

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece* sp.

นางสาวชลดา

น้อยจันทร์

นางสาวผกากรอง

วนไพศาล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 67293
วัน,เดือน,ปี..... 22 พ.ย. ๒๕๕๗

b..... ๑๑๖๖๒๑๑๑
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Transcriptional analysis of reversible hydrogenase gene in the
halotolerant cyanobacterium *Aphanothece* sp.**



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2005**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece* sp.

นักศึกษา นางสาวชลดา น้อยจันทร์ รหัสประจำตัว 45050186
 นางสาวผกากรอง วนไพศาล รหัสประจำตัว 45050217

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

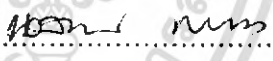
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษย์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นำ โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. มลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษย์	
กรรมการ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชาติ	


 (รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
 หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม <i>Aphanothece</i> sp.		
นักศึกษา	นางสาวชลดา	น้อยจันทร์ระ	รหัส 45050186
	นางสาวผกากรอง	วนไพศาล	รหัส 45050217
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2548		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย		

บทคัดย่อ

เอนไซม์รีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนให้เป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน เอนไซม์รีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxH* และโปรตีนหน่วยย่อยเล็กถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *Aphanothece* sp. ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำแบบต่างๆ โดยวิธี RT-PCR วิธีการทดลองเริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอจากไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ DNaseI เพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ MMuLV reverse transcriptase และนำ cDNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณยีน *hoxH* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* สูงที่สุด คือ การชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน การเติมเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำและสภาวะปกติ พบว่าเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีการชักนำเท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของ RT-PCR ของยีน *hoxH*

Special Project Title	Transcriptional analysis of reversible hydrogenase gene in the halotolerant cyanobacterium <i>Aphanothece</i> sp.	
Name	Miss Chollada	Noychantira
	Miss Phakakrong	Wanapaisarn
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2005	
Special Project Advisor	Asst.Prof.Dr. Saranya	Phunpruch

Abstract

Reversible hydrogenase is an enzyme that catalyzes the oxidation of H₂ to protons and the reduction of protons to H₂. This enzyme contains 2 subunits. The large subunit is encoded by *hoxH* gene and the small subunit is encoded by *hoxY*. This project aims to study and analyze the transcriptional level of *hoxH* in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece* sp. under different cultivation and induction conditions by RT-PCR. Total RNA was isolated from cells grown under different conditions. The isolated total RNA was digested by DNaseI in order to remove the contaminated DNA. The RNA was reverse-transcribed to cDNA by MMuLV reverse transcriptase and the obtained cDNA was used as a template for PCR amplification of *hoxH* gene. From the results, it was found that the optimal induction conditions of *hoxH* transcription level were induction with N₂ gas, iron and nickel addition to the final concentrations of 50 nM and 1 μM, respectively. In addition, *Aphanothece* sp. grown only under the induction condition not normal growth condition showed the PCR product of RT-PCR reaction of *hoxH*.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องมาจาก ความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา
โครงการพิเศษ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษกุล คณะกรรมการโครงการพิเศษ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์
และ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ตลอดจนอาจารย์ท่านอื่นที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และ
ประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่คณะผู้จัดทำ ด้วยเหตุนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ
ไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่คอยอำนวยความสะดวก คอย
เอื้อเฟื้อ ให้ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการใช้งานในระหว่างการปฏิบัติงาน คณะผู้จัดทำ
ขอขอบคุณ พี่แอน พี่น้ำ พี่เตย ที่ให้ความช่วยเหลือ และแนะนำ เพื่อให้เกิดความถูกต้องในการ
ปฏิบัติงาน นอกจากนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณกีฟท์ ฝ่าย แพท และพี่เอ ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่คอยให้
คำแนะนำและเอื้อเฟื้อข้อมูลต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ ในระหว่างการค้าในงานในโครงการ
พิเศษนี้จนแล้วเสร็จ ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ
ด้านจนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

นางสาวชลดา

น้อยจันทร์ระ

นางสาวผกากรอง

วนไพศาล

มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญตาราง (ต่อ)	ฉ
สารบัญรูป	ซ
สารบัญรูป (ต่อ)	ช
สารบัญรูป (ต่อ)	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย	39
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	51
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	83
ภาคผนวก	84
เอกสารอ้างอิง	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	23
2.2	31
2.3	34
3.1	41
3.2	45
3.3	46
3.4	46
3.5	47
3.6	48
3.7	48
3.8	49
3.9	49
3.10	50
4.1	52
4.2	52
4.3	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4	59
ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร	
4.5	60
ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้นต่างๆ	
4.6	65
ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิดความเข้มข้นต่างๆ	
4.7	67
ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร	
4.8	68
ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ	
4.9	73
ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ	
4.10	76
ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติและเซลล์ที่ถูกชักนำ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร	
4.11	76
ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติและเซลล์ที่ถูกชักนำ	
4.12	81
ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่มีการชักนำ	

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	5
2.2 [A]	การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายขนาดเล็ก	8
2.2 [B]	การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้	8
2.3	เซเทอโรซิสต์ในสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว และกลไกการสังเคราะห์ ก๊าซไฮโดรเจน	10
2.4	ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ	11
2.5	การถ่ายทออิเล็กตรอน ซึ่งประกอบด้วย Photosystem I และ Photosystem II	12
2.6	ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกระบวนการบำบัดแบบ ไม่ใช้ออกซิเจน	14
2.7	การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ควบคู่ไปกับการผลิตก๊าซ	15
2.8	แสดงการทำงานของเอนไซม์ Nitrogenase เอนไซม์ Uptake hydrogenase และเอนไซม์ Bidirectional hydrogenase	19
2.9	การถอดรหัสของยีน <i>hoxH</i> ใน <i>N. muscorum</i> ระหว่างการเปลี่ยน สถานะจากสถานะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนเป็นสถานะที่มีการตรึง ไนโตรเจน	20
2.10	ภาพถ่าย <i>Aphanothece</i> sp.	25
2.11	ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในโครงสร้าง ต่างๆ กัน	30
2.12	ขนาดของดีเอ็นเอและระยะทางการเคลื่อนที่ในการสนามไฟฟ้า ที่ความเข้มข้นของเจลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ	32
2.13 ก.	ภาพแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของเจลแอมเบอร์	33
2.13 ข.	ภาพแสดงการประกอบแถบพลาสติก	33
2.13 ค.	ภาพแสดงการประกอบราวและหวี	33
2.14 ก.	การเทอะกาโรสเจลจำนวนน้อยรอบ ๆ บริเวณที่จะเทเจล	36
2.14 ข.	การใส่หวีและเทเจล	36
2.14 ค.	อะกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอ	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.1	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	53
4.2	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	55
4.3	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	56
4.4	กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR. ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ	57
4.5	กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ	58
4.6	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	62
4.7	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	63
4.8	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	64
4.9	กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR. ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ	65
4.10	กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ	66
4.11	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	70
4.12	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	71
4.13	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	72

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.14	กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR. ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ	74
4.15	กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ	74
4.16	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	77
4.17	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	79
4.18	ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน <i>hoxH</i> จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ	80
4.19	กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน <i>hoxH</i> ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติกับสภาวะที่มีการชักนำ	81
4.20	กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติกับสภาวะที่มีการชักนำ	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

ในปัจจุบันนี้มนุษย์ได้นำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้ในการดำรงชีวิตเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ พลังงานดังกล่าวมีอยู่อย่างจำกัดและจะหมดไปในอนาคตหากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือย และไม่ผลิตพลังงานใหม่ๆ ขึ้นมาทดแทน นอกจากนี้ การใช้พลังงานเชื้อเพลิงเหล่านี้ยังอาจส่งผลกระทบต่อความมาได้แก่ ปัญหามลพิษ ความร้อน และภาวะเรือนกระจก เป็นต้น นักวิจัยทั่วโลกจึงได้วิจัยและพัฒนาเพื่อผลิตพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่ๆ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมาก เนื่องจากไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและกลิ่น เมื่อเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อเผาไหม้ในอากาศจะเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ ปัจจุบันมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน นักวิจัยจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

การผลิตไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิตอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ปฏิกิริยาผันกลับแสดงดังสมการ



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้มักเกิดในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

1. unidirectional หรือ uptake hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. bidirectional หรือ reversible hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างและการสลายโมเลกุลของไฮโดรเจน

ในจำนวนสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้มวลชีวภาพและได้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ หากแต่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ไม่สอดคล้องกับความต้องการ ดังนั้น ไชยาโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในฐานะที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้เช่นกัน และมีเอนไซม์ที่ไวต่อออกซิเจนไม่มากนัก นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียมีคุณลักษณะเด่นที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นคือ สามารถหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสังเคราะห์ด้วยแสงได้ออกซิเจนในออร์แกเนลล์เดียวกัน ไชยาโนแบคทีเรียยังมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายพืช เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไชยาโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่มากเกินไปในเซลล์ ได้มีรายงานการศึกษาเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนและไฮโดรจีเนสในไชยาโนแบคทีเรียหลายชนิด (Kerfin and Böger, 1982; Houchins, 1984; Boichenko and Hoffmann, 1994; Schulz, 1996; Appel and Schulz, 1998) อีกทั้งมีรายงานการใช้ไบโอไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ (Hall *et al.*, 1995; Schulz, 1996)

ในไชยาโนแบคทีเรียพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดข้างต้น คือ อัฟเทค และ รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส โดยอัฟเทคไฮโดรจีเนสพบเฉพาะในไชยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน หรือที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และไชยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* (Peschek 1979a, 1979b) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส ทุกชนิดที่พบในไชยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยนิกิตและเหล็ก ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งผลิตมาจากเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) อิเล็กตรอนที่ได้จากปฏิกิริยาของอัฟเทคไฮโดรจีเนส จะถูกถ่ายทอดไปยังลูโคไซเซนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและหายใจ Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไชยาโนแบคทีเรียหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทด์และอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนส (*hupL*) ที่สังเคราะห์หน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรกในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7210 ระยะที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของนิกเกิลไฮโดรเจนและไนโตรเจนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1995) และมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของเอนไซม์นี้ใน *Nostoc* สายพันธุ์ดังกล่าว (Oxelfelt *et al.*, 1998)

ส่วนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่สองรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างและการสลายไฮโดรเจน เอนไซม์ชนิดนี้เร่งการผลิตไฮโดรเจนเมื่อได้อิเล็กตรอนจากเมทิลไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวซ์ด้วยไดไทโอไนท์ (dithionite) มาก่อน โดยเอนไซม์ชนิดนี้ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นชนิดที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับสภาวะการเจริญเติบโต โดยสามารถวัดกิจกรรมได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Aphanocapsa* sp. (Belkin and Paden, 1978), *Synechococcus* sp. และ *Synechocystis* sp. (Frenkel *et al.*, 1950) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) และในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena*, sp. *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or *et al.*, 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris, 1981a, 1981b) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสจะเพิ่มขึ้นในหลายสายพันธุ์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic adaptation) *Spirulina maxima* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับสูงเมื่อเจริญภายใต้สภาวะโฟโตออโตโทรป (Llama *et al.*, 1979) เอนไซม์ชนิดนี้ไวต่อออกซิเจนมากกว่าเอนไซม์ ฮัพเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984) แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีความไวน้อยกว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย จนกระทั่งปัจจุบัน เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสถูกทำให้บริสุทธิ์ใน *Anabaena cylindrica* (Hallenbeck and Beneman, 1978; Ewart and Smith, 1989), *Microcystis aeruginosa* (Asada *et al.*, 1987), *Oscillatoria limnetica* (Belkin *et al.*, 1981) และ *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 (Kentemich *et al.*, 1989) และมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์นี้ใน *Anacystis nidulans* (Schmitz *et al.*, 1995; Boison *et al.*, 1996) และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996)

Aphanothece sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดี่ยว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเชื้อหุ้มเซลล์หนา มีลักษณะที่สำคัญคือ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์ นอกจากนี้ ลักษณะของเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยวทำให้การศึกษาคุณลักษณะของยีน รวมถึงการแสดงออกของยีนทำได้ไม่ยากนัก จากการศึกษาที่ *Aphanothece* sp. เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงนี้ จึงมีความมุ่งหวังในการนำไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์นำไซยาโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม โดยสามารถใช้น้ำทะเลมาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาจมีการเติมสารอาหารบางอย่างลงไปเพียงเล็กน้อย เพื่อใช้ผลิตไฮโดรเจนต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

วิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanotech* esp. ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

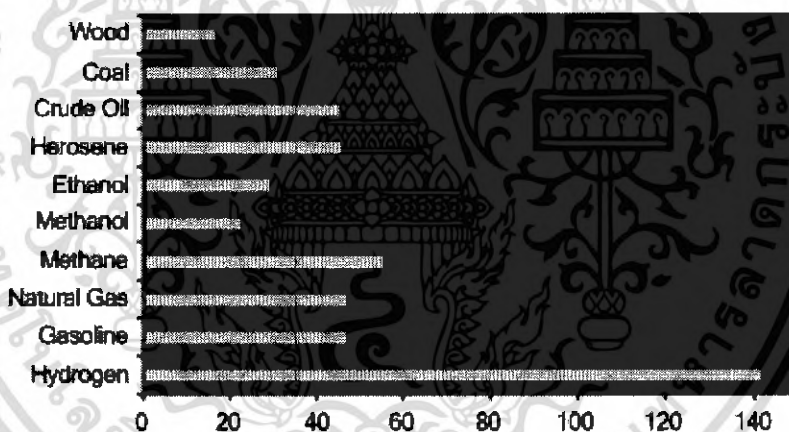
บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ก๊าซไฮโดรเจน

(<http://people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>)

วิกฤตการณ์พลังงานในช่วงทศวรรษที่ 70 ที่ราคาน้ำมันพุ่งขึ้นสูงเป็นประวัติการณ์ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลก ส่งผลให้มีการค้นคว้าหาแหล่งพลังงานอื่นๆ มาทดแทนการใช้น้ำมัน ซึ่งในขณะนั้น ก๊าซไฮโดรเจน ได้ก้าวเข้ามาเป็นตัวเลือกที่จะมาทดแทนน้ำมันในอนาคตด้วยคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น ให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จึงใช้เป็นเชื้อเพลิงในจรวดขับเคลื่อนสำหรับส่งยานอวกาศ และสามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษอันเป็นจุดเด่นของการเป็น พลังงานสะอาด (clean energy) ผลผลิตที่เกิดจากการเผาไหม้มีเพียงน้ำเท่านั้น



รูปที่ 2.1 การเปรียบเทียบพลังงานจากเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ

ที่มา : <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>

อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมาเมื่อราคาน้ำมันลดลง ความสนใจในการใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงก็ซาลงไป ต่อมาในทศวรรษที่ 90 เมื่อโลกตื่นตัวกับปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะปรากฏการณ์เรือนกระจก (greenhouse effect) ทำให้ก๊าซไฮโดรเจนกลับมาเป็นที่สนใจอีกครั้ง เพราะเป็นพลังงานสะอาดและไม่เป็นก๊าซเรือนกระจกเหมือนอย่างก๊าซมีเทน แต่การกลับมาของก๊าซไฮโดรเจนในครั้งนี้ต่างไปจากเดิม เพราะไม่ได้มองไฮโดรเจนในฐานะเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้แบบเดียวกับน้ำมันหรือก๊าซธรรมชาติ แต่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกระแสไฟฟ้า โดยที่เซลล์เชื้อเพลิงสามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้จากปฏิกิริยาเคมีระหว่างก๊าซไฮโดรเจนกับก๊าซออกซิเจนจากอากาศโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ต่างไปจากการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้พลังงานความร้อนจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง เช่น ถ่านหิน น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ หรือแม้แต่ใช้พลังงานนิวเคลียร์

2.1.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมและการนำไปใช้

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้กันมากมีอยู่ 3 วิธี คือ

2.1.1.1 steam hydrocarbon reforming คือทำโดยฉีดพ่นไอน้ำอุณหภูมิสูงเข้าผสมกับก๊าซธรรมชาติ ทำให้โมเลกุลไฮโดรคาร์บอนเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยไฮโดรเจนออกมา

2.1.1.2 gasification คือการเผาถ่านหินที่มีกำมะถันต่ำโดยใช้อุณหภูมิสูง แล้วดักจับก๊าซที่เกิดขึ้นไปสกัดแยกไฮโดรเจนจากก๊าซอื่นๆ เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์อีกทีหนึ่ง

2.1.1.3 electrolysis คือการแยกน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าจะได้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง ไฮโดรเจนที่ได้จากวิธีการที่กล่าวมายังมีต้นทุนที่สูงกว่าน้ำมันและก๊าซธรรมชาติอยู่มาก

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงแล้วยังมีการนำก๊าซไฮโดรเจนไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อีกมากมาย เช่น อุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมอาหาร (การผลิตมาการีนจากน้ำมันพืช) อุตสาหกรรมผลิตแอมโมเนีย

2.1.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

งานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพในช่วงที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าสามารถจะใช้สิ่งมีชีวิตบางชนิดมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในปริมาณมากได้จากทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้ไม่หมด เช่น แสงแดดและน้ำ และยังผลิตได้จากกากของเสียที่เป็นชีวมวล (biomass) หรือจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียได้อีกด้วย เป็นการช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมไปในตัว การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็น เทคโนโลยีสีเขียว (green technology) สำหรับอนาคต

2.2 ไบโอดีไฮโดรเจน

(<http://people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>)

ไบโอดีไฮโดรเจน คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จากสิ่งมีชีวิต งานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพในช่วงที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นว่าสามารถจะใช้สิ่งมีชีวิตบางชนิดมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน ในปริมาณมากได้จากทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้ไม่หมด เช่น แสงแดดและน้ำ และยังผลิตได้จากกากของเสียที่เป็นชีวมวล (biomass) หรือจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียได้อีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นการช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมไปได้ในตัว การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นเทคโนโลยีสีเขียว (green technology) สำหรับอนาคต

2.2.1 สิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนได้

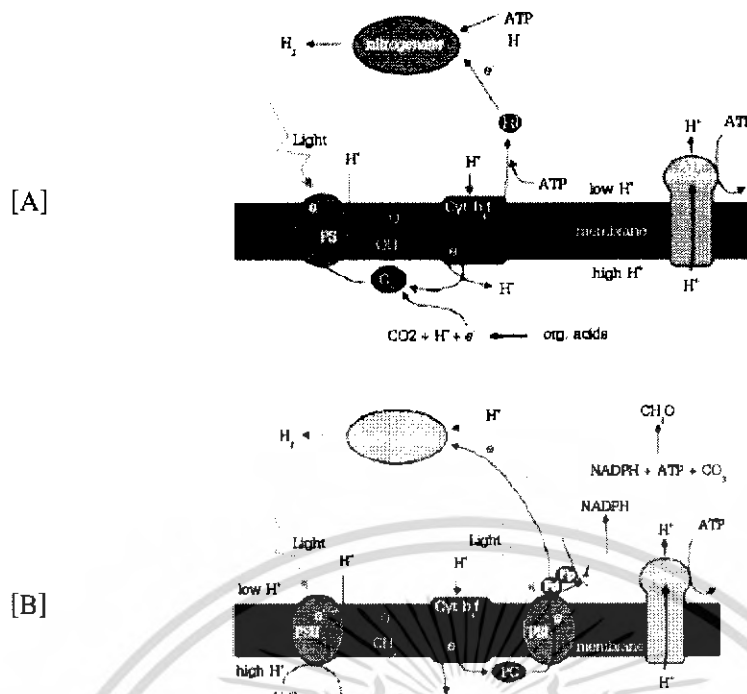
สามารถแบ่งสิ่งมีชีวิตที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.2.1.1 พวกที่ใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

