รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) ใน สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

Partial gene sequence determination of ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) in green alga *Tetraspora* sp. CU2551

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP^{+} reductase (*fnr*) ใน สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

Partial gene sequence determination of ferredoxin-NADP^{+} reductase (*fnr*) in green alga *Tetraspora* sp. CU2551

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 146357
รับ เดือน ปี 19 ม.ค. 2560

b. 00266609
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 แหล่งเงินทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัยพร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (FNR) เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวของกับการไหลของอิเล็คตรอนในระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง ในระบบแสงสอง (Photosystem II: PSII) น้ำจะถูกแยกสลายให้กลายเป็นก๊าซออกซิเจน โปรตอน และอิเล็คตรอน อิเล็คตรอนจะถูกส่งต่อผ่านขั้นตอนต่างๆจากระบบแสงสองไปสู่ระบบแสง1ตามลำดับ จนในที่สุดจะเดินทางถึงโปรตีนตัวสุดท้ายที่ชื่อว่าเฟอรีดอกซิน (Ferredoxin: Fd) เฟอรีดอกซินจะส่งอิเล็คตรอนต่อให้กับเอ็นไซม์ FNR ซึ่งจะสร้างโมเลกุลของ NADPH ภายในคลอโรพลาสต์ นอกจากนี้แล้ว เฟอรีดอกซินยังสามารถส่งอิเล็คตรอนให้กับเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพได้ด้วย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการหาลำดับของยีน Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (*fnr*) บางส่วนเพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการศึกษาในอนาคนทางด้าน gene knockdown/ knockout เพื่อเป็นการส่งเสริมการไหลของอิเล็คตรอนไปสู่เอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสได้มากขึ้น การผลิตไฮโดรเจนชีวภาพก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย ผลการทดลองได้แสดงว่าสามารถติดตามยีนบางส่วนของ fnr ของสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้สำเร็จโดยมีความยาว 573 คู่เบส โดยมีความใกล้เคียงกับยีน ferredoxin-NADP+ oxidoreductase (PETH) ของสาหร่ายสีเขียว *Micromonas pusilla* CCMP1545 ซึ่งมีความคล้ายในระดับ 72% identical และค่า E-value เป็น 2e-33 ผลการทดสอบ BlastN BlastP และ Phylogenetic tree ยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ติดตามได้นี้มีความใกล้ชิดกับยีนและโปรตีนของ FNR จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

คำสำคัญ: Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (*fnr*) สาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 การติดตามหายีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Partial gene sequence determination of ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) in green alga *Tetraspora* sp. CU2551

Researcher: Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj **Faculty:** Science **Department:** Chemistry

ABSTRACT

Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (FNR) is an enzyme involving in electron flow during photosynthesis. Starting from Photosystem II (PSII), water was lysed into oxygen, protons, and electrons. Electrons were further flown through the cascade of PSII and PSI, respectively, to the final protein called ferredoxin (Fd). FD protein will pass the electrons to FNR to form NADPH inside the chloroplast. Beside, the Fd protein could also pass the electrons to hydrogenase enzyme to form the hydrogen gas. This study aims to determine the FNR sequence for the future utilization in gene knockdown/knockout study in order to increase the electron yield flow from Fd protein to hydrogenase enzyme. The result reveals the finding of the partial FNR sequence from *Tetraspora* sp. CU2551. A 573 base pairs fragment was successfully amplified and shown the similarity to ferredoxin-NADP+ oxidoreductase (PETH) of green alga *Micromonas pusilla* CCMP1545 with 72% identical and E-value of 2e-33. BlastN BlastP and Phylogenetic tree have confirmed the close relationship of our nucleotide sequence to other FNR genes/proteins.

Key words: Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (*fnr*), green algae, *Tetraspora* sp. CU2551, gene determination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ภายใต้สัญญาเลขที่ 2559-01-05-028

นายเชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญภาพ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม 5
2.1 ไฮโดรเจน 5
2.2 การผลิตไบโอไฮโดรเจน 6
2.3 สาหร่ายสีเขียว 8
2.4 การสังเคราะห์แสง 9
2.5 การทบทวนวรรณกรรม 12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 14
3.2 สารเคมี 14
3.3 วิธีการทดลอง 14
1 ค้นหาข้อมูลดีเอ็นเอของยีนในฐานข้อมูล 14
2 การทำ alignment 15
3 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15
4 การโคลนชิ้นยีนเข้าสู่โคลนนิ่งเวคเตอร์ 16
บทที่ 4 ผลการวิจัย 17
4.1 การสืบค้นข้อมูลดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NCBI 17
4.2 การออกแบบไพรเมอร์จับจำเพาะ 18
4.3 การเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 20
4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 22
4.5 การวิเคราะห์ยืนยันผลลำดับนิวคลีโอไทด์ 23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 27
5.1 สรุปผลการวิจัย 27
5.2 ข้อเสนอแนะ 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง 28
ภาคผนวก 30
ภาคผนวก ก เอกสารการเผยแพร่ผลงาน 30
ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายเงินในโครงการวิจัย 32
ประวัตินักวิจัย 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 ไอโซโทปทั้ง 3 ชนิดของไฮโดรเจน 6

รูปที่ 2.2 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง 7

รูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม 8

รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas* sp. 9

รูปที่ 2.5 แสดงเมแทบอลิซึมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonasre inhardtii* 12

รูปที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin-NADP+ reductase (*fnr*) ของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่ตรวจพบในฐานข้อมูล NCBI 18

รูปที่ 4.2 แสดง DNA alignment เพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมแก่การออกแบบไพรเมอร์ พื้นที่สีเทาใช้ออกแบบไพรเมอร์ Forward primer และ Reverse primer จากบนลงล่าง ตามลำดับ 20

รูปที่ 4.3 ผลผลิต PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis 22

รูปที่ 4.4 นิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin-NADP+ reductase (*fnr*) จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 23

รูปที่ 4.5 ผลการทำ blastN แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกับยีน FNR ของสาหร่าย Micromonas pusilla 24

รูปที่ 4.6 ตัวอย่างการทำ blastP พบความคล้ายกับโปรตีน FNR ของสาหร่ายชนิดอื่น 25

รูปที่ 4.7 แสดง Phylogenetic tree ของโปรตีน FNR ที่แปรรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่าย *Tetraspora* sp. และจากสาหร่ายชนิดอื่น 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุที่ปรากฏณ์อยู่ในพืชชนิดต่างๆ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในยุคปัจจุบัน พลังงานเป็นสิ่งจำเป็นในการดำรงชีวิตประจำวันของประชากรทั่วทั้งโลก พลังงานนี้มีแหล่งที่มาจากหลายทาง เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานนิวเคลียร์ พลังงานฟอสซิล พลังงานลม และอื่นๆ แหล่งพลังงานหลักที่สร้างปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมก็คือ พลังงานจากฟอสซิล การเผาไหม้พลังงานเหล่านี้ล้วนแล้วแต่จะทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide: CO_2) อันเป็นที่ยอมรับในวงกว้างว่าเป็นหนึ่งในก๊าซเรือนกระจกที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก (Green house gas) ซึ่งก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน (Global warming) ดังนั้นการหาแหล่งพลังงานทางเลือก (Alternative energy) อื่นที่จะทำให้อัตราการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกสู่สิ่งแวดล้อมก็จะเป็นประโยชน์ต่อโลกต่อไป

หนึ่งในพลังงานทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างสูงในปัจจุบันนี้คือ ก๊าซไฮโดรเจน เนื่องด้วยเป็นสารที่มีการปลดปล่อยพลังงานต่อมวลสูงที่สุด อีกทั้งกระบวนการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนนี้ก็จะมีเพียงน้ำเท่านั้น ดังนั้นนักวิจัยทั่วโลกจึงได้สนใจการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากหลากหลายช่องทาง เช่น การสลายน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrolysis of water) การบ่มเลี้ยงแบคทีเรียในบางสภาวะ (Fermentation hydrogen production) การเลี้ยงจุลชีพสีเขียวในบางสภาวะ (Photo biohydrogen production)

จุลชีพสีเขียวนี้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้บนพื้นฐานข้อดีหลายประการ เช่น ไม่ต้องใช้พลังงานในการเลี้ยงเนื่องด้วยสามารถใช้พลังงานแสงอาทิตย์ได้ด้วยตัวของสิ่งมีชีวิตเอง หรือจุลชีพสีเขียวเหล่านี้สามารถตรึงเอาก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศลงมาใช้งานในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง อันเป็นการลดก๊าซเรือนกระจกได้อีกทางหนึ่งโดยอ้อม เป็นต้น จุลชีพที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ จะมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของการสร้างก๊าซไฮโดรเจนขึ้นมา โดยจะใช้เพียงโปรตอน (H^+) และอิเล็คตรอน (e^-) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา

เอนไซม์ ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) เป็นเอนไซม์ที่ใช้อิเล็คตรอน (e^-) เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน ดังนั้นหากสามารถลดการทำงานของ FNR ได้ ก็จะสามารถเพิ่มสารตั้งต้นให้กับเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสได้นั่นเอง ในการที่จะลดการทำงานของ FNR ได้นั้น ก็จำเป็นที่จะต้องรู้ลำดับดีเอ็นเอของยีนนี้เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเชิงลึกในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลชีพสีเขียวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. หาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) โดยอาศัยข้อมูลลำดับพันธุกรรมในฐานข้อมูล NCBI เป็นเครื่องมือช่วยในการออกแบบลำดับดีเอ็นเอไพร์เมอร์ชนิดบางตำแหน่งไม่รู้แน่ชัด (degenerate primer)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

เนื่องด้วยสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 ได้มีการแสดงลักษณะบางประการว่าสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ในระดับที่สูงมากกว่าสาหร่ายสีเขียวต้นแบบ *Chlamydomonas reinhardtii* (Maneeruttanarungroj, Lindblad et al. 2010) อย่างไรก็ดี เนื่องด้วยว่างานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาในระดับของการปรับภาวะเชิงกายภาพและเชิงเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้สูงขึ้น อย่างไรก็ดีการปรับปรุงสายพันธุ์นั้นก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการเพิ่มความสามารถในการผลิตก๊าซของสาหร่ายดังกล่าว งานวิจัยครั้งนี้ต้องการหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) เพื่อใช้เป็นจุดตั้งต้นในการศึกษาเชิงลึกในระดับของการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป แต่เนื่องด้วยสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 นี้เป็นสาหร่ายสีเขียวที่พบได้ในธรรมชาติของประเทศไทย ดังนั้นข้อมูลการศึกษาเชิงพันธุศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตนี้จึงยังไม่มีอยู่ในฐานข้อมูลดีเอ็นเอจากที่ใด ทางผู้วิจัยจึงได้มีความพยายามที่จะสืบหาลำดับดีเอ็นเอจากข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีนนี้จากจุลชีพสีเขียวชนิดอื่นๆที่ได้มีการเผยแพร่ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล NCBI โดยจะนำลำดับดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) ของจุลชีพสีเขียวชนิดอื่นมาเรียงลำดับแล้วเปรียบเทียบลำดับอนุรักษ์ (Conservative sequence from alignment) จากนั้นจะทำการออกแบบไพรเมอร์แบบมีความหลากหลายของเบส (degenerate primer) เพื่อทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 จากนั้นจะได้ทำการโคลนยีนนี้เข้าสู่ cloning vector และส่งเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ค้นหาข้อมูลดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จากฐานข้อมูล NCBI

จะค้นหาลำดับดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว จากฐานข้อมูล NCBI ผ่านโปรแกรม blastN เพื่อจะได้มีข้อมูลเชิงสถิติของลำดับดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

2. ทำ alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ แล้วออกแบบไพรเมอร์ชนิดไม่รู้ลำดับบางส่วน (degenerate primer)

