

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย
ที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE HYDROGENASE LARGE SUBUNIT
GENES IN THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM
Anabaena siamensis



ชมาภรณ์ ธงเพ็ง
CHAMAPORN THONGPENG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

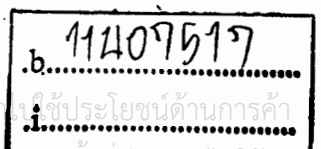
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-08-3



เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 51665.....

วัน,เดือน,ปี 26 ก.ค. 2547

ขอสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE HYDROGENASE LARGE SUBUNIT
GENES IN THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM

Anabaena siamensis



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974-9708-08-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน
ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

นักศึกษา

นางสาวชมภารณ์ ธงเพ็ง

รหัสประจำตัว

43065220

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

พ.ศ.

2547

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ

บทคัดย่อ

ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hupL* เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hupL* และ *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เริ่มต้นโดยออกแบบไพรเมอร์ของยีน *hupL* และ *hoxH* เพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11 และแตกเซลล์ด้วยวิธีกล สกัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำจีโนมดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูท (PCR) และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (pGEM-T Easy หรือ pDrive) หลังจากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาวและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทดลองได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* จำนวน 1,596 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Nostoc punctiforme* (87%), *Anabaena variabilis* (86%) และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 (85%) สำหรับรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* จำนวน 1,461 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สทีเบลไฮโดรจีเนสของ *A. variabilis* (85%), *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 (85%), *Spirulina platensis* (73%), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (73%) และ *Spirulina subsalsa* (70%) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน *hupL* และ *hoxH* มาติดฉลากด้วย DIG-High Prime และใช้เป็นตัวติดตามสำหรับตรวจสอบยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization โดยพบสัญญาณแถบของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสใน *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* ในขณะที่พบสัญญาณแถบของยีนรีเวอร์สทีเบลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Gloeocapsa* sp. Kuetzig



Thesis	Nucleotide Sequences of the Hydrogenase Large Subunit Genes in the Nitrogen-Fixing Cyanobacterium <i>Anabaena siamensis</i>
Student	Miss Chamaporn Thongpeng
Student ID.	43065220
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

In cyanobacteria, hydrogenase enzymes can be classified into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Another enzyme, reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hoxH*. This study aims to sequence *hupL* and *hoxH* genes of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Degenerated primers of *hupL* and *hoxH* genes were designed. *A. siamensis* was cultivated in BG11 medium and cells were broken by mechanical method. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform method. The PCR products of *hupL* and *hoxH* genes were amplified by polymerase chain reaction method. They were ligated into plasmid PCR cloning vector (pGEM-T Easy or pDrive) and transformed to competent *E. coli* DH5 α . Transformants were selected on ampicillin containing LB agar based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNAs were extracted from white colonies and sequenced. A 1,596 bp of *hupL* PCR product was sequenced. The amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by Blast server and showed the high similarity to the uptake hydrogenase of *Nostoc punctiforme* (87%), *Anabaena variabilis* (86%) and *Nostoc* sp. PCC 7120 (85%). For reversible hydrogenase, a 1,461 bp of *hoxH* PCR product was sequenced. The amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

by Blast server and showed the high similarity to the reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* (85%), *Nostoc* sp. PCC 7120 (85%), *Spirulina platensis* (73%), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (73%) and *Spirulina subsalsa* (70%). The fragments of *hupL* and *hoxH* genes were labeled with the DIG-High Prime and used as probes for Southern blot hybridization to detect hydrogenase genes in other cyanobacteria. Uptake hydrogenase signal was found in *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* and *Nostoc carneum* whereas reversible hydrogenase signal was found in all cyanobacteria investigated including the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. Kuetzig.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา
ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ ในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดีในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาที่
ผ่านมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์
ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ มลินี ตันติยาภรณ์
รองศาสตราจารย์ ดร.พรณี ฐิตาภิขิต และ รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ ที่กรุณาให้
คำแนะนำ ตรวจแก้ไข และปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา-
ประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน เข้าใจ เป็นกำลังใจ
และคอยเฝ้าดูความสำเร็จในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 พลังงานไฮโดรเจน.....	5
2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส.....	6
2.3 เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส.....	7
2.4 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส.....	10
2.5 ไฮยาโนแบคทีเรีย.....	13
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
3.2 สารเคมี.....	21
3.3 อุปกรณ์.....	23
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
4.1 การเตรียมเชื้อไฮยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation.....	34
4.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมดีเอ็นเอของไฮยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i>	36
4.3 การออกแบบไพรเมอร์.....	38
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนฮัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และยีน รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่.....	42
4.5 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล.....	44
4.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์ม เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E.coli</i> สายพันธุ์ DH5α.....	45
4.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานส์ฟอร์มเม้นท์ด้วยต่าง.....	46
4.8 การตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	47
4.9 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1.....	49
4.10 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนฮัทเทคไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่.....	53
4.11 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่.....	64
4.12 การศึกษายีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในไฮยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยวิธี Southern blot hybridization.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	82
5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่.....	82
5.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่.....	82
5.3 การศึกษาการมียีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้ง 2 ชนิดในไฮยาโนแบคทีเรีย สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	83
บรรณานุกรม.....	85

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	92
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11.....	93
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB.....	94
ภาคผนวก ค บัฟเฟอร์.....	95
ภาคผนวก ง เวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR.....	96
ประวัติผู้เขียน.....	97



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ร้อยละของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hupSL</i> ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด <i>Nostoc</i> sp. PCC 73102, <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	10
2.2 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary.....	14
2.3 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้.....	15
3.1 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม.....	28
4.1 ไพรมเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1.....	50
4.2 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ <i>A. siamensis</i> ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pUTA1.1 กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	52
4.3 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ <i>A. siamensis</i> ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pRVA1.1 กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	53
4.4 ไพรมเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน อัทเทคไฮโดรจีเนส.....	54
4.5 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	62
4.6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของอัทเทคไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> กับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994) ในบริเวณของการเข้าจับกับนิคเกิล.....	62
4.7 ไพรมเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนส.....	65
4.8 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	73
4.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> กับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994) ในบริเวณของการเข้าจับกับนิคเกิล....	73

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน.....	6
2.2 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนส.....	9
2.3 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Alcaligenes eutrophus</i>	11
2.4 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803, <i>Anacystis nidulans</i> และ <i>Anabaena variabilis</i>	12
2.5 รูปร่างของ <i>Anabaena siamensis</i>	16
3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (n) และการดูดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x).....	24
3.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในพลาสติก.....	25
4.1 <i>Anabaena siamensis</i> บนอาหารแข็ง BG11.....	35
4.2 จีโนมิตีเอ็นเอของ <i>Anabaena siamensis</i> จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์.....	37
4.3 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>Anabaena</i> <i>variabilis</i> และ <i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 73102.....	39
4.4 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>Synechococcus</i> sp., <i>Prochlorothrix hollandica</i> , <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803 และ <i>Anabaena variabilis</i>	41
4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 (n) และผลิตภัณฑ์ PCR ของ ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 (x) ที่อุณหภูมิการจับตัวต่างๆ.....	43
4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป.....	45
4.7 พลาสมิด pUTA (n) และพลาสมิด pRVA (x) ที่สกัดด้วยต่าง.....	47
4.8 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA1.1 (n) และการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRVA1.1 (x) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	48
4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pUTA1.1.....	51
4.10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pRVA1.1.....	52

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 แผนที่ยีนอัทเทคไฮโดรจีเนส.....	54
4.12 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของอัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป.....	55
4.13 พลาสมิด pUHS (ก) และ พลาสมิด pUSA (ข) ที่สกัดด้วยต่าง.....	57
4.14 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUHS6.1 (ก) และพลาสมิด pUSA4.1 (ข) ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	58
4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ของ <i>A. siamensis</i>	61
4.16 แผนที่ยีนรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนส.....	64
4.17 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนสหน่วย ย่อยใหญ่ ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป.....	66
4.18 พลาสมิด pRHY (ก) และพลาสมิด pRTH (ข) ที่สกัดด้วยต่าง.....	68
4.19 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRHY5.1 (ก) และพลาสมิด pRTH1.1 (ข) ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	69
4.20 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ของ <i>A. siamensis</i>	72
4.21 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอด้วย DIG-High Prime.....	75
4.22 ดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลาก (DIG-labeled DNA control).....	75
4.23 จีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	76
4.24 ผลการตรวจสอบยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> เป็นตัวติดตาม.....	78
4.25 จีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	79
4.26 ผลการตรวจสอบยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนสของ <i>A. siamensis</i> เป็นตัวติดตาม.....	81

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ในปัจจุบัน โลกมีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการประดิษฐ์คิดค้นอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ขึ้นมามากมาย เพื่อใช้อำนวยความสะดวกและใช้ในการดำรงชีวิต ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้มีการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรด้านพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ พลังงานดังกล่าวมีอยู่อย่างจำกัดและจะหมดไปในอนาคต หากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือยและไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากเชื้อเพลิงเหล่านี้จะให้พลังงานแล้ว ผลกระทบที่ตามมาจากการใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้ ได้แก่ ปัญหามลพิษ ความร้อน ภาวะเรือนกระจก และ ฝนกรด เป็นต้น จากความเป็นมาดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีหน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกหันมาให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัย พัฒนาและผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม น้ำพุร้อน และพลังงานความร้อนใต้พิภพ ในหลายๆ ประเทศมีการรณรงค์ให้ลดการใช้และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่นมีการนำพลังงานนิวเคลียร์มาใช้ทดแทนน้ำมันและยังมีการจัดหาพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ โดยนำพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้เป็นพลังงาน สำหรับประเทศไทยได้มีการคิดหาพลังงานทางเลือกใหม่มาใช้แทนน้ำมัน โดยรัฐบาลสนับสนุนการผลิตแอลกอฮอล์จากพืช เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงซึ่งอาจช่วยลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีการปนเปื้อน เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ในปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและในการขับเคลื่อนยานอวกาศ ในประเทศเยอรมนี มีการประดิษฐ์รถยนต์ที่ใช้พลังงานไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน นอกจากนี้ ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการสร้างโรงงานผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งในการผลิตต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงาน

ไฮโดรเจนที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตจำพวกสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่เกิดจากการแปรพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ (Schulz, 1996)

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ทุกชนิดและไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวบางชนิดที่ไม่ตรึงไนโตรเจน เช่น *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a; 1979b) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสทุกชนิดมีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Ni-Fe hydrogenase) Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7210 และอธิบายโปรแกรมการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (programmed DNA rearrangement) ที่เกิดขึ้นในยีนหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของอัฟเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt et al., 1998) *Anabaena variabilis* (Happe et al., 2000) และ *Gloeotheca* สายพันธุ์ PCC 6909 (unpublished result) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่สอง คือ เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป เอนไซม์ชนิดนี้มีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับชนิดแรกและทำงานได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (Frenkel et al., 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* (Llama et al., 1979) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or et al., 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris, 1981a; 1981b) จนกระทั่งปัจจุบัน มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *A. variabilis* (Schmitz et al., 1995) *A. nidulans* (Boison et al., 1996) *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996) *Prochlorothrix hollandica* (unpublished result) *Arthrospira platensis* (unpublished result) และ *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 (unpublished result)

โครงการวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* และนำผลิตภัณฑ์ PCR บางส่วนของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้เป็นตัวติดตาม ในการตรวจสอบยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดต่างๆ เพื่อที่จะนำไปสู่การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมหรือสร้างไซยาโน-
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตและสะสมไฮโดรเจนได้ในปริมาณสูง สำหรับผลิตพลังงานไฮโดรเจนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้ง 2 ชนิด คือ อพเทคไฮโดรจีเนส และรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* และตรวจสอบยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) และ ยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. siamensis* ที่เตรียมได้จากวิธี Single cell isolation (Hoshaw and Rosowski, 1973) จากนั้นสกัดจีโนมดีเอ็นเอและนำมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้งสองชนิด นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) หรือ pDrive (Qiagen, USA) และทำการทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์ผู้ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมแล้วนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสกับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน สุดท้ายนำชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้งสองมาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจสอบการมียีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้ง 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินนาในประเทศไทย และสามารถใชยีน *hupL* และ *hoxH* ของ *A. siamensis* มาใช้เป็นตัวติดตามในการทดสอบการมียีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ในอนาคตยังสามารถนำ

ความรู้ที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการผลิตไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ผลิตและสะสมไฮโดรเจนได้ในปริมาณมาก เพื่อประโยชน์ในการผลิตพลังงานสะอาดต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

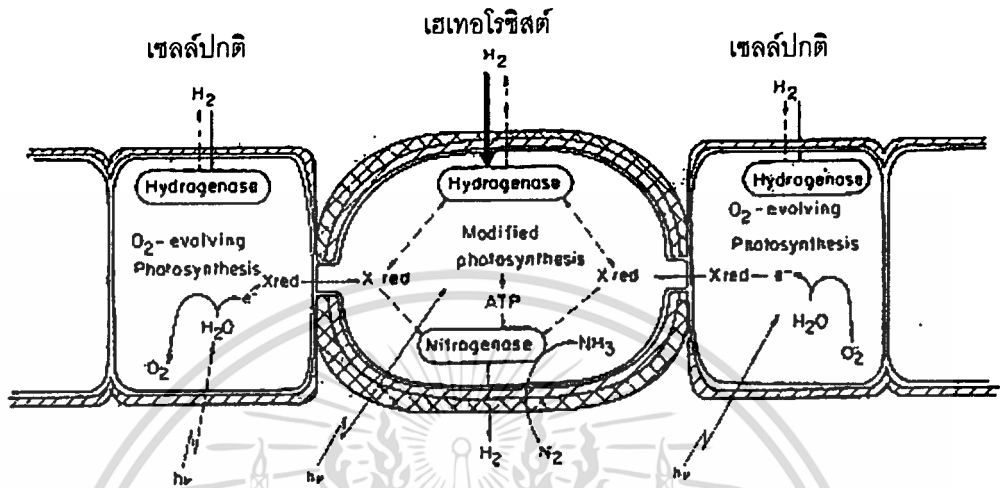
2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ในปัจจุบัน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเมื่อเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะให้พลังงานสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนยังมีน้ำหนักเบาจึงใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนจรวดและยานอวกาศ ในธรรมชาติ ไฮโดรเจนอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และเป็นส่วนประกอบของน้ำ การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ในประเทศสหรัฐอเมริกา ไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการสตรีมรีฟอร์มมิง (stream reforming) หรือเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทางปิโตรเลียมและทางเคมี กระบวนการสตรีมรีฟอร์มมิงใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล โดยขั้นแรกของปฏิกิริยาเชื้อเพลิงถูกสลายไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปโดยเปลี่ยนคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 392 องศาฟาเรนไฮต์ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้คือ การแยกน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (electrolysis) โดยที่อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้น้ำเกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการสลายพันธะเคมีระหว่างไฮโดรเจนกับออกซิเจน 1.24 โวลต์ และใช้ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยเหตุที่วิธีการผลิตพลังงานไฮโดรเจนดังกล่าว ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) โดยเฉพาะจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย พลังงานแสงจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีของแสง (photoelectrochemical process) และได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถพบได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์และในเซลล์ปกติ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนสพบในเฮเทอโรซิสต์ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย โดยปฏิกิริยาดังกล่าวต้องอาศัยพลังงาน ATP และรีดิวซิงพาวเวอร์ (reducing power) ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเกิดขึ้น ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในเซลล์ปกติ จะเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจากน้ำไปยังตัวรับอิเล็กตรอนและผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อทำหน้าที่สร้างไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่ 2.1)

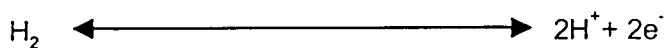


รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน

ที่มา : Tel-Or et al., 1978

2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

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



ในปี ค.ศ. 1931 Stephenson และ Stickland บัญญัติศัพท์คำว่า "ไฮโดรจีเนส" ขึ้นเป็นครั้งแรก ภายหลังจากพบการสร้างและสลายไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ซึ่งงานนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารการเกษตร (Agricultural Journal) ไม่กี่ปีต่อมา อย่างไรก็ตามมีข้อผิดพลาดในเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความไว (sensitive) ต่อก๊าซไฮโดรเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

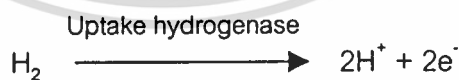
1. อัฟเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เร่งทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น

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

2.3 เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า membrane-bound hydrogenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือในไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakoid membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ (Appel and Schulz, 1998; Eisbrenner *et al.*, 1978; Vignais *et al.*, 2001) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการ



เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสได้รับความสนใจศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Azotobacter* sp. (Smith *et al.*, 1976) *Rhizobium* sp. (Dixon, 1972) *Rhodopseudomonas capsulata* (Colbeau *et al.*, 1980) และ *Clostridium pasteurianum* (Adams *et al.*, 1981) โดยพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อก๊าซไฮโดรเจน นอกจากมีการค้นพบในแบคทีเรียแล้ว สามารถพบเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสในสาหร่ายในแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกชนิด (Houchins, 1984; Lambert and Smith, 1981; Tamagnini *et al.*, 2000) รวมถึงสาหร่ายในแบคทีเรียเซลล์เดียว

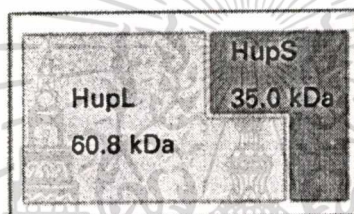
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 (*Anacystis nidulans*) (Peschek, 1979a; 1979b; 1979c; Boison *et al.*, 1996; Elisbrenner *et al.*, 1978)

เนื่องจากเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสมีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายไฮโดรเจน ซึ่งไฮโดรเจนเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเฮเทอโรซิสต์จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ จึงได้รับความสนใจมาศึกษาเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Lambert and Smith, 1981; Oxelfelt *et al.*, 1995; Wolk *et al.*, 1994) โดยสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์ (Eisbrenner *et al.*, 1978) และในเซลล์ปกติ (Houchins and Burris, 1981a; Lindblad and Sellstedt, 1990; Rai *et al.*, 1992) ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ในการเกิดเฮเทอโรซิสต์ (Tamagnini *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าปัจจัยภายนอกได้แก่ แสง นิกเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลต่อปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน (Oxelfelt *et al.*, 1995) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะอากาศที่มีการเติมไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศจะมีสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศปกติ (Eisbrenner *et al.*, 1978) ใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413 มีการศึกษาพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ปกติที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ (Troshina *et al.*, 1996) และจากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (1984) ที่ศึกษาผลของนิกเกิลต่อการสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F พบว่าการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงไปในการเลี้ยง ซึ่งนอกเหนือจาก *Anabaena* แล้วยังมีรายงานอื่นที่ยืนยันว่าในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ อีกหลายสายพันธุ์ที่กิจกรรมของการสลายไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน (Daday *et al.*, 1985; Daday and Smith, 1987; Oxelfelt *et al.*, 1995; Papen *et al.*, 1986; Shravan and Polasa, 1991; Tredici *et al.*, 1990)

ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอร์ิกเอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 2 หน่วยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.2) โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน และถอดรหัสมาจากยีน *hupL* (*hup* มาจาก *hydrogen uptake*) ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน และถอดรหัสมาจากยีน *hupS* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Carrasco *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 2000; Lindberg *et al.*, 2000; Lindblad and Sellstedt, 1990; Oxelfelt *et al.*, 1998; Tamagnini *et al.*, 1995) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดของอัลเทคไฮโดรจีเนสในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียด้วยกัน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง (similarity) กันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 2.1 แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 กับแบคทีเรีย *Desulfovibrio gigas* พบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน HupL จะลดลงเป็น 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่ง HupL ของไซยาโนแบคทีเรียมีบริเวณจับของนิคเกิลที่ปลายเอ็น (N-terminal) ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น FRGFE(IV) ILRGKDPQAGLIVTPRIC⁶²GIC⁶⁵G(A/G)SH ส่วนบริเวณจับของนิคเกิลที่ปลายซี (C-terminal) มีลำดับกรดอะมิโนเป็น DPVEVGHVARSFDSC⁵⁰⁹LVC⁵¹²TVHAH (Tamagnini *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.2 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนส
ที่มา : Tamagnini *et al.*, 2002

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนส เริ่มต้นโดย Carrasco และคณะ (1995) ได้อธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ และต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสทั้งหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1998) และ *Anabaena variabilis* (Happe *et al.*, 2000)

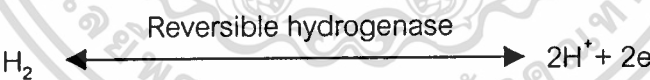
ตารางที่ 2.1 ร้อยละของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด *Nostoc* sp. PCC 73102, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* sp. PCC 7120

Strains	Nucleotide Identity (%)		Amino acid Identity/similarity (%/%)	
	<i>hupS</i>	<i>hupL</i>	HupS	HupL
<i>Nostoc</i> sp. PCC 73102 vs <i>Anabaena variabilis</i>	84.4	83.8	88.8/93.8	91.1/95.1
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 vs <i>Anabaena variabilis</i>	95.1	94.9	98.1/99.7	98.7/99.6
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 vs <i>Nostoc</i> sp. PCC 73102	84.2	85.0	88.8/93.8	90.6/95.1

ที่มา : Tamagnini et al., 2002

2.4 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการ



รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน (Hansel and Lindblad, 1998; Kentemich et al., 1989; 1991; Lindblad and Tamagnini, 2001; Serebriakova et al., 1994) โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (Frenkel et al., 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* (Llama et al., 1979) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or et al., 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris,

1981a; 1981b) เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์
 อพเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนมอน-
 ออกไซด์มากกว่าเอนไซม์อพเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อพเทคไฮโดรจีเนส
 (Houchins, 1984; Serebryakova *et al.*, 1996) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส
 ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ
 (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของ
 โปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อย
 รวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส
 (diaphorase) (รูปที่ 2.3) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน
 $hoxY$ และ $hoxH$ ตามลำดับ (hox มาจาก hydrogen oxidation) ส่วนหน่วยย่อยของ
 ไดอะฟอเรส α และ γ ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน $hoxF$ และ $hoxU$ โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่
 ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ $NAD(P)^+$



รูปที่ 2.3 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน

Alcaligenes eutrophus

ที่มา : Friedrich and Schwartz, 1993

จนกระทั่งปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยา-
 โนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* (Ewart *et al.*, 1990), *A. variabilis* ATCC 29413 (Schmitz
et al., 1995), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996) และ
A. nidulans (Boison *et al.*, 1996) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิล-
 ไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียกับแบคทีเรียอื่นๆ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ไชยาโนแบคทีเรีย

ไชยาโนแบคทีเรียหรือที่เคยรู้จักกันในชื่อ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดอยู่ในดิวิชันไชยาโนไฟตา (Cyanophyta) และจัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ ไชยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลผลิต เนื่องจากมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเซลล์ทำให้ทราบว่า ไชยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบด้วยกัน พวกแรกคือ พวกคอคคอยด์ (cocoid form) พบว่ามีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปร่างกลม ทรงกระบอก กระสวย เป็นต้น พบได้ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) และอยู่รวมกัน โดยเซลล์มักจะมีซีทหรือสารเมือกหุ้ม พวกที่สองเป็นพวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous form) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถว มีทั้งที่ไม่สร้างกิ่งแขนง (unbranched filament) และสร้างกิ่งแขนง (branched filament) (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542) นอกจากนี้ บางสายพันธุ์ของไชยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นสายยังสามารถสร้างเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ผนังหนา ภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ ในสภาพธรรมชาติสามารถพบไชยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

2.5.1 ลักษณะสำคัญของไชยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2542)

1. สารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย
 - คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ
 - แคโรทีนอยด์ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) ลูเทอิน (lutein) ฟลาวิซิน (flavicin) อะฟานิไซฟิลล์ (aphanizophyll) และอะฟานิซิน (aphanycin)
 - ไฟโคบิลิโปรตีน จากรายงานของ Sze (1986) กล่าวว่าไฟโคบิลิโปรตีนในไชยาโนแบคทีเรียมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phyococyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) ไฟโคอีโรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซี-ไฟโคอีทริน (c-phycoerythrin)

2. ผนังเซลล์ของไชยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane)

ค่อนข้างหนาและฉีกขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยสารประเภทเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีองค์ประกอบเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเมมเบรนชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีรงควัตถุเรียกว่า โปรโตพลาสซึม (protoplasm) และส่วนที่มีสารพันธุกรรมเรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) ซึ่งอยู่ใจกลางของเซลล์ (กาญจนาภาชน์ ลิ้มโนมนต์, 2527)

3. แฟลกเจลลา (flagella) เซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดไม่มีแฟลกเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

4. ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) เป็นสารจำพวกแป้ง ไชยานโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เรียกเม็ดเล็กๆ ว่า ไชยานโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งแป้งไชยานโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่น คือเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง

5. ลักษณะพิเศษประจำตัวชั้นไชยานโนไฟตา คือ เป็นพืชชั้นต่ำจำพวกโปรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริงและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ไชยานโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวและชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย นอกจากนี้ไชยานโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสายบางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ ดังนั้นจึงได้มีการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไชยานโนแบคทีเรีย ซึ่งการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไชยานโนแบคทีเรียมีหลายระบบ แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ระบบของ Desikachary (1959) ได้จัดจำแนกไชยานโนแบคทีเรียออกเป็น 5 อันดับ แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การจัดจำแนกไชยานโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary

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

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดย Watanabe และคณะ (1951) ได้ทำการแยกไซยาโนแบคทีเรียจากดินนาในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกา พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีในเฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ในอินเดียพบไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน 33 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่แยกได้จากดิน ไซยาโนแบคทีเรียที่พบยกตัวอย่างเช่น *Nostoc* sp., *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Aulosira* sp., *Plectonema* sp., *Hapalosiphon* sp., *Scytonema* sp. และ *Cylindrospermum* sp. นอกจากนี้ Kaplan และคณะ (1986) ได้จัดหมวดหมู่ของไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยใช้รูปร่างเป็นเกณฑ์ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้มีทั้งหมด 26 สกุล ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

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

ที่มา : Kaplan et al., 1986

ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาไฮโดรจีเนสไนไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* (รูปที่ 2.5) ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย และเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีแสงจำกัด เมื่อจำแนก *A. siamensis* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary พบว่า *A. siamensis* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

Family Nostocaceae

Genus *Anabaena*

Specie *Anabaena siamensis*

เซลล์ของ *A. siamensis* มีรูปร่างเป็นแบบดั่งเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยมจตุรัสทรงกระบอกขนาดสม่ำเสมอ เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ตำแหน่งของการเกิดเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณตอนปลายด้านหัวท้ายของเซลล์ ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 รูปร่างของ *Anabaena siamensis*

ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สูง (Antarikanonda, 1982a; 1982b) โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrifica-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tion) ให้เป็นไนโตรท ไนเตรท หรือสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเต็มที่และตายไปจะให้อินทรีย์วัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการไถนาได้ผลดี จากประโยชน์ของ *A. siamensis* ดังที่ได้กล่าวมา *A. siamensis* จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตในการเพาะปลูก ข้าวในปัจจุบัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Daday และคณะ (1979) ศึกษาวิธีการวัดการผลิตไฮโดรเจนภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* พบว่าเมื่อเติมเมทิลไวโอเลตที่มีความเข้มข้นต่ำ (1-10 มิลลิโมลาร์) แก่เชื้อที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ จะทำให้เชื้อมีการผลิตไฮโดรเจน แต่สภาวะนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นใน *A. cylindrica* จึงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์และถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อยโดยอะเซทิลีน

Llama และคณะ (1979) ศึกษาการแยกและคุณลักษณะของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Spirulina maxima* พบว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยผ่านคอลัมน์ DE52 ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 65 เปอร์เซ็นต์และสุดท้ายผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสมีความบริสุทธิ์มากถึง 100 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุล $56,000 \pm 2,000$ ดาลตัน นอกจากนี้เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่บริสุทธิ์นี้สามารถถูกยับยั้งด้วยคาร์บอนมอนอกไซด์

Houchins และ Burris (1981a) ศึกษาบริเวณของการพบเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่แตกต่างกัน 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในเซลล์ปกติและเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์นี้ไม่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมไฮโดรเจนในเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยง สำหรับเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสพบเฉพาะในเฮเทอโรซิสต์ของเชื้อที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีอากาศ แต่กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติของเชื้อที่เจริญในสภาวะที่ให้อากาศเพียงเล็กน้อย (microaerobic) และมีไฮโดรเจน 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Houchins และ Burris (1981b) ยังศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่แตกต่างกันทั้ง 2 ชนิดของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสไม่สามารถผันกลับได้ แต่การทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนสสามารถผันกลับได้ นอกจากนี้เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสยังมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสลายไฮโดรเจนโดยรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส คือ พีเอช 6 และ 9 ตามลำดับ

Benemann และคณะ (1982) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูง *Mastigocladus laminosus* พบว่าการใช้ไฮโดรเจนภายในเซลล์ของ *M. laminosus* มีมากกว่าไซยาโนแบคทีเรีย *A. cylindrica* ถึง 10 เท่า และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่ถูกยับยั้งด้วยคาร์บอนมอนอกไซด์

Spiller และคณะ (1983) ศึกษาการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน *A. variabilis* พบว่าในเซลล์ปกติของ *A. variabilis* เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ผลิตขึ้นถูกยับยั้งอย่างผันกลับด้วยแสงและออกซิเจน โดยแสงสีขาวหรือแสงสีแดงที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจนจะยับยั้งกิจกรรมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ปกติของเชื้อได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่มิตัวให้อิเล็กตรอน กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์ปกติไม่ถูกยับยั้งด้วยแสง และในเฮเทอโรซิสต์ กิจกรรมของเอนไซม์จะไม่ถูกยับยั้งด้วยแสงที่มีความเข้ม 5,000 ลักซ์และมีความเข้มข้นของออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้ในช่วงที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์

Zhang และคณะ (1984) ศึกษาผลของนิคเกิลต่อการผลิตและสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F พบว่าการสร้างไฮโดรเจนในสภาวะที่มีอากาศและการชักนำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิคเกิลที่เติมลงไปในการ ความเข้มข้นต่ำของนิคเกิล (10 นาโนโมลาร์) จะมีผลยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน และเร่งกิจกรรมการสลายไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในเซลล์

Troshina และคณะ (1996) ศึกษาผลของไฮโดรเจนและสารอินทรีย์ตั้งต้นต่อการชักนำการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสและเอนไซม์ไนโตรจีเนสใน *A. variabilis* ATCC 29413 พบว่าในเชื้อที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ กิจกรรมของเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสมีปริมาณน้อย (2-7 ไมโครโมลของไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ เอ ต่อชั่วโมง) และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนไม่มีผลกระตุ้นการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ที่เกิดในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์

Appel และ Schulz (1996) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NAD(P)-reducing hydrogenase operon ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่าโอเปอรอนของ NAD(P)-reducing hydrogenase ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ประกอบด้วยยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก ยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ และ open reading frame (ORF) โดยเรียงลำดับต่อกันดังนี้ *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY*, *hoxH* และมี ORF3 แทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxF* กับ *hoxU* และ ORF6 กับ ORF7 แทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxY* และ *hoxH* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 กับสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ HoxE ใน *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มีความคล้ายคลึงกับ HndA ของ *Desulfovibrio fructosovorans* 33 เปอร์เซ็นต์ ลำดับกรดอะมิโนของ HoxF มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน HoxF ของ *A. variabilis* ถึง 65 เปอร์เซ็นต์และ HndC ของ *D. fructosovorans* 45 เปอร์เซ็นต์ ลำดับกรดอะมิโน HoxU คล้ายคลึงกับ HndD ของ *D. fructosovorans* 34 เปอร์เซ็นต์และ HoxU ของ *A. variabilis* ถึง 61 เปอร์เซ็นต์ ลำดับกรดอะมิโน HoxY มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน HoxY ของ *A. variabilis* และ *Alcaligenes eutrophus* เท่ากับ 65 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ HoxH ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับกรดอะมิโน HoxH ของ *A. variabilis* สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์

Tamagnini และคณะ (1997) ตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม Av1 และ Av3 ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. variabilis* ATCC 29413 สำหรับศึกษายีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็กและหน่วยย่อยใหญ่ ตามลำดับ และตรวจสอบการมียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม hup2 ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่า *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 มียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสแต่ไม่มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส ต่อมาในปี ค. ศ. 2000 Tamagnini และคณะ ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยเลือกศึกษาในส่วนที่เป็นยีน *hup*, *hox* และ *xisC* (*xisC* เป็นบริเวณที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *hupL*) พบว่าสามารถพบเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดที่ตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสและยีน *xisC* พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้น

Axelsson และคณะ (1999) ศึกษาการควบคุมการถอดรหัสของฮัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc muscorum* พบว่าหลังเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจากสภาวะที่มีไนโตรเจนไป เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน การถอดรหัสของยีน *hupL* สามารถพบในช่วงเวลาที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการถอดรหัสของยีน *hoxH* สามารถพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกของ การเพาะเลี้ยง ต่อมา Axelsson และ Peter (2002) ศึกษาผลของออกซิเจน ไนโตรเจนและนิคเกิลต่อการควบคุม การถอดรหัสของไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และ *N. muscorum* พบว่าความเข้มข้นออกซิเจนในระดับต่ำและการเติมนิคเกิลจะชักนำให้การถอดรหัสของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในระดับสูงขึ้น ส่วนไนโตรเจนจะมีผลต่อการถอดรหัสของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสเท่านั้น

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

Happe และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสและการกลายพันธุ์ของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern hybridization พบว่ายีน *hupSL* ถอดรหัสได้ขึ้นส่วนที่มีขนาด 2.7 กิโลเบสและพบการถอดรหัสในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน เชื้อสายพันธุ์กลายผลผลิตและสะสมไฮโดรเจนมากกว่าสายพันธุ์แท้ถึง 3 เท่า

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ได้จากสถาบันวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR*
17 *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ข)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 เม็ดแก้ว (Glass bead) (Sigma, USA)

3.2.2.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (ภาคผนวก ค)

3.2.2.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauroyl sarcosine) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.5 ฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol)

3.2.2.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)

(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)

3.2.2.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)

3.2.2.8 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์

3.2.2.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% ethanol)

3.2.2.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

- 3.2.3.1 dNTPs (Deoxynucleotidetriphosphate) (Promega, USA)
- 3.2.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.3.3 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.3.4 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.3.5 เจลสตาร์ (GelStar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.3.6 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ค)
- 3.2.3.7 สีส้มดีเอ็นเอ (Tracking Dye) (ภาคผนวก ค)

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

- 3.2.4.1 เอนไซม์ T4 ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด

- 3.2.5.1 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)
- 3.2.5.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)
- 3.2.5.3 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.4 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.5 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin)
- 3.2.5.6 ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (Kanamycin)

3.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.6.1 แลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (λ /*HindIII*) (Promega, USA)

3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.2.7.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.7.2 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.3 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.4 ชุด DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.3.5 ตู้อบไอร้อน (hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hermle-Labortechnik Z383K, Germany)
- 3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer 480, USA)
- 3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) (Amersham Pharmacia Biotech EPS301, Sweden)
- 3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech GNA100, Sweden)
- 3.3.12 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermoblock) (Biosan, TDB-120, Thailand)
- 3.3.15 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.3.16 เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ (Glasswares)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

3.4.1.1 เทคนิค Single cell isolation (Single cell isolation technique)

การเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Single cell isolation ทำตามวิธีของ Hoshaw และ Rosowski (1973) ขั้นแรกทำโดยเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ที่ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาเจือจางในอาหารเหลว BG11 แล้วปิเปตสารละลายเซลล์มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด นำแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงเตรียมพาสเจอร์-ปิเปต (pasteur pipette) ปลายเรียวแหลม จากการนำพาสเจอร์ปิเปตไปเผาด้วยตะเกียงบุนเส้น จนกระทั่งแก้วอ่อนตัว ขณะเดียวกันก็ใช้ปากคีบดึงปลายปิเปตให้ยืดยาวออก (รูปที่ 3.1 ก) จากนั้นนำพาสเจอร์ปิเปตที่เตรียมได้ไปใช้ดูดเซลล์ของ *A. siamensis* เพียง 1 เซลล์ (รูปที่ 3.1 ข) ไปใส่ในจานหลุมที่มีอาหารเหลว BG11 แล้วนำจานหลุมไปวางให้ได้รับแสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ ส่องดูจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นทุกวันด้วยกล้อง inverted microscope เมื่อเซลล์เดียวของ *A. siamensis* ที่แยกได้เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี streak plate technique



รูปที่ 3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (ก) และการดูดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)

ที่มา : Hoshaw and Rosowski, 1973

3.4.1.2 เทคนิค streak plate (streak plate technique)

การเตรียมเชื้อไฮยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำลวดเย็บเชื้อ (loop) ไปลนไฟจนร้อนแดง ทั้งไว้สักพักให้เย็น แล้วนำลวดเย็บเชื้อไปเย็บเชื้อไฮยาโนแบคทีเรียมาลาก (streak) บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบเซลล์ที่เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว BG11 ต่อไป

