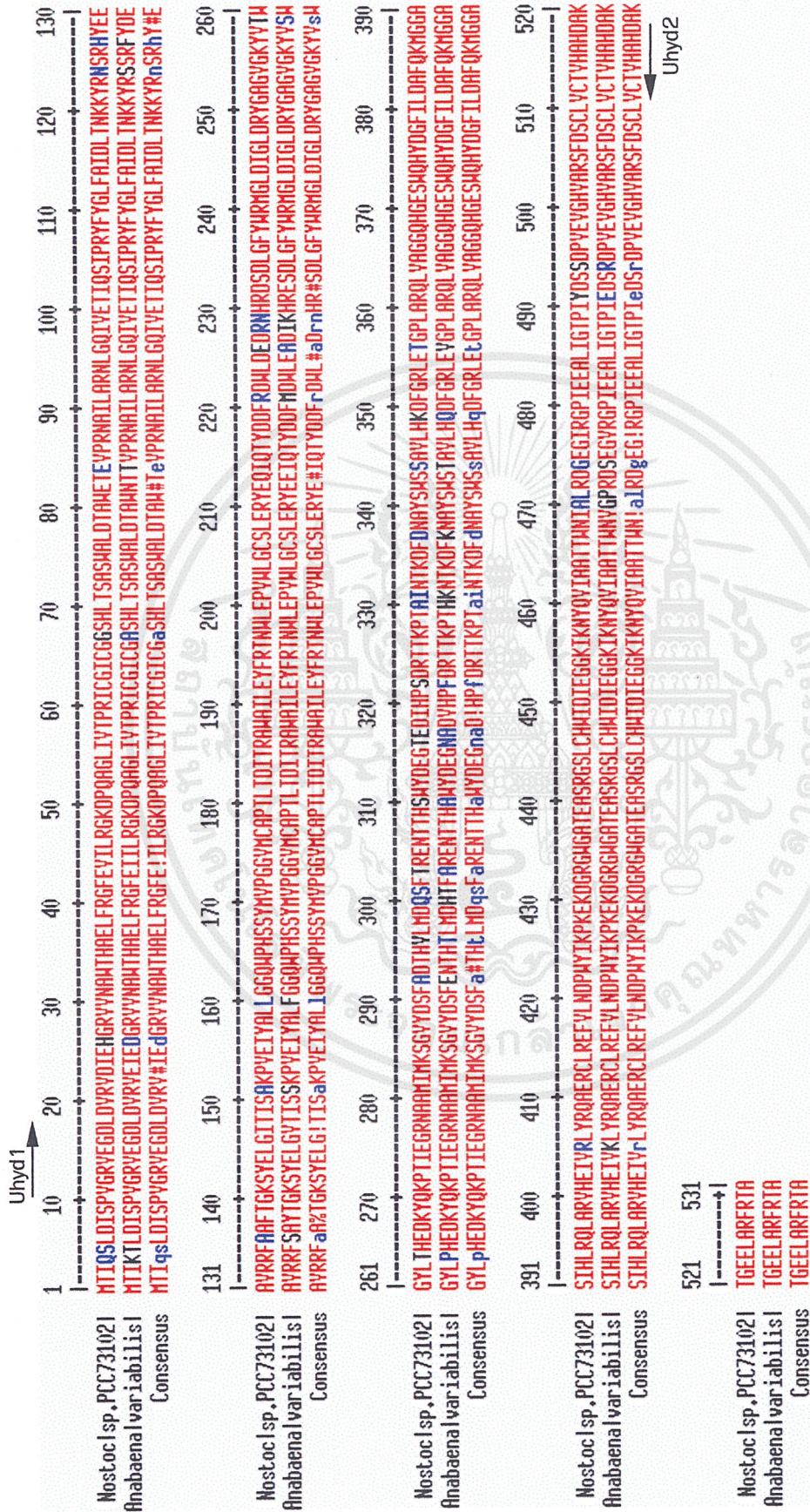
เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมี 2 ชนิดคือ Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ซึ่งในการออกแบบไพรเมอร์จะทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Uptake hydrogenase จากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และยีน Reversible hydrogenase จากไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301, *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803, *Prochlorothrix hollandica* และ *Anabaena variabilis* หลังจากนั้นเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนไปเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน Uptake hydrogenase

นำลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 มาทำการเปรียบเทียบและเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 2 บริเวณคือ ช่วงต้นและช่วงท้าย (ลูกศรในรูปที่ 11) ลำดับกรดอะมิโนในช่วงต้นที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 5' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 10 ถึง 16 ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้ PVGRVEG หลังจากนั้นเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'-CCCGTCGGTAGAGT(CT)GA(GA)GG-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ของ Uptake hydrogenase เป็น Uhyd1 ส่วนลำดับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 3' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 512 ถึง 518 โดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ DHAHVTC หลังจากนั้นนำมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับดังนี้ 5'-GC(AG)TC(AG)TGGGCGTGGA C(GT)GT-3' เรียกว่า Uhyd2 และจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,529 คู่เบส

4.2.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีน Reversible hydrogenase

นำลำดับกรดอะมิโนของ *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301, *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803, *Prochlorothrix hollandica* และ



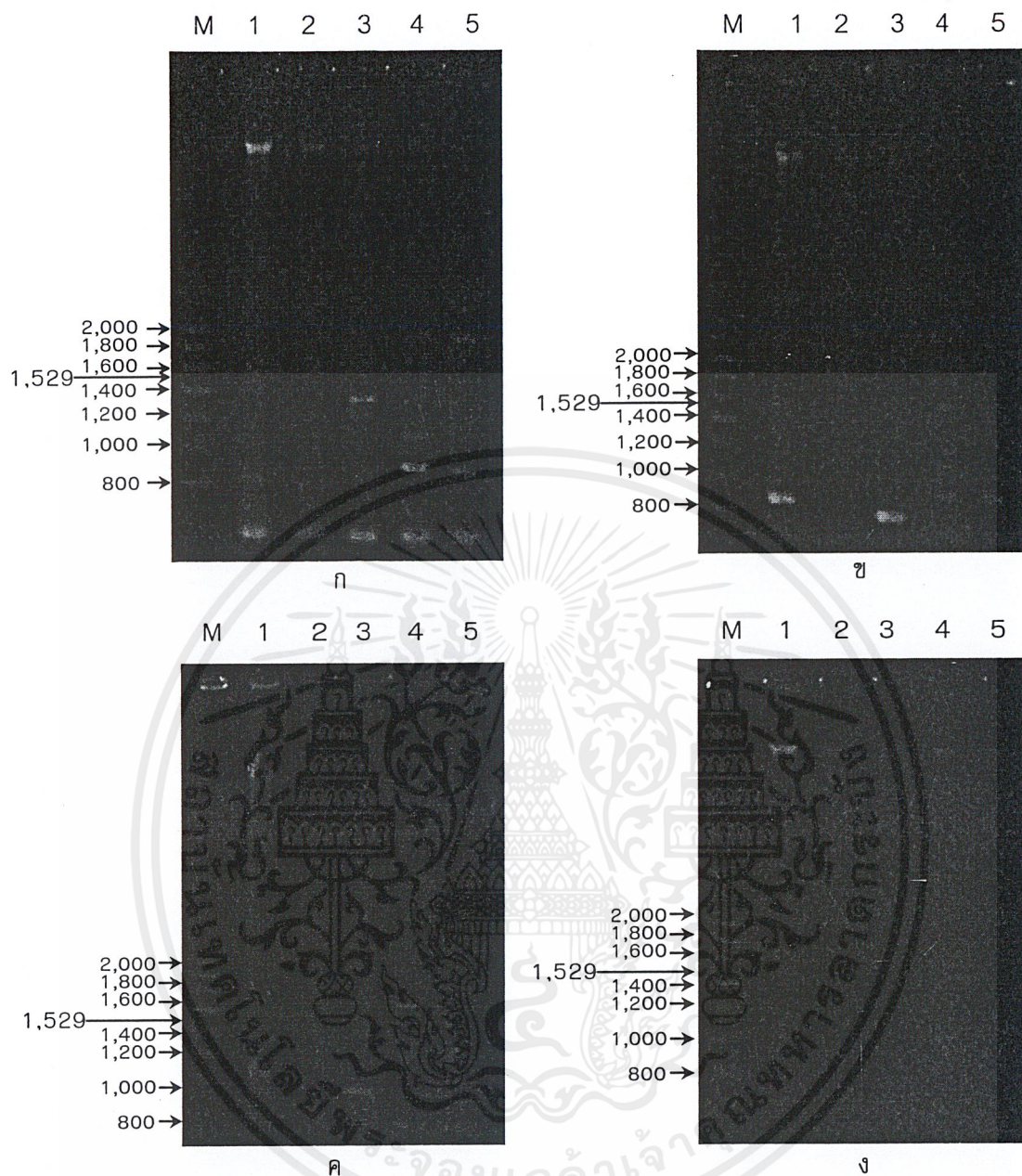
รูปที่ 11 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของ Uptake hydrogenase โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc สายพันธุ์ PCC 73102* อักษรสีแดงแสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน สีน้ำเงินแสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน

Anabaena variabilis มาทำการเปรียบเทียบและเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 2 บริเวณคือ ช่วงต้นและช่วงท้าย (ลูกศรในรูปที่ 12) ลำดับกรดอะมิโนในช่วงต้นที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 5' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 62 ถึง 68 ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้ ICGICPY หลังจากนั้นนำมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ดังนี้ 5'-AT(CT)TG(GT)GG(CT)ATTTGTCC(CG)GT-3' เรียกชื่อไพรเมอร์ของ Reversible hydrogenase เป็น hyd1 ส่วนลำดับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จากปลายทางด้าน 3' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 452 ถึง 458 โดยมีลำดับกรดอะมิโน คือ DPCLSCS หลังจากนั้นนำมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีลำดับดังนี้ 5'-(AG)CA(AG)GCC(AC)A(AG)(AG)CA(AG)GG(AG)TC-3' เรียกชื่อไพรเมอร์ของ Reversible hydrogenase เป็น hyd2 โดยจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,191 คู่เบส

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Uptake และ Reversible hydrogenase ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR

เติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR โดยเติมไพรเมอร์ Uhyd1 กับ Uhyd2 และ hyd1 กับ hyd2 เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ตามลำดับ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เลือกโปรแกรมที่ต้องการใช้และปรับอุณหภูมิของ Annealing โดยในการทดลองใช้อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิของ Extension คือ 72 องศาเซลเซียส และเวลาในการทำ Extension 2 นาทีตามขนาดของผลิตภัณฑ์ (1,529 และ 1,191 คู่เบส) หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ และล้างออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตซึ่งจะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14 ตามลำดับ

จากรูปที่ 13 และ 14 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของยีน Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase จากไซยาโนแบคทีเรียตัวอย่าง เมื่อใช้อุณหภูมิ Annealing ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4



รูปที่ 13 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR ของ Uptake hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค อีเกอโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดยแสดง ในรูป ก, ข, ค และ ง ตามลำดับ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน Bioladder 200

- 1 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR จากเชื้อ *Anabaena siamensis*
- 2 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR จากเชื้อ *Calothrix* sp.
- 3 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR จากเชื้อ *Gloeocapsa* sp. Keutzig
- 4 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR จากเชื้อ *Hapalosiphon delicatulus*
- 5 ผลิตรหัสพันธุกรรม PCR จากเชื้อ *Spirulina* sp. Turpin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ของ Reversible hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดยแสดงในรูปแบบ ก, ข, ค และ ง ตามลำดับ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน Bioladder 200

- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Anabaena siamensis*
- 2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Calothrix* sp.
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Gloeocapsa* sp. Keutzig
- 4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Hapalosiphon delicatulus*
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Spirulina* sp. Turpin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของยีน Uptake hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)			
	40	45	50	55
<i>Anabaena siamensis</i>	< 800	900	900	-
	900	<u>1,500</u>	<u>1,500</u>	-
<i>Calothrix</i> sp.	< 800	-	-	-
<i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig	< 800	800	800	-
	1,300		1,300	
<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	900	900	900	-
	1,050	1,000	1,000	
		1,100	1,100	
		<u>1,500</u>	<u>1,500</u>	
<i>Spirulina</i> sp. Turpin	850	850	850	-
	1,800	1,800	1,000	
			1,800	