นำลำดับดีเอ็นเอของยีนที่ได้จากหลากหลายแหล่งสิ่งมีชีวิต มาเข้าโปรแกรมสำหรับทำ alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ หากมีบางตำแหน่งของเบสที่เอ็นเอที่ไม่เป็นแบบอนุรักษ์ ก็จะอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ชนิดไม่รู้ลำดับบางส่วนแทน เพื่อคาดหวังว่าจะมีไพรเมอร์บางโมเลกุลที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของสาหร่าย *Tetraspora* sp. ได้

3. ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้น ก็นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) โดยจะอาศัยสภาวะมาตรฐานของการทำ PCR ที่จะมีรอบดังต่อไปนี้

1. Denaturation	94 °C	3 นาที
2. Denaturation	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	55 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	60 วินาที
5. repeat 2 - 4 for 29 cycle		
6. Final extension	72 °C	3 นาที

จากนั้นจะทำการแยกผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เพื่อติดตามหาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสมและน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โคลนชิ้นยีนที่ได้เข้าสู่ cloning vector คัดเลือกโคลน แล้วสกัดพลาสมิดเพื่อส่งหาลำดับตัดแถบดีเอ็นเอที่มีความเป็นไปได้ออกจากแผ่นวุ้นอะกาโรสแล้วทำการสกัดเอาชิ้นดีเอ็นเอออกจากเนื้อวุ้น แล้วทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนี้มีความบริสุทธิ์ เพื่อทำการโคลนเข้ากับ T-easy cloning vector เพื่อสะดวกแก่การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการ PCR ขึ้นมาได้ ดีเอ็นเอลูกผสมครั้งนี้จะถูกนำส่ง (transform) เข้าสู่ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนโมเลกุลให้มากต่อไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้นนี้จะถูกสกัดออกจากเซลล์ *E. coli* และทำบริสุทธิ์เพื่อเตรียมนำส่งในการตรวจสอบหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

5. รวมรวม วิเคราะห์ผล และสรุปผล
รวบรวมผลการทดลอง พร้อมทั้งคิดวิเคราะห์วางแผนในการเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

2.1 ไฮโดรเจน

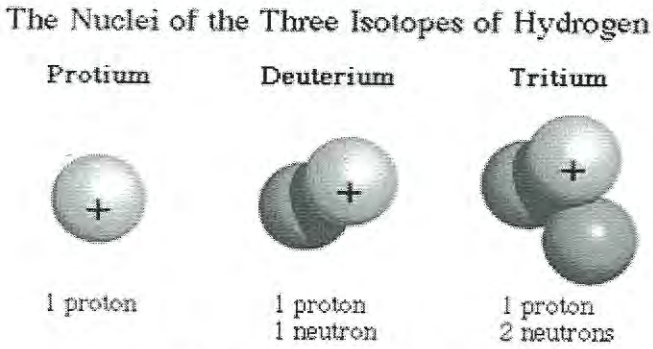
ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำ ที่มีมากที่สุดบนโลก นอกจากนี้ยังเป็นธาตุที่รวมอยู่ในโมเลกุลของสารประกอบอื่นๆ เช่น สารประกอบจำพวกไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปิโตรเลียมที่มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทางเศรษฐกิจของประเทศ คุณสมบัติทั่วไปของไฮโดรเจน คือ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ติดไฟง่าย มีความสะอาดสูง ไม่เป็นพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ประโยชน์ของการนำก๊าซไฮโดรเจนมาใช้งานคือ ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้และให้ความร้อนออกมา หรือใช้ในเซลล์เชื้อเพลิงโดยปฏิกิริยาทางเคมีแล้วเกิดกระแสไฟฟ้าซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในการขับเคลื่อนรถ ผลิตกระแสไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็คทรอนิคส์ขนาดเล็กและอื่นๆ

ไฮโดรเจนเป็นโมเลกุลที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยบรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ หรือใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอนและนิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอกเหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทป (รูปที่ 2.1) ขึ้นกับจำนวนโปรตอนและจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

1. โปรเตียม มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 1.0078
2. ดิวเทอเรียม (Deuterium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 2.0141
3. ตริเที่ยม (Tritium) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวนนิวตรอน 2 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

ลักษณะทั่วไปของไฮโดรเจนทั้ง 3 สถานะ คือ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็งจะไม่มีสี มีโครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตรต่อโมล (Molar Volume) เท่ากับ 2.56 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล ส่วนไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวจะไม่มีสีมีค่าความหนืด (Viscosity) ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ขณะที่ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ไอโซโทป 3 ชนิด ของไฮโดรเจน
ที่มา : http://www.tint.or.th/nkc/nkc5002/nkc5002a.html

2.2 กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก

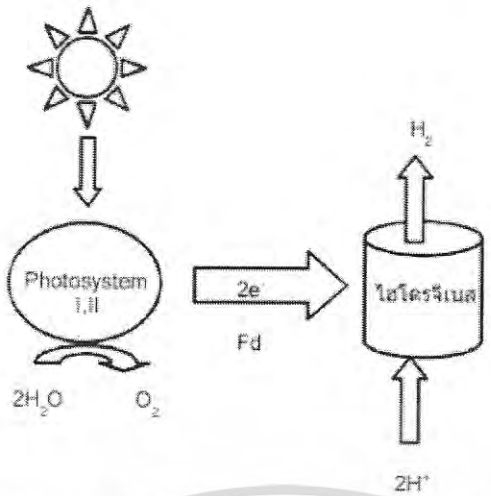
2.2.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (2.1) (Ni et al., 2006)

$$H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 2H_2 + O_2 \qquad (2.1)$$

ระบบแสงที่สอง (photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตรอน (H^+) และอิเล็กตรอน (e^-) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง
ที่มา : home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf

เนื่องจากออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1% เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน (Hallenbeck and Benemann, 2002) สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis et al., 2000) และ *Chlorella fusca* (Winkler et al., 2002)

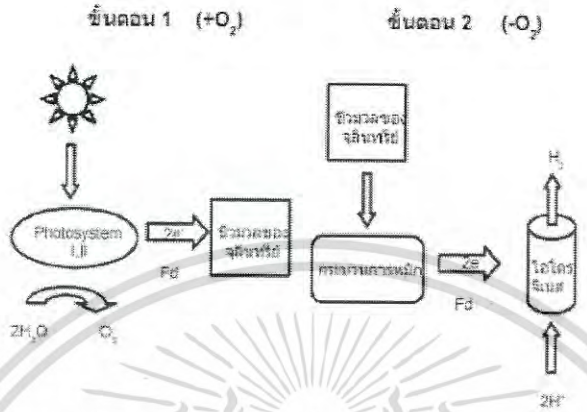
2.2.2 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม (indirect biophotolysis)

กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนที่ใช้แสงด้วยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกัน โดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่ายดังสมการที่ (2.2) และในขั้นตอนที่สอง ชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ (2.3) (Levin et al., 2004)

$$12H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (2.2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \xrightarrow{\text{พลังงานแสง}} 12H_2 + 6CO_2 \qquad (2.3)$$



รูปที่ 2.3 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม
ที่มา : home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553/3.pdf

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina et al., 2002)

2.3 สาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียว (green algae) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอต (eukaryote) อยู่ในดิวิชัน คลอโรไฟตา (chlorophyta) พบทั้งในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำกร่อย และที่ชื้นแฉะ สาหร่ายสีเขียวบางชนิดเป็นอิสระลอยอยู่ตามผิวน้ำ มีรูปร่างลักษณะมากมาย มีทั้ง เซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว หรือรวมกันเป็นกลุ่ม มีทั้งเคลื่อนที่ได้ และเคลื่อนที่ไม่ได้ สาหร่ายสีเขียวสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.1 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว

สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลัมที่ใช้ในการโบกพัดจำนวน 2-4 เส้น ตัวอย่างเช่น *Chlamydomonas* sp. เป็นต้น สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้โดยไม่มีแฟลกเจลลัม เช่น *Chlorella* sp., *Chlorococcoum* sp. เป็นต้น (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas* sp.
ที่มา : https://kingdomprotista00.wordpress.com/algae/species-4-chlamydomonas/

2.3.2 สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์

สาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์มีทั้งชนิดที่ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Ulothrix* sp., *Spirogyra* sp. เป็นต้น และที่อยู่เป็นกลุ่ม ได้แก่ *Volvox* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

สาหร่ายสีเขียวมีรงควัตถุที่พบเช่นเดียวกับรงควัตถุที่พบในพืชชั้นสูง คือ มีคลอโรฟิลล์ เอ และบีแคโรทีน และแซนโทฟิลล์ รงควัตถุทั้งหมดนี้จะรวมกันอยู่ในเม็ดสีหรือพลาสติด (Plastid) ที่อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ โดยอาจจะมี 1 อันหรือบางชนิดมีมากกว่า 1 อัน ซึ่งทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียวมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการรวมกันของแกมีตซึ่งมีทั้งแบบ Isogamy, Anisogamy และ Oogamy ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีทั้งการแบ่งเซลล์ การสร้างสปอร์ และการสร้าง Akinete

2.4 การสังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์แสง คือ กระบวนการซึ่งพืชสังเคราะห์สารอินทรีย์จากสารประกอบอนินทรีย์ โดยมีแสงปรากฏอยู่ด้วย สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและรักษาสภาพเดิมให้คงอยู่ สาหร่าย พืชชั้นสูง และแบคทีเรียบางชนิดสามารถรับพลังงานโดยตรงจากแสงอาทิตย์ และใช้พลังงานนี้ในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่สัตว์ไม่สามารถรับพลังงานโดยตรงจากแสงอาทิตย์ ต้องรับพลังงานโดยการบริโภคพืชและสัตว์อื่น ดังนั้นแหล่งของพลังงานทางเมตาบอลิสม์ในโลกคือ ดวงอาทิตย์และกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงจำเป็นสำหรับชีวิตบนโลก

การที่พืชรับพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์ได้โดยตรงนี้ พืชต้องมีกลไกพิเศษคือ มีรงควัตถุ (Pigment) สีเขียว ซึ่งเรียกว่า คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน Pyrrole 4 วง เรียงติดกัน มี Mg อยู่ตรงกลาง ซึ่งเป็นส่วนที่ดูดแสงเรียกว่า Head ส่วน Tail คือ Phytol ซึ่งคลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ปรากฏอยู่ในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ในการจับพลังงานจากแสง นอกจากคลอโรฟิลล์แล้วรงค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงยังมีคาโรทีนอยด์ (Carotenoids) และไฟโคบิลินส์ (Phycobilins) สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้จะมีรงควัตถุหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด รงควัตถุเหล่านี้แสดงอยู่ในตารางที่ 2.1

คลอโรฟิลล์ เอ นั้นจัดว่าเป็น primary pigment ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงโดยตรง ส่วนรงควัตถุชนิดอื่นๆ ต้องรับแสงแล้วจึงส่งต่อให้คลอโรฟิลล์ เอ เรียกว่าเป็น Accessory pigment ในพืชชั้นสูงทั่วๆ ไป จะมีคลอโรฟิลล์ เอ มากกว่าคลอโรฟิลล์ บี ประมาณ 2-3 เท่า ส่วนแบคทีเรียบางชนิด เช่น Green bacteria และ Purple bacteria จะมีรงควัตถุซึ่งเรียกว่า Bacteriochlorophyll ซึ่งปรากฏอยู่ใน ไธลาคอยด์ การสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียจะต่างจากการสังเคราะห์แสงของพืชชั้นสูง เพราะไม่ได้ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและโปรตอน แต่ใช้ H_2S แทน และเมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์แสงจะไม่ได้ก๊าซออกซิเจนออกมา แต่จะได้สารอื่น เช่น กำมะถันแทน

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุที่ปรากฏอยู่ในพืชชนิดต่าง ๆ