(photosynthesis - light process) ได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงแยกโปรตอนและออกซิเจนจากน้ำ แล้วนำไฮโดรเจนอะตอม (proton, H^+) ที่ได้ดังรูป 2.2[A] ไปสังเคราะห์เป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) อีกชนิดหนึ่งคือแบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ (photosynthetic bacteria) แยกไฮโดรเจนจากสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งอาหาร โดยอาศัยกระบวนการหมัก ซึ่งจะย่อยสลายสารอินทรีย์อย่างสมบูรณ์ให้กลายเป็นโปรตอน และคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วใช้พลังงาน (ATP) ส่วนหนึ่งจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมาช่วยเอนไซม์ไนโตรจีเนสในการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน ดังรูป 2.2[B]

2.2.1.2 พวกที่ใช้กระบวนการหมักในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (fermentation dark process) ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria)

นอกจากนี้ยังมี nitrogen-fixing aerobic bacteria บางชนิด กับโปรโตซัวบางชนิดที่สามารถสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนได้เช่นกัน แต่ยังไม่ถูกนำมาใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน



รูปที่ 2.2 [A] การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนในสาหร่ายขนาดเล็ก

[B] แบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้

ที่มา : <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent>

2.3 การผลิตไบโอไฮโดรเจน

(<http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.htm>)

แนวคิดของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ แยกออกเป็น 2 แบบ แบบแรกจะใช้สิ่งมีชีวิตมาเก็บเกี่ยวพลังงานแสงอาทิตย์ไปสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน ส่วนอีกแบบจะทำการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย หรือใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

2.3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากพลังงานแสงอาทิตย์

แสงอาทิตย์เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดราบเท่าที่ดวงอาทิตย์ยังมีอยู่ โลกได้รับพลังงานจากดวงอาทิตย์ปีละประมาณ $5.7 \times 1,024$ จูล หรือประมาณ 10,000 เท่าของพลังงานที่มนุษยชาติใช้ในแต่ละปี เทคโนโลยีในการนำพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้ประโยชน์มีมานานแล้ว ตัวอย่างที่เห็นในปัจจุบันคือ เซลล์แสงอาทิตย์ (solar cell or photovoltaic cell) ซึ่งผลิตกระแสไฟฟ้าจากพลังงานแสง เซลล์แสงอาทิตย์ที่ใช้กันทั่วไปมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานไฟฟ้าประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์เชื้อเพลิงที่ผลิตกระแสไฟฟ้าจากก๊าซไฮโดรเจนและออกซิเจน มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนพลังงาน 40-70 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะหาวิธีที่สามารถดึงเอาพลังงานแสงอาทิตย์มาใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้าหรือใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ หนึ่งในวิธีเหล่านั้นคือการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตมาดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกมา อย่างไรก็ตามมีความจริงอยู่ข้อหนึ่งคือ สิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสงสามารถดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ได้เพียงบางช่วงความยาวคลื่นเท่านั้น (400-700 นาโนเมตรสำหรับสาหร่ายสีเขียว และ 400-950 นาโนเมตรสำหรับแบคทีเรียสีม่วง พลังงานแสงในช่วงคลื่นนี้เรียกว่า photosynthetic active radiation (PAR) ซึ่งคิดเป็นพลังงานประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์ ของแสงอาทิตย์ทุกช่วงความยาวคลื่น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยสิ่งมีชีวิตจึงไม่มีโอกาสถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ไปได้

2.3.1.1 สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน

2.3.1.1.1 Microalgae

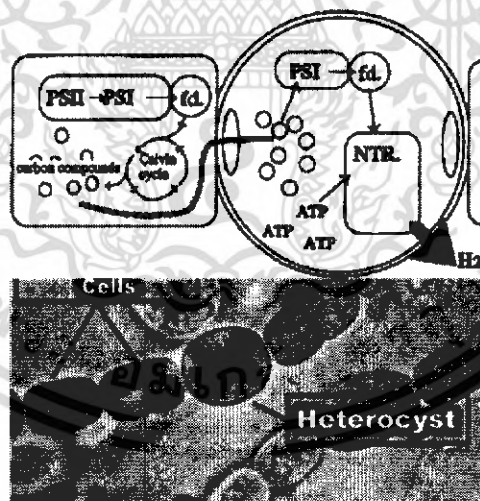
สาหร่าย (algae) ที่รู้จักกันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ สาหร่ายขนาดใหญ่ (macroalgae) ที่เป็นพืชชั้นต่ำ กับ สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวมีขนาดเพียงไม่กี่ไมโครเมตรอันได้แก่ ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ (สาหร่ายสีแดง, สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล) กับ โปรคาริโอตที่มีกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบเดียวกับพืชที่เรียกกันว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae หรือ cyanobacteria) สาหร่ายพวก microalgae มีข้อดีตรงที่มีต้นทุนวัตถุดิบราคาถูกมากคือน้ำและแสงแดด เพราะสาหร่ายสามารถใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมาสร้างพลังงาน ไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และยังดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศกลับมาสร้างชีวโมเลกุลในเซลล์ได้อีก การใช้สาหร่ายจึงเป็นกระบวนการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาก ประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานจากแสงอาทิตย์ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอยู่ระหว่าง 10-20 เปอร์เซ็นต์ (ขึ้นกับค่า PAR) และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

ข้อดีของพวกสาหร่าย อีกประการคือ มีผลพลอยได้ (by product) ที่มีมูลค่าสูงและเป็นที่ต้องการของตลาด เช่น DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่นำไปเติมในนมผงเด็ก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงเป็นที่สนใจของอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ

แต่อย่างไรก็ดี ปัญหาใหญ่ของพวกสาหร่าย คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งโดยออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของตัวเอง เมื่อ 60 กว่าปีก่อนมีการค้นพบว่าสาหร่ายสีเขียว (unicellular green algae) ที่เลี้ยงในสภาพไร้ออกซิเจนและไม่มีแสงจะสามารถผลิต

ก๊าซไฮโดรเจนออกมาได้ทันทีเมื่อได้รับแสง แต่ทว่าการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะหยุดลงหลังจากเวลาผ่านไปไม่กี่นาที เนื่องจากออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจะไปยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์ ปัญหานี้ทำให้ปิดโอกาสในการนำสาหร่าย ไปใช้งาน งานวิจัยในช่วงที่ผ่านมา จึงเป็นการค้นหาหนทางที่จะแก้ปัญหานี้ ซึ่งในอนาคตอาจจะใช้กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมมา คัดแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อแก้ปัญหานี้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่มีระบบสังเคราะห์ด้วยแสงเหมือนในพืช กลไกการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ใช้สังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนถูกยับยั้งโดยออกซิเจนได้เช่นเดียวกับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว แต่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดจะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่าเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งมีหน้าที่ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนและไม่มีระบบสังเคราะห์ด้วยแสงดังรูปที่ 2.3 ดังนั้นในเฮเทอโรซิสต์จึงไม่มีออกซิเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบธรรมดาที่มีทั้งแสงและออกซิเจนแต่ผลผลิตที่ได้ยังต่ำอยู่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นแบคทีเรียที่เรียกดังนั้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงเร็วกว่าในสาหร่ายสีเขียว อีกทั้งการคัดแปลงตัดแต่งพันธุกรรมก็ทำได้ง่ายกว่า โอกาสในการนำไปใช้งานจึงเปิดกว้างกว่า



รูปที่ 2.3 เฮเทอโรซิสต์ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และกลไกการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจน

ที่มา : <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0g.htm#chapter1เปอร์เซ็นต์20เปอร์เซ็นต์20>

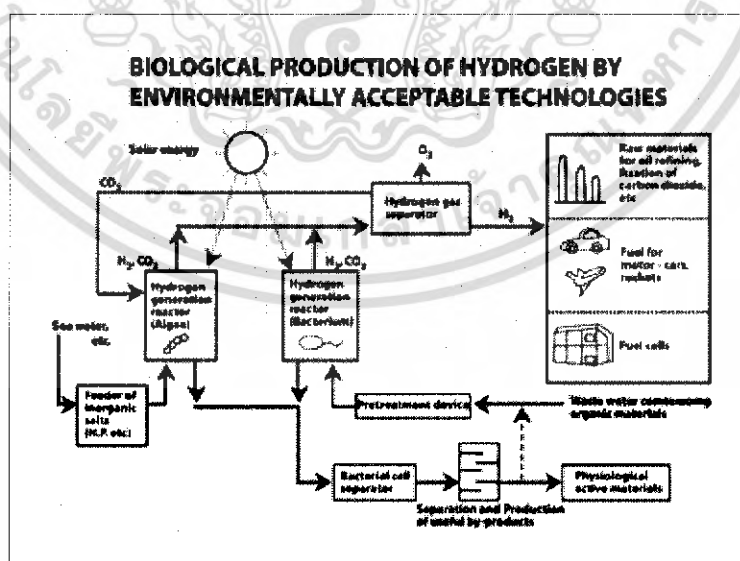
เปอร์เซ็นต์20เปอร์เซ็นต์20hydrogen%20Production

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.1.2 Photosynthetic bacteria

แบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ (photosynthetic bacteria) ไม่ได้ใช้น้ำเป็นตัวให้อิเล็กตรอนเหมือนอย่างในพืช จึงไม่มีออกซิเจนเกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เอนไซม์ในโตรจีนเนสไม่ถูกรบกวนโดยออกซิเจนในเซลล์ การสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจึงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในสภาวะที่มีแสง เมื่อเทียบกับพวกสาหร่ายแล้ว แบคทีเรียพวกนี้มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่สูงกว่า แบคทีเรียพวกนี้ใช้สารประกอบกำมะถันหรือสารอินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำ จึงแยกแบคทีเรียพวกนี้เป็น 2 กลุ่มคือ sulfur photosynthetic bacteria และ non- sulfur photosynthetic bacteria

เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้ใช้สารอินทรีย์เป็นอาหาร จึงมีการนำเอาแบคทีเรียนี้ไปใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียด้วย กลายเป็นกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากพลังงานแสงอาทิตย์ที่สามารถบำบัดน้ำเสียไปด้วยพร้อมกัน ในทางทฤษฎีแล้วแบคทีเรียพวกนี้สามารถที่จะกำจัดสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในการทดลองพบว่า สามารถลดค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำที่หาได้โดยวิธีการทางเคมี (Chemical Oxygen Demand : COD) ในน้ำเสียได้เพียง 15-25 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าที่คาดไว้ และถึงแม้ว่าแบคทีเรียพวกนี้จะปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาในระหว่างการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วย แต่ถ้าสามารถแยกก๊าซออกจากกันและกักเก็บไว้ได้ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอีกอย่างหนึ่งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้อีก ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ

ที่มา : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p15/biohydrogens.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสโตไซยานิน (Plastocyanin) ด้วยการรีดักชันของพลาสโตไซยานิน (plastocyanin) เกิดขึ้นโดย FeS protein ที่ช่วยขนส่งอิเล็กตรอนจากสารประกอบที่มีอิเล็กตรอน 2 ตัวคือ พลาสโตควิโนนไปยังสารประกอบที่มีอิเล็กตรอน 1 ตัว พลาสโตไซยานินที่ถูกรีดิวซ์จะให้อิเล็กตรอนแก่ P₇₀₀ เพื่อกระตุ้น P₇₀₀ ให้ถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปยังเฟอร์ริดอกซิน (Fd) และฟลาโวโปรตีน (Fb) ทำให้เกิดรีดิวซ์ซึ่งพาวเวอร์คือ NADPH และโปรตอนกราเดียนท์ ส่วนอิเล็กตรอนที่มากเกินไปจะถูกส่งกลับจากเฟอร์ริดอกซินกลับไปยัง complex I ซึ่งเชื่อมติด (coupling) อยู่กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และให้ผลผลิตเป็นก๊าซไฮโดรเจน

2.3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสีย

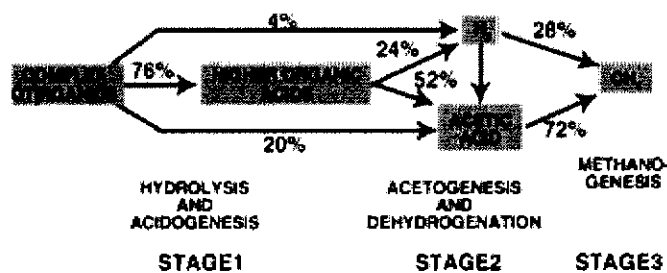
สารอินทรีย์ที่เจือปนอยู่ในน้ำเสียคือ แหล่งอาหารที่จะป้อนให้กับจุลินทรีย์ที่เราสามารถจะเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากเซลล์ได้ ในการผลิตแบบแรกได้กล่าวถึงการนำแบคทีเรียสังเคราะห์ด้วยแสงไปใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากระบวนการบำบัดน้ำเสีย แต่ระบบที่จะใช้ผลิตได้ต้องเป็นระบบปิดเพื่อกักเก็บก๊าซที่เกิดขึ้นไว้ได้ ปัญหาจึงเกิดขึ้นเพราะวัสดุที่ใช้ทำถังหมัก (bioreactor) ต้องเป็นวัสดุโปร่งแสงเพื่อให้แบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ในระหว่างกระบวนการผลิต ต้นทุนจึงสูง ในขณะที่การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการแสงสามารถทำได้ในถังหมักทั่วไปที่ทำจากวัสดุทึบแสง ต้นทุนจึงถูกกว่า และเทคโนโลยีการผลิตก๊าซจากระบบบำบัดน้ำเสียก็มีอยู่แล้ว ก็คือการเก็บเกี่ยวก๊าซมีเทนจากระบบแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic treatment) มาใช้เป็นก๊าซเชื้อเพลิงที่เรียกกันว่า ก๊าซชีวภาพ (biogas) ซึ่งในบางแห่งใช้มูลสัตว์หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอื่นๆ มาเป็นวัตถุดิบแทนน้ำเสีย ในปัจจุบันนี้แนวโน้มของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียจึงมุ่งไปที่การใช้กระบวนการหมักโดยอาศัยระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน

2.3.2.1 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน นั้น มีจุลินทรีย์หลายกลุ่มที่ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยได้ก๊าซมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการ แต่ในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลายจะมีก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น

สารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ในน้ำเสีย เช่น แป้ง เซลลูโลส โปรตีน และไขมัน จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ต่างๆ ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน และกรดไขมันอิสระ จากนั้นจุลินทรีย์จะนำสารโมเลกุลเล็กเหล่านี้ไปใช้ในเซลล์โดยกระบวนการหมักเกิดเป็นกรดอินทรีย์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม methanogen จะนำไปใช้ต่อและสังเคราะห์ก๊าซมีเทนออกมา ดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน

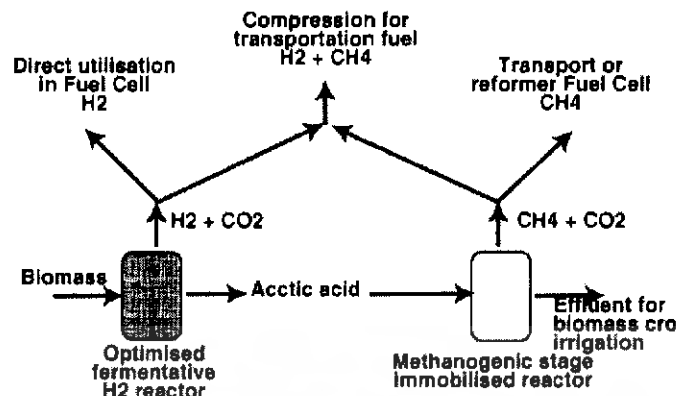
ที่มา : <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0f.htm>

แบคทีเรียที่สังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนในสภาพไร้ออกซิเจนมีอยู่หลายกลุ่ม ถ้าแบ่งตามกลไกทางชีวเคมีที่ใช้สังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนก็จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ Clostridial system, *Escherichia coli* system และ *Desulfovibrio desulfuricans* system ตามชื่อของแบคทีเรียในกลุ่มที่เป็นที่รู้จักกันดี แต่มีแค่ 2 กลุ่มแรกที่มีการศึกษากันมาก แบบ Clostridial system มีทิศทางการสังเคราะห์เกิดขึ้น 2 แบบ ให้ผลผลิต ได้สูงสุดคือ 4 mol H₂/mol glucose โดยใช้เอนไซม์ H₂: ferredoxin oxidoreductase ในขณะที่แบบ *E. coli* system ให้ผลผลิต ได้น้อยกว่าคือได้ 2 mol H₂/mol glucose โดยใช้เอนไซม์ hydrogenase และ formate dehydrogenase แต่มีกลไกที่ซับซ้อนน้อยกว่าแบบแรก

2.3.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการบำบัดน้ำเสีย

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคโนโลยีบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนมาดัดแปลงเพื่อใช้ผลิตก๊าซไฮโดรเจน มีทั้งที่ใช้เชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว (pure culture) และที่ใช้เชื้อแบคทีเรียรวมๆ กันหลายชนิด (mixed culture) จากตะกอนที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งผลผลิตสูงสุดที่ทำได้คือ 2.59 mol H₂/mol hexose เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous process) ยาวนานถึง 212 วัน โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาล และใช้ตะกอนที่ได้มาจาก aerobic activated sludge เป็นหัวเชื้อในการหมัก โดยมีก๊าซมีเทนเกิดขึ้นเพียง 0.001 mol/mol hexose อย่างไรก็ตามพบว่าขั้นตอนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถลดค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำที่ทำได้โดยวิธีการทางเคมีในน้ำเสียไปได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ จำเป็นต้องมีการบำบัดในขั้นตอนต่อไปเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ยังมีเหลืออยู่ ซึ่งอาจจะเป็นการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนต่อ เป็นกระบวนการ 2 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2.7 ดังนั้นกระบวนการโดยรวมจึงสามารถใช้กระบวนการ anaerobic treatment เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนจากการบำบัดน้ำเสียและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

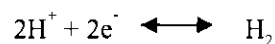


รูปที่ 2.7 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรควบไปกับการผลิตก๊าซที่มาจาก : <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0f.htm>

นอกจากนี้ยังสามารถนำน้ำเสียมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน และ poly-hydroxyalkanoates (PHA) ที่นำไปใช้ผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) โดยใช้กระบวนการ 2 ขั้นตอน ในขั้นแรกน้ำเสียจะถูกนำไปหมักในถังหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic reactor) เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน จากนั้นน้ำเสียจากขั้นตอนแรกจะถูกถ่ายเทไปยังถังหมักแบบใช้ออกซิเจน (aerobic reactor) ที่มีการเติมอากาศเพื่อผลิต PHA กระบวนการทั้งหมดนี้ใช้หัวเชื้อที่ได้มาจากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน และสามารถกำจัดค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำที่หาได้โดยวิธีการทางเคมี ในน้ำเสียไปได้ถึง 9 เปอร์เซ็นต์

2.4 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Axelsson *et al.*, 2002)