ใน *Anabaena siamensis* พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ที่มีขนาดน้อยกว่า 800 และขนาดประมาณ 900 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 900, 1,500 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส

ใน *Calothrix* sp. พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 800 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR

ใน *Gloeocapsa* sp. Keutzig พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 800 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มี

ตารางที่ 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของยีน Reversible hydrogenase ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)			
	40	45	50	55
<i>Anabaena siamensis</i>	-	-	<u>1,200</u>	-
<i>Calothrix</i> sp.	-	-	-	-
<i>Gloeocapsa</i> sp. Keutzig	900			
	<u>1,100</u>	-	-	-
	1,300			
<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	950	950	950	-
<i>Spirulina</i> sp. Turpin	1,000	1,000	1,000	-
	<u>1,100</u>	<u>1,100</u>	<u>1,100</u>	-

ขนาดประมาณ 800 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR

ใน *Hapalosiphon delicatulus* พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 900 และ 1,050 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 900, 1,000, 1,100 และ 1,500 คู่เบส ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์

ใน *Spirulina* sp. Turpin พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 850 และ 1,800 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ยังพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ใน *Anabaena siamensis* พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ใน *Calothrix* sp. ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา

ใน *Gloeocapsa* sp. Keutzig พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ซึ่งมีขนาดประมาณ 900, 1,100 และ 1,300 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ใน *Hapalosiphon delicatulus* พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส

ใน *Spirulina* sp. Turpin พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 1,000 และ 1,100 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส

ที่อุณหภูมิ Annealing 55 องศาเซลเซียส ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ในไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรีย พบว่านอกจากจะได้ดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่พบแล้วจะพบอาร์เอ็นเอปนเปื้อนด้วยในบางครั้ง โดยสังเกตได้จากแถบด้านล่างของหมายเลข 1 และ 5 ของรูปที่ 10 จากเชื้อ *Anabaena siamensis* และ *Spirulina* sp. Turpin ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดของเชื้อแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะแตกต่างกันไป บางชนิดเมื่อสกัดดีเอ็นเอจะได้อาร์เอ็นเอหรือโปรตีนปนเปื้อนออกมามาก นอกจากนี้ในการทดลองยังต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนของเอนไซม์ DNase จากมือ ซึ่งจะย่อยสลายดีเอ็นเอ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นปื้นของหมายเลข 1 และ 5 ของรูปที่ 10 จากเชื้อ *Anabaena siamensis* และ *Spirulina* sp. Turpin

การออกแบบไพรเมอร์

จากการออกแบบไพรเมอร์สองชนิดคือ Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase ไพรเมอร์ที่ได้ของ Uptake hydrogenase สามารถจับกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไซยาโนแบคทีเรียได้ดีที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยดูจากแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่พบ อาจเป็นเพราะว่าการออกแบบไพรเมอร์ของ Uptake hydrogenase ได้มาจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อสองชนิดคือ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ จึงอาจไม่เพียงพอสำหรับออกแบบไพรเมอร์ที่ดีที่จะใช้ได้สำหรับไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด ส่วนไพรเมอร์ของ Reversible hydrogenase ที่ออกแบบได้ นำมาจากบริเวณที่เป็น Nickel binding site ซึ่งเป็นบริเวณที่พบในทุกสิ่งมีชีวิตที่มี Reversible hydrogenase จึงสามารถใช้ค้นหา ยีน Reversible hydrogenase ได้

อุณหภูมิของ Annealing

การปรับอุณหภูมิของ Annealing (การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ) มีผลต่อผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ พบว่าที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิดที่มีขนาดต่างๆ ทั้งมีขนาดใกล้เคียงและแตกต่างจากขนาดที่คาดว่าจะได้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้อาจจะสามารถจับกับดีเอ็นเอในบริเวณอื่นได้ จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดอื่นปนด้วย

ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake และ Reversible hydrogenase