ชนิดของรงควัตถุ	**ช่วงแสงที่ดูดกลืนแสง (nm)**	**ชนิดของพืช**
คลอโรฟิลล์		
คลอโรฟิลล์ เอ	420, 660	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่าย
คลอโรฟิลล์ บี	435, 643	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว
คลอโรฟิลล์ ซี	445, 625	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
คลอโรฟิลล์ ดี	450, 690	สาหร่ายสีแดง
คาร์โรทีนอยด์		
เบตา คาร์โรทีน	425, 450, 480	พืชชั้นสูงและสาหร่ายส่วนใหญ่
แอลฟา คาร์โรทีน	420, 440, 470	พืชส่วนใหญ่และสาหร่ายบางชนิด
ลูตีออล (Luteol)	425, 445, 475	สาหร่ายสีเขียว สีแดงและพืชชั้นสูง
ไวโอลาแซนธอล (Violaxanthol)	425, 450, 475	พืชชั้นสูง
แกมมา คาร์โรทีน	-	แบคทีเรีย
ฟูโคแซนธอล (Fucoxanthol)	425, 450, 475	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
ไฟโคบิลินส์		
ไฟโคอีรีธรินส์ (Phycoerythrins)	490, 546, 576	สาหร่ายสีแดง และสาหร่ายสีน้ำเงิน
ไฟโคไซยานินส์ (Phycocyanins)	618	สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว และสาหร่ายสีแดงบางชนิด

ที่มา : http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY4_photosyn.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รงควัตถุ จะกระจายอยู่ในส่วนของลาเมลลาของคลอโรพลาสต์ นอกจากนั้นในคลอโรพลาสต์ยังมีโปรตีน ไขมัน และควิโนน อีกหลายชนิดกระจายตัวอยู่ เช่น ไซโตโครม บี 6 (Cytochrome b6) และ ไซโตโครม เอฟ (Cytochrome f) พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทองแดงประกอบอยู่ด้วยเฟอร์ริดอกซิน (Ferredoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กประกอบอยู่ด้วยและเป็น non heme โลหะ พบในลาเมลลา คือ สังกะสี เหล็ก และแมกนีเซียม

การสังเคราะห์แสง เป็นกระบวนการซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสองกระบวนการใหญ่ๆ คือ

2.4.1 การไหลของอิเล็กตรอน

การไหลของอิเล็กตรอน หรือ Light Reaction ซึ่งแบ่งเป็น

1. Hill Reaction ซึ่งคือ การแตกตัวของน้ำโดยพลังงานแสง พบโดย Robert Hill เมื่อน้ำแตกตัวแล้วจะให้อิเล็กตรอนออกมา ซึ่งตามธรรมชาติของการสังเคราะห์แสงตัวรับอิเล็กตรอนคือ $NADP^+$ ทำให้กลายเป็น NADPH ซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพในการรีดิวซ์สารอื่นสูงมาก และจะนำไปใช้รีดิวซ์ CO_2 ในกระบวนการต่อไป

การที่น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจนได้นี้ เกิดโดยพลังงานแสงที่คลอโรฟิลล์ดูดแล้วส่งไปช่วยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่แยกโมเลกุลของน้ำ (Water Splitting enzyme) ให้เกิดปฏิกิริยาได้อิเล็กตรอนและก๊าซออกซิเจนนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแตกตัวของน้ำคือโปรตอน ซึ่งจะใช้เป็นตัวพาอิเล็กตรอนและนำไปสร้างสารให้พลังงานสูง NADPH นอกจากนั้นอิเล็กตรอนยังถูกส่งเข้าไปทดแทนอิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์ซึ่งสูญเสียไปในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนดังจะได้กล่าวถึงต่อไป

2. Photophosphorylation คือ การสังเคราะห์สารเคมีที่ให้พลังงานสูง ATP จากการไหลของอิเล็กตรอนจากน้ำไปสู่ $NADP^+$ ซึ่ง $NADP^+$ ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนได้โดยตรง ต้องไหลผ่านสารอื่นๆ หลายชนิด ในระหว่างการไหลนี้ทำให้เกิด ATP ขึ้นมา

2.4.2 Enzymatic Reaction

เกิดในสโตรมาเป็นกระบวนการที่เปลี่ยน CO_2 ให้เป็นน้ำตาลสามารถเกิดได้ในที่มืดและที่มีแสง เนื่องจากแสงมีลักษณะเป็นคลื่นและมีพลังงาน แสงจะมาในลักษณะเป็นควอนตา (Quanta) หรือโฟตอน (Photon) ซึ่งเป็นพลังงาน พลังงานแต่ละโฟตอนจะเป็นสัดส่วนผกผันกับความยาวคลื่นแสง ดังนั้นแสงสีม่วงและน้ำเงิน จะมีพลังงานมากกว่าแสงสีแดงและสีส้ม

หลักพื้นฐานของการดูดซับแสง เรียกว่า Einstein's Law ซึ่งกล่าวว่า รงควัตถุใดๆ สามารถดูดซับแสงได้ทีละหนึ่งโฟตอน และหนึ่งโฟตอนนี้จะทำให้เกิดการ Excitation ของอิเล็กตรอนหนึ่งอิเล็กตรอนซึ่งอิเล็กตรอนที่หมุนอยู่รอบๆ นิวเคลียสในสภาพ Ground State นั่นเอง อิเล็กตรอนในสภาพ Excitation นี้

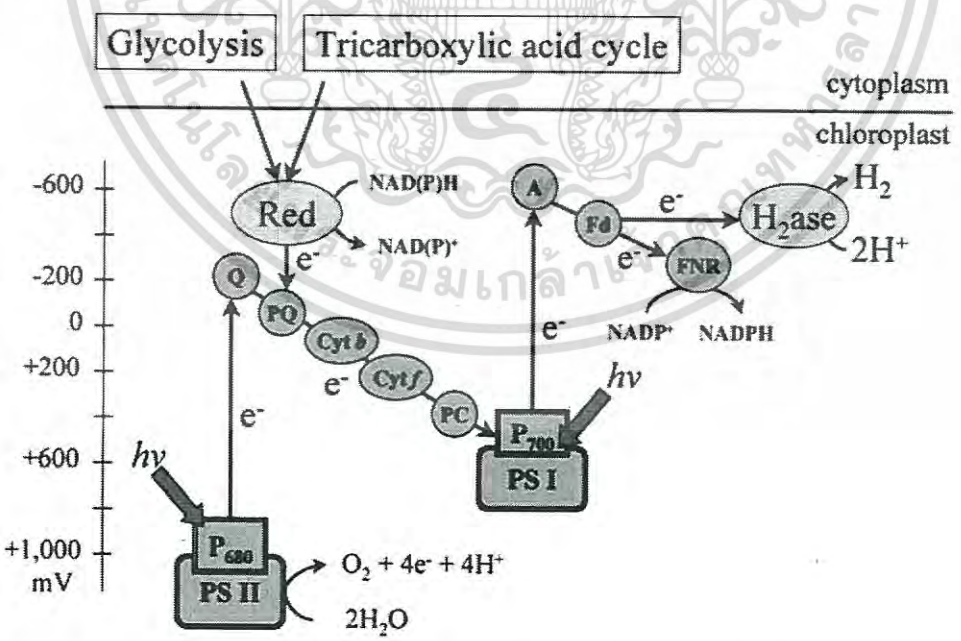
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถหลุดออกไปจากนิวเคลียสได้ รงควัตถุที่มีอิเล็กตรอนในสภาพ Excitation นั้นถือว่าอยู่ในสภาพ Excited State

คลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ อาจจะคงอยู่ในสภาพ Excited State เป็นระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 10-9 ของหนึ่งวินาที พลังงานที่ได้จากการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน อาจจะเสียไปในรูปของความร้อนเมื่ออิเล็กตรอนกลับเข้าสู่ Ground State ซึ่งเกิดในกรณีที่คลอโรฟิลล์ได้รับแสงสีน้ำเงิน ดังนั้นแสงสีน้ำเงินจึงใช้ในการสังเคราะห์แสงไม่ได้ ดังเหตุผลข้างต้น แต่ถ้าคลอโรฟิลล์ได้รับแสงสีแดง จะทำให้คลอโรฟิลล์ อยู่ในสภาพ Excited แล้วอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปถึงจุดศูนย์กลางของปฏิกิริยาซึ่งจุดศูนย์กลางของปฏิกิริยานี้อยู่ในไธลาคอยส์ (Thylakoids) ของคลอโรพลาสต์มีรงควัตถุที่เป็นคลอโรฟิลล์ เอ รวมกับโปรตีนบางชนิด แสงสีเขียวนั้นคลอโรฟิลล์ไม่ได้ดูดซับเอาไว้จะสะท้อนออกมาหรือผ่านไป ส่วน คาร์โรทีนอยด์จะดูดซับแสงสีน้ำเงินและม่วงและสะท้อนแสงสีเหลืองและแดงทำให้เห็นเป็นสีเหลือง

2.5 การทบทวนวรรณกรรม

จุลชีพสีเขียวที่มีเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส จะมีการเร่งปฏิกิริยา $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ ซึ่งในหลายงานวิจัยได้แสดงว่ามีเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว (Wunschiers, Heide et al. 1999; Winkler, Heil et al. 2002; Yan, Chen et al. 2008; Fan, Chen et al. 2011) ในปี 2001 Anastasios Melis และ Thomas Happe ได้แสดงเส้นทางเมแทบอลิซึมของก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ไว้ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงเมแทบอลิซึมของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรูปที่ 2.5 นั้นจะเห็นได้ชัดว่า อิเล็คตรอนที่มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จะถูกเร่งระดับพลังงานแล้วส่งต่อไปยังโปรตีนหลายชนิด จนไปถึงตัวสุดท้าย นั่นคือ Fd (ferredixin) ซึ่ง Fd นี้จะส่งอิเล็คตรอนต่อไปให้ทั้ง FNR (ferredoxin-$NADP^+$ reductase) และ H_2ase (Hydrogenase enzyme) ดังนั้น ระดับของสารตั้งต้น (อิเล็คตรอน) นี้จะถูกแย่งใช้ทั้งสองเอนไซม์ได้แก่ FNR และ H_2ase หากสามารถลดระดับของ FNR ได้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสก็จะมีสารตั้งต้นที่สูงขึ้น ส่งผลให้มีระดับของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงขึ้นเช่นกัน ในปี 2013 Sun และคณะได้แสดงให้เห็นว่า การลดระดับของ FNR นั้น จะส่งผลให้ *Chlamydomonas reinhardtii* มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงขึ้นจริง (Sun, Chen et al. 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Microcentrifuge tube
2. Centrifuge
3. Autoclave
4. Spectrophotometer
5. Agarose gel electrophoresis chamber
6. Sequencer
7. Gel doc
8. Incubator shaker

3.2 สารเคมี

1. DNA primer
2. Pfu polymerase
3. Agarose
4. Tris
5. Acetic acid
6. EDTA
7. Ethidium bromide
8. pET22b(+) vector
9. T4 DNA ligase
10. Agar
11. Peptone
12. Yeast extract
13. Sodium chloride
14. Ampicillin

3.3 วิธีการทดลอง

1. ค้นหาข้อมูลดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จากฐานข้อมูล NCBI จะค้นหาลำดับดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว จากฐานข้อมูล NCBI ผ่านโปรแกรม blastN เพื่อจะได้มีข้อมูลเชิงสถิติของลำดับดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำ alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ แล้วออกแบบไพรเมอร์ชนิดไม่รู้ลำดับบางส่วน (degenerate primer)

นำลำดับดีเอ็นเอของยีนที่ได้จากหลากหลายแหล่งสิ่งมีชีวิต มาเข้าโปรแกรมสำหรับทำ alignment เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ หากมีบางตำแหน่งของเบสที่เอ็นเอที่ไม่เป็นแบบอนุรักษ์ ก็จะอาศัยการออกแบบไพรเมอร์ชนิดไม่รู้ลำดับบางส่วนแทน เพื่อคาดหวังว่าจะมีไพรเมอร์บางโมเลกุลที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของสาหร่าย *Tetraspora* sp. ได้

3. ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอจากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้น ก็นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) ไพร โดยที่ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

10X Pfu buffer	5	ul
10 mM mixed dNTP	1	ul
10 uM Forward primer	3	ul
10 uM Reverse primer	3	ul
gDNA	5	ng
Pfu polymerase	2	unit
Water	up to 50 ul	

อาศัยสภาวะมาตรฐานของการทำ PCR ที่จะมีรอบดังต่อไปนี้

1. Denaturation	94 °C	3 นาที
2. Denaturation	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	55 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	60 วินาที
5. repeat 2 - 4 for 29 cycle		
6. Final extension	72 °C	3 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นจะทำการแยกผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เพื่อติดตามหาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสมและน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) จากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp.