3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไฮยาโนแบคทีเรีย

3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

เพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka *et al.*, 1979) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 7 ถึง 10 วัน (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 การเพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์

ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติม GelStar ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาด จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรส เจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.4.5 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่ถอดรหัสมาจากยีน *hupL* และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่ถอดรหัสมาจากยีน *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรียที่รายงานไว้ในธนาคารยีน (GenBank) มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anacystis nidulans*, *Prochlorothrix hollandica*, *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anabaena variabilis* จากนั้นเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกัน โดยคาดว่าจะเป็บริเวณอนุรักษ์มาเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาใช้สร้างไพรเมอร์ คำนวณค่า Tm (melting temperature) และความเป็นไปได้ในการเข้าจับกันของไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ทั้งสองไปใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ของ *Anabaena siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR 1 เท่าที่มีดีออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมลาร์ upstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ downstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ จีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาณ 100 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Machine) โดยมีขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอนแรก initial denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่สองจะทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นจำนวน 30 รอบ โดยแต่ละรอบแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรก denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่สอง annealing ใช้อุณหภูมิ 40 ถึง 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นสุดท้าย extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (ตารางที่ 3.1) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่ 3 คือ final extension ทำที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้งหมดทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามข้อ 3.4.4

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

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

3.4.7 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ทำการตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลและนำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลแบบสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) โดยนำหลอดทดลองที่มีเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์แล้ว ปิเปตสารละลายใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน Spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10 การทรานสฟอร์มเมชัน

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.9 หรือที่ได้เตรียมในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง ปิดเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีส่วนผสมที่เตรียมไว้สำหรับ ligation ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.8 จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นย้ายไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมหอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

3.4.11 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลินเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยต่าง

3.4.12 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ต่าง (Alkali lysis)

นำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.4.11 มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายใน Solution I ที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาและวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution III ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 60

มิลลิลิตร กลาเซี่ยลอะซิดิก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 วินาที และวางบนน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนใสในหลอดใหม่ เติมหเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรที่ได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ตากให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.4.13 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.12 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 15 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

3.4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ชนิดจาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer

3.4.15 การศึกษาการมียีนไฮโดรจิเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซโทพลาซึมด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

3.4.15.1 การติดตามตัวติดตาม

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน *hupL* และ *hoxH* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 3.4.13 วิเคราะห์ปริมาณและขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 307 คู่เบสและ 400 คู่เบส เพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับยีน *hupL* และ *hoxH* ตามลำดับ ทำการติดตาม Dioxygenin ที่ปลายของดีเอ็นเอ โดยเปิดพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมใสในหลอดทดลองขนาดเล็กและปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 16

ไมโครลิตร นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที

เติม DIG-High Prime ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม EDTA 0.2 โมลาร์ พีเอช 8 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3.4.15.2 การตรวจสอบตัวติดตาม

นำดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *hupL* และ *hoxH* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime ตามวิธีในข้อ 3.4.15.1 มาตรวจสอบการติดฉลาก โดยเจือจางดีเอ็นเอที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} ปีเปตดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจางต่างๆ ตามที่ได้เตรียมไว้มา 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนลอน เมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับแผ่นเมมเบรนโดยฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต 3 นาที นำแผ่นเมมเบรนไปแช่ในบัฟเฟอร์มาเลอิก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เซย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ย้ายแผ่นเมมเบรนมาใส่ในสารละลายแอนติบอดี (Antibody solution) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เซย่าต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างเมมเบรน 2 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween 20 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.5 ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมไนโตรบลูเตตระโซเลียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดซิล-ฟอสเฟต (BCTP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มืด รอจนกระทั่งมีแถบสีดำปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยด้วยน้ำกลั่น

3.4.15.3 การทำ Southern hybridization

นำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ในปฏิกิริยาประกอบด้วย จีโนมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* 10 เท่า และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมาแยกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่เจลใน Denaturation solution ที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปแช่ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.5 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ทำการ blot เพื่อให้ดีเอ็นเอไปอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) แล้วตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 3 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปบ่มในบัฟเฟอร์ Prehybridization ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวติดตามที่เตรียมสำหรับยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิด บ่มข้ามคืน หลังจากนั้น ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ โซเดียมซิเตรท 30 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 0.1 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมนบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween 20 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ล้าง 5 นาที แล้วเททิ้ง เติม Blocking solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเติม แอนติบอดี (Antibody solution) ลงในสารละลาย นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนอีก 2 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมไนโตรบลูเตตระโซเลียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดซิลฟอสเฟต (BCIP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในที่มืด รอจนกระทั่งมีแถบสีดำปรากฏขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยน้ำกลั่น

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮอปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) และยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* ทำโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. siamensis* ที่เตรียมได้จากวิธี Single cell isolation (Hoshaw and Rosowski, 1973) จากนั้นสกัดจีโนมดีเอ็นเอและนำมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะการอสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้งสองชนิด นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และทำการทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมแล้วนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสกับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้ง 2 ชนิด โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้าย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany) ทำการทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมแล้วนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสกับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน สุดท้ายนำชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้งสองมาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจสอบการมียีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

4.1 การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี Single cell isolation

จากการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของ *Anabaena siamensis* ด้วยวิธี Single cell isolation (Hoshaw and Rosowski, 1973) ซึ่งทำโดยเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 ที่ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ในอาหารเหลว BG11 เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเซลล์ของ *A. siamensis* เจริญเพิ่มจำนวนขึ้น จึงนำเซลล์มาเจือจางในอาหารเหลว BG11 แล้วเปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายเซลล์มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด นำแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้พาสเจอร์รีเปตปลายเรียวแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์ของ *A. siamensis* เพียงเซลล์เดียวไปใส่ในจานหลุมที่มีอาหารเหลว BG11 จากนั้นนำจานหลุมไปวางและให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน ส่องดูจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นภายใต้กล้อง inverted microscope ทุกวัน เมื่อ *A. siamensis* เซลล์เดี่ยวที่แยกได้เจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี streak plate เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าไม่มีการปนเปื้อนจากไซยาโนแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยเขียนเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้น 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบกลุ่มเซลล์สีเขียวของ *A. siamensis* เจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวอยู่บนอาหาร ดังรูปที่ 4.1 นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดจีโนมดีเอ็นเอต่อไป



รูปที่ 4.1 *Anabaena siamensis* บนอาหารแข็ง BG11

เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างทางด้าน รูปร่าง ลักษณะ สี และขนาด รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ไซยาโนแบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสม รูปร่างของไซยาโนแบคทีเรียก็เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่น่าสนใจ (ลัดดา วงศ์รัตน์, 2543) ในการทดลองการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* นี้เป็นการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิค Single cell isolation และ streak plate ร่วมกัน เทคนิค Single cell isolation เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้แยกสายพันธุ์และไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีขนาด

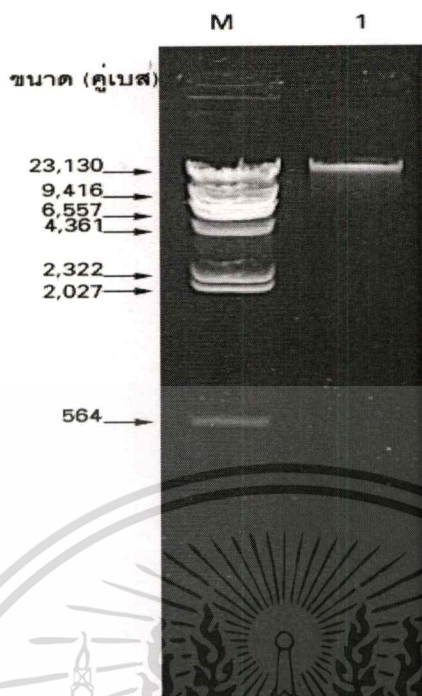
ใหญ่สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40 เท่า เอกสารอื่นเอกสารที่ลงบนเว็บไซต์เพื่อการเข้าถึงฟรีเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่เว้นการณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียเป็นเซลล์ที่มีสิ่งไม่จำเป็นต้องย้อมแกรมก็สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการใช้เทคนิค Single cell isolation แยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์จึงทำให้ *A. siamensis* ที่แยกได้ปราศจากการปนเปื้อนจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ และเมื่อนำเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเทคนิค Single cell isolation มาตรวจสอบการปนเปื้อนอีกครั้งโดยวิธี streak plate ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้แยกเชื้อปนเปื้อนที่มีขนาดเล็กอย่างเช่นแบคทีเรียออกจากไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งในขั้นตอนของการ streak plate ทำโดยการใช้ลวดเย็บเชื้อ (loop) ที่ฆ่าเชื้อโดยการลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นมาเย็บเชื้อ *A. siamensis* ลงบนอาหารแข็ง BG11 ซึ่งอาหารแข็ง BG11 เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากในอาหารมีธาตุอาหารต่างๆ ที่ไซยาโนแบคทีเรียต้องใช้ในการเจริญเติบโตนอกเหนือจากธาตุอาหารหลักที่สิ่งมีชีวิตทั่วไปใช้ในการเจริญ นอกจากนี้เทคนิค streak plate ยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สะดวก และใช้อุปกรณ์น้อยชิ้น จึงเป็นเทคนิคที่ใช้แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ที่มีมาตั้งแต่อดีต ซึ่งเห็นได้จากงานวิจัยของ Allen ในปี ค. ศ. 1952 ที่ใช้เทคนิคนี้ในการแยกเชื้อ *Anacystis nidulans* ให้บริสุทธิ์ ดังนั้นการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Single cell isolation ร่วมกับเทคนิค streak plate จึงทำให้เชื้อ *A. siamensis* ที่แยกได้ปราศจากการปนเปื้อนของทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไซยาโนแบคทีเรียอื่นๆ

4.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิตีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย

A. siamensis

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็ง BG11 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำเซลล์มาสกัดจีโนมิตีเอ็นเอ โดยการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้ว (glass bead) และสกัดด้วยฟีนอลลิ้มด้วยบัฟเฟอร์ TE นำจีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร แล้วนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากการเปรียบเทียบแถบของจีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้ของ *A. siamensis* กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบแถบจีโนมิตีเอ็นเอ 1 แถบที่มีระดับอยู่เหนือกว่าแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 4.2) และมีปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.2 จีโนมิตีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

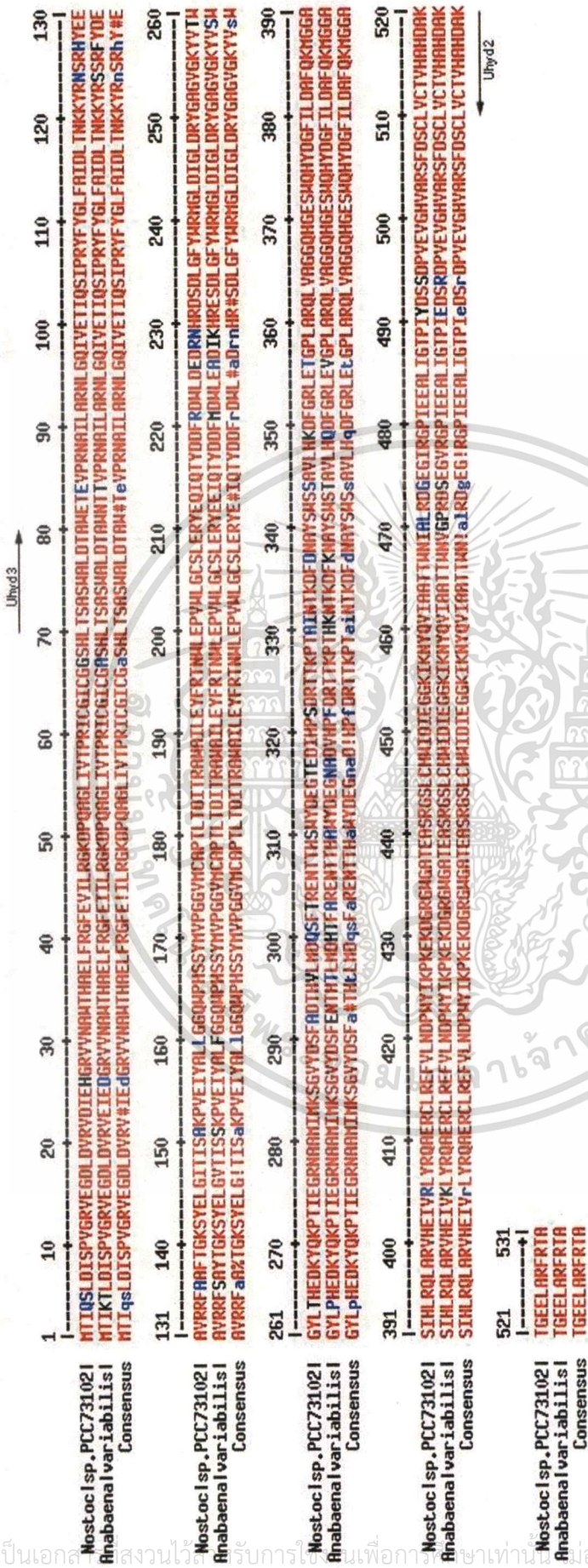
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 1 จีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Anabaena siamensis*

จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิตีเอ็นเอของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิคอะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงให้เห็นว่าวิธีการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้วและสกัดด้วยฟีนอลอิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิตีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียได้ เนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่ายและสะดวก เพราะสามารถใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้จีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีความบริสุทธิ์ เพราะปรากฏแถบจีโนมิตีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase รวมถึงปริมาณจีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีปริมาณมาก ซึ่งปริมาณจีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่นำมาสกัด จากนั้นจึงนำจีโนมิตีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป

4.3 การออกแบบไพรเมอร์

4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์ของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

การออกแบบไพรเมอร์ของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทำได้โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนของไซยาโนแบคทีเรีย คือ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันที่คาดว่าจะเป็บริเวณอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ ช่วงต้นและช่วงท้าย (ดูสรุปในรูปที่ 4.3) ลำดับกรดอะมิโนในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 5' คือ ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 71 ถึง 81 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น TSASWALDTAW และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACATCTGCAT C(C/T)TGGGCATTAGATACAGC-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Uhyd3 สำหรับลำดับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 3' คือ ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 518 ถึง 512 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น DHAHVTC และเมื่อเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ATCATGGGCGTG(G/A)AC(T/A)GTAC A-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Uhyd2 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ เมื่อใช้ไพรเมอร์ Uhyd3 และ Uhyd2 ควรจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,343 คู่เบส



รูปที่ 4.3 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของอู่เพาะไฮโดรเจนของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ลูกศรแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับ PCR อีกขั้วที่แสดงแถบบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน อีกขั้วที่แสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน และอีกขั้วที่แสดงบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน

4.3.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

การออกแบบไพรเมอร์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ทำได้โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp., *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803, *Prochlorothrix hollandica* และ *Anabaena variabilis* และคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณอนุรักษ์ในช่วงต้นและช่วงท้าย (ดังลูกศรในรูปที่ 4.4) ลำดับกรดอะมิโนช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 5' คือ ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 62 ถึง 68 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น ICGICPY และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-AT(C/T)TG(G/T)GG(C/T)ATTTGTCC(C/G)GT-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Rhyd1 ส่วนลำดับกรดอะมิโนในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จากปลายด้าน 3' คือ ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 458 ถึง 452 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น SCSLCPD และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมาเปลี่ยนเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GAAGAACTTAAACAGGGGTC-3' ให้ชื่อไพรเมอร์เป็น Rhyd3 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ใน *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 ควรจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 1,189 คู่เบส

Synechococcus lsp. PCC	1	10	20	30	40	50	60	Rhyd1	70	80	90	100	110	120	130
Prochlorothrix hollandica	MTRTIVDPVTRIEGHAQTSVFLDQGNRE--RARTWVVEYRGFEKFCCEGRPTENAGTITAGTCGCVSHLLAAKTKGDKLAVQIPPAHEMLRLINLRLQITQSHALSFHFLSSPQFLLLGMDSDPARRH														
Synechocystis lsp. PCC	HAKSTIVDPVTRIEGHAQTSVFLDQGNRE--RARTWVVEYRGFEKFCCEGRPTENAGTITAGTCGCVSHLLAAKTKGDKLAVQIPPAHEMLRLINLRLQITQSHALSFHFLSSPQFLLLGMDSDPARRH														
Anabaena variabilis	HAKSTIVDPVTRIEGHAQTSVFLDQGNRE--RARTWVVEYRGFEKFCCEGRPTENAGTITAGTCGCVSHLLAAKTKGDKLAVQIPPAHEMLRLINLRLQITQSHALSFHFLSSPQFLLLGMDSDPARRH														
Consensus	Hsk.ITVDPVTRIEGHAQTSVFLDQGNRE--RARTWVVEYRGFEKFCCEGRPTENAGTITAGTCGCVSHLLAAKTKGDKLAVQIPPAHEMLRLINLRLQITQSHALSFHFLSSPQFLLLGMDSDPARRH														
Synechococcus lsp. PCC	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
Prochlorothrix hollandica	LFGLIADPESAPAGTIRLQFGQQLIEMGGKTIHAAHAPGGVSSLSQEGHAIUROLPAELATVATLDRKRLIDREFREETAVFGFPSSLFNGLVADNGDMEHYGHLRFVDSQGRITIAORLRED														
Synechocystis lsp. PCC	VFGIADNPOLARAGTIRLQFGQQLIEMGGKTIHAAHAPGGVSSLSQEGHAIUROLPAELATVATLDRKRLIDREFREETAVFGFPSSLFNGLVADNGDMEHYGHLRFVDSQGRITIAORLRED														
Anabaena variabilis	VFGIADNPOLARAGTIRLQFGQQLIEMGGKTIHAAHAPGGVSSLSQEGHAIUROLPAELATVATLDRKRLIDREFREETAVFGFPSSLFNGLVADNGDMEHYGHLRFVDSQGRITIAORLRED														
Consensus	IFGLIADNPOLARAGTIRLQFGQQLIEMGGKTIHAAHAPGGVSSLSQEGHAIUROLPAELATVATLDRKRLIDREFREETAVFGFPSSLFNGLVADNGDMEHYGHLRFVDSQGRITIAORLRED														
Synechococcus lsp. PCC	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
Prochlorothrix hollandica	DYASFLGEAVEPHSYLKFYYKPGTYPE-----GNYRVGPIARLNVCDRIGTGSGSRATGATARS66TVTSFLYHAYARLVEITLASLEKTAENVEPNLQTGFLRSQAGVNCLEATGVSEAPRGT														
Synechocystis lsp. PCC	NYDLFGEGVEKSYLKFYYKPGTYPE-----GNYRVGPIARLNVCDRIGTGSGSRATGATARS66TVTSFLYHAYARLVEITLASLEKTAENVEPNLQTGFLRSQAGVNCLEATGVSEAPRGT														
Anabaena variabilis	RYDFFIGESAVEPHSYLKFYYKPGTYPE-----GNYRVGPIARLNVCDRIGTGSGSRATGATARS66TVTSFLYHAYARLVEITLASLEKTAENVEPNLQTGFLRSQAGVNCLEATGVSEAPRGT														
Consensus	Y...FIEGaVpweSYLKFYYKPGTYPE-----GNYRVGPIARLNVCDRIGTGSGSRATGATARS66TVTSFLYHAYARLVEITLASLEKTAENVEPNLQTGFLRSQAGVNCLEATGVSEAPRGT														
Synechococcus lsp. PCC	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	498	499		
Prochlorothrix hollandica	LFHHYRVDSHGKTIERNLITATGNNLAAHRTVTQTAHYIRHGEVQESFLARVENGICFDPQLSCSTHAGGMPPLKIEIFDSRGEELYQCLCRDL														
Synechocystis lsp. PCC	LFHHYRVDSHGKTIERNLITATGNNLAAHRTVTQTAHYIRHGEVQESFLARVENGICFDPQLSCSTHAGGMPPLKIEIFDSRGEELYQCLCRDL														
Anabaena variabilis	LFHHYRVDSHGKTIERNLITATGNNLAAHRTVTQTAHYIRHGEVQESFLARVENGICFDPQLSCSTHAGGMPPLKIEIFDSRGEELYQCLCRDL														
Consensus	LFHHYRVDSHGKTIERNLITATGNNLAAHRTVTQTAHYIRHGEVQESFLARVENGICFDPQLSCSTHAGGMPPLKIEIFDSRGEELYQCLCRDL														