ขบวนการเมตาบอลิซึมของโมเลกุลไฮโดรเจนในจุลินทรีย์ถูกค้นพบตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 และต่อมาพบว่าเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ดังสมการ



ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด

1. Unidirectional หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. Bidirectional หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน

การจำแนกเอนไซม์จากชนิดของโลหะที่อยู่ศูนย์กลางบริเวณเร่งของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจึงสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กและนิกเกิลเป็นองค์ประกอบ ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ และไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ (Vignais *et al.*, 2001)

ในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยศึกษาเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง ไซยาโนแบคทีเรียมีคุณลักษณะโดดเด่นและแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นคือสามารถหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสังเคราะห์ด้วยแสงได้ออกซิเจนในออร์แกเนลเดียวกัน นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียยังมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงและถ่ายเทอิเล็กตรอนคล้ายในพืช ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสมีบทบาทสำคัญในการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่มีอยู่มากเกินไปในเซลล์ มีการศึกษาเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนและไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียและนำไปใช้ไฮโดรเจนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานสะอาด

ในไซยาโนแบคทีเรียจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพียง 2 ชนิด ชนิดแรก อพเทคไฮโดรจีเนสซึ่งพบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ และในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* ชนิดที่ 2 Reversible hydrogenase พบทั่วไปในไซยาโนแบคทีเรีย จนกระทั่งปัจจุบันถึงมีรายงานลำดับเบสของยีนนี้ในไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Anacystis nidulans* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสส่วนใหญ่ที่พบในแบคทีเรีย คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กและนิกเกิลเป็นองค์ประกอบ (Cammack, 1999; Przybyla *et al.*, 1992; Vignais *et al.*, 2001) โครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบชนิดแรก ประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วนที่สามารถละลายน้ำได้และพบใน *Desulfovibrio gigas* (Albracht, 1994) เอนไซม์ชนิดนี้เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึมทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนและมีความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์กับเอนไซม์อพเทคไฮโดรจีเนสที่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Vignais *et al.*, 2001)

ในไซยาโนแบคทีเรียพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กและนิกเกิลเป็นองค์ประกอบซึ่งทำหน้าที่ทำงานแตกต่างกัน 2 ชนิด คือ เอนไซม์ชนิดอัทเทค และเอนไซม์ชนิดรีเวิร์สซิเบลในปี ค.ศ. 1995 ได้มีรายงานเกี่ยวกับโครงสร้างของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนส (Schmitz *et al.*, 1995)

2.4.1. เอนไซม์ รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย

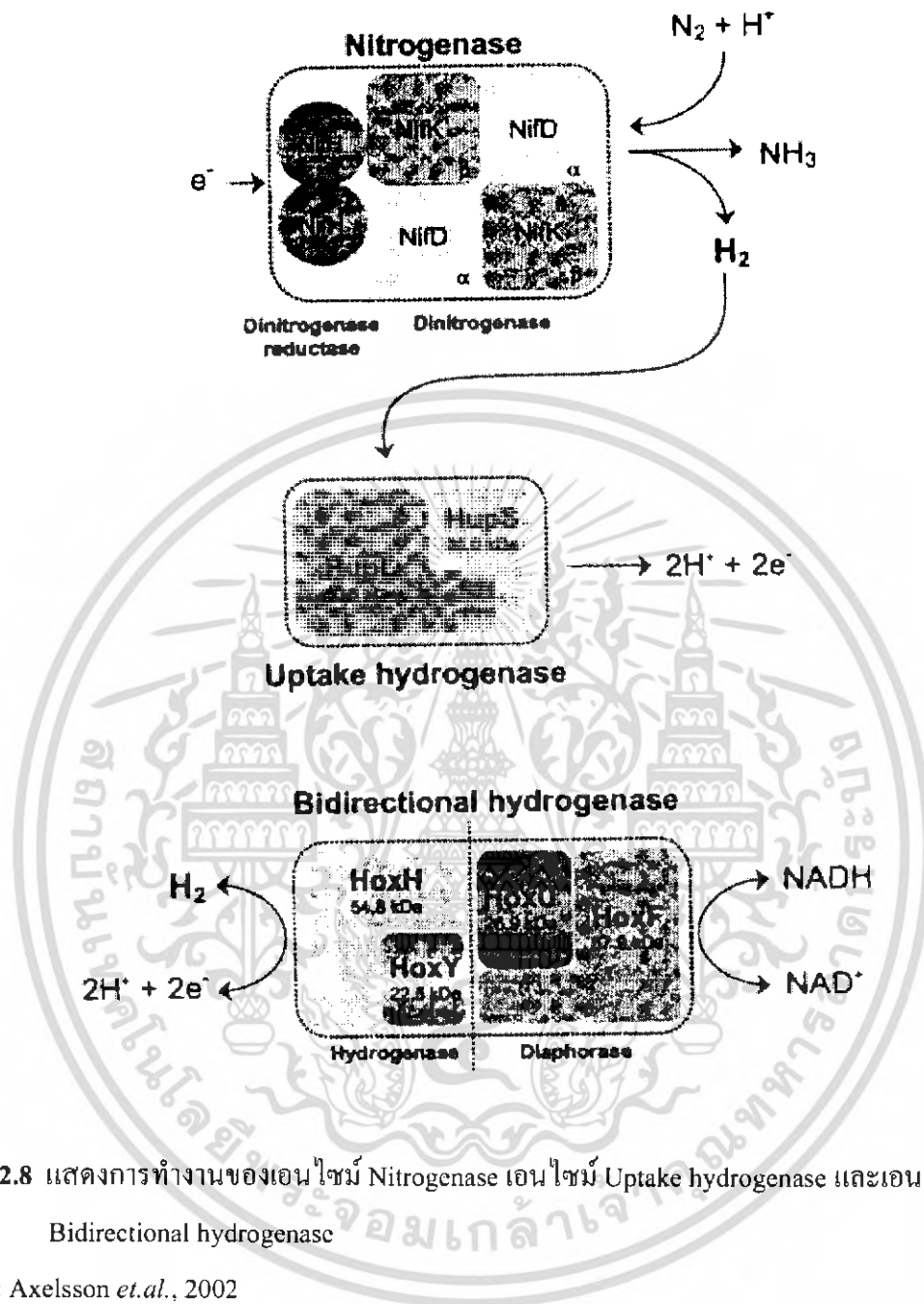
เอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่พบได้โดยทั่วไปทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน (Hansel and Lindblad, 1998) แต่ในปัจจุบันพบว่าในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้บางสายพันธุ์ไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ (Tamagnini *et al.*, 1997; Tamagnini *et al.*, 2000) ได้มีการทำให้เอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลเป็นองค์ประกอบบริสุทธิ์ใน *A. variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 (Serebryakova *et al.*, 1996) ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพและการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากเอนไซม์ อัทเทคไฮโดรจีเนส (Serebryakova *et al.*, 1996; Tredici *et al.*, 1990) โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีคุณลักษณะที่ไวต่อออกซิเจน ทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อไฮโดรเจนสูง (Serebryakova *et al.*, 1996) เอนไซม์ชนิดนี้เร่งการผลิตไฮโดรเจนได้เมื่อได้อิเล็กตรอนมาจากเมทิลไวโอลินที่ถูกรีดิวซ์ด้วยโคโทไนท์ การวิเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้จึงอาศัยการวัดจากตัวให้อิเล็กตรอน การตรวจสอบไฮโดรเจนระหว่างการเจริญไม่สามารถนำมาใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสได้ การให้ไนโตรเจนระหว่างการเพาะเลี้ยงมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสเพียงเล็กน้อย ซึ่งกล่าวได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ไม่ขึ้นกับการตรึงไนโตรเจน เพื่อสนับสนุนทฤษฎีนี้ Howarth และ Codd ได้แสดงให้เห็นว่าไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวหลายสายพันธุ์มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนส (Howarth and Codd, 1985) ในสิ่งมีชีวิตกิจกรรมของเอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสในสายพันธุ์ที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ จะเพิ่มมากขึ้นในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนหรือในสถานะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Serebriakova *et al.*, 1994) ขณะที่ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน เช่น *Gloeocapsa alpicola* และ *Chroococcidiopsis thermalis* พบว่าออกซิเจนไม่ค่อยมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อย่างชัดเจน (Serebryakova *et al.*, 2000; Serebryakova *et al.*, 1998)

บทบาทของเอนไซม์รีเวิร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสยังคงอยู่ในระหว่างการศึกษาและยังคงไม่แน่ชัด แต่ความเป็นไปได้ของหน้าที่ของเอนไซม์นี้คือ การลดปริมาณตัวรีดิวซ์ในสถานะที่มีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน มีรายงานว่าไฮโดรเจนความเข้มข้นต่ำจะทำให้เกิด