4. โคลนชิ้นยีนที่ได้เข้าสู่ cloning vector คัดเลือกโคลน แล้วสกัดพลาสมิดเพื่อส่งหาลำดับ ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีความเป็นไปได้ออกจากแผ่นวุ้นอะกาโรสแล้วทำการสกัดเอาชิ้นดีเอ็นเอออกจากเนื้อวุ้น แล้วทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนี้มีความบริสุทธิ์ เพื่อทำการโคลนเข้ากับ T-easy cloning vector เพื่อสะดวกแก่การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการ PCR ขึ้นมาได้ ดีเอ็นเอลูกผสมครั้งนี้จะถูกนำส่ง (transform) เข้าสู่ *E. coli* DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนโมเลกุลให้มากต่อไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้นนี้จะถูกสกัดออกจากเซลล์ *E. coli* และทำบริสุทธิ์เพื่อเตรียมนำส่งในการตรวจสอบหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การสืบค้นข้อมูลดีเอนเอจากฐานข้อมูล NCBI

ได้มีการค้นคว้าหาลำดับเบสของยีนสำหรับสร้างเอนไซม์ ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) ของสาหร่ายสาหร่ายสีเขียวจากเวบไซต์ฐานข้อมูลยีนจากฐานข้อมูลNCBI พบว่ามียีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับ ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จาก 3 สิ่งมีชีวิต ได้แก่ *Chlamydomonas reinhardtii* mRNA (Acc. No. U10545.1) *Guillardia theta* partial mRNA (Acc. No. DQ383763.1) และ *Volvox carteri* mRNA (Acc. No. U22328.1) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ (fasta) ของยีนทั้งสาม ได้แสดงในรูปที่ 4.1

> *Chlamydomonas reinhardtii* mRNA (Acc. No. U10545.1)

```
cacatcatacactgtcaaaacagaccgggagtgcggcccgcgggggaagcggaaccggcaccgtctctcggtgttctcttc
gtcttctcaaaatggcatctctacgcaaacccagcaaccatgcagaccgtgcgtgctcccgccgcctccgcgttgccaccc
gcgtggctggccgccgcatgtgccgcccgtggcggccaccaaggcttcgaccgcggtgaccaccgatatgtccaagcgca
ccgtgcccaccaagctggaggagggtgagatgcccctgaacacctactcgaacaaggctcccttcaaggccaaggttcgct
cggtggagaagatcaccggccccaaggccactggtgagacttgccacatcatcatcgagaccgagggcaagatccccttct
gggagggccagtcctacggtgtgatcccccgggcaccaagatcaactccaagggcaaggaggtgcccacggcacgcctct
actccatcgcctcgtcccgctacggcgatgacggcgacggccagaccgcctcgctgtgcgtgccgcgccgtgtacgtgg
accccgagaccggcaaggaggacccgccaagaagggcctgtgctccaacttcctgtgcgacgccacccccggcaccgaga
tctcgatgaccggcccccaccggcaaggtgctgctgctgcccgctgacgccaacgcccctctgatctgcgtggccaccggca
ccggcattgccccttccgctccttctggcgccgctgcttcattgagaacgtgcccagctacaagttcaccggcctgttct
ggctgttcatgggcgttggcaacagcgacgccaagctgtacgacgaggagctgcaggccatcgccaaggcctaccccggcc
agttccgcctggactacgccctgtcgcgcgagcagaacaaccgcaagggcggcaagatgtacatccaggacaaggtggagg
agtacgccgacgagatcttcgacctgctggacaacggcgcgcacatgtacttctgcggcctgaagggcatgatgcccggca
tccaggacatgcttgagcgcgtggccaaggagaagggcctgaactacgaggagtgggttgagggcctgaagcacaagaacc
agtggcacgtggaggtctactaagcggcctgcgctctgccctctccgcacacgtcgagtgggcgggagcgagttgtgtag
cggtggcggcttgggtagcagcacggccacggcgtgctccttgagcgggctcgagcgtaacagcggcgaaagcagcagcga
ggagcttctgctctctcggacgaggcaaggggggcgctggcggtggcgggacgagaacgcggcgggcagcgggccgggcggg
cggcatgcctcgccggaaagcaaaggcgcgcgccggccgcggcactagcatgtctggagcagtctagttgcctcgctggcg
ttgatgtctagagcccggaaggtccgttccgaatacctgcgctgcgcagagcgcgtgtcaggatgaaggcgggcctcttgt
gtgtgtatgcagggttgggtttgcgg
```

> *Guillardia theta* partial mRNA (Acc. No. DQ383763.1)

```
gcgctgcaggcgcctacgcgttcacaggacctgctcctgtcgcactccgccatggacgtgctggagctctctcccagcgcc
tctccatggctgcgaccatccccaaggttcccttcagcggcgtcagccccaccggaccttcgggccccaccctccctgctc
ccggggaggacctcgagttcctcgaggccaagccttactgggaccagtccggagtccaggtgaacatcgccaagcagaaga
acccccctcatcggcaagatcatctccgtccagcgcatcgttggccccaactctcctggagagacctgcaacatcatcatcg
atcatcagggcaagctcccctactgggagggccagtcctacggtgtcgtcccccccggcatcgacccgaagaagaacaagc
cctacggtgttcgcctctattctatcgcctccacccgctacggagacgacaagaccggcaagaccaccaccctctgcgttc
gccgtgccacctactggtgccctgagctcaaggctgaggaccccgccaagaagggtgtctgctccaactacctctgcgact
ccaagcccggtgatgagatctccctcaccggaccttccggcaaggtcatgctcatgcccgaggacgaccccaacatgacct
acatcatggtcgccaccggaactggtatcgctcccttccgcagcttcctccgccgcctcttcggcgagggcaaccctgctg
gcaagaacttcaagggtctcgcctggctcttcctcggagttgccaacaaggactccctcctctacgacgaggagttccagg
tttacctccgccagaaccctgacaagatgcgcctcgactacgcgctctcccgtgagggacctctcaacaagaagggcggca
agatgtacatccaggacaaggtcgaggagtacgctgacgaggtcttcgatgccctcgacaagggagcccacatctacttct
gcggcttgaagggcatgatgcctggaatccaggacatgctcaggggagtgtgcgagtccaagggcctcaacttcgaggagt
acctcgagggcttgaagaagaagggccagtggcacgtcgaggtttattaagctgttcatgcatgaatgaaagactccaaaa
tgcaaaaaaaaaaaaaa
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

146357

> *Volvox carteri* mRNA (Acc. No. U22328.1)

```
cacagcctaaccgagttacatgcagaccatgcgtgctcccgctgcccagggcgctgccacccgcgtggccagccgccgcgt
gttccgcccggtggcgtccaccaaggtctcgacggccgtgaccaccgatgtgtccaagcggactgtgcccaccgctctgga
ggagggcgagatgccactgaacacttactcgaacaaggctcccttcaaggccaagattcgctctgttgagaccatcaccgg
tcctaaggccactggtgagacctgccacatcatcatcgagaccgagggcaagatcccgttctgggagggtcagtcctacgg
tgtgatcccgccgggcaccaagattaacagcaagggtaaggaggtgccgcacggcacccgtctgtactccattgcctcgtc
ccgctacggtgacgacttcgacggcaagactgcctcgctgtgcgtccgccgtgccgtgtacgtggacccggagaccggcaa
ggaggaccctgccaagaagggtatctgctccaactacctgtgcgatgctacccccggcactgagatcgtcatgaccggccc
gaccggcaaggtgctgcttctgccggctgacgccaacgccccgctcatctgcgtggccactggcactggcattgctccctt
ccgctccttctggcgccgttgcttcatggagaacgtgccgagctacaagttcaccggcctgttctggctgttcatgggtgt
ggccaactcggacgccaagctctacgacgaggagctgcaggctctggccaaggcctaccccagccagttccgcctggacta
tgctctgtcgcgtgagcagaagaaccgcaagggcggcaagatgtacattcaggacaaggtggaggagtactctgacgagat
cttcgacctgctggacaacggcgctcacatgtacttctgcggcctgaagggcatgatgcctggcattcaggagatgcttga
gcgcgtggccaagtccaagggcctgaactacgaggagtgggttgagggcctcaagcaccgcaaccagtggcacgtcgaggt
ctactaagcggcttcctcctcggggctgcaatgggtgctgtgatgtggatctggggctcgtctggctcttgcgccatcttg
cagctttccgcgtgtgtcgttcggaccggacgacgagggtggcgactttcagctggtttgctacatgcgcctaacttgctg
caagtggagccgtgatgggtggattccatgtacgctagtaggaccggaccgggctcgtacccgaagcgttggctgcccctg
ccgccatggacggctgtgcggggagttgattgctcaattttggttgttgagcgcactttcgccatttacttgttttcccaa
tgcggtggtcatctggtgtgtgtgtctgtacttgattatacaccccgcgccgacctgcgtgagtagagcggattgagcgag
agtgagaacgtgcgagtggggcggaaggggacgttgtagatgttgagccgccggagcaggcttgcagatggcccataactg
accaccaaacttgtgctatagtttgtaatggaaggaatggcgactgcgcagctttcccctctccgctcccaagcggatgaa
gtgattagtgggcatgatgtgttggttcatacgcatgaatctgtaaatatctgggaagatt
```

รูปที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) ของสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ที่ตรวจพบในฐานข้อมูล NCBI

4.2 การออกแบบไพร์เมอร์จับจำเพาะ

เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่จะโคลนเข้ากับระบบเพิ่มจำนวนชิ้นยีน (cloning vector) จึงต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอนเอที่ต้องการผ่านวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) อย่างไรก็ดี ชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณผ่านการ PCR นั้น จะต้องถูกเชื่อมต่อเข้ากับดีเอนเอของระบบเพิ่มจำนวนชิ้นยีน (pGEM-T easy vector) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามเส้นจึงได้ถูกนำมา align เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ผลเป็นไปดังรูปที่ 4.2 พร้อมแสดงบริเวณที่จะออกแบบไพร์เมอร์ทั้ง Forward primer และ Reverse primer

```
CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

U10545.1_Chlamydomonas      CACATCATACACTGTCAAAACAGACCGGGAGTGCGGCCCGCGGGGGAAGC 50
U22328.1_Volvox             ----------------------------------------------------
DQ383763.1_Guillardia       ----------------------------------------------------

U10545.1_Chlamydomonas      GGAACCGGCACCGTCTCTCGGTGTTCTCTTCGTCTTCTCAAAATGGCATC 100
U22328.1_Volvox             ----------------------------------------------------
DQ383763.1_Guillardia       ----------GCGCTGCAGGCGCCTACGCGTTCACAGGAC--CTGC 34

U10545.1_Chlamydomonas      TCTACGCAAACCCAGCAACCATGCAGACCGTGCGTGCTCCCGCCGCCTC- 149
U22328.1_Volvox             CACAGCCTAACCGAGTTAC-ATGCAGACCATGCGTGCTCCCGCTGCCCA- 48
DQ383763.1_Guillardia       TCCTGTCGCACTCCGCCATGGACGTGCTGGAGCTCTCTCCCAGCGCCTCT 84
                                 *  **  *  *       **     *****  ***
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
U10545.1_Chlamydomonas      ----CG-CGTTGCCACCCGCGTGGCTGGCCGCCGCATGTGCCGCCCCGTG 194
U22328.1_Volvox             ----GGGCGCTGCCACCCGCGTGGCCAGCCGCCGCGTGTTCCGCCCGGTG 94
DQ383763.1_Guillardia       CCATGGCTGCGACCATCCCCAAGGTTCCCTTCAGCGGCGTCAGCCCCACC 134
                                 *  *   *** ** *  **    *  * **     * ****