รูปที่ 4.4 การจัดเรียงลำดับการดะมีโนของรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *Synechococcus* sp., *Prochlorothrix hollandica*, *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anabaena variabilis* ลูกศรแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับ PCR

อักษรสีแดงแสดงบริเวณที่มีลำดับการดะมีโนเหมือนกัน อักษรสีน้ำเงินแสดงบริเวณที่มีลำดับการดะมีโนคล้ายคลึงกัน และอักษรสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับการดะมีโนแตกต่างกัน

4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

จากการนำจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้ตามข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการจับตัว (annealing) เป็น 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบในทุกๆ อุณหภูมิของการจับตัว และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.5 ก) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,343 คู่เบส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความจำเพาะสูงต่อไพรเมอร์ที่ใช้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ เมื่อใช้อุณหภูมิของการจับตัวต่างๆ เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มักพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ดังนั้นลำดับกรดอะมิโนจึงมีความคล้ายคลึงกันสูง (รูปที่ 4.3) ในการออกแบบไพรเมอร์นั้น ได้นำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้ใน *A. variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับ *A. siamensis* มาใช้เปรียบเทียบเพื่อสร้างไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์ที่ได้มีความจำเพาะสูงมาก

4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

จากการนำจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้ตามข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 และปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงการจับตัว (annealing) เป็น 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบในทุกๆ อุณหภูมิของการจับตัว ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิของการจับตัวสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200

คู่เบส (รูปที่ 4.5 ข) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดร-
 ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,189 คู่เบส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความจำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ เนื่องจากไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ที่ไม่จำเพาะ เอนไซม์รีเวอร์สคิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ทั้งที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน ในการออกแบบไพรเมอร์ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนและเลือกบริเวณอนุรักษ์ที่เป็นบริเวณของการจับของการจับนิคเกิล (Nickel-binding site) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp., *Prochlorothrix hollandica*, *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anabaena variabilis* (รูปที่ 4.4) ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์มีเพียง *A. variabilis* เท่านั้นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ จึงทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมา สามารถนำไปใช้ในศึกษาซีนีเวอร์สคิเบิลไฮโดรจีเนสได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน ดังนั้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของซีนีเวอร์สคิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* คุณภูมิของการจับตัวที่ 50 และ 55 องศาเซลเซียส จึงเป็นคุณภูมิที่เหมาะสมสำหรับการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ชนิดที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 (ก) และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ Rhyd1-Rhyd3 (ข) ที่คุณภูมิของการจับตัวต่างๆ

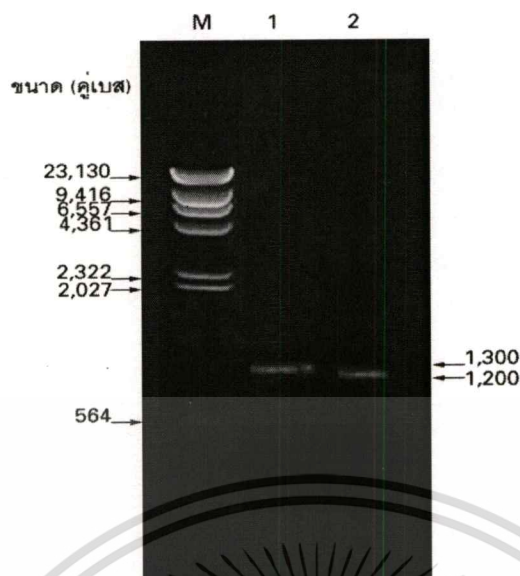
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
- 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และ Rhyd1-Rhyd3 ที่มีขนาดประมาณ 1,300 และ 1,200 คู่เบส ตามลำดับ จากข้อ 4.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) ชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูปดังกล่าวออกแบบมาสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 70 คู่เบส จนถึง 10 กิโลเบส จึงสามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการได้ โดยอาศัยหลักการที่ใช้ความร้อนและบัฟเฟอร์ในการละลายเจลที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ แล้วทำการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากบัฟเฟอร์โดยใช้ Spin column ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR จะจับกับเมมเบรนของ Spin column จากนั้นล้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่อยู่บนเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ ทำให้สิ่งปนเปื้อนที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอถูกชะออกจากเมมเบรน ทำการชะผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเมมเบรน จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร และเปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.6 ช่องที่ 1) และแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.6 ช่องที่ 2) ซึ่งขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่มิขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.5 ก,ข) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คูเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 2 คูมีปริมาณ 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าว จึงเป็นการแยกเอาสิ่งปนเปื้อนจากขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกไขออกจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ เพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้ไปรบกวนปฏิกิริยาของการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.6 ผลิตรหัส PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 ผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2

2 ผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3

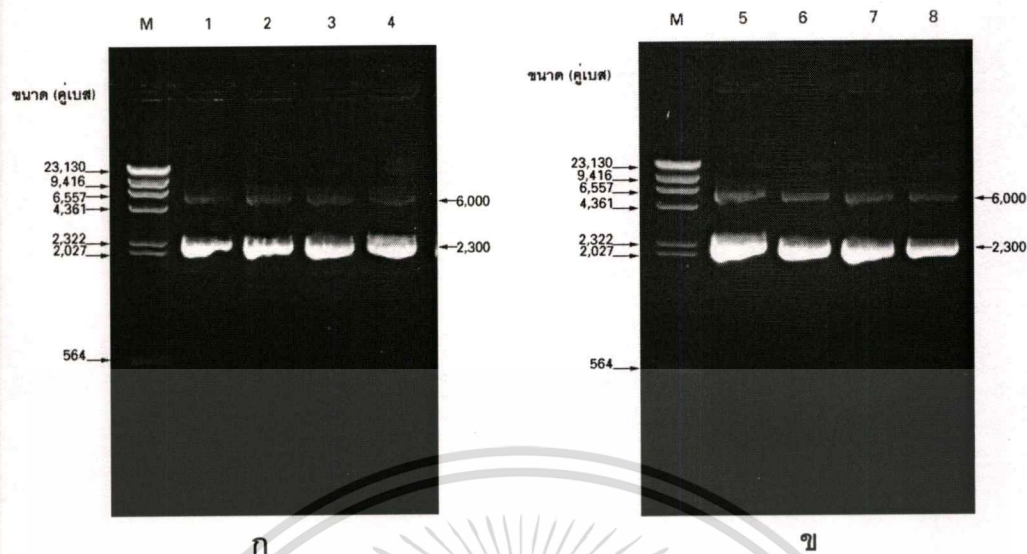
4.6 การเชื่อมผลิตรหัส PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

จากการนำผลิตรหัส PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ Uhyd3-Uhyd2 ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ตรงบริเวณปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตรหัส PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งเซลล์ให้อาศัยมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficiency) เท่ากับ 1.6×10^5 CFU ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีสีขาวเนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตรหัสที่มีสีน้ำเงิน จากการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 อย่างละ 4 โคโลนี จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มแมนท์ด้วยต่าง

นำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และ Rhyd1-Rhyd3 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์และนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยต่าง (Alkali lysis) ตามข้อ 3.4.12 ตั้งชื่อพลาสมิดลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 ว่า pUTA1.1, pUTA1.2, pUTA1.3 และ pUTA1.4 และตั้งชื่อพลาสมิดลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ว่า pRVA1.1, pRVA1.2, pRVA1.3 และ pRVA1.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pUTA1.1, 1.2, 1.3 และ 1.4 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 6,000 คู่เบส และ 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.7 ก) เหมือนกัน และพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRVA1.1, 1.2, 1.3 และ 1.4 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาด 6,000 คู่เบส และ 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.7 ข) เหมือนกัน ดังนั้นโคโลนีทั้ง 4 ชนิดที่เลือกมาในแต่ละการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR จึงมีพลาสมิดเหมือนกัน จึงคัดเลือกมาอย่างละ 1 โคโลนี เพื่อนำมาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ยีนฮ็อพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*



รูปที่ 4.7 พลาสมิด pUTA (ก) และพลาสมิด pRVA (ข) ที่สกัดด้วยต่าง

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 pUTA1.1

5 pRVA1.1

2 pUTA1.2

6 pRVA1.2

3 pUTA1.3

7 pRVA1.3

4 pUTA1.4

8 pRVA1.4

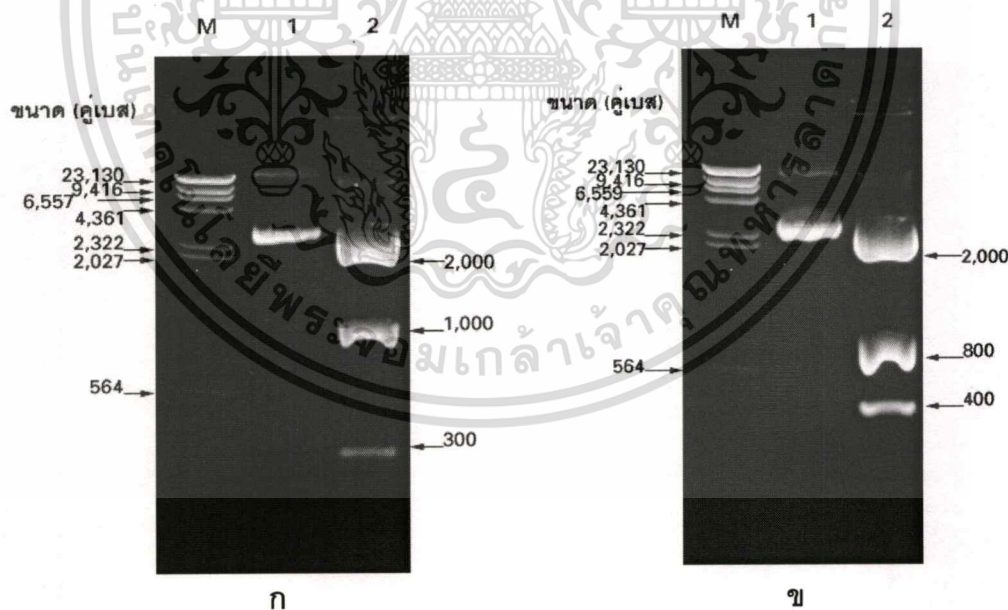
4.8 การตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA1.1 และ pRVA1.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUTA1.1 และ pRVA1.1 ที่สกัดได้จากข้อ 4.7 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และ Rhyd1-Rhyd3 ตามลำดับ โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pUTA1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น 3 แถบ ที่มีขนาด 2,000, 1,000 และ 300 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ก ช่องที่ 2) แถบที่ปรากฏ 3 แถบนี้ แถบบนสุดที่มีขนาด 2,000 คู่เบสจะเป็นแถบของเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ไม่มี insert เนื่องจากใน pGEM-T Easy มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ในบริเวณ multicloning site ซึ่งอยู่ก่อนหน้าปลาย T ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ก็จะได้เวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 3,015 คู่เบส และผลิตภัณฑ์ PCR ออกมา แถบที่ 2 และ 3 ที่มีขนาดประมาณ 1,000 และ 300

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่เบส คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป แต่เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวนี้อาจมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ 1 บริเวณ จึงทำให้ปรากฏแถบ 2 แถบ เมื่อนำขนาดของแถบทั้งสองมารวมกันก็จะได้ 1,300 คู่เบสซึ่งเท่ากับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป จึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pUTA1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pGEM-T Easy เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และภายในมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง จากการนำพลาสมิด pRVA1.1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ไปวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่มีขนาด 2,000, 800 และ 400 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ข ช่องที่ 2) แถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนสุดขนาด 2,000 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 และ 400 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง ทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pRVA1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pGEM-T Easy เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 และภายในมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 4.8 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUTA1.1 (ก) และ การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRVA1.1 (ข) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ

2 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนไวสาหรับการใชงานเพื่การศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใชประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1

นำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUTA1.1 และ pRVA1.1 ที่ผ่านการทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ Uhyd3-Uhyd2 และ Rhyd1-Rhyd3 ตามลำดับ มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Reactions และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PISM^R 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ T7 และ SP6 ของเวกเตอร์ pGEM-T Easy (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.1) ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pUTA1.1 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ต่อกับปลาย T ของเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ T7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 504 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับปลาย T ของเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ SP6 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 420 คู่เบส ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสอง เมื่อนำมารวมกันจึงทำให้ทราบว่ายังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนตรงกลางที่จะเป็นส่วนที่ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ T7 และ SP6 เชื่อมต่อกันได้ เพราะฉะนั้นจึงทำการออกแบบ forward primer ใหม่จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้านไพรเมอร์ T7 ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า Uhyd5 และออกแบบ reverse primer ใหม่จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้าน SP6 ให้ชื่อว่า Uhyd6 (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.1) สำหรับใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนตรงกลางทั้งหมด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อยู่ในพลาสมิด pUTA1.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,343 คู่เบส (รูปที่ 4.9) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่ามีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่งอยู่ภายใน (รูปที่ 4.9) ซึ่งจะทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 1,036 คู่เบส และ 307 คู่เบส โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการตัดพลาสมิด pUTA1.1 ในข้อ 4.8 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pUTA1.1 ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BLAST server พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีนอัลฟาไซโตโครีนของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Nostoc punctiforme* สูงสุดถึง 87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ไพรมเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	TTCTATAGTGTACCTAAAT
Uhyd5	ATTGGCGCATGGGTTTGGAT
Uhyd6	GGGGTCATAATGCTGCCAAG
Rhyd4	AACAAAATCGCACCCATATC
Rhyd5	TAATGGAAATTCTCGCAT

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pRVA1.1 ดังวิธีที่กล่าวมาแล้ว จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ต่อกับปลาย T ของเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ T7 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 500 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับปลาย T ของเวกเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ SP6 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 520 คู่เบส ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรมเมอร์ทั้งสอง เมื่อนำมารวมกันจึงทำให้ทราบว่า ยังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนตรงกลางที่จะเป็นส่วนที่ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรมเมอร์ T7 และ SP6 เชื่อมต่อกันได้ เพราะฉะนั้นจึงทำการออกแบบ forward primer ใหม่จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้านไพรมเมอร์ T7 ให้ชื่อว่า Rhyd4 และออกแบบ reverse primer ใหม่จากส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทางด้าน SP6 ให้ชื่อว่า Rhyd5 (ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.1) สำหรับใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนตรงกลางทั้งหมด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อยู่ในพลาสมิด pRVA1.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,187 คู่เบส (รูปที่ 4.10) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์หาตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่ามีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่งอยู่ภายใน (รูปที่ 4.10) ซึ่งจะทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาด 787 และ 400 คู่เบส โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการตัดพลาสมิด pRVA1.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ในข้อ 4.8 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pRVA1.1 ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BLAST server พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิปิไลโดโรจีนเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 สูงสุดถึง 84 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

1 ACATCTGCATCTTGGGCATTAGATACAGCTTGGGGTACAGAAAGTTCCACG 50
 51 CAATGCTATTTTGGCGCGGAATTTAGGTCAGTTGTGGAAACAATCCAAA 100
 101 GCATTCCCTCGCTATTTCTATGGATTGTTTGGCATTGATTTAACTAATAAA 150
 151 AATTATCGTCGTAGTCATTTCTATGATGAGGCTTGTGCTCGCTTTGCTGC 200
 201 TTTCACAGGGGAAATCCTATGAGTTAGGTTGTGACAAATTTCTGCCAAACCTG 250
 251 TGGAAATTTACGCTTTATTAGGAGGACAAATGGCCTCACAGCAGTTATATG 300
 301 GTGCTTGGTGGTGTGATGTGCGCCCCCACTTTGACTGACCATCACCCGCG 350
 351 CTTGGGGTATCCTCGAATATTTCCGCACCACTGGTTAGAACCCGTTTGGT 400
 401 TGGGTTGTTCTTTGGAAAGATACGAAAGAAATCCAAAGCTATGACGACTTT 450
 451 ATGAATTGGTTAGATGAAGATGTCAAAACATCGGGAATCTGATTTAGGTTT 500
 501 ATATTGGCGGATGGGTTTGGATATCGGTTTAGAGCGTTTTGGTGTCTGGTG 550
 551 TAGGTAAGATATGTAACTTGGGGATATTTACCCCATGAGGATAGATACAAC 600
 601 AAAACCCACCATTTGAGGGTCTGTAAAGCTGCGGTAAATTTATGAAGAGCGGTGT 650
 651 TTACGATAGCTTTAGTGAATACCCATACCTTGTATGGATCAATCTTTTGGCC 700
 701 GTGAAGATTTAAGCCATTTCTTGGTATGATGAAAGGAACCTCAAGATTGGCAT 750
 751 CCAAGCGATCGCACCAACATCACCCACCATCAACAAACCAAAAGACTTTAG 800
 801 CGGTGCATATTCTTGGGCAAGTGGCGTTCTCCACAAAGATTTGGGACGTT 850
 851 TAGAAGCAGGGCCCTTAGSCCGGCAATTAGTGGCAGGTGGTACACATGGG 900
 901 GAGTCTTGGCAGCATTTATGACCCCTTCATCTTGGACGTGTTCAAGGAAGAT 950
 951 GGGTGGCCCAAGCGTTTCATGTGCGTCAATTGGCAGGAGTTTCATGAAGATTG 1000
 1001 TGAAGCTATACCGTCAAGCAGGACACTGTTTGGCAGGAATTCAGATTAAAT 1050
 1051 GACCCCTGGTATATCAAAACCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1100
 1101 AACGGAGGCTGCAAGAGGTTGCAATTGTCTCACTGGGTAGATATTGAAGAAAG 1150
 1151 GGAAGATTAAACAATAACCAAGTTATTGCCCTGGTACTTGGAAATATTGGC 1200
 1201 CCCCCTGACGGTGTGCTGCTCAACGGGGCCCTGTTGAAGGAAGCATTAAATTGG 1250
 1251 TACACCGATTGAAGACCCAAACAGACCCGGTAGAAGTGGGTCAATGTTGCC 1300
 1301 GTTCTTTGACTCTTGTCTTAGGTGTGTACAGTCCACGCCCATGA 1349 1350

รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pUTA1.1

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ ตำแหน่งที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ตารางที่ 4.3 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pRVA1.1 กับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของกรดอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
<i>Anabaena variabilis</i>	hydrogenase large subunit	84
<i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7120	hydrogenase large subunit	84
<i>Spirulina platensis</i>	HoxH	72
<i>Spirulina subsalsa</i>	HoxH	70
<i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803	hydrogenase large subunit	69
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	Bidirectional hydrogenase large subunit	67
<i>Gloeocapsa alpicola</i>	Nife bidirectional hydrogenase large subunit	67
<i>Synechococcus</i> สายพันธุ์ PCC 7002	hydrogenase large subunit	66
<i>Synechococcus</i> สายพันธุ์ PCC 6301	HoxH	64

4.10 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

4.10.1 การออกแบบไพรเมอร์ยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และส่วนท้ายของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*)

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* จำนวน 1,343 คู่เบส (รูปที่ 4.9) ยังขาดส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) ที่มีตำแหน่งการจัดเรียงตัวอยู่หน้ายีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ของ *A. variabilis* (รูปที่ 4.11) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis* สูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้งยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* จึงเริ่มต้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันในส่วนของยีน *hupS* สำหรับใช้ศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของยีน *hupL* (ลูกศรในรูปที่ 4.11) ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า UHS และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และออกแบบไพรเมอร์ในส่วนท้ายของยีน *hupL* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนท้ายของยีน *hupL* ใน *A. variabilis* (ลูกศรในรูปที่ 4.11) ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า Uhyd8 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอัปเดตไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป



รูปที่ 4.11 แผนที่ยีนอัปเดตไฮโดรจีเนส ลูกศรแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์
ที่มา : Tamagnini et al., 2002

ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน
อัปเดตไฮโดรจีเนส

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
UHS	ATGACTAACGTACTCTGGCT
Uhyd8	AGCACTGCGAAAACGCGCCA

4.10.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนต้น ส่วนท้ายของยีนอัปเดตไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่และการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนต้นของยีนอัปเดตไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ทำโดยใช้ไพรเมอร์ UHS ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.10.1 ร่วมกับไพรเมอร์ Uhyd6 ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.9 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 2,171 คู่เบส โดยใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 2,100 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (รูปที่ 4.12 ช่องที่ 1) จากการเพิ่มปริมาณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอส่วนท้ายของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ Uhyd3 ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.3.1 (รูปที่ 4.3) ร่วมกับไพรเมอร์ Uhyd8 ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.10.1 ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ควรมีขนาด 1,386 คู่เบส และใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (รูปที่ 4.12 ช่องที่ 2) จากผลการทดลองแสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะกับจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* สูง เนื่องมาจากการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในครั้งนี้ (UHS และ Uhyd8) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* (Uhyd3 และ Uhyd6) จึงทำให้การจับกันระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่เกิดขึ้นได้ดี ไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany) ต่อไป



รูปที่ 4.12 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของอัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณส่วนต้นจากไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6

2 ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณส่วนท้ายจากไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd8

4.10.3 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6 และ Uhyd3-Uhyd8 กับเวกเตอร์ pDrive และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

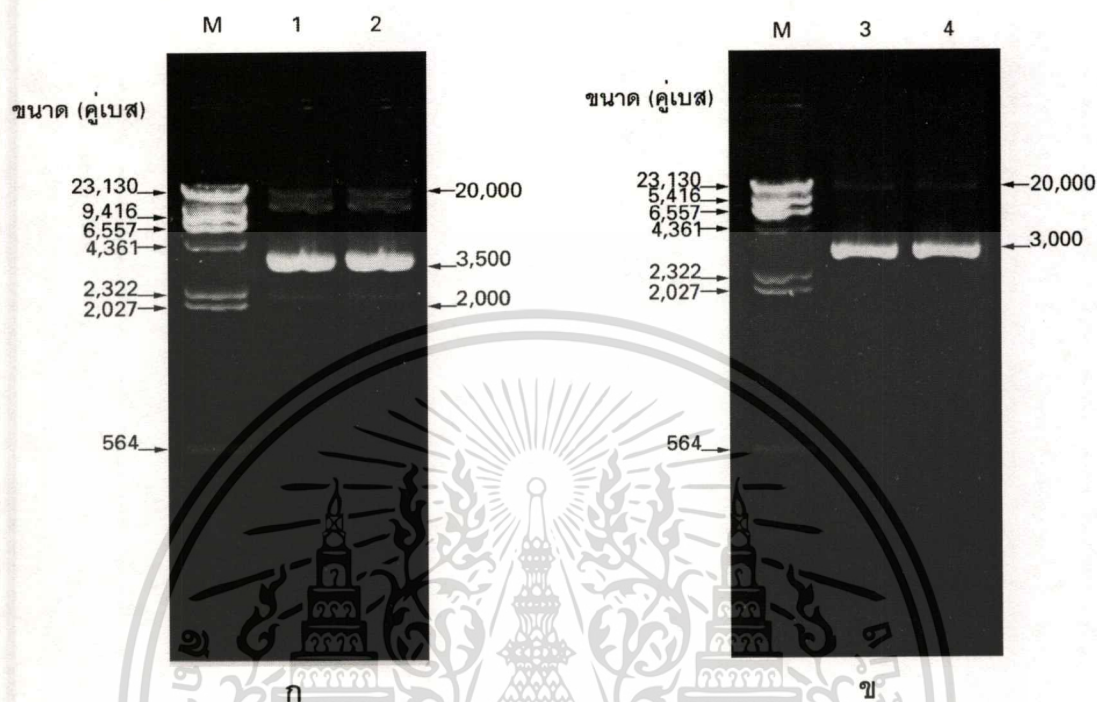
นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ UHS-Uhyd6 และ Uhyd3-Uhyd8 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.10.2 ที่มีขนาดประมาณ 2,100 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive ตรงปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 แล้วทรานสฟอร์มเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งโคโลนีที่มีเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตภัณฑ์ PCR จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ โคโลนีที่ได้จึงมีสีขาว จากการทรานสฟอร์มได้คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-Gal และ IPTG อย่างละ 2 โคโลนี

4.10.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มเม้นต์ด้วยต่าง

นำโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ UHS-Uhyd6 และ Uhyd3-Uhyd8 อย่างละ 2 โคโลนีไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บเซลล์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยต่าง (ข้อ 3.4.12) ตั้งชื่อพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6 ว่า pUHS6.1 และ pUHS6.2 และตั้งชื่อพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd8 ว่า pUSA4.1 และ pUSA4.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pUHS6.1 และ pUHS6.2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 20,000, 3,500 และ 2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.13 ก) แถบบนสุดที่มีขนาดประมาณ 20,000 คู่เบส เป็นแถบของจีโนมดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แถบที่ 2 และ 3 ที่มีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส และ 2,000 คู่เบส เป็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มีรูปร่างต่างกัน เนื่องจากพลาสมิดทั้ง 2 มีขนาดเท่ากัน จึงเลือกพลาสมิด pUHS6.1 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pUSA4.1 และ pUSA4.2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 20,000 คู่เบส และ 3,000 คู่เบส (รูปที่ 4.13 ข) แถบบนสุดที่มีขนาดประมาณ 20,000 คู่เบส เป็นแถบของจีโนมดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส เป็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ เนื่องจากพลาสมิดทั้งสองมีขนาดเท่ากันจึงเลือกพลาสมิด pUSA4.1 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*



รูปที่ 4.13 พลาสมิด pUHS (ก) และ พลาสมิด pUSA (ข) ที่สกัดด้วยต่าง

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 pUHS6.1

3 pUSA4.1

2 pUHS6.2

4 pUSA4.2

4.10.5 การทดสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด pUHS6.1 และ pUSA4.1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUHS6.1 และ pUSA4.1 ที่สกัดได้ในข้อ 4.10.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6 และ Uhyd3-Uhyd8 ตามลำดับ และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUHS6.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,500 และ 2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.14 ก) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,500 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pDrive ที่ไม่มี insert ซึ่งใกล้เคียงกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบส มีขนาดใกล้เคียงกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6 (2,100 คู่เบส) (ยีนส่วนต้นของ *hupL*) ที่เชื่อมเข้าไปในเวกเตอร์ จึงสรุปได้ว่า พลาสมิด pUHS6.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนฮิพเพคไฮโดรจีเนสที่เกิดจากไพรเมอร์คู่ UHS-Uhyd6 และเมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของ pUSA4.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,500, 1,000 และ 300 คู่เบส (รูปที่ 4.14 ข) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pDrive ที่ไม่มี insert และแถบที่ 2 และ 3 ที่มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และ 300 คู่เบส เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป แต่เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ 1 บริเวณ จึงทำให้ปรากฏแถบ 2 แถบ เมื่อนำขนาดของแถบทั้งสองมารวมกันจะได้ 1,300 คู่เบส ซึ่งเท่ากับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป (1,300 คู่เบส) จึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pUSA4.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pDrive เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd8 และภายในมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 4.14 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUHS6.1 (ก) และพลาสมิด pUSA4.1 (ข) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ

2 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.10.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUHS6.1 และ pUSA4.1

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ตามข้อ 4.10.5 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีของ BigDye Terminator Reactions และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer ร่วมกับไพรเมอร์ Uhyd8 (ในข้อ 4.10.1) และไพรเมอร์ Uhyd9 ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* ที่ได้ศึกษามาแล้ว เนื่องจากไพรเมอร์ที่มีอยู่ในตำแหน่งที่ห่างเกินไป สำหรับที่จะใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ต้องการ ซึ่งไพรเมอร์ Uhyd9 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GCTGTATCTAATGCCCA-3' ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของยีนอัลเทอไรเซชันหน่วยย่อยใหญ่จาก pUHS6.1 ร่วมกับไพรเมอร์ Uhyd9 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 600 คู่เบส และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนท้ายของยีนอัลเทอไรเซชันหน่วยย่อยใหญ่จากพลาสมิด pUSA4.1 ร่วมกับไพรเมอร์ Uhyd8 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 500 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดทั้งสองชนิดไปหาบริเวณที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาไว้ในตอนแรกของพลาสมิด pUTA1.1 (รูปที่ 4.9) ซึ่งจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนอัลเทอไรเซชันหน่วยย่อยใหญ่ทั้งหมด 1,596 คู่เบส (รูปที่ 4.15) และได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์นี้แล้วใน GenBank โดยมี accession number เป็น AY152844 ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มจาก ATG ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (start codon) และสิ้นสุดที่ TAA ซึ่งเป็นจุดสุดท้ายของการแปลรหัส (stop codon) เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน จะได้กรดอะมิโน 532 ตัว จากการคำนวณ พบว่าเอนไซม์อัลเทอไรเซชันหน่วยย่อยใหญ่มีขนาดประมาณ 58.5 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดที่ได้ใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ของอัลเทอไรเซชันที่รายงานไว้คือ 60.8 กิโลดาลตัน (Tamagnini *et al.*, 2002) และนำลำดับกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากยีนอัลเทอไรเซชันหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัลเทอไรเซชันของ *Nostoc punctiforme* (87 เปอร์เซ็นต์) และ *Anabaena variabilis* (86 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนของไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *N. punctiforme*, *A. variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Gloeothoece* สายพันธุ์ PCC 6909 พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ *N. punctiforme* และ *A. variabilis* มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย สร้างเฮเทอโรซิสต์และยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับ *A. siamensis* จึงมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนมากกว่า

ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์อย่าง *Gloeotheca* สายพันธุ์ PCC 6909 จาก รายงานการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุก สายพันธุ์มีเหล็กและนิกเกิลเป็นองค์ประกอบจัดเป็น NiFe-hydrogenase โดยนิกเกิลมีส่วนสำคัญ ในการกระตุ้นการผลิตไฮโดรเจน (H_2 -activation) และมีตำแหน่งอยู่ในบริเวณเร่งของหน่วยย่อย ใหญ่ ดังนั้นในการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงสามารถพบตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับ การทำงานของเอนไซม์จากบริเวณของการเข้าจับของนิกเกิล (Nickel-binding site) ซึ่งเป็น โคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ จากรายงานของ Simon (1994) พบว่าภายในยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อย ใหญ่มีบริเวณเข้าจับของนิกเกิลได้ 5 บริเวณ โดยดูจากลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ (motif) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนทั้ง 532 ตัวไปเปรียบเทียบและค้นหากรดอะมิโนที่อนุรักษ์ 5 บริเวณ พบว่า เอนไซม์ฮัพเทอไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนของบริเวณการเข้าจับกับนิกเกิล ทั้ง 5 บริเวณ (กรอบสี่เหลี่ยม ในรูปที่ 4.15) และลำดับกรดอะมิโนมีความใกล้เคียงและสอดคล้อง กับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (ตารางที่ 4.6)



Start codon

1 **ATG** CCA ATT AAA ACT TTA GAT ATT GCA CCT GTT GGT AGA GTT GAA GGC GAT TTA GAT GTC 68
 M P I K T L D I A P U G R U E G D L D U
 61 CGT GTG GAA ATT GAC AAT GGA TAT GTA ACT AAT GCC TGG ACT CAT GCT GAA TTG TTT CGC 120
 R V E I D N G Y U T H A W T H A E L F **R** ← 1L
 121 GGT TTT GAA ATC ATT CTG CGT GGC AAA GAC CCC CAA GCC GGG TTA ATT GTT ACG CCA CCA 180
G F E I I L R G K D P Q A G L I U T P **R** ← 2L
 181 ATT TGT GGT ATC TGC GGT GGT TCT CAC TTA ACA TCT GCA TCT TGG GCA TTA CAT ACA GCT 240
 I C G I C G G S H L T S A S W A L D T A
 241 TGG GGT ACA GAA GTT CCA CGC AAT GCT ATT TTG GCG CGG AAT TTA GGT CAA GTT GTG GAA 300
 W G T E U P R M A I L A R M L G Q U U E
 301 ACA ATC CAA AGC ATT CCT CGC TAT TTC TAT GGA TTG TTT GCC ATT GAT TTA ACT AAT AAA 360
 T I Q S I P R Y F Y G L F A I D L T H K
 361 AAT TAT CAT CGT AGT CAT TTC TAT GAT GAG GCT TGT CGT CGC TTT GCT GCT TTC ACA GCG 420
 H Y R R S H F Y D E A C R R F A A F T G
 421 AAA TCC TAT GAG TTA GGT GTG GCA ATT TCT GCC AAA CCT GTG GAA ATT TAC GCT TTA TTA 480
 K S V E L G U T I S A K P U E I Y A L L
 481 GGA GCA CAA TGG CCT CAC AGC AGT TAT ATG GTG CCT GGT GCT GTG ATG TGC GCC CCC ACT 540
 G G Q W P H S S Y M U P G G U M C A P T
 541 TTG ACT GAC ATC ACC CGC GCT TGG GCT ATC CTC GAA TAT TTC CCC ACC AAC TGG TTA GAA 600
 L T D I T R A W A I L E Y F R T H W L E
 601 CCC GTT TGG TTG GGT TGT TCT TTG GAA AGA TAC GAA GAA ATC CAA AGC TAT GAC GAC TTT 660
 P U W L G C S L E R Y E E I Q S Y D D F
 661 ATG AAT TGG TTA GAT GAA GAT GTC AAA CAT CGG GAA TCT GAT TTA GGT TTA TAT TGG CGG 720
 M H W L D E D U K **H R E S D L G L** V W R ← 3L
 721 ATG GGT TTG GAT ATC GGT TTA GAG CGT TTT GGT GCT GGT GTA GGT AAA TAT GTA ACT TGG 780
 H G L D I G L E R F G A G U G K Y U T W
 781 GGA TAT TTA CCC CAT GAG GAT ACA TAC AAC AAA CCC ACC ATT GAG GGT CGT AAC GCT GCG 840
 G Y L P H E D R Y N K P T I E G R N A A
 841 GTA ATT ATG AAA AGC GGT GTT TAC GAT AGC TTT ACT GAT ACC CAT ACT TTG ATG CAT CAA 900
 U I M K S G U Y D S F S D T H T L M D Q
 901 TCT TTT GCC CGT GAA AAT TTA AGC CAT TCT TGG TAT GAT GAA GGA ACT CAA GAT TGG CAT 960
 S F A R E N L S H S W Y D E G T Q D W H
 961 CCA AGC GAT CGC ACC ACA TCA CCC ACC ATC AAC AAC CAA AAA GAC TTT AGC GGT GCA TAT 1020
 P S D R T T S P T I M M Q K D F S G A Y
 1021 TCC TGG GCA AGT CCC GTT CTC CAC AAA GAT TTC GCA CGT TTA GAA GCA GGC CCC TTA GCC 1080
 S W A S A U L H K D F G R L E A G P L A
 1081 CGG CAA TTA GTC GCA GGT GGT ACA CAT GCG GAG TCT TGG CAG CAT TAT GAC CCC TTC ATC 1140
 R Q L U A G G T H G E S W Q H V D P F I
 1141 TTG GAC GTG TTC AAC AAA ATG GGT GGC CCA AGC GTT CAT GTG CGT CAA TTG GCA CGA GTT 1200
 L D U F K K M G G P S U H U R Q L A R U
 1201 CAT GAA ATT GTG AAG CTA TAC CGT CAA GCA GAA CAC TGT TTG CCA GAA TTC AAA TTA AAT 1260
 H E I U K L Y R Q A E H C L R E F K L N
 1261 GAC CCC TGG TAT ATC AAA CCC AAA GAA AAA GAC GGC AAA GGT TGG GGT GCA AGC GAA GCT 1320
 D P W Y I K P K E K D G K G **G A T E A** ← 4L
 1321 CCA AGA GGT GCA CTG TGT CAC TGG GTA GAT ATT GAA GAA GGG AAG ATT AAA CAA TAC CAA 1380
 A R G A L C H W U D I E E G K I K Q Y Q
 1381 GTT ATT GCC CCT GGT ACT TGG AAT ATT GGC CCC CGT GAC GGT GCT GGT CAA CGC GGC CCT 1440
 U I A P G T W N I G P R D G A G Q R G P
 1441 GTT GAA GAA GCA TTA ATT GGT ACA CCG ATT GAA GAC CCA ACA GAC CCG GTA GAA GTG GGT 1500
 U E E A L I G T P I E D P T D P U E U S
 1501 CAT GTT GCC CGT TCT TTC GAC TCT TGT TTA GTG TGT ACA GTT CAT GCC CAC GAT GCC AAA 1560
 H U A R S F **D S C L U C T U H** A N D A K ← 5L
 1561 ACT GCG AAG GAA TTG GCG CGT TTT CGC ACT GCT TAA 1620
 T G K E L A R F R T A *