การเร่งปฏิกิริยาในทิศทางนำไฮโดรเจนเข้า (hydrogen uptake) เมื่อโปรตอนเกรเดียนต์ในไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ภายนอกมีค่ามากขึ้น และพบว่าเอนไซม์น่าจะมีส่วนที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนที่ด้านเพอร์พลาสซึม และส่งให้แก่ลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของการหายใจ (Kentemich *et al.*, 1991; Schmitz *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังคาดว่าเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เหมือนวาล์วเพื่อลดศักยภาพอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาที่ใช้แสงของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความช้าในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในสภาวะที่มีความเครียดเกิดขึ้น (Appel *et al.*, 2000) ได้มีการจัดจำแนกระบบ respiratory complex I ที่ไม่สมบูรณ์ (ประกอบด้วย 11 หน่วยย่อย แต่ไม่มีบริเวณอนุรักษ 14 แห่งเหมือนใน โปรคาริโอตอื่นๆ เช่น *E. coli*) ของไซยาโนแบคทีเรียและพบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เติมเต็มระบบแทนหน่วยย่อยที่หายไป (Appel *et al.*, 2000; Appel and Schulz, 1996) แต่อย่างไรก็ตามมีหลายทฤษฎีที่ขัดแย้งกับข้อมูลนี้ รวมทั้งความจริงที่ว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่เอนไซม์ที่มีอยู่ในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิด (Tamagnini *et al.*, 1997; Tamagnini *et al.*, 2000) เมื่อเอนไซม์ รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสมีบทบาทที่สำคัญต่อระบบ respiratory complex I ไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีการพัฒนากลไกบางอย่างที่ทำหน้าที่แทนเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสมีบริเวณอนุรักษที่มีความคล้ายคลึงกับ 2 หน่วยย่อยของ respiratory complex I แต่มีความคล้ายคลึงกันน้อยมาก มีการทดสอบอัตราการหายใจของ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนส ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น (Boison *et al.*, 1999) และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ซึ่งเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสได้ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปบางส่วน พบว่าเกิดการยับยั้งการเจริญและระดับการหายใจเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Howitt and Vermaas, 1999) ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการศึกษาเพิ่มมากขึ้นถึงเพื่อให้ทราบหน้าที่ที่แท้จริงของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย

2.5 ยีนไฮโดรจีเนส

ในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ ไฮโดรจีเนส อีพเทคไฮโดรจีเนส และรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนส ดังรูปที่ 2.8 โดยที่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสทำการตรึงไนโตรเจนและมีผลเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เอนไซม์อีพเทคไฮโดรจีเนสประกอบด้วยยีน *hupL* และ *hupS* พบในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนเอนไซม์รีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนสประกอบด้วยยีน *hoxH* *hoxY* *hoxE* *hoxF* และ *hoxU* พบได้ในทั้งพวกที่ตรึงและไม่ตรึงไนโตรเจนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน



รูปที่ 2.8 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Nitrogenase เอนไซม์ Uptake hydrogenase และเอนไซม์ Bidirectional hydrogenase

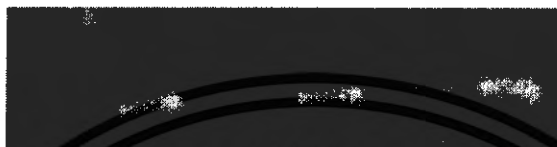
ที่มา : Axelsson *et al.*, 2002

2.5.1 การถอดรหัสของยีน *hox*

มีรายงานการศึกษาการถอดรหัสของยีน *hox* โดยใช้เทคนิค RT-PCR และพบว่ายีนที่เป็นโครงสร้างของยีน *hox* ถูกถอดรหัสร่วมกันเป็น 1 หน่วยใน *A. variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 (Boison *et al.*, 2000) ในทางตรงกันข้ามพบว่าไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 มีการถอดรหัส ร่วมกันใน 2 ชุดของยีน คือ *hoxEF* และ *hoxUYHWhypAB* (Boison *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังได้ศึกษากิจกรรมของโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่งของยีน *hox* โดยใช้เอนไซม์เอกสาร์เป็นเอกสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบต้า-กาแลคโตซิเดสและ เอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Boison *et al.*, 2000) การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน *hox* ของ *N. muscorum* พบว่ามีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยเปลี่ยนจากสภาวะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนให้เป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.9 (Axelsson *et al.*, 1999)

M 0 14 24 41 61 (h)



รูปที่ 2.9 ระดับของการถอดรหัสของยีน *hoxH* ใน *N. muscorum* ระหว่างการเปลี่ยนสภาวะจากสภาวะที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจนเป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยแสดงระดับการถอดรหัสในชั่วโมงที่ 0, 14, 24, 41 และ 61 หลังจากเปลี่ยนให้เป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน (Axelsson *et al.*, 1999) M แสดง marker (100-bp DNA ladder)

ที่มา : Axelsson, 2002

2.6 สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) (ยูวดี, 2546)

มีชื่อสามัญว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ชื่อวิทยาศาสตร์ชื่อหนึ่งคือ Cyanochloronta นอกจากนี้ยังมีชื่อสามัญอีกชื่อหนึ่งว่า Cyanobacteria สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไป คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีคลอโรฟิลล์ เอ จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และมีออกซิเจนซึ่งเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ด้วยแสงด้วย ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในพวกแบคทีเรีย สาหร่ายกลุ่มนี้ไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถขยับอยู่ได้ทั่วทุกแห่งในโลกทั้งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน นอกจากนี้ ยังพบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์

ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนี้ไม่มีคลอโรพลาสต์ชัดเจน เพียงแต่มีไทลาคอยด์ ซึ่งจะอยู่เดี่ยวๆ ไม่มีเยื่อบางๆ หุ้ม และไม่มีการจัดเรียงตัวกันเป็นชั้นๆ จะพบเป็นอิสระทั่วไปในเซลล์หรือบริเวณรอบๆ นอกของตัวเซลล์ จึงเรียกบริเวณที่มีรงควัตถุเหล่านี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) บริเวณไทลาคอยด์นี้เป็นที่อยู่ของคลอโรฟิลล์เอ ส่วนรงควัตถุอื่นๆ จะเกาะอยู่บนผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งเราเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รงควัตถุทั้งหลายที่กล่าวมาแล้วจะไม่รวมกันเป็นพลาสติด (plastid) เหมือนพืชชั้นสูง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่แบบร่างแหกระจายอยู่ทั่วไป

การที่สาหร่ายชนิดนี้มีทั้งคลอโรฟิลล์ และซี-ไฟโคไซยานิน จึงทำให้มองเห็นเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้าสาหร่ายชนิดไหนมีซี-ไฟโคอิริทรินมากอาจจะมองเห็นเป็นสีแดงปนอยู่ด้วย สัดส่วนของรงควัตถุดังกล่าวมีต่างกัน ซึ่งทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีสีแตกต่างกัน ซึ่งทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีสีแตกต่างกันไป เช่น มีตั้งแต่สีเขียว (grass-green) ไปจนถึงดำหรือแดง และสีที่เป็นสีกึ่งกลางของสีเหล่านี้

2.6.2 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram-negative) ที่เรียกว่า มิวโคเพปไทด์ (mucopolysaccharide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ซิท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบ ซิทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสี ไม่มีสี หรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ

2.6.3 ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product)

ผลผลิตของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารพวกแป้งชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) ลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปเรียกว่า ไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่น คือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

2.6.4 ส่วนประกอบของเซลล์

เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วย ผนังเซลล์ 2 ชั้น และรอบนอกมีซิท ซึ่งเป็นสารเมือกหุ้มอยู่ ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อบางๆ เรียกว่า เยื่อพลาสมา (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่จำนวนมาก ฉะนั้น จึงเรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียส จึงเรียกส่วนนี้ว่า เซนโตรพลาสซึม เนื่องจากส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้ม จึงถือว่าเป็นไซโทพลาสซึมที่แท้จริงในส่วนของโครโมพลาสซึมจะมีไซยาโนไฟซินแกรนูล ซึ่งเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เม็ดเล็กๆนี้ เป็นอาหารสะสมพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซียน นอกจากไซยาโนไฟซินแกรนูลแล้ว ยังมี ก๊าซแวกิวโอล (gas vacuole) ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในโครโม-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสซิม ก๊าซแคววโวลนี้ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (40เท่า) จะเห็นเป็นเม็ดสีดำ แต่เมื่อใช้กำลังขยายสูงๆ (ตั้งแต่ 100 เท่าขึ้นไป) จะเห็นเป็นเม็ดสีแดงเนื่องจากการสะท้อนแสง โดยทั่วไปก๊าซแคววโวลมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจมีลักษณะเป็นถุงกลม เช่น ในสกุล Oscillatoria ถุงนี้มีเยื่อบางๆหุ้ม เยื่อนี้ประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนซึ่งสามารถให้ออกซิเจนซึมผ่านได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการหายใจ ส่วนก๊าซที่บรรจุภายในถึงค่าว่าเป็นก๊าซไนโตรเจน หรือสารประกอบของไนโตรเจนจำพวกเอมีน (amine)

2.6.5 รงควัตถุ (pigment)

รงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลิน (phycobilin) รงควัตถุในสาหร่ายแต่ละชนิดมีผลทำให้สาหร่ายเหล่านั้นมีสีที่แตกต่างกันไป เช่น สาหร่ายสีเขียว สีเขียวแกมน้ำเงิน สีน้ำตาล และสีแดง เป็นต้น รงควัตถุเหล่านี้อาจกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึม เช่น ที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือในพลาสมิด พวกคลอโรพลาสต์ หรือโครโมพลาสต์ เช่น ที่พบในสาหร่ายสีอื่นๆ รงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

2.6.5.1 คลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงสีแดงและน้ำเงินมาก และสะท้อนแสงสีเขียว คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี ซี ดี และอี คลอโรฟิลล์ เอ มีสีเขียวแกมน้ำเงิน คลอโรฟิลล์ บี มีสีเขียวแกมเหลือง สาหร่ายทุกชนิดมีคลอโรฟิลล์เอเป็นรงควัตถุหลัก ส่วนคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ นั้นก็กระจายอยู่ในสาหร่ายแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.1 คลอโรฟิลล์เหล่านี้จะรวมอยู่กับโปรตีน และฝังอยู่ระหว่างโปรตีนกับไขมันของเยื่อคลอโรพลาสต์

คลอโรฟิลล์ เอ นั้นเป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงขั้นต้น สามารถดูดพลังงานแสงด้วยตนเอง ส่วนคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ จัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นที่ 2 คือ จะทำหน้าที่ดูดพลังงานแสงแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์เออีกครั้งหนึ่ง คลอโรฟิลล์ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ร้อนหรือเย็น อะซิโตน (acetone) ปีโตรเลียมสปิริต (petroleum spirit) หรือส่วนผสมของเมทานอล (methanol) และปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร

ตารางที่ 2.1 รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงและสิ่งมีชีวิตที่มีรงควัตถุชนิดนั้นๆ อยู่

ที่มา : ยิวดี, 2546

ชนิดของรงควัตถุ	สิ่งมีชีวิตที่พบ
Chlorophyll	
-chlorophyll a	พืชชั้นสูงและสาหร่ายทุกชนิด
-chlorophyll b	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว
-chlorophyll c	สาหร่ายสีน้ำตาลและไดอะตอม
-chlorophyll d	สาหร่ายสีแดง
Carotenoid	
-beta-carotene	พืชชั้นสูงและสาหร่ายส่วนใหญ่
-alpha-carotene	พืชส่วนใหญ่และสาหร่ายบางชนิด
-myxoxanthophyll	พืชชั้นสูง
Phycobilin	
-phycoerythrin	สาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด
-phycocyanin	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีแดงบางชนิด
-allophycocyanin	สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีแดง

2.6.5.2 แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

เป็นรงควัตถุที่พบในเซลล์ที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงทุกชนิด รงควัตถุกลุ่มนี้จะดูดแสงสีน้ำเงินบริเวณความยาวช่วงคลื่น 400-550 นาโนเมตร และสะท้อนแสงสีเหลืองและส้ม ในพืชชั้นสูงทั่วไปสีของคลอโรฟิลล์จะบังสีของแคโรทีนอยด์ในใบไว้ นอกจากนี้ในตอนที่ไม่แก่ใกล้จะร่วงเมื่อคลอโรฟิลล์สลายไปก็อาจจะเห็นสีเหลือง หรือส้มของแคโรทีนอยด์ในใบไม่อย่างชัดเจน สภาพเช่นนี้อาจเห็นได้บ้างในสาหร่าย แต่ไม่ชัดเจนเท่าพืชชั้นสูง แคโรทีนอยด์อยู่ในเยื่อของคลอโรพลาสต์ติดกับคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย แคโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ซึ่งจะแยกกล่าวไว้ดังนี้

2.6.5.2.1. แคโรทีน (carotene) เป็นรงควัตถุที่สะท้อนแสงสีส้ม จึงมองเห็นเป็นสีส้ม เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือ ประกอบด้วยออกซิเจนและคาร์บอนเท่านั้น ประกอบด้วย แอลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน และซีกมาแคโรทีน ชนิดที่พบในสาหร่ายทุกชนิด คือ เบต้าแคโรทีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5.2.2 แชนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นรงควัตถุที่สะท้อนแสงสีเหลือง จึงมองเห็นเป็นสีเหลือง แชนโทฟิลล์นี้อาจจะเรียกว่า แคโรทีนอล (carotenol) หรือออกซีแคโรทีน (oxycarotene) เพราะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเพิ่มเข้ามาโดยเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) แชนโทฟิลล์ประกอบด้วย ลูเทอีน (lutein) ฟลูโคแซนทิน (flucoxanthin) และมิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) แคโรทีนอยด์ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ ดังนั้นในการจะแยกแคโรทีนอยด์จากคลอโรฟิลล์เริ่มแรกต้องสกัดรงควัตถุทั้งหมดด้วยการใช้แอลกอฮอล์ร้อนแล้วปล่อยให้เย็นลง เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl₄) และน้ำกลั่นลงไปเพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ แล้วเขย่าเบาๆ สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนจะเป็นชั้นของแอลกอฮอล์ ซึ่งมีแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ ชั้นล่างจะเป็นคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ซึ่งมีคลอโรฟิลล์ละลายอยู่ แยกนำไปศึกษาได้ ถ้าจะแยกแคโรทีนออกจากแซนโทฟิลล์ ให้เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ลงไป แคโรทีนจะละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ แยกนำไปศึกษาต่อไป

2.6.5.2.3 ไฟโคบิลิน (phycobilin) เป็นรงควัตถุที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและสาหร่ายสีแดงไฟ โคบิลินจะรวมอยู่กับโปรตีนเป็นสารประกอบที่เรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliprotein) สามารถละลายได้ดีในน้ำ ไฟโคบิลินมี 3 ชนิดคือ

2.6.5.2.1 ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) พบในสาหร่ายสีแดงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด รงควัตถุชนิดนี้จะดูดแสงสีเขียวเหลือง ซึ่งคลอโรฟิลล์ไม่ดูด และไม่ดูดแสงสีแดงจึงเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ด้วยเหตุผลนี้พวกสาหร่ายสีแดงจึงอาศัยอยู่ในน้ำระดับลึกที่แสงสีแดงส่องลงไปไม่ถึง ยิ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ลึกมากก็จะมีปริมาณของไฟโคอีริทรินมากเมื่อเปรียบเทียบกับคลอโรฟิลล์ ทำให้สีของสาหร่ายเหล่านี้มีสีแดงยิ่งขึ้น

2.6.5.2.2 ไฟโคไซยานิน (phycocyanin)

2.6.5.2.3 อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin)

ทั้ง 2 ชนิดเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีแดง ดูดแสงช่วงคลื่นที่ยาวกว่ารงควัตถุสีแดง

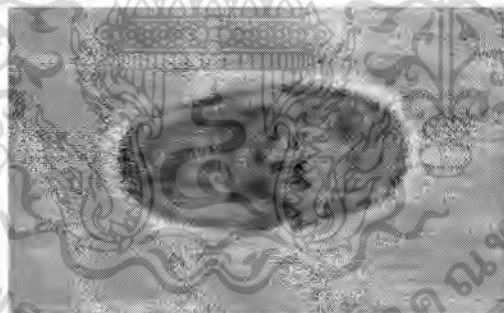
ทั้งแคโรทีนอยด์และไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุเสริม (accessory pigment) ทำหน้าที่ดูดพลังงานแสงแล้วถ่ายทอดต่อไปให้คลอโรฟิลล์ เอ เสมอ

2.7 *Aphanothece* sp. (ยูวดี, 2546)

เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสังเคราะห์แสงและสร้างอาหารได้เอง โดยผลพลอยได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสงนั้นมีก๊าซไฮโดรเจนรวมอยู่ด้วยซึ่งนำมาใช้พลังงานได้ มีลักษณะพิเศษคือ สามารถเจริญได้ในน้ำทะเล จัดอยู่ใน Division *Synechococcus* Genus *Aphanothece* โดยมีลักษณะดังนี้

Division Synechococcus เซลล์ที่มีรูปร่างแบบรูปไข่ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไม่มีซีทห่อหุ้ม เมื่อแบ่งเซลล์แล้วเซลล์อาจไม่หลุด แต่จะติดกันเป็นคู่ เซลล์มักมีขนาดใหญ่สีเขียวแกมน้ำเงินสด พบมากในน้ำพุร้อนและสามารถแยกออกมาให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ในเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้มีสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ และสารเพิ่มภูมิคุ้มกันบางชนิด เป็นต้น

Aphanothece sp. มีลักษณะคือ เซลล์จะอยู่รวมกันเป็นโคโลนี โดยมีซีทซึ่งเป็นสารเมือกหุ้ม โดยเซลล์ของ *Aphanothece* sp. จะมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกปลายมน เป็นท่อนสั้นๆ บางชนิดเซลล์จะเป็นรูปไข่ เรียงตัวกันอย่างหลวมๆ และมีเป็นจำนวนมากในโคโลนีหนึ่งๆ รูปร่างของโคโลนีไม่แน่นอนอาจกลมมนหรือโค้งคล้ายรวงเท้าและ รูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10. ภาพถ่าย *Aphanothece* sp.

ที่มา : รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 100 เท่า

2.8 การวิเคราะห์การถอดรหัส (สุรินทร์, 2545)

ในศึกษาชิ้นบางชิ้นที่มีการแสดงออกในช่วงเวลาและอวัยวะหนึ่ง มักจะใช้วิธีการศึกษาจาก mRNA ซึ่งในเซลล์ดังกล่าวนี้บางชนิดจะมีการสร้าง mRNA ชนิดหนึ่งมากกว่าชนิดอื่น ๆ ทำให้อัตราส่วนของ mRNA ชนิดนั้นมีอยู่ในอัตราสูง จึงเป็นข้อดีในกรณีที่ต้องการศึกษาชิ้นสำหรับ mRNA ชนิดนั้น เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ยังอ่อนอยู่จะมีการสร้างเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mRNA สำหรับฮีโมโกลบินจำนวนมาก ในท่อนำไปของไถ่จะมีการสร้าง mRNA สำหรับโปรตีน โอวัลบูมินในปริมาณมากถึง 100,000 โมเลกุลต่อเซลล์ ขณะที่มีการสร้าง mRNA ชนิดอื่น ๆ ประมาณ 12,507 ชนิด ในปริมาณรวมกันไม่ถึง 100,000 โมเลกุลต่อเซลล์ นั่นคือ มี mRNA สำหรับโปรตีนโอวัลบูมินอยู่มากกว่า 50เปอร์เซ็นต์ ของ mRNA ทั้งหมด นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่ได้จากการถอดรหัสมาจาก mRNA จะเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน เพราะ mRNA ที่อยู่ในไซโตพลาซึมได้ผ่านการตัดแต่งเอาอินทรอนออกเรียบร้อยแล้ว

ดีเอ็นเอที่ได้จากการถอดรหัสจาก mRNA นี้เรียกว่า complementary DNA (cDNA) อาศัยเอนไซม์หลายชนิด ขั้นแรกต้องศึกษาก่อนว่ายีนที่สนใจนั้นมีการแสดงออกในอวัยวะใด และในช่วงเวลาใด แล้วจึงแยกสกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วย PCR เรียกวิธีนี้ว่า RT-PCR ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ยีนที่แสดงออกในปริมาณน้อย ๆ ได้