U10545.1_Chlamydomonas      GCGGCCACCAAGGCTTCGACCGCGGTGACCACCGATATGTCCAAGCGCAC 244
U22328.1_Volvox             GCGTCCACCAAGGTCTCGACGGCCGTGACCACCGATGTGTCCAAGCGGAC 144
DQ383763.1_Guillardia       GGACCTTCGGGCCCCACCCTCCCTGCTCCCGGGGAGGACCTCGAGTTCCT 184
                            *   *  *        *     * *   **   **      * **

U10545.1_Chlamydomonas      CGTGCCCA--CCAAGCTGGAGG-AGGGTGAGATGCCCCTGAACACCTACT 291
U22328.1_Volvox             TGTGCCCA--CCGCTCTGGAGG-AGGGCGAGATGCCACTGAACACTTACT 191
DQ383763.1_Guillardia       CGAGGCCAAGCCTTACTGGGACCAGTCCGGAGTCCAGGTGAACATCGCCA 234
                             * * ***  **   ****    **   *   * *   ******    *

U10545.1_Chlamydomonas      CGAACAAGGCTCCCTTCAAGGCCAAGGTTCGCTCGGTGGAGAAGATCACC 341
U22328.1_Volvox             CGAACAAGGCTCCCTTCAAGGCCAAGATTCGCTCTGTTGAGACCATCACC 241
DQ383763.1_Guillardia       AGCAGAAGAACCCCCTCATCGGCAAGATCATCTCCGTCCAGCGCATCGTT 284
                             * * ***   *** ***  * **** *   *** **  **   ***

U10545.1_Chlamydomonas      GGCCCCAAGGCCACTGGTGAGACTTGCCACATCATCATCGAGACCGAGGG 391
U22328.1_Volvox             GGTCCTAAGGCCACTGGTGAGACCTGCCACATCATCATCGAGACCGAGGG 291
DQ383763.1_Guillardia       GGCCCCAACTCTCCTGGAGAGACCTGCAACATCATCATCGATCATCAGGG 334
                            ** ** **  *  **** ***** *** *************     ****

U10545.1_Chlamydomonas      CAAGATCCCCTTCTGGGAGGGCCAGTCCTACGGTGTGATCCCCCCGGGCA 441
U22328.1_Volvox             CAAGATCCCGTTCTGGGAGGGTCAGTCCTACGGTGTGATCCCGCCGGGCA 341
DQ383763.1_Guillardia       CAAGCTCCCCTACTGGGAGGGCCAGTCCTACGGTGTCGTCCCCCCCGGCA 384
                            **** **** * ********* **************  **** ** ****

U10545.1_Chlamydomonas      CCAAGATCAACTCCAAGGGCAAGGAGGTGCC-CACGGCAC--GCCTCTAC 488
U22328.1_Volvox             CCAAGATTAACAGCAAGGGTAAGGAGGTGCCGCACGGCACCCGTCTGTAC 391
DQ383763.1_Guillardia       ------TCGACCCGAAG---AAGAACAAGCCCTACGGTGTTCGCCTCTAT 425
                                 *  **   ***   *** *   ***  ****     * ** **

U10545.1_Chlamydomonas      TCCATCGCCTCGTCCCGCTACGGCGATGACGGCGACGGCCAGACCGCCTC 538
U22328.1_Volvox             TCCATTGCCTCGTCCCGCTACGGTGACGACTTCGACGGCAAGACTGCCTC 441
DQ383763.1_Guillardia       TCTATCGCCTCCACCCGCTACGGAGACGACAAGACCGGCAAGACCACCAC 475
                            ** ** *****  ********** ** ***     **** ****  ** *

U10545.1_Chlamydomonas      GCTGTGCGTGCGCCGCGCCGTGTACGTGGACCCCGAGACCGGCAAGGAGG 588
U22328.1_Volvox             GCTGTGCGTCCGCCGTGCCGTGTACGTGGACCCGGAGACCGGCAAGGAGG 491
DQ383763.1_Guillardia       CCTCTGCGTTCGCCGTGCCACCTACTGGTGCCCTGAGCTCAAGGCTGAGG 525
                             ** ***** ***** ***   ***  *  *** ***  *      ****

U10545.1_Chlamydomonas      ACCCCGCCAAGAAGGGCCTGTGCTCCAACTTCCTGTGCGACGCCACCCCC 638
U22328.1_Volvox             ACCCTGCCAAGAAGGGTATCTGCTCCAACTACCTGTGCGATGCTACCCCC 541
DQ383763.1_Guillardia       ACCCCGCCAAGAAGGGTGTCTGCTCCAACTACCTCTGCGACTCCAAGCCC 575
                            **** ***********  * ********** *** *****  * *  ***

U10545.1_Chlamydomonas      GGCACCGAGATCTCGATGACCGGCCCCACCGGCAAGGTGCTGCTGCTGCC 688
U22328.1_Volvox             GGCACTGAGATCGTCATGACCGGCCCGACCGGCAAGGTGCTGCTTCTGCC 591
DQ383763.1_Guillardia       GGTGATGAGATCTCCCTCACCGGACCTTCCGGCAAGGTCATGCTCATGCC 625
                            **   ******   * ***** **  **********  ****  ****

U10545.1_Chlamydomonas      CGCTGACG---CCAACGCCCCTCTGATCTGCGTGGCCACCGGCACCGGCA 735
U22328.1_Volvox             GGCTGACG---CCAACGCCCCGCTCATCTGCGTGGCCACTGGCACTGGCA 638
DQ383763.1_Guillardia       CGAGGACGACCCCAACATGACCTACATCATGGTCGCCACCGGAACTGGTA 675
                             *  ****   *****    *    ***   ** ***** ** ** ** *

U10545.1_Chlamydomonas      TTGCCCCCTTCCGCTCCTTCTGGCGCCGCTGCTTCATTGAGAACGTGCCC 785
U22328.1_Volvox             TTGCTCCCTTCCGCTCCTTCTGGCGCCGTTGCTTCATGGAGAACGTGCCG 688
DQ383763.1_Guillardia       TCGCTCCCTTCCGCAGCTTCCTCCGCCGCCTCTTCGGCGAGGGCAACCCT 725
                            * ** *********  ****   *****   ****   ***  *   **

U10545.1_Chlamydomonas      AGCTACAAG---TTCACCGGCCTGTTCTGGCTGTTCATGGGCGTTGGCAA 832
U22328.1_Volvox             AGCTACAAG---TTCACCGGCCTGTTCTGGCTGTTCATGGGTGTGGCCAA 735
DQ383763.1_Guillardia       GCTGGCAAGAACTTCAAGGGTCTCGCCTGGCTCTTCCTCGGAGTTGCCAA 775
                                 ****   ****  ** **   ****** *** * ** ** * ***

U10545.1_Chlamydomonas      CAGCGACGCCAAGCTGTACGACGAGGAGCTGCAGGCCATCGCCAAGGCCT 882
U22328.1_Volvox             CTCGGACGCCAAGCTCTACGACGAGGAGCTGCAGGCTCTGGCCAAGGCCT 785
DQ383763.1_Guillardia       CAAGGACTCCCTCCTCTACGACGAGGAGTTCCAGGTTTACCTCCGCCAGA 825
                            *   *** **   ** ************ * ****       *

U10545.1_Chlamydomonas      ACCCCGGCCAGTTCCGCCTGGACTACGCCCTGTCGCGCGAGCAGAA---C 929
U22328.1_Volvox             ACCCCAGCCAGTTCCGCCTGGACTATGCTCTGTCGCGTGAGCAGAA---G 832
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
DQ383763.1_Guillardia       ACCCTGACAAGATGCGCCTCGACTACGCGCTCTCCCGTGAGGGACCTCTC 875
                            ****   * ** * ***** ***** ** ** ** ** ***

U10545.1_Chlamydomonas      AACCGCAAGGGCGGCAAGATGTACATCCAGGACAAGGTGGAGGAGTACGC 979
U22328.1_Volvox             AACCGCAAGGGCGGCAAGATGTACATTCAGGACAAGGTGGAGGAGTACTC 882
DQ383763.1_Guillardia       AACAAGAAGGGCGGCAAGATGTACATCCAGGACAAGGTCGAGGAGTACGC 925
                            ***   ******************** ********** ********* *

U10545.1_Chlamydomonas      CGACGAGATCTTCGACCTGCTGGACAACGGCGCGCACATGTACTTCTGCG 1029
U22328.1_Volvox             TGACGAGATCTTCGACCTGCTGGACAACGGCGCTCACATGTACTTCTGCG 932
DQ383763.1_Guillardia       TGACGAGGTCTTCGATGCCCTCGACAAGGGAGCCCACATCTACTTCTGCG 975
                             ****** *******    ** ***** ** ** ***** **********

U10545.1_Chlamydomonas      GCCTGAAGGGCATGATGCCCGGCATCCAGGACATGCTTGAGCGCGTGGCC 1079
U22328.1_Volvox             GCCTGAAGGGCATGATGCCTGGCATTCAGGAGATGCTTGAGCGCGTGGCC 982
DQ383763.1_Guillardia       GCTTGAAGGGCATGATGCCTGGAATCCAGGACATGCTCAGGGGAGTGTGC 1025
                            ** ***************** ** ** ***** *****   * * ***  *

U10545.1_Chlamydomonas      AAGGAGAAGGGCCTGAACTACGAGGAGTGGGTTGAGGGCCTGAAGCACAA 1129
U22328.1_Volvox             AAGTCCAAGGGCCTGAACTACGAGGAGTGGGTTGAGGGCCTCAAGCACCG 1032
DQ383763.1_Guillardia       GAGTCCAAGGGCCTCAACTTCGAGGAGTACCTCGAGGGCTTGAAGAAGAA 1075
                             **   ******** **** ********   * ****** * *** *

U10545.1_Chlamydomonas      GAACCAGTGGCACGTGGAGGTCTACTAAGCGGCCTGCGCTCTGCCCTCTC 1179
U22328.1_Volvox             CAACCAGTGGCACGTCGAGGTCTACTAAGCGGCTTCCTCCTCGGGG-CTG 1081
DQ383763.1_Guillardia       GGGCCAGTGGCACGTCGAGGTTTATTAAGCTGTTCATGCATGAATG---- 1121
                              ************ ***** ** ***** *      *