ใน *Anabaena siamensis* พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้งสองชนิด ทำให้คาดว่า *Anabaena siamensis* มียีนของไฮโดรจีเนสทั้งสอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ตีพิมพ์แล้วใน *Anabaena variabilis* (Nakamura, K. และคณะ, 2001; Happe, T. และคณะ, 2000) *Anabaena siamensis* ที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นคือมีเฮเทอโรซิสต์หัวท้าย ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการตรึงไนโตรเจนและมีการใช้เอนไซม์ Uptake hydrogenase มาก ดังนั้นจึงทำให้พบแถบดีเอ็นเอของยีน Uptake hydrogenase มากกว่าแถบดีเอ็นเอของยีน Reversible hydrogenase (ตารางที่ 3 และ 4)

ใน *Calothrix* sp. ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิด อาจเกิดจากดีเอ็นเอของเชื้อจับกับไพรเมอร์ได้ไม่ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Calothrix* sp. มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในบริเวณอนุรักษ์ของยีนทั้งสองชนิด หรืออาจเป็นไปได้ว่าไม่มียีนที่ผลิตเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทั้งสอง

Gloeocapsa sp. Keutzig คาดว่ามียีน Uptake hydrogenase เนื่องจากพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ซึ่งมีขนาดไม่ตรงกับขนาดที่คาดว่าจะได้ (1,529 คู่เบส) ดังนั้นหากต้องการตรวจสอบว่ามียีน Uptake hydrogenase ทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปโคลนและหาลำดับเบส นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเท่านั้น เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้จับกับดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Keutzig มีความจำเพาะเจาะจงกันน้อย จึงพบแถบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิต่ำ

ใน *Hapalosiphon delicatulus* พบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase (ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส) ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้ (1,529 คู่เบส) ทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะมียีน Uptake hydrogenase

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์พบว่า เป็นกลุ่มก้อน เจริญเติบโตช้า มีเฮเทอโรซิสต์ ภายในน่าจะมีการตรึงไนโตรเจนและใช้ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน จึงอาจกล่าวได้ว่า *Hapalosiphon delicatulus* น่าจะมี Uptake hydrogenase นอกจากนี้จะพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase แล้วยังพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะได้ (1,191 คู่เบส) ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า *Hapalosiphon delicatulus* อาจมียีน Reversible hydrogenase เหมือนในกรณีของ *Anabaena variabilis* ซึ่งมียีนทั้ง 2 ชนิด การพิสูจน์การมียีน Reversible hydrogenase ใน *Hapalosiphon delicatulus* ทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปโคลนแล้วหาลำดับเบสต่อไป

ใน *Spirulina* sp. Turpin พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 850 และ 1,800 คู่เบส ซึ่งแตกต่างจากขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้ (1,529 คู่เบส) และเนื่องจาก *Spirulina* sp. Turpin มีลักษณะเป็นเกลียว ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ จึงคาดว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Uptake hydrogenase นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Reversible hydrogenase ที่มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้ (1,191 คู่เบส) ซึ่งสอดคล้องกับการค้นพบแอกติวิตีของ เอนไซม์ Reversible hydrogenase ในไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina maxima* (Llama และ คณะ, 1979) จึงเป็นการสนับสนุนการมียีน Reversible hydrogenase ใน *Spirulina* sp. Turpin

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. พบยีน Uptake hydrogenase ใน *Anabaena siamensis* และ *Hapalosiphon delicatulus* ส่วน *Calothrix* sp. ไม่สามารถสรุปได้ว่ามียีนชนิดนี้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ทุกอุณหภูมิ Annealing ใน *Gloeocapsa* sp. Keutzig และ *Spirulina* sp. Turpin ไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่ามียีน Uptake hydrogenase เนื่องจากมีขนาดไม่ตรงกับที่คาดว่าจะได้ (1,529 คู่เบส)
2. พบยีน Reversible hydrogenase ใน *Anabaena siamensis*, *Gloeocapsa* sp. Keutzig และ *Spirulina* sp. Turpin ส่วน *Calothrix* sp. ไม่สามารถสรุปได้ว่ามียีน

ชนิดนี้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ทุกอุณหภูมิ Annealing ใน *Hapalosiphon delicatulus* ไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่ามีเอนไซม์ Reversible hydrogenase เนื่องจากมีขนาดไม่ตรงกับที่คาดว่าจะได้ (1,191 คู่เบส)

3. จากการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดคือ Uptake hydrogenase และ Reversible hydrogenase สรุปได้ว่าไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบนี้สามารถจำแนกเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียได้



ภาคผนวก 1

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

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

ส่วนประกอบอาหาร BG 11 100 เท่า

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

ส่วนประกอบอาหาร BG 11

อาหาร BG 11 100 เท่า	10 มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (2 กรัม/100มิลลิลิตร)	1 มิลลิลิตร
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1 มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ($FeNH_4$ Citrate) (0.60 กรัม/100มิลลิลิตร)	1 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

ส่วนประกอบ Tris-boric-EDTA 10 เท่า

Tris	0.89	โมลาร์
กรดบอริก	0.89	โมลาร์
EDTA	25	มิลลิโมลาร์

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris 107.81 กรัม กรดบอริก 55.03 กรัม และ EDTA 9.31 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนได้ 8.3 หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

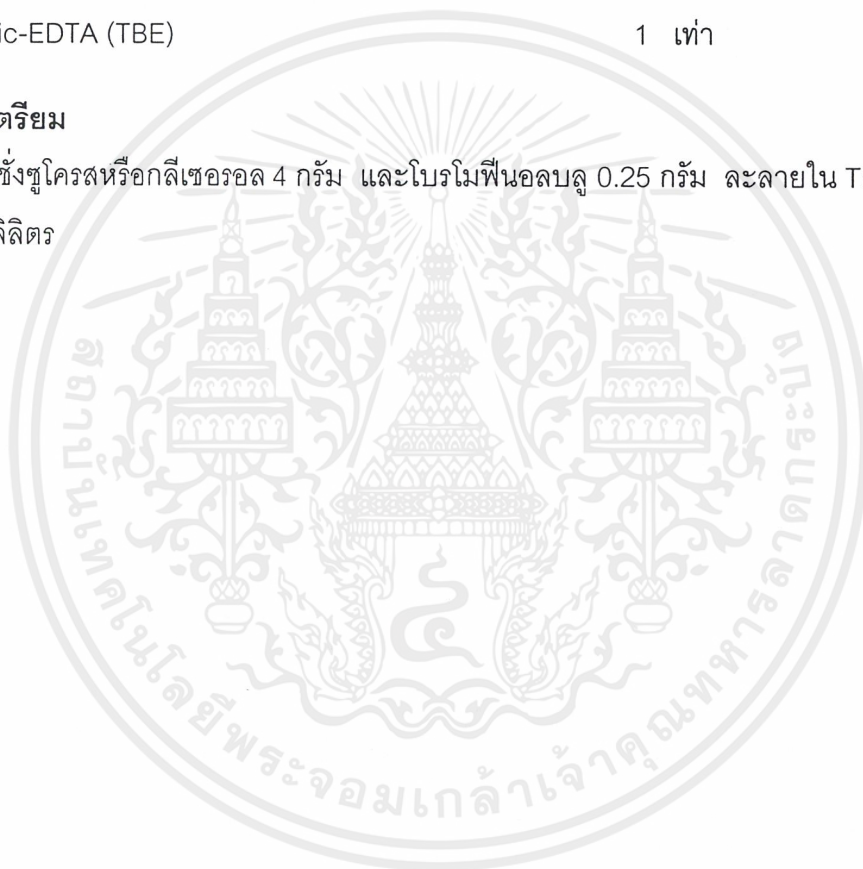
ภาคผนวก 3

ส่วนประกอบ Tracking dye

ซูโครส (Sucrose) หรือกลีเซอรอล (Glycerol)	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue)	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-boric-EDTA (TBE)	1	เท่า

วิธีการเตรียม

ชั่งซูโครสหรือกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟีนอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-boric-EDTA 100 มิลลิลิตร



เอกสารอ้างอิง

พรงาม ลิ้มตระกูล., ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. หน้า 237-239, โรงพิมพ์ดาว กรุงเทพฯ , 2541.