Stop codon

รูปที่ 4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ

A. siamensis กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณเข้าจับของนิคเกิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไวยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
<i>Nostoc punctiforme</i> ZP 00112356	Ni,Fe-hydrogenase I large subunit	87
<i>Anabaena variabilis</i>	[NiFe] uptake hydrogenase large subunit	86
<i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7120	[NiFe] uptake hydrogenase large subunit	85
<i>Anabaena</i> sp.	[NiFe] uptake hydrogenase large subunit	85
<i>Nostoc punctiforme</i> AAC 16277	HupL homolog	85
<i>Gloeotheca</i> สายพันธุ์ PCC 6909	Uptake hydrogenase large subunit	80

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของอัฟเทคไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994) ในบริเวณของการเข้าจับกับนิกเกิล

บริเวณของการเข้าจับกับ นิกเกิล (ลำดับที่)	ลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994)	ลำดับกรดอะมิโนของ <i>Anabaena siamensis</i>
1L	R-G-x-E	R-G-F-E
2L	R-x-C-G-x-C-x-x-H	R-I-C-G-I-C-G-G-S-H
3L	H-x-x-x-x-x-L	H-R-E-S-D-L-G-L
4L	G-x-x-x-x-P-R-G-x-x-x-H	G-A-T-E-A-A-R-G-A-L-C-H
5L	D-P-C-x-x-C-x-x-H	D-S-C-L-V-C-T-V-H

ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 1L และอยู่ในลำดับกรดอะมิโนที่ 40-43 นับจากจุดเริ่มต้นการแปลรหัส ซึ่งโดยทั่วไป ลำดับกรดอะมิโนของ motif 1L จะอยู่ภายในลำดับกรดอะมิโน 62 ตัวแรกจากด้านปลาย N (N-terminal) ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 2 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 2L และอยู่ในลำดับกรดอะมิโนที่ 60-69 โดยมีกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารผลงานในสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อยู่ระหว่าง motif ทั้งสอง 16 ตัว ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส motif ทั้งสองจะมีกรดอะมิโนที่อยู่ห่างกัน 16 ตัวเสมอ ภายใน motif 2L มีกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 ตัว ซึ่งจะทำหน้าที่เชื่อมระหว่างอะตอมของนิกเกิลกับอะตอมของเหล็กเข้าด้วยกัน (Tamagnini et al., 2002) ช่วยทำให้เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้ดียิ่งขึ้น ลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษบริเวณที่ 3 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 3L และอยู่ในลำดับกรดอะมิโนที่ 230-237 มีลักษณะสำคัญคือมีกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่สามารถจับนิกเกิลได้ดี motif 3L ที่มี Hx₆L จะพบได้ในเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด กรดอะมิโนฮิสทีดีนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างบริเวณเร่งกับตัวรับอิเล็กตรอนอื่นๆ ลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษบริเวณที่ 4 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 4L และอยู่ในบริเวณปลาย C (C-terminal) ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 416-427 พบลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันคือ กรดอะมิโนอะลานีน (A) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนโพรลีน (P) เหมือนใน motif 4L และลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษบริเวณที่ 5 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 5L และอยู่ในลำดับกรดอะมิโนที่ 487-495 ลำดับกรดอะมิโนที่ motif 5L จะมีกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 ตัวเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับโลหะให้ดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนอนุรักษของไซยาโนแบคทีเรียที่มีบริเวณจับของนิกเกิลที่ปลาย N ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น FRGFE(IV) ILRGKDPQAGLIVTPRIC⁶²GIC⁶⁵G(AVG)SH และบริเวณจับของนิกเกิลที่ปลาย C ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น DPVEVGHVARSFDSC⁵⁰⁹LVC⁵¹²TVHAH (Tamagnini et al., 2002) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* เหมือนกันทั้งหมดกับลำดับกรดอะมิโนอนุรักษบริเวณปลาย N และปลาย C โดยบริเวณเข้าจับของนิกเกิลที่ปลาย N ตามรายงานของ Tamagnini และคณะ (2002) ได้รวมเอาส่วนที่มี motif 1L และ 2L เข้าไว้ด้วยกัน ส่วนบริเวณเข้าจับของนิกเกิลที่ปลาย C จะเป็นบริเวณที่มี motif 5L รวมอยู่ด้วย แสดงว่าส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเข้าจับของนิกเกิลมี 2 บริเวณคือ บริเวณปลาย N และปลาย C ซึ่งทั้ง 2 บริเวณนี้จะมีกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นกรดอะมิโนหลักอยู่ในตำแหน่งที่จำเพาะเท่านั้น

4.11 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

4.11.1 การออกแบบไพรเมอร์ยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hoxY*) และส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*)

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* จำนวน 1,187 คู่เบส (รูปที่ 4.10) ยังขาดส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก (*hoxY*) ที่มีตำแหน่งการจัดเรียงตัวอยู่หน้ายีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ของ *A. variabilis* (รูปที่ 4.16) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis* สูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้งยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* จึงเริ่มต้นโดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันในส่วนของยีน *hoxY* สำหรับใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของยีน *hoxH* (ลูกศรในรูปที่ 4.16) ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า RHY และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และออกแบบไพรเมอร์ในส่วนท้ายของยีน *hoxH* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนท้ายของยีน *hoxH* ใน *A. variabilis* (ลูกศรในรูปที่ 4.16) ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า RTH และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป



รูปที่ 4.16 แผนที่ยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส ลูกศรแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์

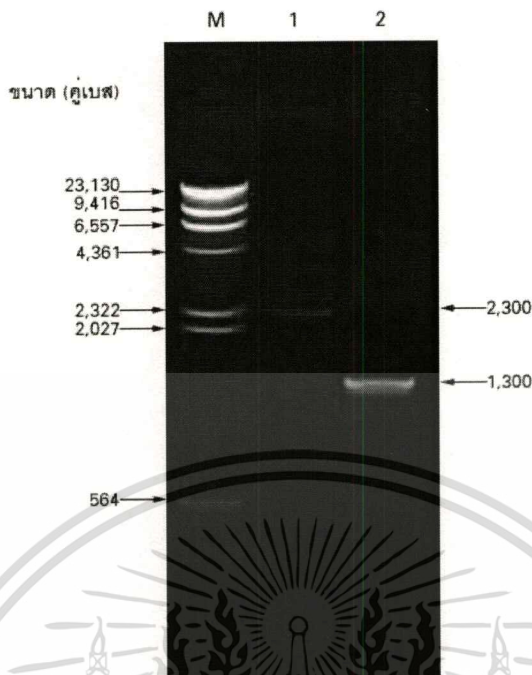
ที่มา : Tamagnini et al., 2002

ตารางที่ 4.7 ไพรเมอร์สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน
รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
RHY	ATGTCTCGTTTGAAGTTAGC
RTH	CCTAAACCCCTAAACCCCTA

4.11.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิล
ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนต้นของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ทำโดยใช้ไพรเมอร์ RHY ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.11.1 ร่วมกับไพรเมอร์ Rhyd5 ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.9 จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 2,366 คู่เบส โดยใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจ แลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (รูปที่ 4.17 ช่องที่ 1) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ โดยใช้ไพรเมอร์ Rhyd1 ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.3.1 (รูปที่ 4.4) ร่วมกับไพรเมอร์ RTH ที่ออกแบบไว้ในข้อ 4.11.1 ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ควรมีขนาด 1,305 คู่เบส และใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจ แลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (รูปที่ 4.17 ช่องที่ 2) จากผลการทดลองแสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะกับจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* สูง เนื่องมาจากการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ในครั้งนี้ (RHY และ RTH) ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะซึ่งออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* (Rhyd5 และ Rhyd1) จึงทำให้การจับกันระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่เกิดขึ้นได้ดี ไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany) ต่อไป



รูปที่ 4.17 ผลิตราก PCR บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป
 M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 1 ผลิตราก PCR บริเวณส่วนต้นจากไพรเมอร์คู่ RHY-Rhyd5
 2 ผลิตราก PCR บริเวณส่วนท้ายจากไพรเมอร์คู่ Rhyd1-RTH

4.11.3 การเชื่อมผลิตราก PCR ของไพรเมอร์คู่ RHY-Rhyd5 และ Rhyd1-RTH กับเวกเตอร์ pDrive และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

นำผลิตราก PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ RHY-Rhyd5 และ Rhyd1-RTH ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.11.2 ที่มีขนาดประมาณ 2,300 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive ตรงปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตราก PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 แล้วทรานสฟอร์มเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตราก PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตราก PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งโคโลนีที่มีเวกเตอร์ที่เชื่อมกับผลิตราก PCR จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์

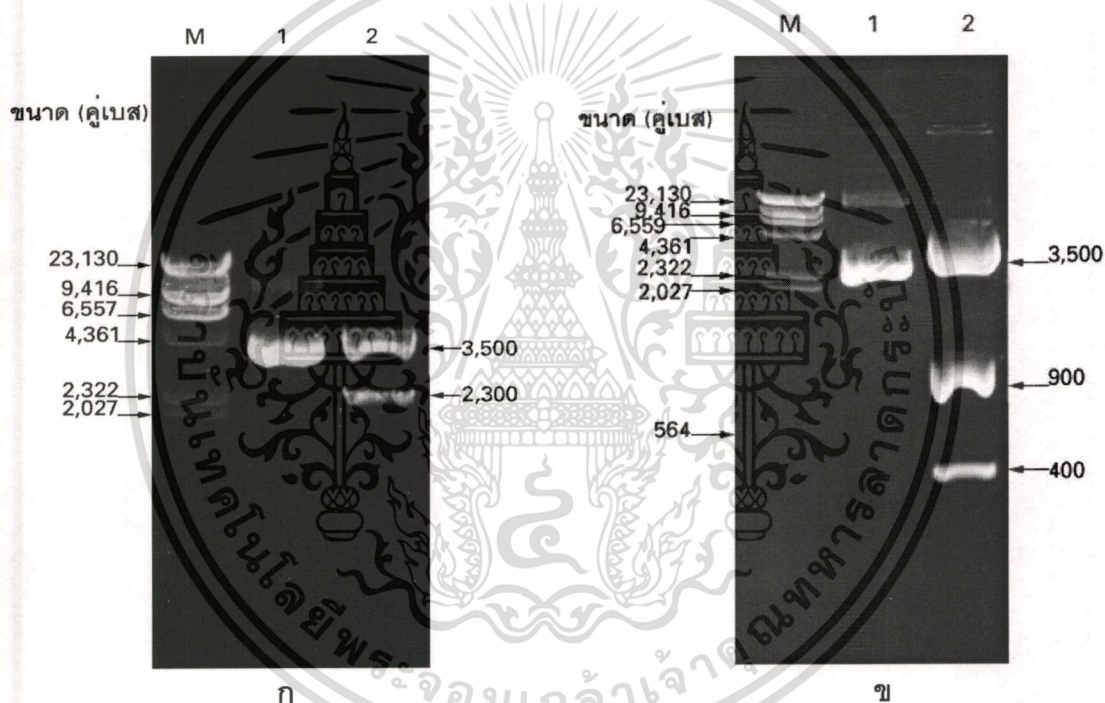
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวได้ โคลนีที่ได้จึงมีสีขาว จากการทรานสฟอร์มได้คัดเลือกโคลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-Gal และ IPTG อย่างละ 2 โคลนี

4.11.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มแมนต์ด้วยต่าง

นำโคลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ RHY-Rhyd5 และ Rhyd1-RTH อย่างละ 2 โคลนีไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เก็บเซลล์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยต่าง (ข้อ 3.4.12) ตั้งชื่อพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ RHY-Rhyd5 ว่า pRHY5.1 และ pRHY5.2 ตั้งชื่อพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-RTH ว่า pRTH1.1 และ pRTH1.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRHY5.1 และ pRHY5.2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 16,000 คู่เบส และ 4,300 คู่เบส (รูปที่ 4.18 ก) แถบบนสุดที่มีขนาดประมาณ 16,000 คู่เบส เป็นแถบของจีโนมดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แถบที่มีขนาด 4,300 คู่เบส เป็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ เนื่องจากพลาสมิดทั้ง 2 มีขนาดเท่ากัน จึงเลือกพลาสมิด pRHY5.1 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRTH1.1 และ pRTH1.2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 23,000 คู่เบส และ 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.18 ข) แถบบนสุดที่มีขนาดประมาณ 23,000 คู่เบส เป็นแถบของจีโนมดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส เป็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ เนื่องจากพลาสมิดทั้งสองมีขนาดเท่ากันจึงเลือกพลาสมิด pRTH1.1 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เกิดจากไพรเมอร์คู่ RHY-Rhyd5 และเมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของ pRTH1.1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,500, 900 และ 400 คู่เบส (รูปที่ 4.19 ข) แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pDrive ที่ไม่มี insert และแถบที่ 2 และ 3 ที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 400 คู่เบส เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป แต่เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ 1 ตำแหน่ง จึงทำให้ปรากฏแถบ 2 แถบ เมื่อนำขนาดของแถบทั้งสองมารวมกันจะได้ 1,300 คู่เบส ซึ่งเท่ากับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป (1,300 คู่เบส) จึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pRTH1.1 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pDrive เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-RTH และภายในมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 1 ตำแหน่ง



รูปที่ 4.19 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRHY5.1 (ก) และพลาสมิด pRTH1.1 (ข) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ

2 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

4.11.6 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRHY5.1 และ pRTH1.1

นำพลาสมิดที่เอ็นเอทีผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ตามข้อ 4.11.5 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีของ BigDye Terminator Reactions และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PIRSM^R 3700 DNA Analyzer ร่วมกับไพรเมอร์ RTH (ในข้อ 4.11.1) และไพรเมอร์ Rhyd8 ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* ที่ได้ศึกษามาแล้ว เนื่องจากไพรเมอร์ที่มีอยู่ในตำแหน่งที่ห่างเกินไป ที่จะใช้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ต้องการ ซึ่งไพรเมอร์ Rhyd8 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-AATGCGATCGCCTGTTT-3' ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่จาก pRHY5.1 ร่วมกับไพรเมอร์ Rhyd8 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 676 คู่เบส ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนท้ายของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่จากพลาสมิด pRTH1.1 ร่วมกับไพรเมอร์ RTH จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 500 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากพลาสมิดทั้งสองชนิดไปหาบริเวณที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาไว้ในตอนแรกของพลาสมิด pRVA1.1 (รูปที่ 4.10) ซึ่งจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้งหมด 1,416 คู่เบส (รูปที่ 4.20) และได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไว้ใน GenBank โดยมี accession number เป็น AY152845 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นจาก ATG ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (start codon) และสิ้นสุดที่ TAG ซึ่งเป็นจุดสุดท้ายของการแปลรหัส (stop codon) เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน จะได้กรดอะมิโน 487 ตัว จากการคำนวณ พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่มีขนาดประมาณ 53.6 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ของรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่รายงานไว้คือ 54.8 กิโลดาลตัน (Tamagnini *et al.*, 2002) และนำกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Aabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 สูงสุดถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 อาจเนื่องมาจาก *A. variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและตรึงไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับ *A. siamensis* สำหรับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียมีคุณสมบัติและลักษณะที่แตกต่างจาก *A. siamensis* อย่างเห็นได้ชัดเจน เช่น ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายแต่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Spirulina platensis* และ *Spirulina subsalsa* ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ

Synechococcus สายพันธุ์ PCC 7002 ในการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สามารถพบตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์จากบริเวณของการเข้าจับของนิกเกิล (Nickel-binding site) ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์อัลเทอไฮโดรจีเนส เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 487 ตัวไปเปรียบเทียบและค้นหากรดอะมิโนที่อนุรักษ์ 5 บริเวณ พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนของบริเวณการเข้าจับของนิกเกิลทั้ง 5 บริเวณเช่นกัน (กรอบสี่เหลี่ยม ในรูปที่ 4.20) และลำดับกรดอะมิโนมีความใกล้เคียงและสอดคล้องกับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (ตารางที่ 4.9)