U10545.1_Chlamydomonas      CCGCACACGTCGAG-TGGGCGGGAGCGAGTTGTGTAGCGGTGGCGGC-TT 1227
U22328.1_Volvox             CAATGGGTGCTGTGATGTGGATCTGGGGCTCGTCTGGCTCTTGCGCCATC 1131
DQ383763.1_Guillardia       --AAAGACTCCAAAATGCAAAAAAAAAAAAAA----------------- 1151
```

รูปที่ 4.2 แสดงDNA alignment เพื่อหาบริเวณที่เหมาะสมแก่การออกแบบไพรเมอร์ พื้นที่สีเทาใช้ออกแบบไพรเมอร์ Forward primer และ Reverse primer จากบนลงล่าง ตามลำดับ

บริเวณสีเทานั้นคือบริเวณที่ Forward primer และ Reverse primer เข้าจับที่บริเวณเริ่มต้นและบริเวณปลายของยีน ตามลำดับ โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งสองคือ

Forward: 5’ gac ytg cma cat cat cat c g 3’

Reverse: 5’ rta rac ctc sac gtg cca ct 3’

4.3 การเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้น ก็นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR) ไพร โดยที่ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

10X Pfu buffer	5	ul
10 mM mixed dNTP	1	ul
10 uM Forward primer	3	ul
10 uM Reverse primer	3	ul

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gDNA (or cDNA)	5	ng
Pfu polymerase	2	unit
Water	up to 50 ul	

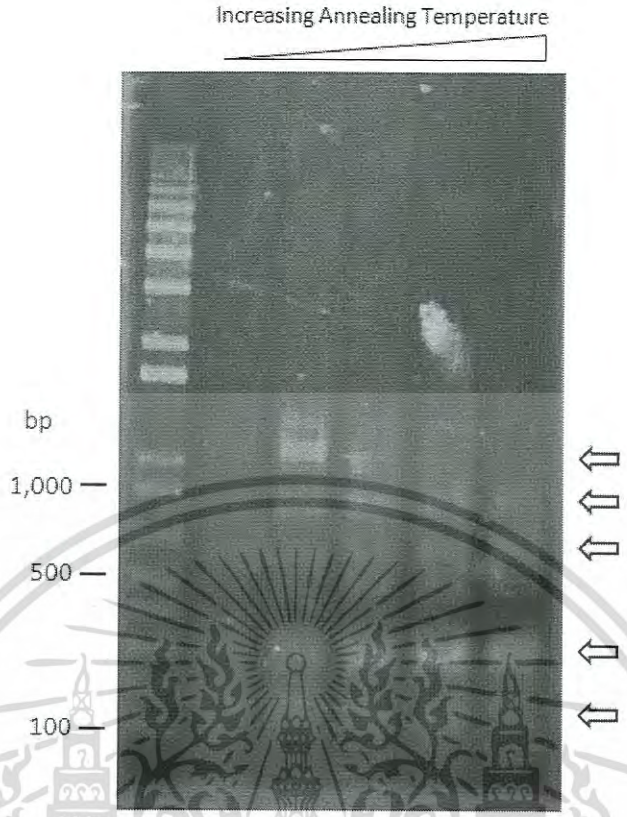
อาศัยสภาวะมาตรฐานของการทำ PCR ที่จะมีรอบดังต่อไปนี้

1. Denaturation	94 °C	3 นาที
2. Denaturation	94 °C	30 วินาที
3. Annealing	45-65 °C	30 วินาที
4. Extension	72 °C	60 วินาที
5. repeat 2 - 4 for 29 cycle		
6. Final extension	72 °C	3 นาที

จากนั้นจะทำการแยกผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เพื่อติดตามหาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสมและน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชิ้นดีเอ็นเอของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase *(fnr)* จากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. ขนาดของชิ้นคาดหวัง คือ 793 คู่เบส (อ้างอิงจากลำดับของ *C. reinhardtii)*

ผลการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ในวุ้น Agarose ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.3 ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการแปรอุณหภูมิทำให้มีผลผลิต PCR ทุกช่วงค่า อย่างไรก็ตาม ชิ้นขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังจะอยู่ในช่วงประมาณ 900 คู่เบส แต่การทดลองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลผลิต PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis
45 – 65: annealing temperature ของ PCR

4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ชิ้นดีเอ็นเอตามตำแหน่งศรชี้ จะถูกสกัดออกจากวุ้นอะกาโรส และโคลนเข้า pGEM-T easy vector เพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นส่ง recombinant plasmid เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจสอบพบว่าเฉพาะชิ้นขนาดประมาณ 600 คู่เบสเท่านั้นที่ตรวจพบความเกี่ยวข้องกับยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 4.4 หลังจากการตรวจสอบแล้วพบว่า ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบมีขนาด 573 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

>*TetrasporaFNR*

TAAACTTCGACATGCCACTGGTTCTTGTGCTTGAGCCCCTCTACGAACTCCTC
AAAGTTGATACCCTTCTCCTTTGACACACGCTCAAGCATCTCCAAGATGCCTG
GCATCATGCCTTTCAAACCGCAGAAGTACATGTGTGCACCGTTGTTCAACAGG
TCAAAGATCTCGTCAGCGTACTCCTCAACCTTGTCTTGGATGTACATCTTGCC
GCCCCTGTTGTTCTTCTGCTCACGGGACAGGGCATAGTCGAGCCTGAACTGGT
CTGGGTAGGTGGCTGCAATCTGTGGCATCTCATCATCATACAGCTTGGCATCA
CTGTTGGCAACACCCATGAACACCCAGAACAGACCTGTGAACTTCCAGTTGGG
GACGTTCTCAAAGAAGCAACGACGCCAGAAGCTGCGGAATGGTGCAATGCCAG
TACCAGTGGCAACGCAGATCAGCACACTGTTAGGGTCCTCTGGCATCAGGAGA
ATCTTGCCAGTGGGGCCAGTCATTACAACCTCAGTGCCTGGTGTTGCATCGCA
CAGGAAGTTTGAGCAGATACCCTTCTTTGCTGGGTCCTCCTTG

รูปที่ 4.4 นิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ที่ได้จากการทำพีซีอาร์

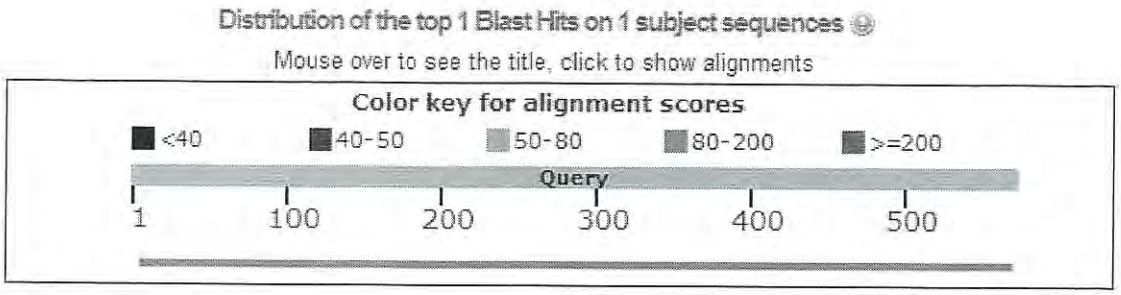
4.5 การวิเคราะห์ยืนยันผลลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้น ได้ถูกยืนยันเพื่อแสดงกลุ่มของยีน โดยได้ตรวจสอบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม blastN จากเว็บฐานข้อมูล NCBI ผลการทดลองเป็นไปดังรูปที่ 4.5 โดยพบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Micromonas pusilla* CCMP1545 ferredoxin-NADP oxidoreductase (PETH), mRNA (Acc. No. XM_003064361.1) ความครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 98% ค่า E-value อยู่ที่ 3e-33 และค่า identity อยู่ที่ 72 %

การตรวจสอบระดับโปรตีนด้วยโปรแกรม blastP พบว่าโปรตีนที่แปรจากกรอบ -2 (frame -2) จะแปรรหัสให้ลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนตะกูล FNR จากสาหร่ายหลากหลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ความครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่มากกว่า 96% ค่า E-value อยู่ที่ 5e-121 ถึง 5e-84 และค่า identity อยู่ที่ 60 - 84 %

นอกจากนี้แล้วยังได้ทดสอบการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อยืนยันความใกล้เคียงกับโปรตีน FNR ของสาหร่ายชนิดอื่นๆ ผลการทดลองเป็นไปตามรูปที่ 4.7 ซึ่งได้เป็นหลักฐานยืนยันว่ายีนที่ติดตามได้จากการทดลองครั้งนี้เป็นยีน FNR ของสาหร่าย *Tetrspora* sp. จริง อีกทั้งยังมีความใกล้เคียงในระดับโปรตีนกับโปรตีน FNR จากสาหร่ายชนิดอื่นๆเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



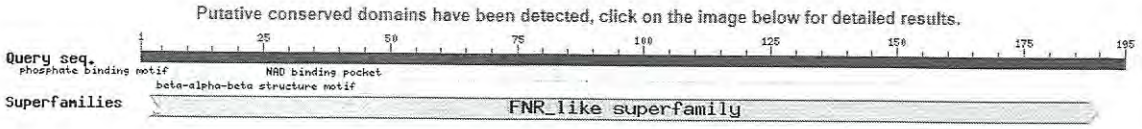
Range 1: 580 to 1142 GenBank Graphics

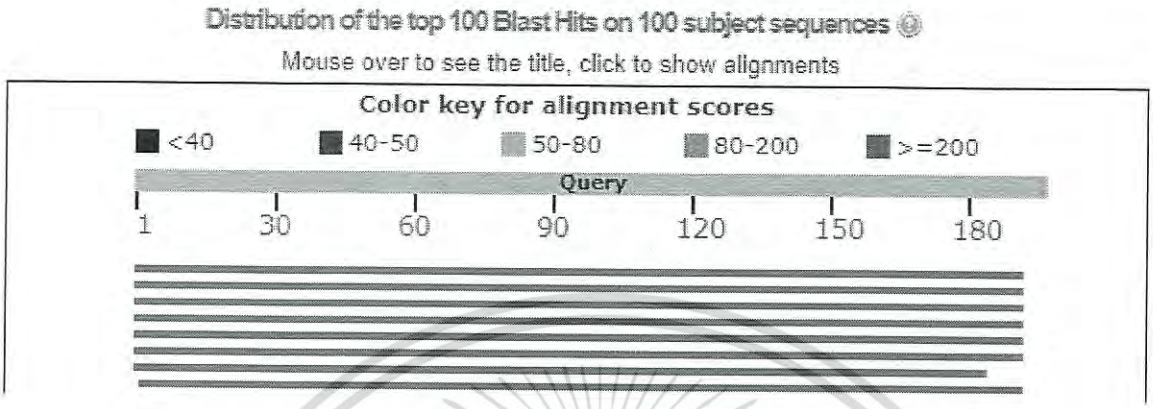
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
154 bits(83)	3e-33	414/574(72%)	22/574(3%)	Plus/Minus

```
Query  7     TCGACATGCCACTGGTTCTTGTGCTTGAGCCCCTCTACGAACTCCTCAAAGTTGATACCC  66
Sbjct  1142  TCGACGTGCCACTGCCCCTTCTTCTTGAGCCCCTCGAGCCACTCCTCGTAGTCGATGCCC  1083

Query  67    TTCTCCTTTGACACACG--CTCAAGCATCTCCAAGATGCCTGGCATCATGCCTTTCAAAC  124
Sbjct  1082  TTCTCCTT-G-CACACGCCCTCGAGCATCTCGAGGATGCCCGGCATCATCCCCTTGAGGC  1025

Query  125   CGCAGAAGTACATGTGTGCACCGTTGTTCAACAGGTCAAAGATCTCGTCAGCGTACTCCT  184
Sbjct  1024  CGCAGAAGTACATGTGCGCGCCGCCGTCGAGGAGCTGGAACACCTGGTCCTTGTACTCCT  965

Query  185   CAACCTTGTCTTGGATGTACATCTTGCCGCCCCTGTTGTTCTTCTGCTCACGGGACAGGG  244
Sbjct  964   CGACCTTGTCTTGGATGTACATCTTGCCGCCCTTGCGGTTCTGAGACTCGCGCGAGAGCG  905

Query  245   CATAGTCGAGCCTGAACTGGTCTGGGTAG-G-TGGCTGCAATCTGTGGCATCTCATCATC  302
Sbjct  904   CGTAGTCGACGCGGAACTGACCGGGGAACCGCTTGATGCACTCAGAGA-A-CTCGTCGTC  847

Query  303   ATACAGCTTGGCATCACTGTTGGCAACACCCATGAACACCCAGAACAGACCTGTGAACTT  362
Sbjct  846   GTACAGCTTCGCGTCCGAGTTGGCGACGCCCATGAAGAGCCACGCCAAACCCTTGAACTC  787

Query  363   CCAGTTGGGGACGTTCTCAAAGAAGCAACGACGCCAGAAGCTGCG---GAAT-GGTGCAA  418
Sbjct  786   CCAGTTCTTGACGTCCTCGACGAAA-AA-G-CGGC-GAATGTACGACCGCATCGGCGCGA  731

Query  419   TGCCAGTACCAGTGGCAACGCA-GATCAGCACACTGTTA--GGGTCCTCTGGCATCAGGA  475
Sbjct  730   TGCCCGTGCCCGTCGCCAC-CATGATCACCGG-C-GTCGCGGGGTCCTCGGGGAGGAGCA  674