ลัดดา วงศ์รัตน์., แพลงก์ตอนพืช. หน้า 22-51, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 2542.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล., การประชุมเชิงวิชาการเรื่อง เทคนิค PCR ในการวินิจฉัยโรคและแยกวิเคราะห์ยีน. หน้า 32-47, กรุงเทพฯ ฯ, 2536.

อภัสสรฯ ชมิดท์., เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. หน้า 78-82, สำนักพิมพ์รั้วเขียว, 2537.

Appel, J. and Schulz, R., "Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I)" Biochim. Biophys. Acta. 1298 (1996) :141-147.

Appel, J. and Schulz, R., "Hydrogen metabolism in organism with oxygenic photosynthesis : hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning?" J. Photochem. Photobiol. 47(1998) : 1-11.

Boichenko, V.A. and Hoffmann, P., Photosynthetica 30. pp.522-527, 1994.

Boison, G., Schmits, O., Mikheeva, L., Shestakov, S. and Bothe, H., "Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*" FEBS Lett. 394 (1996) : 153-158.

Caldwell, Daniel R., Microbial physiology & metabolism. pp.156-158, Dubuque, IA : Wm.C. Brown, 1995.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Carr, N.G. and Whitton, B.A., The biology of blue-green algae. 676 p., University of California, 1973.
- Carrasco, C.D., Buettner, J.A. and Golden, J.W., "Programmed DNA rearrangement of cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts" Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 92 (1995) : 791-795.
- Desikachary, T.V., Indian Council of Agricultural Research. pp. 528-580, New Delhi Press, 1959.
- Fay, P. and Walsby A.E., "Metabolic activities of isolated heterocysts of the blue-green algae *Anabaena cylindrica*" Nature.Land (1966) : 94-95.
- Fay, P. and Lang N.J., "The heterocysts of blue-green algae I, Ultrastrual integrity often isolation" Proc.R.SocLond B. 179 (1971) : 185-192.
- Fay, P. และคณะ., "Is the heterocysts the site of nitrogen fixation in blue-green algae". Nature.Land. 220 (1968) : 810-812.
- Graham, Linda E., Algae. 579 p., Hall International (UK), London, 2000.
- Hall, D.O., Markov, S.A., Watanabe, Y. and Rao, K.K., "The potential applications of cyanobacteria photosynthesis for clean technologies" Photosynthesis Res. 46. pp. 159-167, 1995.
- Houchins, J.P., "The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria" Biochim. Biophys. Acta. 786 (1984) : 227-255.
- Kerfin, W. and Boger, P., "Light-induced hydrogen evolution by blue-green algae (cyanobacteria)" Physiol. Plant. 54 (1982) : 93-98.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R. and Lindblad, P., "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102 : Effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen. Plant Physiol" Biochem. 33 (1995) : 617-623.

- Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R. and Lindblad, P., "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102 : Cloning and characterization of a *hupSL* homologue" Arch. Microbiol. 169 (1998) : 276-274.
- Peschek, G.A., "Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H₂ dependent photoreduction and related reactions" Biochim. Biophys. Acta. 548 (1979a) : 187-202.
- Peschek, G.A., "Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction" Biochim Biophys. Acta. 548 (1979b) : 203-221.
- Rickwood D. and Hames B.D., Gel electrophoresis of nucleic acid. 311 p., Oxford : IRL Press, 1990.
- Sambrook Joseph., Molecular Cloning. 312 p., Harbor Laboratory United states of America, 1989.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H., "Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria" Eur. J. Biochem. 233 (1995) : 266-276.
- Schulz, R., "Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and Cyanobacteria". J. Mar. Biotechnol. 4 (1996) : 16-22.
- Stephenson, M. and Stickland, L.H., "Hydrogenase : A bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme" J. Biochem. 25 (1931) : 205-214.
- Stewart, W.D.P. และคณะ., "Nitrogenase activity in heterocysts of blue-green algae." Nature, Land. (1969) : 226-228.
- Stewart, W.D.P. และคณะ., "N₂-fixing cyanobacteria and their potential application." Phil.Trans.R.Soc.Land.B. 317 (1987) : 245-258.

Sze, Philip., A biology of the algae. pp. 19-30, Imprint Dubuque. IA : Wm. C. Brown,
1993.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้