Start codon

1 **ATG** AAA AAA ATC ATT ATT GAT CCT GTT ACC CCG ATC GAA GGA CAC GCA AAA ATT AGT ATT 60
 M K K I I I D P U T R I E G H A K I S I
 61 TAT CTT GAT GAT GAC GGT CAA GTT CAT GAT GCT AGA TTT CAT GTC ACA GAA TTT **CGC GGA** 120
 V L D D D G Q U H D A R F H U T E F **R G** ← 1L
 121 TTT GAA AAA TTC TGT GTT GGT CGT CCT TTC CCA GAA ATG CCA GGA ATT ACA GCG AGA ATT 180
F E K F C U G R P F P E M P G I T A **R I** ← 2L
 181 TGC GGT ATT TGT CCG GTC AGC CAC CTA TTA GCA TCA GCG AAA ACA GGC GAT CGC ATT CTT 240
C G I C P U S H L L A S A K T G D R I L
 241 GCT GTC ACC ATC CCC AAA GCT GCC ACC AAA CTC CGC CGC TTA ATG AAT TTA GGG CAA ATC 300
 A U T I P K A A T K L R R L M N L G Q I
 301 GTC CAA TCC CAT GCG CTG AGT TTC TTT CAC CTC AGC GCC CCA GAC CTG TTA TTA GGG ATG 360
 U Q S **H A L S F F H L** S A P D L L L G M ← 3L
 361 GAT AGC GAC CCA ACT AAA CCG AAC GTC TTC GGT CTC ATT GCA TCC GAC CCA GAA TTA GCT 420
 D S D P T K R N U F G L I A S D P E L A
 421 AGA GGT GGA ATC CGT CTG CGT CAA TTT GGA CAA GAA ATC ATT GAA TTA CTG GGA GGA AAG 480
 R G Q I R L R Q F G Q E I I E L L G G K
 481 AAA ATC CAT CCC TCC TGG GCT GTT CCC GGT GGA GTC AGT GAC CCA CTA ACC GAA CAA AAT 540
 K I H P S W A U P G G U S D P L T E Q H
 541 CGC ACC CAT ATC CAA AAC AGG ATT CCG GAA GCC CGC ACA ACC GTC ATT AAT GCG ATC GCA 600
 R T N I Q N R I P E A R T T U I N A I A
 601 TTA TTT AAA GGT TTA CTC AAA GAC TAC GAA AAA GAA GCC CAA ACC TTT GGT AAC TTT CCC 660
 L F K G L L K D V E K E A Q T F G N F P
 661 AGC TTA TTT ATG GGT TTA GTC ACA CCA GAA GGC TTA TCG GAA ACC TAC GAC GGA CAT TTC 720
 S L F M G L U T P E G L W E T V D G H L
 721 CGA TTT GTA CAT AGT GCA GGC AAC ATA GTA GCT GAT AAT CTT GAC CCC GCT AAC TAT CAC 780
 R F U D S A G N I U A D H L D P A N V H
 781 GAC TTT CTC GCG GAA GCC GTT CAA GCA GAT TCT TAC TTA AAA TCC CCC TAT TAT CGT CCC 840
 D F L G E A U U Q A D S V L K S P V Y R P
 841 CTT GCG TAT CCC GAC TCC AGC GAC CAT TGT CGT TTA GAT AGC GCC ATG TAT GCG GTC GCG 900
 L G V P D S S D H C R L D S G M V R U G
 901 CCC TTA GCC AGA CTT AAC ATT TGT AAT CCG ATT GCG ACA CCC CTA GCT GAC CAA GAA TTA 960
 P L A R L N I C M R I G T P L A D Q E L
 961 AAA GAA TTC CCG AGC TAT GGT AGC GGC ACA GTC AAA TCA TCG TTC TTC TAT CAC TAC GCC 1020
 K E F R S V G S G T U K S S F F V H V A
 1021 CGC TTA ATT GAA ATT CTC GCA TCC ATT GAA CAC ATA GAA ATT CTT CTA GAT GAC CCA GAT 1080
 R L I E I L A S I E H I E I L L D D P D
 1081 ATA TTA TCA ACT CCG CTT CGT GCG GAA GCA GGA ATT AAC CAA CTC GAA GCC GTA GGT GTC 1140
 I L S T R L N A E A G I N Q L E A U **G U** ← 4L
 1141 AGC GAA GCA CCA CCG GGA AGA TTA TTT CAT CAT TAT CGA GTT GAT GAA GAC GGC TTA ATC 1200
S E A P R G T L F H H V R U D E D G L M
 1201 CAG AAA GTC AAC TTA ATC ATT GCC ACT GGT CAA AAT AAC TTG GCC ATC AAT CCG ACA GTC 1260
 Q K U N L I I A T G Q M N L A M N R T U
 1261 GCC CAA ATA GCC CCG CAT TTT ATC CAA GGC ACA GAA ATT AAA GAA GGA ATG TTA AAT CCG 1320
 A Q I A R H F I Q G T E I K E G M L N R
 1321 GTC GAG GCA GGA ATT AGG GCT TTT GAC CCC TGT TTA AGT TCT TCC ACC CAT GCA GCC GGA 1380
 U E A G I R A F **D P C L S S S T H** A A G ← 5L
 1381 CAA ATC CCA TTA CAC ATT CAA TTA GTT GCA GCA AAT GGA AAT ATT GTT AAT CAA GTT TGG 1440
 Q M P L R I Q L U A A N G N I U N Q U W
 1441 CGA GAA AAA TTA GGG GTA **TAG** 1500
 R E K L G U *****
 Stop codon

รูปที่ 4.20 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สเทรนสคริปต์ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อย

ใหญ่ของ *A. siamensis* กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณเข้าจับของนิกล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สทิเบิลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของกรดอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
<i>Anabaena variabilis</i>	Hydrogenase large subunit	85
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Hydrogenase large subunit	85
<i>Spirulina platensis</i>	HoxH	73
<i>Spirulina subsalsa</i>	HoxH	70
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Hydrogenase large subunit	67
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Hydrogenase large subunit H	65

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของรีเวอร์สทิเบิลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994) ในบริเวณของการเข้าจับกับ นิคเกิล

บริเวณของการเข้าจับกับ นิคเกิล (ลำดับที่)	ลำดับกรดอะมิโนตามรายงานของ Simon (1994)	ลำดับกรดอะมิโนของ <i>Anabaena siamensis</i>
1L	R-G-x-E	R-G-F-E
2L	R-x-C-G-x-C-x-x-x-H	R-I-C-G-I-C-P-V-S-H
3L	H-x-x-x-x-x-L	H-A-L-S-F-F-H-L
4L	G-x-x-x-P-R-G-x-x-x-H	G-V-S-E-A-P-R-G-T-L-F-H
5L	D-P-C-x-x-C-x-x-H	D-P-C-L-S-S-S-T-H

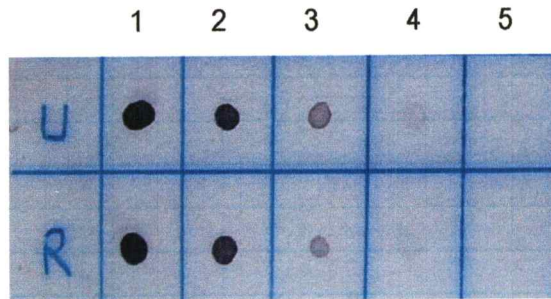
ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของเอนไซม์รีเวอร์สทิเบิลไฮโดรจีเนสบริเวณที่ 1 ถึง 4 ของ *A. siamensis* จะมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 1L ถึง 4L แต่จากรายงานของ Schmitz และคณะ (1995) ที่รายงานบริเวณเข้าจับของนิคเกิลบริเวณด้านปลาย N และปลาย C ว่ามีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ดังนี้คือ RGXEX16RXCGXCXXH และ DPCX(A/S)CXXH ตามลำดับ พบว่าลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N จะครอบคลุมบริเวณที่เป็น motif 1L และ 2L ตามรายงานของ Simon (1994) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ *A. siamensis* ที่ได้เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนที่รายงานไว้ทั้งหมด และลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 5 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของ motif 5L ตามรายงานของ Simon (1994) และคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย C ตามรายงานของ Schmitz และคณะ (1995) แต่ต่างกันตรง

ตำแหน่งที่เป็นกรดอะมิโนเซอร์อิน (S) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนซีสเทอีน (C) อย่างไรก็ตาม เมื่อดูจากภาพรวม ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสก็มีความคล้ายคลึงกับ motif ส่วนใหญ่ และสามารถจับกับนิคเกิลหรือโลหะอื่นได้ดี

4.12 การศึกษายีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยวิธี Southern blot hybridization

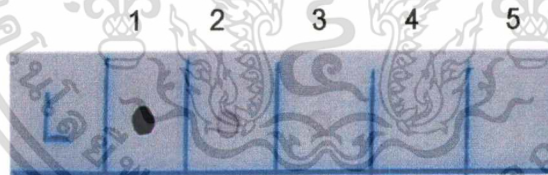
4.12.1 การติดฉลากตัวติดตามและการตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามสำหรับศึกษายีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดที่อยู่ในพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตัดแถบดีเอ็นเอขนาด 307 คู่เบส และ 400 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ก และ 4.8 ข) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, USA) และทำการติดฉลากที่ปลายของดีเอ็นเอทั้ง 2 ด้วย Dioxygenin-11-dUTP เพื่อใช้สำหรับศึกษายีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส ตามลำดับ จากนั้นเปิดดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจางต่างๆ มาหยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ตามรูปที่ 4.21 ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่ติดฉลากกับ DIG-labeled DNA control ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 100, 10, 3, 1 และ 0.3 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.22) พบว่าประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอเกิดขึ้นได้ดี เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทำให้เกิดจุดสีดำปรากฏบนแผ่นเมมเบรนได้อย่างชัดเจนและดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดที่ติดฉลากมีปริมาณ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.21 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอด้วย DIG-High Prime

- U ดีเอ็นเอของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสที่ติดฉลาก
- R ดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่ติดฉลาก
- 1 ดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ติดฉลาก 10^0
- 2 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}
- 3 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}
- 4 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}
- 5 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}

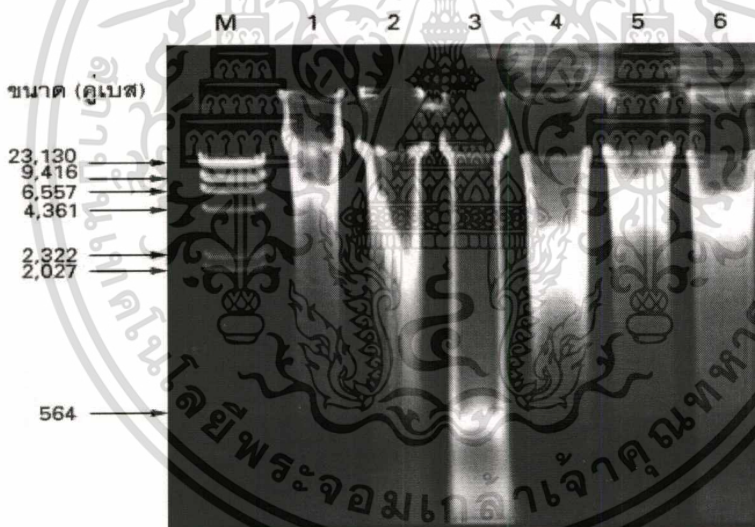


รูปที่ 4.22 ดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลาก (DIG-labeled DNA control)

- L ดีเอ็นเอติดฉลากที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ
- 1 ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 100 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร
- 2 ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 10 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร
- 3 ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 3 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร
- 4 ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 1 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร
- 5 ดีเอ็นเอที่ระดับความเข้มข้น 0.3 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร

4.12.2 การตรวจสอบการมียืนอัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

การตรวจสอบการมียืนอัพเทคไฮโดรจีเนส เริ่มต้นทำโดยนำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้แก่ *Anabaena siamensis* TISTR 8012, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Gloeocapsa* sp. Kuetzig, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน จากนั้นสกัดจีโนมดีเอ็นเอโดยการแตกเซลล์เม็ดแก้ว แล้วสกัดด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัพเฟอร์ TE นำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III สามารถย่อยจีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 4.23



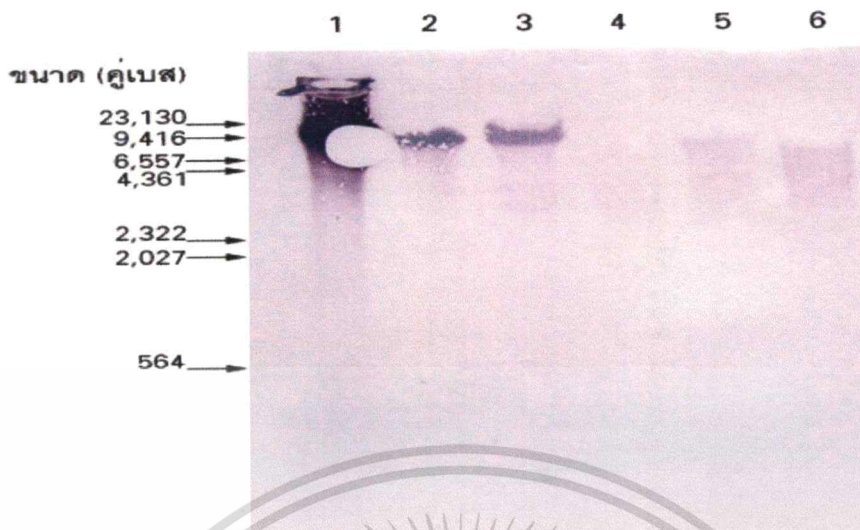
รูปที่ 4.23 จีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III

- 1 จีโนมดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*
- 2 จีโนมดีเอ็นเอของ *Calothrix* sp. Agardh
- 3 จีโนมดีเอ็นเอของ *Fischerella muscicola*
- 4 จีโนมดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig
- 5 จีโนมดีเอ็นเอของ *Hapalosiphon delicatulus*
- 6 จีโนมดีเอ็นเอของ *Nostoc carneum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดอยู่กับเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มาทำการ blot ด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) เพื่อย้ายดีเอ็นเอให้ไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน แล้วตรวจสอบการมียีนอัลเทคไฮโดรจีเนส โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* ขนาด 307 คู่เบสที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime (ข้อ 4.12.1) พบแถบสีดำที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-Digoxigenin AP conjugate กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา NBT และ BCIP ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* แต่ในช่องที่มีดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig ไม่ปรากฏแถบสีดำ ดังรูปที่ 4.24 ซึ่งแถบสีดำที่ปรากฏในช่องที่มีจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* จะมีความเข้มมากที่สุด เนื่องจากตัวติดตามที่ใช้ในการตรวจสอบ เตรียมมาจากดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. siamensis* จึงทำให้จับกับดีเอ็นเอของตัวเองได้จำเพาะมากกว่าดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ในการทดลอง ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้มีทั้งชนิดที่ตรึงในโตรเจนและไม่ตรึงในโตรเจน ซึ่งพบว่าในช่องที่มีจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* และ *N. carneum* จะปรากฏแถบสีดำ จากรายงานของ Oxelfelt และคณะ (1998) และ Tamagnini และคณะ (1997) ที่ตรวจสอบการมียีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงในโตรเจน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102, *A. variabilis* และ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ด้วยเทคนิค Southern hybridization พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มียีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า *N. carneum* น่าจะมียีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่เช่นกัน ส่วนไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola* และ *Hapalosiphon delicatulus* ยังไม่มีรายงานการตรวจสอบยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization แต่เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เหล่านี้เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงในโตรเจนได้เช่นเดียวกับ *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. จึงน่าจะมียีนอัลเทคไฮโดรจีเนส สำหรับ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig เป็นไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงในโตรเจนจึงไม่พบยีนอัลเทคไฮโดรจีเนส เนื่องจากยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่จะพบในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงในโตรเจน ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ จึงเป็นการยืนยันว่า ยีนอัลเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงในโตรเจนได้ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *A. siamensis*, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum*

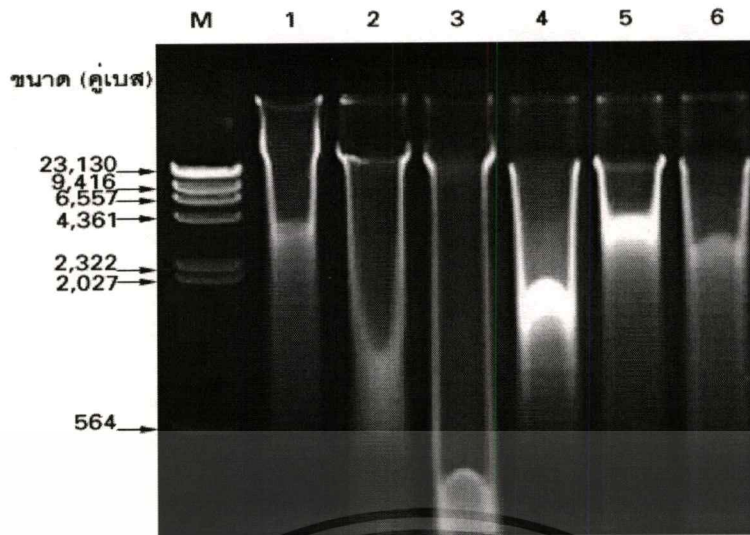


รูปที่ 4.24 ผลการตรวจสอบยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* เป็นตัวติดตาม

- 1 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*
- 2 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Calothrix* sp. Agardh
- 3 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Fischerella muscicola*
- 4 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig
- 5 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Hapalosiphon delicatulus*
- 6 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Nostoc carneum*

4.12.3 การตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

การตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยทำการแยกจีโนมิคดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิล็คโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* สามารถย่อยจีโนมิคดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 4.25



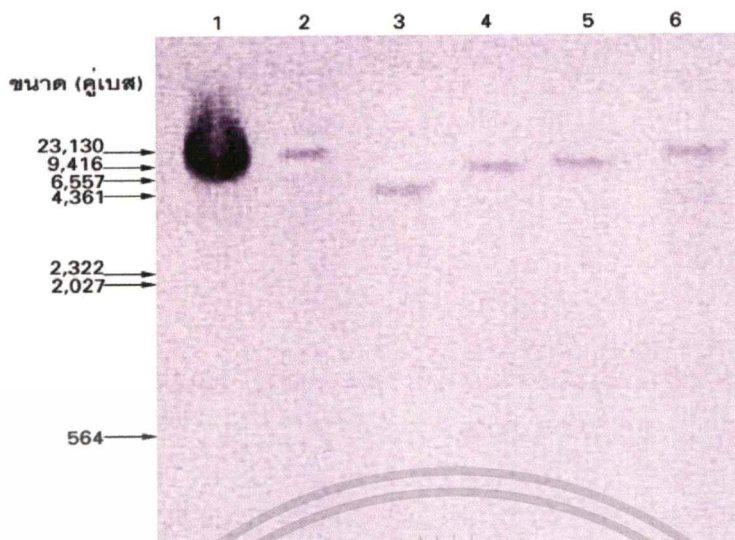
รูปที่ 4.25 จีโนมิคดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III
- 1 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*
 - 2 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Calothrix* sp. Agardh
 - 3 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Fischerella muscicola*
 - 4 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig
 - 5 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Hapalosiphon delicatulus*
 - 6 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Nostoc carneum*

จากนั้นทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดอยู่กับเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลมาทำการ blot ด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) เพื่อย้ายดีเอ็นเอให้ไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน แล้วตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* ขนาด 400 คู่เบสที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime (ข้อ 4.12.1) ในการทดลองได้นำไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงในโตรเจน *A. siamensis*, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* และไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงในโตรเจน *Gloeocapsa* sp. Kuetzig มาตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส พบแถบสีดำปรากฏในช่องที่มีดีเอ็นเอของ *A. siamensis*, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Gloeocapsa* sp. Kuetzig, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* ดังรูปที่ 4.26 ซึ่งแถบสีดำที่ปรากฏในช่องที่มีดีเอ็นเอของ *A. siamensis* จะปรากฏชัดที่สุด เนื่องจากใช้ตัวติดตามที่เตรียมมาจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. siamensis* จึงทำ

ให้ตัวติดตามสามารถจับกับจีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ได้จำเพาะมากกว่าจีโนมิคดีเอ็นเอเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ จากผลการทดลอง พบแถบสีดำปรากฏในทุกช่องที่มีจีโนมิค ดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา แสดงให้เห็นว่า ไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส จากรายงานของ Tamagnini และคณะ (1997) พบยีน *hoxH* ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120, *A. variabilis* และ *Nostoc muscorum* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและตรึงไนโตรเจนได้ แสดงให้เห็นว่า *A. siamensis* และ *N. carneum* น่าจะมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเช่นเดียวกัน สำหรับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola* และ *Hapalosiphon delicatulus* ยังไม่มีรายงานการพบ *hoxH* แต่จากผลที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization ทำให้ทราบว่าไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวน่าจะมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเช่นเดียวกับไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสายพันธุ์อื่นๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ในการศึกษาการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Gloeocapsa* sp. Kuetzig ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน ก็พบว่ามีแถบสีดำปรากฏขึ้นในช่องที่มีจีโนมิค ดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งจากรายงานการศึกษายีน *hoxH* ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่า *Anacystis nidulans* (Schmitz and Bothe, 1996), *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758 และ *Gloeocapsa alpicola* (Serebryakova et al., 1999) มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงคาดว่า *Gloeocapsa* sp. Kuetzig มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส และจากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สามารถพบยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา



รูปที่ 4.26 ผลการตรวจสอบยีนรีเวอร์สทีเบลไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization

โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สทีเบลไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* เป็นตัวติดตาม

- 1 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis*
- 2 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Calothrix* sp. Agardh
- 3 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Fischerella muscicola*
- 4 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Gloeocapsa* sp. Kuetzig
- 5 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Hapalosiphon delicatulus*
- 6 จีโนมิคดีเอ็นเอของ *Nostoc carneum*

สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2, UHS-Uhyd6 และ Uhyd3-Uhyd8 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวในทุกๆ คู่ของไพรเมอร์ที่ใช้ มีขนาดประมาณ 1,300, 2,100 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมามีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ *A. siamensis*

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy หรือ pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วนำพลัสไมด์ที่ได้ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* มีทั้งหมด 1,596 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงสูงกับเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสของ *Nostoc punctiforme* 87 เปอร์เซ็นต์ และ *Anabaena variabilis* 86 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยค้นหาบริเวณเข้าจับของนิคเกิล (Ni-binding site) ภายในลำดับกรดอะมิโนของอะพเทคไฮโดรจีเนสของ *A. siamensis* พบบริเวณเข้าจับของนิคเกิล 5 บริเวณ ที่มีกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ (motif) ในแต่ละบริเวณมีความใกล้เคียงกับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่มีตามรายงานของ Simon (1994) แต่มีเพียงลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 4 และ 5 ของ *A. siamensis* เท่านั้น ที่มีลำดับกรดอะมิโนบางตัวที่ต่างจากที่รายงานไว้ คือ ในกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 4 พบกรดอะมิโนอะลานีน (A) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนโพรลีน (P) และในกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 5 พบกรดอะมิโนเซอรีน (S) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนโพรลีน (P)

5.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Uhyd3, RHY-Rhyd5 และ Rhyd1-RTH พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงแถบเดียวในทุกๆ คู่ของไพรเมอร์ที่ใช้ มีขนาดประมาณ 1,300, 2,100 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมามีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ *A. siamensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย และผู้จัดทำเอกสารนี้ขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวในทุกๆ คู่ของไพรเมอร์ที่ใช้ มีขนาดประมาณ 1,200, 2,300 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับ แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมามีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของ *A. siamensis*

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy หรือ pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วนำพลาสมิดที่ได้ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. siamensis* มีทั้งหมด 1,461 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงสูงกับเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 85 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากบริเวณเข้าจับของนิคเกลที่อยู่ภายในลำดับกรดอะมิโนของรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส พบบริเวณการเข้าจับกับนิคเกล 5 บริเวณ โดยลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษของรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสบริเวณที่ 1 ถึง 4 ของ *A. siamensis* มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษ (motif) ที่มีในรายงานของ Simon (1994) มีเพียงลำดับกรดอะมิโนในอนุรักษบริเวณที่ 5 ของ *A. siamensis* ที่มีลำดับกรดอะมิโนบางตัวที่ต่างจากที่รายงานไว้ คือ พบกรดอะมิโนเซอรีน (S) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนซีสเทอีน (C)

5.3 การศึกษาการมีฮีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ทั้ง 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

จากการนำพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* และ *hoxH* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 307 คู่เบส และ 400 คู่เบส จากพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 ตามลำดับ มาทำการติดฉลากด้วย DIG High Prime เพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับตรวจสอบการมีฮีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และฮีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าเมื่อใช้ตัวติดตามที่เตรียมได้จาก pUTA1.1 ไปตรวจสอบการมีฮีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ จะปรากฏแถบสีดำที่เกิดจากการที่ตัวติดตามสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ในช่องที่เป็นดีเอ็นเอของ *A. siamensis*, *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* แสดงว่าไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวมีฮีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส ส่วนการตรวจสอบการมีฮีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมได้จาก pRVA1.1 พบว่าจะปรากฏแถบสีดำใน

ทุกช่องที่มีติเอ็นเอของไชยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองรวมถึง *Gloeocapsa* sp. Kuetzig แสดงว่ายีนรีเวอร์สทีเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในไชยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กาญจนาภรณ์ ลีวมโนมนต์. 2527. สหราชอาณาจักร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- Adams, M. W. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S. 1981. "Hydrogenase". *Biochim. Biophys. Acta.* 594 : 105-176.
- Antarikanonda, P. 1982a. "Effect of salinity on growth, nitrogen fixation and sodium uptake of rapidly growing N_2 -fixing blue-green alga *Anabaena* sp. TA1". *Microbios.* 34 : 177-184.
- Antarikanonda, P. 1982b. "Influence of pretreating the seeds with extract of *Anabaena siamensis* on germination and growth of some rice varieties from Thailand". *FAO Internl Commission* 31 : 37-39.
- Appel, J. and Schulz, R. 1996. "Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I)". *Biochim. Biophys. Acta.* 1298 : 141-147.
- Appel, J. and Schulz, R. 1998. "Hydrogenase metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis : hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox posing?". *J. Photochem. Photobiol. Ser. B.* 47: 1-11.
- Axelsson, R., Oxelfelt F. and Lindblad, P. 1999. "Transcriptional regulation of *Nostoc* uptake hydrogenase". *FEMS Microbiology Lett.* 170 : 77-81.
- Axelsson, R. and Peter, L. 2002. "Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases : effects of oxygen, hydrogen and nickel". *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 444-447.
- Belkin, S. and Paden, E. 1978. "Sulfide-dependent hydrogen evolution in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*". *FEBS Lett.* 94 : 291-294.
- Benemann, J. R., Miyamoto, K., Hallenberk, P. C. and Murry, M. A. 1982. "Hydrogenase activity in the thermophile *Mastigoçladus laminosus*". *Biochemical and Biophysical Research Communication* 106 : 1196-1202.

- Boison, G., Schmitz, O., Mikheeva, L., Shestakov, S. and Bothe, H. 1996. "Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*". *FEBS Lett.* 394 : 153-158.
- Boison, G., Schmitz, O. and Bothe, H. 1998. "Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*". *Curr. Microbiol.* 36 : 253-258.
- Boison, G., Hermann, B. and Olives, S. 2000. "Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR". *Curr. Microbiol.* 40 : 315-321.
- Carrasco, C. D., Buettner, J. A. and Golden, J. W. 1995. "Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 791-795.
- Colbeau, A., Kelley, B. C. and Vignais, P. M. 1980. "Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata* : relationship with nitrogenase activity". *J. Bacteriol.* 144 : 141-148.
- Daday, A., Grant, R. L. and Geoffrey, D. S. 1979. "Measurement *in vivo* of hydrogenase catalysed hydrogen evolution in the presence of nitrogenase enzyme in cyanobacteria". *Biochem. J.* 177 : 139-144.
- Daday, A., Mackerras, A. H. and Smith, D. 1985. "The effect of nickel on hydrogen metabolism and nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*". *J. Gen. Microbiol.* 131: 231-238.
- Daday, A. and Smith, D. 1987. "The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolated from *Macrozamia communis* L. Johnson". *Aust. J. Plant Physiol.* 131 : 231-238.
- Desikachary, T. V. 1959. *Indian Council of Agariculture Research*. NewDelhi.
- Dixon, R. O. D. 1972. "Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties". *Arch. Microbiol.* 85 : 193-201.
- Eisbrenner, G., Distler, L. Floener, L. and Bothe, H. 1978. "The occurrence of the hydrogenase in some blue-green algae". *Arch. Microbiol.* 118 : 117-184.

- Ewart, G. D., Reed, K. C. and Smith, G. D. 1990. "Soluble hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. Cloning and sequencing of a potential gene encoding the tritium exchange subunit". *Eur. J. Biochem.* 187 : 215-223.
- Frenkel, A., Gaffron, H. and Battley, E. H. 1950. "Photosynthesis and photoreduction by the blue-green alga *Synechococcus elongatus*". *Näg. Biol. Bull.* 99 : 157-162.
- Friedrich, B. and Schwartz, E 1993. "Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs". *Annu. Rev. Microbiol.* 47 : 351-383.
- Happe, T., Schutz, K. and Bohme, H. 2000. "Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413". *Curr. Microbiol.* 40 : 315-321.
- Hansel, A. and Lindblad, P. 1998. "Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 : 153-160.
- Hoshaw, R. W. and Rosowski, J. R. 1973 *Method for microalgae. Handbook of Phycological Methods and Growth. Measurement.* Cambridge Press. USA.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981a. "Occurrence and localization of two distinct hydrogenases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120". *J. Bacteriol.* 146 : 209-214.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981b. "Comparative characterization of two distinct hydrogenases from *Anabaena* sp. strain 7120". *J. Bacteriol.* 146 : 215-221.
- Houchins, J. P. 1984. "The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria". *Biochem. Biophys. Acta.* 768 : 227-255.
- Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. and Aarson, S. 1986. *Algal nutrition. Handbook of Microalgal Mass Culture.* CRC Press Inc. Florida
- Kentemich, T., Bahnweg, M., Mayer, F. and Bothe, H. 1989. "Location of the reversible hydrogenase in cyanobacteria". *Z. Naturforsch.* 44c : 384-391.
- Kentemich, T., Casper, M. and Bothe, H. 1991. "The reversible hydrogenase in *Anacystis nidulans* is a component of the cytoplasmic membrane". *Naturwissenschaften* 78 : 559-560.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. 1980. "Hydrogen metabolism by filamentous cyanobacteria." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 205 : 36-50.

- Lambert, G. and Smith, G. 1981. "The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae)". *Biol. Rev.* 56 : 589-660.
- Lindberg, P., Hansel, A. and Lindblad, P. 2000. "*hupS* and *hupL* constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102". *Arch. Microbiol.* 174 : 129-133.
- Lindblad, P. and Sellstedt, A. 1990. "Occurrence and localization of an uptake hydrogenase in the filamentous heterocystous cyanobacterium *Nostoc* PCC 73102". *Protoplasma* 159 : 9-15.
- Lindblad, P. and Tamagnini, P. 2001. Cyanobacterial hydrogenases and biohydrogen: Present status and future potential. In J. Miyake, Matsunga, T. and San Pietro, A.(ed). *Biohydrogen II*. Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 143-169.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. 1979. "Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*". *FEBS Lett.* 98 : 342-346.
- Masukawa, H., Mochimaru, M. and Sakurai, H. 2002. "Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 : 618-624.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Lindblad, P. 1995. "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen". *Plant Physiol. Biochem.* 33 : 617-623.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Lindblad, P. 1998. "Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of *hupSL* homologue". *Arch. Microbiol.* 169 : 267-274.
- Papen, H., Kentemich, T., Schmulling, T. and Bothe, H. 1986. "Hydrogenase activities in cyanobacteria". *Biochimie.* 68 : 121-132.
- Peschek, G. A. 1979a. "Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H_2 -dependent photoreduction and related reactions". *Biochim. Biophys. Acta.* 548 : 187-202.

- Peschek, G. A. 1979b. "Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction". *Biochim. Biophys. Acta.* 548 : 203-221.
- Peschek, G. A. 1979c. "Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans*". *Arch. Microbiol.* 123 : 81-92.
- Rai, A. N., Borthakur, M., Söderbäck, E. and Bergman, B. 1992. "Immunogold localization of hydrogenase in the cyanobacterial-plant symbioses *Peltigera canina*, *Anthoceros punctatus* and *Gunnera magellanica*". *Symbiosis* 12 : 131-144.
- Rippka, R., Duruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". *J. Gen. Microbiol.* 111 : 1-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. 2nd ed. Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. 1995. "Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria". *Eur. J. Biochem.* 233 : 266-276.
- Schulz, R. 1996. "Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria". *J. Mar. Biotechnol.* 4 : 16-22.
- Serebriakova, L., Zorin, N. A. and Lindblad, P. 1994. "Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 : presence and localization in non-N₂-fixing cells". *Arch. Microbiol.* 161 : 140-144.
- Serebryakova, T. L., Milagros, M., Nikolay, A. Z., Ivan, N. G. and Richard, C. 1996. "Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres". *FEBS Lett.* 383 : 79-82.
- Shravan, K. C. and Polasa, H. 1991. "Influence of nickel and copper on photobiological hydrogen production and uptake in *Oscillatoria subbrevis* strain 111". *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* B57 : 281-285.
- Simon, J. A. 1994. "Nickel hydrogenase: in search of the active site". *Biochim. Biophys. Acta.* 1188 : 167-204.
- Smith, L. A., Hill, S. and Yates, M. G. 1976. "Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria". *Nature* 262 : 209-210.

- Spiller, H., Gerhard, B. and Shanmugam, K. T. 1983. "Regulation of hydrogenase activity in vegetative cells of *Anabaena variabilis*". J. Bacteriol. 155 : 129-137.
- Stephenson, M. and Stickland, L. H. 1931. Hydrogenase : A bacterial enzyme activating molecular hydrogen I. The properties of the enzyme. Biochem J. 25 : 205-214.
- Sze, P. 1986. A biology of the algae. WM. C. Brown Publishers. England.
- Tamagnini, P., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. "Immunological characterization of hydrogenase in the nitrogen-fixing *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Curr. Microbiol. 31 : 102-107.
- Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R., Lindblad, P. 1997. "Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme". Appl. Environ. Microbiol. 63 : 1801-1807.
- Tamagnini, P., Jose'-Lui's, C., Ligia, A., Maria-Jos'e, O., Roberto, S. and Peter, L. 2000. "Diversity of cyanobacteria hydrogenases, a molecular approach". Current Microbiology 40 : 356-361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindblad, P., Oxelfelt, F. and Wünschiers, R. 2002. "Hydrogenase and hydrogen metabolism of cyanobacteria". Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 : 1-20.
- Tel-Or, E., Luijk, L. W. and Packer, L. 1978. "Hydrogenase in N_2 -fixing cyanobacteria". Archives of Biochemistry and Biophysics 185 : 185-194.
- Tredici, M. R., Margheri, M. C., De Philippis, R. and Materassi, R. 1990 "The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas sirsinalis* L.". J. Gen. Microbiol. 136 : 1009-1015.
- Troshina, O. Y., Larissa, T. S and Peter, L. 1996. "Induction of H_2 -uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413: Effects of hydrogen and organic substrate". Current Microbiol. 33 : 11-15.
- Vignias, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. 2001. "Classification and phylogeny of hydrogenases". FEMS Microbiol. Rev. 25 : 455-501.
- Watanabe, A., Nishigaka, S and Konishi, C. 1951. "Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants". Nature 168 : 748-749.

- Wolk, C. P., Ernest, A. and Elhai, J. 1994. Heterocyst metabolism and development. In D. A. Bryant (ed), The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 769-823.
- Zhang, X., Robert, T. and Chase Van, B. 1984. "Nickel control of hydrogen production and uptake in *Anabaena* sp. strain CA and 1F". J. Gen Microbiology 130 : 1815-1818.





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Rippka *et al.*, 1979)

ส่วนผสม 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

ส่วนผสมอาหาร 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		

ส่วนผสมอาหาร BG 11

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

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบอาหาร

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

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตร โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร LB ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร



ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์ TBE 10 เท่า

ส่วนประกอบ

Tris	0.89 โมลาร์
กรดบอริก	0.89 โมลาร์
EDTA	25 มิลลิโมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายน้ำ ปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

บัฟเฟอร์ TE

ส่วนประกอบ

Tris-HCl	1 โมลาร์
EDTA	0.5 โมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

Tracking dye

ส่วนประกอบ

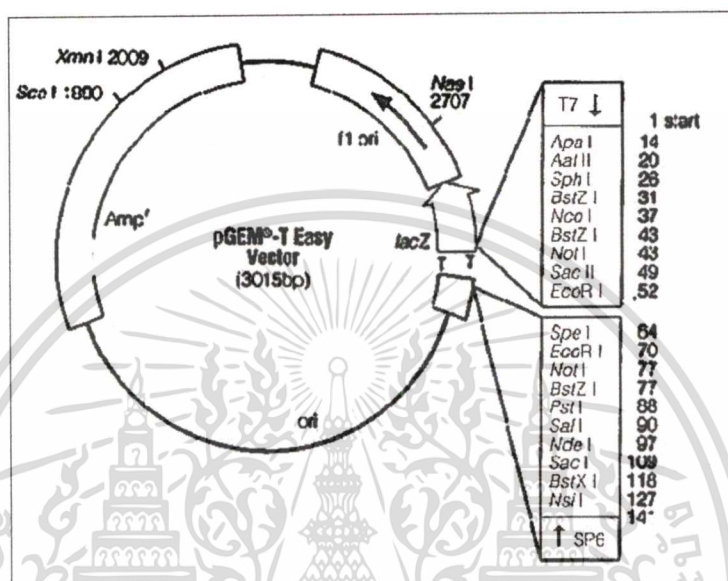
ซูโครส (sucrose) หรือกลีเซอรอล (glycerol)	40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรมอฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

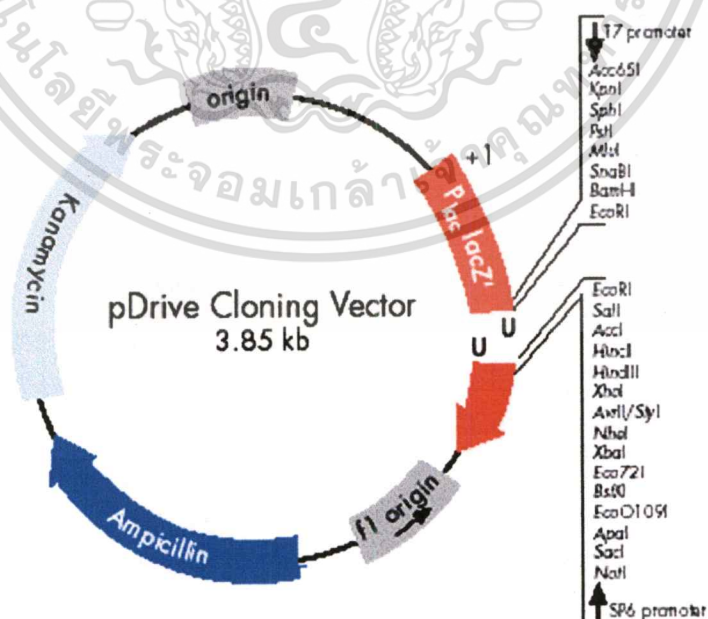
ภาคผนวก ง

เวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

pGEM-T Easy



pDrive



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชมาภรณ์ ธงเพ็ง เกิดวันที่ 4 ตุลาคม 2521 ที่จังหวัด ราชบุรี สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ปีการศึกษา 2543 จนถึงปีการศึกษา 2546



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้