Query  476   GAATCTTGCCAGTGGGGCCAGTCATTACAACCTCAGTGCCTGGTGTTGCATCGCACAGGA  535
Sbjct  673   TCACCTGCCCGGTCGGGCCGGTCATCATCACCTCGGCGCCGGGCTTGGCGTCGCAGAGGA  614

Query  536   AGTTTGAGCAGATACCCTTCTTTGCTGGGTCCTC  569
Sbjct  613   AGTTGGAGCAGATGCCCTTCTTCGCCGGGTCCTC  580
```

รูปที่ 4.5 ผลการทำ blastN แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกับยีน FNR ของสาหร่าย *Micromonas pusilla*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

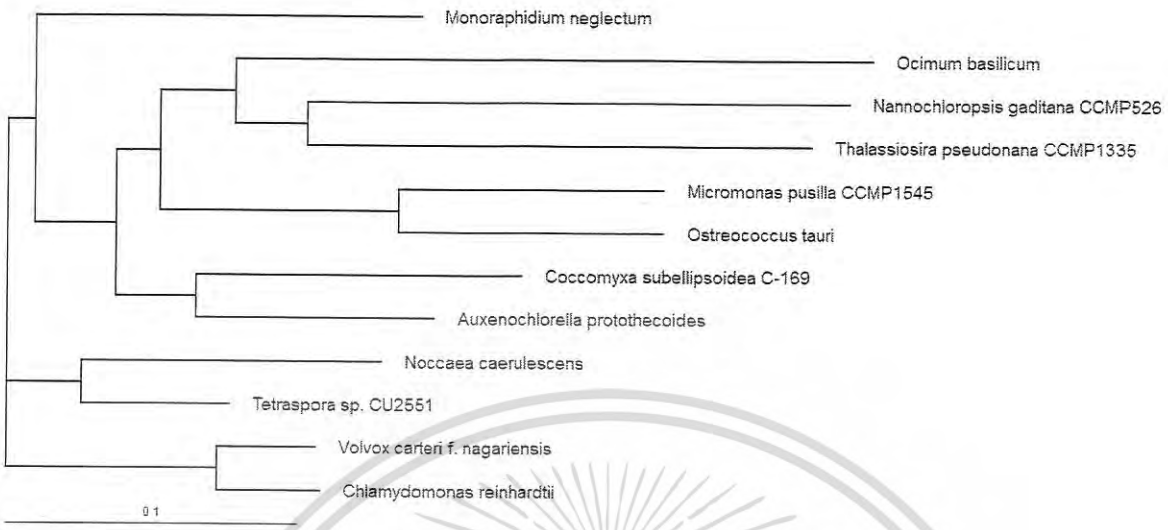




	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	ferredoxin-NADP+ reductase [Volvox carteri f. nagariensis]	355	355	97%	5e-121	84%	XP_002954986.1
☐	ferredoxin-nadp reductase [Chlamydomonas reinhardtii]	352	352	97%	3e-120	84%	XP_001697352.1
☐	ferredoxin NADP reductase [Chlamydomonas reinhardtii]	348	348	97%	5e-120	84%	CAA55406.1
☐	RecName: Full=Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor	351	351	97%	2e-119	84%	P53991.1
☐	hypothetical protein GPECTOR_42g802 [Gonium pectorale]	345	345	97%	2e-117	83%	KXZ46591.1
☐	ferredoxin--NADP+ reductase [Monoraphidium neglectum]	338	338	97%	2e-114	82%	XP_013905631.1
☐	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic [Naccaea caerulescens]	337	337	93%	6e-114	85%	JAU10338.1
☐	hypothetical protein GPECTOR_29g73 [Gonium pectorale]	311	311	96%	1e-103	73%	KXZ48298.1
☐	ferredoxin-NADP+ reductase [Coccomyxa subellipsoidea C-169]	308	308	96%	1e-102	74%	XP_005644145.1
☐	hypothetical protein CHLNCDRAFT_35035 [Chlorella variabilis]	308	308	97%	1e-102	73%	XP_005848997.1
☐	Ferredoxin-NADP reductase, chloroplastic [Auxenochlorella protothecoides]	300	300	96%	2e-100	72%	XP_011400423.1
☐	hypothetical protein g.8829 [Auxenochlorella protothecoides]	303	303	96%	2e-100	72%	JAT78023.1
☐	predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	302	302	96%	3e-100	74%	XP_001422240.1

รูปที่ 4.6 ตัวอย่างผลการทำ blastP พบความคล้ายกับโปรตีน FNR ของสาหร่ายชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดง Phylogenetic tree ของโปรตีน FNR ที่แปรรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาหร่าย *Tetraspora* sp. และจากสาหร่ายชนิดอื่น

จากผลการทดสอบทั้ง BlastN และ BlastP พร้อมทั้งการสร้าง Phylogenetic tree ยืนยันได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ติดตามได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (*fnr*) จากสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 อันจะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญในการศึกษาเชิงลึกต่อไปต่อการศึกษาในระดับพันธุกรรมของสาหร่าย *Tetraspora* sp. เพื่อใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*)ของสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551 ถูกติดตามเพื่อใช้เป็นองค์ความรู้สำหรับงานวิจัยต่อยอดในอนาคต ยีนดังกล่าวสามารถติดตามได้ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ชนิด degenerate primer ผลการทำพีซีอาร์พบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จำนวนหลายชนิดเกิดขึ้น จึงทำการโคลนชิ้น PCR ทุกขนาดที่เจอเข้ากับ pGEM T-easy vector เพื่อสะดวกแก่การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เฉพาะชิ้นขนาด 573 คู่เบสเท่านั้นที่มีหลักฐานว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) จึงได้ทำการยืนยันด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) ทั้ง 3 การทดสอบ ได้แก่ BlastN BlastP และ Phylogenetic tree ผลการทดสอบพบว่าทั้ง BlastN และ BlastP ตรวจพบว่ามีความเป็นไปได้ที่สูงมากที่จะยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่พีซีอาร์ได้นั้นเป็นยีน FNR จริง อีกทั้งผลการทำ Phylogenetic tree ก็ยังได้ยืนยันว่าโปรตีนที่แปรรหัสจากยีนที่พีซีอาร์ได้นี้ มีความใกล้เคียงกับโปรตีน FNR กับสาหร่ายอื่นๆอีกหลายชนิด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงประสบความสำเร็จในการติดตามหายีนบางส่วนของ ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) ในสาหร่าย *Tetraspora* sp. CU2551

5.2 ข้อเสนอแนะ

จุดประสงค์ในระยะยาวสำหรับการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อต้องการรู้ลำดับของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (*fnr*) บางส่วนเพื่อใช้สำหรับในการศึกษาการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยคาดหวังว่าเมื่อลดอัตราการแสดงออกได้แล้ว เซลล์จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้น การลดอัตราการแสดงออกของยีนนั้นสามารถทำได้หลายลักษณะ แต่สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ตั้งใจจะอาศัยเทคนิค recombination เพื่อให้เกิด crossing over ในระหว่างขั้นการแบ่งเซลล์ อย่างไรก็ตาม ลำดับที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับ cDNA ซึ่งอาจจะมีอินทรอนแทรกตัวอยู่ตรงกลางยีนก็เป็นได้ ดังนั้น เป็นไปได้ที่ควรจะออกแบบไพรเมอร์อีกครั้งและใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ เพื่อให้ได้ชิ้นยีนที่มีความยาวเพิ่มขึ้น หรืออาจจะมีอินทรอนแทรกตัวอยู่ข้างในยีน อันจะทำให้การเกิด recombination ของยีนเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สูงขึ้นตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

1. Fan, F., Chen, Z.A., Li, W., Cao, X.P., Xue, S., Zhang, W., 2011. Purification and characterization of a hydrogenase from the marine green alga *Tetraselmis subcordiformis*. Process Biochemistry. 46, 1212-1215.
2. Hallenbeck, P.C., Benemann, J.R. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. International Journal of Hydrogen Energy. 27:1185-1193.
3. Levin, D.B., Pitt, L. and Love, M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy. 29(2): 173-185.
4. Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P., Incharoensakdi, A., 2010. A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 35, 13193-13199.
5. Melis, A. and Happe, T. (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. Plant Physiol. 127: 740 – 748.
6. Sun, Y.L., Chen, M., Yang, H.M., Zhang, J., Kuang, T.Y., Huang, F., 2013. Enhanced H-2 photoproduction by down-regulation of ferredoxin-NADP(+) reductase (FNR) in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. International Journal of Hydrogen Energy. 38, 16029-16037.
7. Troshina, O., Serebryakova, L., Sheremetieva, M. and Lindblad, P. (2002) Production of H_2 by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. Int. J. Hydrogen Energy. 27: 1283–1289.
8. Winkler, M., Heil, B., Happe, T., 2002. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. Biochim Biophys Acta. 1576, 330-334.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Winkler, M., Hemsehemeier, A., Gotor, C., Melis, A. and Happe, T. (2002) [Fe]-hydrogenase in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. Int. J. Hydrogen Energy. 27: 1431-1439.

10. Wünschiers, R. and Lindblad, P. (2002) Hydrogen in education a biological approach. Int J Hydrogen Energ. 27: 1131-1140.

11. Wunschiers, R., Heide, H., Follmann, H., Senger, H., Schulz, R., 1999. Redox control of hydrogenase activity in the green alga *Scenedesmus obliquus* by thioredoxin and other thiols. FEBS Lett. 455, 162-164.

12. Wünschiers, R., Stangier, K., Senger, H. and Schulz, R. (2001) Molecular evidence for a Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus*. Curr Microbiol. 42: 353 – 360.

13. Yan, F., Chen, Z.A., Yu, X.J., Zhang, W., 2008. Preliminary purification of an iron hydrogenase from marine green alga *Platymonas subcordiformis*. Journal of Biotechnology. 136, S566-S566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
เอกสารการเผยแพร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้ได้มีการนำไปเสนอในงานนิทรรศการวันวิทยาศาสตร์ประจำปี 2559 ระหว่างวันที่ 14-17 สิงหาคม 2559 ณ หอประชุมจุฬาภรณ์ฯ ในรูปแบบโปสเตอร์ดังรูปด้านล่าง

Partial gene sequence determination of ferredoxin-NADP$^+$ reductase (FNR) in green alga *Tetraspora* sp. CU2551

Cherdsak Maneeruttanarungroj[a,b]

[a]Bioenergy Research Unit and [b]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand.
cherdsak.ma@kmitl.ac.th Tel: +662-329-8400-11

Abstract

Ferredoxin-NADP$^+$-reductase (FNR) is an enzyme involving in electron flow during photosynthesis. Starting from Photosystem II (PSII), water was lysed into oxygen, protons, and electrons. Electrons were further flown through the cascade of PSII and PSI, respectively, to the final protein called ferredoxin (Fd). FD protein will pass the electrons to FNR to form NADPH inside the chloroplast. Beside, the Fd protein could also pass the electrons to hydrogenase enzyme to form the hydrogen gas. This study aims to determine the FNR sequence for the future utilization in gene knockdown/knockout study in order to increase the electron yield flow from Fd protein to hydrogenase enzyme. The result reveal the finding of the partial FNR sequence from *Tetraspora* sp. CU2551. A 573 base pairs fragment was successfully amplified and shown the similarity to ferredoxin-NADP+ oxidoreductase (PETH) of green alga *Micromonas pusilla* CCMP1545 with 72% identical and E-value of 2e-33.

Introduction

The green alga *Tetraspora* sp. CU2551 has proved to produce the hydrogen gas[1]. This organism has been identified belonging to the green algae which contain the photosynthetic apparatus including photosystem II and photosystem I. Those machineries could allow the flow of electron which will be further used in NADPH production through the catalysis of ferredoxin-NADP$^+$ reductase (FNR). The electron substrate was flown from ferredoxin protein (Fd). The Fd itself pass the electrons to both FNR and hydrogenase enzyme, the enzyme catalyzing the formation of hydrogen gas. Inhibition of FNR should result in higher electron flow to hydrogenase enzyme. The study aims to determine the DNA sequence of fnr gene from *Tetraspora* sp. CU2551 to be further used in gene knockdown/ knockout experiment.

Materials and Methods

PCR analysis: *Tetraspora* sp. CU2551 was cultivated in TAP medium Cells were harvested and resuspended in water to be used as a template for pcr reaction. Degenerate primer were designed as 5' gac ytg cma cat cat cat cg 3' (FNRForward) and 5' rta rac ctc sac gtg cca ct 3' (FNRReverse) . The PCR conditions were described elsewhere[2].

DNA sequencing: A PCR fragment was excised from the agarose gel and purified using the PCR/Gel extraction kit. The purified PCR fragment was subjected to DNA sequencing using dideoxy method.

Sequence analysis: the sequence was used in blastn program available online at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Results and Discussion

Primer design: Three FNR genes from different organisms were obtained from NCBI: Chlamydomonas (acc. No. U10545.1), Volvox (acc. No. U22328.1), and Guillardia (acc. No. DQ383763.1). The shaded regions were used in primer design (Fig 1.). The primer sequences were described in materials and methods section.

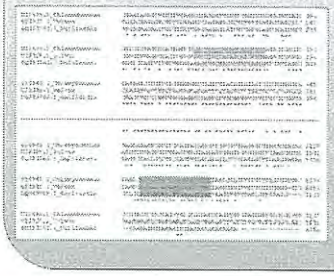


Fig. 1. Discontinuous alignment showing the yellow shaded for forward primer design and green shaded for reverse primer design.

Fig. 2. An example of sequencing result of FNR fragment using degenerate primer

A sequence of 573 bp was obtained after trimming the vector sequence. Each base signal was checked carefully and confirmed of that base at certain position before subjecting to blast against to NCBI database.

Characterization: The DNA sequence was subjected to blastn against the NCBI database. The result show the similarity to the ferredoxin-NADP$^+$ oxidoreductase of *Micromonas pusilla* CCMP1545 with 72% identical and e-value of 2e-33 (Fig 3.).

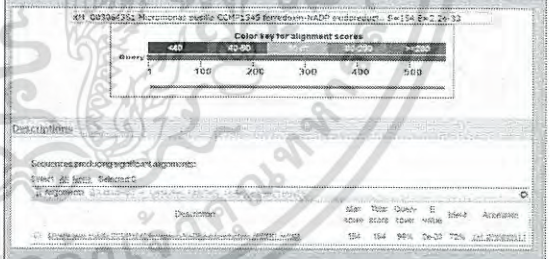


Fig. 3. DNA blastn result of query sequence to NCBI database.

The results confirmed the available of FNR gene the *Tetraspora* sp. genome. And, this study was enable the alternative choice for gene knockdown/knockout study in genetic manipulation for enhanced biohydrogen production.

Acknowledgements

This work was supported by the Faculty of Science, King Mongkut's Institute Technology Ladkrabang fund (2559-01-05-028) to C. Maneeruttanarungroj.

References:

[1] C. Maneeruttanarungroj, P. Lindblad, A. Incharoensakdi, International Journal of Hydrogen Energy 35, 13193 (Dec, 2010).

[2] C. Maneeruttanarungroj, P. Lindblad, A. Incharoensakdi, International Journal of Hydrogen Energy 37, 15105 (Oct, 2012).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การใช้จ่ายเงินในโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ ...2559-01-05-028..... ตั้งแต่วันที่ .....1 ตุลาคม 2558.... ถึงวันที่ .....30 กันยายน 2559.....

แหล่งทุน: แหล่งเงินรายได้ (ประเภทส่งเสริมนักวิจัย)

ชื่อโครงการ : การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP+ reductase (FNR) ในสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
							ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)		50,000.00										-
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)		42,500.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)		7,500.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 3)												
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)			21,717.52			-	-	410.00	21,307.52	-	-	21,717.52
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)			28,282.47			-	-	792.20	27,490.27	-	-	28,282.47
	งบประมาณคงเหลือ		50,000.00		**0.01**	**0.00**							
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												
ครั้งที่ 1													
9 ก.พ. 59	Yeast extract 500 g	IV16-020303								3,611.89			3,611.89
	Peptone bacto 500 g												-
	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethane 500 g	IV16-020922								3,736.44			3,736.44
16 ก.พ. 59	Tip 5000 ul	700/10108457								3,419.72			3,419.72
11 มี.ค. 59	Seive No.10	590098								7,888.04			7,888.04
	Seive No.12												-
	Pan and cover												-
18 มี.ค. 59	Sodium Lauryl Sulphate 500 g	RE5900290								1,764.43			1,764.43
25 มี.ค. 59	ค่าวิเคราะห์	20							410.00				410.00
1 เม.ย. 59	ชุดเลนส์มิวอาย	203								800.00			800.00
17 เม.ย. 59	ท่อน้ำ	427167								87.00			87.00
	ฝาครอบ 1 นิ้ว												-

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ ...2559-01-05-028..... ตั้งแต่วันที่ .....1 ตุลาคม 2558.... ถึงวันที่ .....30 กันยายน 2559.....

แหล่งทุน: แหล่งเงินรายได้ (ประเภทส่งเสริมนักวิจัย)

ชื่อโครงการ : การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP+ reductase (FNR) ในสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
	ฝาครอบ 3/4 นิ้ว												
	รวมครั้งที่ 1		-			-	-	-	410.00	21,307.52	-	-	21,717.52
ครั้งที่ 2													
28 มี.ค. 59	หน้ากาก 3 ช่อง	167110								218.25			218.25
	หน้ากากกันน้ำ												-
5 พ.ค. 59	ชุดไฟ Mega 2560	254								900.00			900.00
6 พ.ค. 59	เครื่องชั่งดิจิตอล	cs1606073								640.00			640.00
13 พ.ค. 59	ค่าวิเคราะห์	16							300.00				300.00
7 ก.ค. 59	DNA primer	IV1607264								693.36			693.36
14 ก.ค. 59	กระดาษทิชชู	5023061358								370.00			370.00
14 ก.ค. 59	DNA ladder	RC-5901120								2,356.03			2,356.03
15 ก.ค. 59	Multi meter	DO5907-0076								4,975.50			4,975.50
18 ก.ค. 59	ขวดน้ำเกลือ	IV5907-0847								2,250.00			2,250.00
20 ก.ค. 59	DNA primer	IV1607711								616.32			616.32
1 ส.ค. 59	Tip 200 ul	RC-5901152								1,805.95			1,805.95
	PCR tube												-
3 ส.ค. 59	น้ำยาสกัดพีซีอาร์	RC-5901215								2,075.80			2,075.80
23 ส.ค. 59	Alginate	IV16-080595								4,462.97			4,462.97
30 ส.ค. 59	ค่าวิเคราะห์	RC-5901390							492.20				492.20
31 ส.ค. 59	Tube 1.5 ml	RC-5901391								6,126.09			6,126.09
	Tip 200 ul												-
	Tip 10 ul												-

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ ...2559-01-05-028..... ตั้งแต่วันที่ .....1 ตุลาคม 2558.... ถึงวันที่ .....30 กันยายน 2559.....

แหล่งทุน: แหล่งเงินรายได้ (ประเภทส่งเสริมนักวิจัย)

ชื่อโครงการ : การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP+ reductase (FNR) ในสาหร่ายสีเขียว Tetraspora sp. CU2551

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
	Sterillized tube												
	รวมครั้งที่ 2		-	-	-		-	-	792.20	27,490.27	-	-	28,282.47

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ..... วันที่ .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงความเป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ไทย) อาจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์
   (อังกฤษ) Mr. Cherdsak Maneeruttanarungroj, Ph.D.
   เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 3606 00476 64 4
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
   สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง
   จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10520
   โทรศัพท์ 02-329-8400-11
   โทรศัพท์มือถือ 084-662-6149
   Email: Cherdsak.ma@kmitl.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
   ปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ปริญญาเอก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

   6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :
   - การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechosystis* sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก
   - การสกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากแปะก๊วย Ginkgo biloba
   - การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เชื่อมต่อดีเอนเอของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803
   - การสกัดสารพันธุกรรมจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551
   - การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-NADP$^+$ reductase (FNR) ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551

   6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
   - การโคลนยีนที่ผลิตเอนไซม์เชื่อมสายดีเอนเอของสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรีย *Synechosystis* sp. PCC 6803 สู่ระบบการแสดงออก (ทุนคณะวิทยาศาสตร์ ปี 2557 เผยแพร่ในงานนิทรรศการวันวิทยาศาสตร์ สจล.)
   - การสกัดสาร Ginkgolide และ Bilobalide จากแปะก๊วย Ginkgo biloba (ทุนคณะวิทยาศาสตร์ ปี 2558 เผยแพร่ในงานนิทรรศการวันวิทยาศาสตร์ สจล.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เชื่อมต่อดีเอนเอของสาหร่าย *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ทุนคณะวิทยาศาสตร์ ปี 2558)
  - The 14th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, Saint Petersburg-Pushkin, Russia: 6-9 Nov 2016. In silico approaches to identify the NAD^+-dependent DNA ligase gene (*sll1209*) from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Poster presentation)
- การสกัดสารพันธุกรรมจากสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 (ทุนพัฒนานักวิจัยใหม่ สถาบันฯ ปี 2558)
  - Science and Technology of Emerging Materials (STEMa2016), Pattaya, Thailand: 27-29 July, 2016. RNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551 (Oral presentation)
  - **Maneeruttanarungroj, M.** and Incharoensakdi, A. (2016) Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. World J Microbiol Biotechnol 32:99

6.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ

- การหาลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน ferredoxin-$NADP^+$ reductase (FNR) ในสาหร่ายสีเขียว *Tetraspora* sp. CU2551 (ทุนคณะวิทยาศาสตร์ งานวิจัยฉบับนี้)

7. ผลงานวิจัย

7.1 Maneeruttanarungroj, M. and Incharoensakdi, A. (2016) Rapid method for DNA isolation from a tough cell wall green alga *Tetraspora* sp. CU2551. World J Microbiol Biotechnol 32:99

7.2 Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2012) Sulfate permease (SulP) and hydrogenase (HydA) in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551: Dependence of gene expression on sulfur status in the medium. Int J Hydrogen Energ 37:15105-15116.

7.3 Maneeruttanarungroj, C., Lindblad, P. and Incharoensakdi, A. (2010) A newly isolated green alga, *Tetraspora* sp. CU2551, from Thailand with efficient hydrogen production. Int J Hydrogen Energ 35:13193-13199.

7.4 Nzila, A., Rottmann, M., Chitnumsub, P., Kiara, S. M., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Taweechai, S., Yeung, B. K., Goh, A., Lakshminarayana, S. B., Zou, B., Wong, J., Ma, N. L., Weaver, M., Keller, T. H., Dartois, V., Wittlin, S., Brun, R., Yuthavong, Y. and Diagana, T. T. (2010) Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N060-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate. Antimicrob Agents Chemother 54, 2603–2610.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.5 Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., **Maneeruttanarungroj, C.**, Nichols, SE., Lyons, TM., Tirado-Rives, J., Jorgensen, WL., Yuthavong, Y. and Anderson, K.S. (2009) Exploiting structural analysis, *in silico* screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant *Falciparum* malaria. ACS Chem Biol 4:29–40. Supungul, P., Tang, S.,

7.6 **Maneeruttanarungroj, C.**, Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T. and Tassanakajon A. (2008) Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Dev Comp Immunol 32, 61–70.

7.7 **Maneeruttanarungroj, C.**, Pongsomboon, S., Wuthisuthimethavee, S., Klinbunga, S., Wilson, K.J., Swan, J., Li, Y., Whan, V., Chu, K.H., Li, C.P., Tong, J., Glenn, K., Rothschild, M., Jerry, D. and Tassanakajon, A. (2006) Development of polymorphic expressed sequence tag-derived microsatellites for the extension of the genetic linkage map of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Anim Genet 37, 363–368.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้