2.9 วิธีการและหลักการของวิธีการ RT-PCR (Roger, 1999)

RT-PCR คือ reverse transcription-polymerase chain reaction เป็นการเปลี่ยนสาย mRNA ที่เราสนใจให้เป็น cDNA แล้วจึงเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction โดยในการเปลี่ยนสาย mRNA ให้เป็น cDNA นั้นทำได้เมื่อมีการค้นพบ RNA-dependent DNA polymerase ของไวรัสที่มีชื่อว่ารีเวอร์สทรานสคริปเทส (Reverse transcriptase: RTase) โดยนักไวรัสวิทยา 2 ท่านคือ Howard Temin และ David Baltimore ซึ่งได้รับโนเบลในปี 1975 ทางด้าน Physiology and medicine ร่วมกับ Renato Dulbecco เอนไซม์ RTase เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จาก Retrovirus ในการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่เพื่อที่จะนำเข้าร่วมกับจีโนมของเซลล์เจ้าบ้าน ในการเปลี่ยนสาย mRNA ให้เป็น cDNA มีขั้นตอนดังนี้

2.9.1 การสกัด mRNA และการทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากโครงสร้างของอาร์เอ็นเอไม่คงตัวเท่ากับสายดีเอ็นเอ การสกัดจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังมาก เนื่องจากอาร์เอ็นเอเป็นสายเดี่ยว และจะเกิดการย่อยสลายที่พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ทำให้ได้เป็นสายอาร์เอ็นเอชิ้นเล็กๆ มีสองปัจจัยที่ทำให้อาร์เอ็นเอไม่เสถียรคือ เอนไซม์ Endoribonuclease (RNase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรมาก ในมือของคนเรานั้นเป็นแหล่งของเอนไซม์ RNase ดังนั้นจึงควรสวมถุงมือขณะทำการสกัดอาร์เอ็นเอ และอุปกรณ์ในการทำการทดลองต่างๆ ควรปลอดเอนไซม์ RNase อย่างที่สองคืออาร์เอ็นเอทนต่ออุณหภูมิได้น้อยกว่าดีเอ็นเอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ เพราะตำแหน่ง 2'-OH ของน้ำตาลไรโบสจะทำให้พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จับกันเป็นวงจากพันธะ 2'-3' วงฟอสเฟตที่เกิดขึ้นจะเสถียรขึ้นเมื่อมีแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งแมกนีเซียมไอออนส่วนมากจะเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาชีวเคมี ดังนั้นถ้ามีเอนไซม์ RNase เข้ามารบกวนหรือเกิดการยับยั้งระหว่างการสกัดอาร์เอ็นเอก็จะเกิดการย่อยสลายของสายอาร์เอ็นเอ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะตกตะกอนในเอทานอลและสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ในการทำ mRNA ให้บริสุทธิ์จะต้องกำจัดดีเอ็นเอออกจาก Total RNA ในการทำจะใช้อุปกรณ์ต่างๆ ที่ปราศจาก RNase โดยใช้สารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (Diethyl pyrocarbonate: DEPC) 0.1 เปอร์เซ็นต์เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase นอกจากนี้ยังมีตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase (RNase inhibitor) 2 ชนิด ซึ่งสามารถเติมลงในสารละลายอาร์เอ็นเอได้โดยตรง ชนิดแรกคือ RNasin[®] (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) และอีกชนิดหนึ่งคือ Vanadyl-ribonucleoside ซึ่งทำหน้าที่เป็น inhibitory transition state analogues ของ RNase activity

2.9.2 การเปลี่ยนสาย mRNA ให้เป็น cDNA

นอกจากไพรเมอร์และคิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตจะจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA สายแรกแล้ว ในปฏิกิริยายังจำเป็นต้องมีเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (Reverse Transcriptase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจากสายอาร์เอ็นเอต้นแบบเอนไซม์ Avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase เป็นเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทสชนิดแรกที่ใช้ในปฏิกิริยาสังเคราะห์สาย cDNA เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์สายพอลิเมอร์ของดีเอ็นเอ (DNA polymerizing activity) และเร่งการย่อยสลายสายอาร์เอ็นเอ (RNase activity) เรียกว่า RNaseH ซึ่งเร่งการย่อยสลายสายอาร์เอ็นเอต้นแบบที่จับเป็นสายคู่อยู่กับสายของดีเอ็นเอ กิจกรรมการย่อยสลายอาร์เอ็นเอนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการสร้างดีเอ็นเอสายคู่ในการสังเคราะห์จีโนมของ retrovirus แต่กิจกรรมของ RNase H activity ในการสังเคราะห์สาย cDNA ในหลอดทดลองจะทำให้เกิดการตัดส่วนปลาย 3' ของสาย cDNA ออกไปบางส่วนเนื่องจากมีคุณสมบัติ Endogenous RNaseH activity ของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงมีการใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จาก Moloney murine leukemia virus (MMLV) ซึ่งเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้เป็นในปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA เนื่องจาก MMLV-RTase ที่ได้ผ่านขบวนการทางพันธุวิศวกรรมจะปราศจากกิจกรรมของ RNaseH ทำให้สาย cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่ถูกตัดบางส่วนออกไป

2.10 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (นภา, 2547)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่นๆ เช่น การหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเจลสตาร์ (gel star) จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นด้วยการวาวแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่าง (shape) ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มักจะทำในตัวกลาง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซิส หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวกลาง เช่น พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) สตาร์ชเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล (starch gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก็คืออิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

2.10.1 ปัจจัยในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า

ในการแยกดีเอ็นเอหรือ อาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำให้บัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 ซึ่งที่ pH นี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบเนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.10.1.1 ขนาดและโครงรูป (conformation) ของดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอผู้นั้นอยู่ใน โครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่ โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้อย่างชัดเจน ได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงรูปต่างๆ กัน เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆ อยู่ในรูปที่เรียกว่า ซูเปอร์คอยล์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.11 นั่นคือดีเอ็นเอที่อยู่ในรูปเกลียวขดแน่น จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขณะที่อยู่ในรูปคลายเกลียวนั่นเอง

2.10.1.2 ความเข้มข้นของอะกาโรส (agarose concentration)

ขณะที่อิเล็กโทรโฟรีซิส ดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือ เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิส จะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส เจลนั้นดังสมการ

$$\text{Log} \mu = \text{Log} \mu_0 - K_r C$$

μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

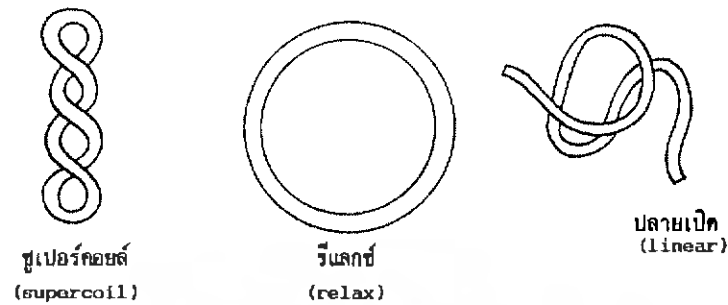
μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าที่คงที่ขึ้นกับขนาดและ โครงรูปของ ดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดมีรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่า สัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอผู้นั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้น หนึ่ง ๆ ของอะกาโรสเจล ค่า \log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ใน ลักษณะผกผันกับการเคลื่อนที่ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.12 จากภาพจะเห็นได้ว่าทุกๆ ความเข้มข้น ของอะกาโรสเจลนั้น จะมีอยู่เพียงช่วงเดียวเท่านั้นที่การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลจะมีความ สัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงกับค่า \log ขนาดของโมเลกุล ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะต้อง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ ปรึกษาหารือใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม ดังรูปที่ 2.12 ขนาดของดีเอ็นเอที่มีการเคลื่อนที่แบบแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลได้รวบรวมไว้ใน ตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.11. ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของพลาสมิดชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในโครงรูปต่างๆ กัน 3 รูปแบบคือ ซูเปอร์คอยล์ (supercoiled) รีแลกซ์ (relaxed) และปลายเปิด (linear) ที่มา : นภา, 2547

2.10.1.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 – 5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากเป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้ดังตารางที่ 2.2 จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบสการที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์/เซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่มีการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

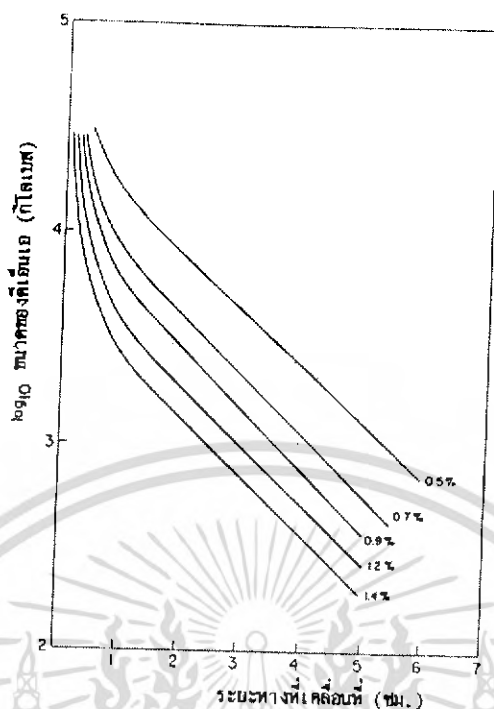
ที่มา : นภา, 2547

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60 – 5
0.6	20 – 1
0.7	10 – 0.8
0.9	7 – 0.5
1.2	6 – 0.4
1.5	4 – 0.2
2.0	3 – 0.1

หมายเหตุ : ตารางนี้ใช้ได้เฉพาะกับดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในรูปปลายเปิด และต้องทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0 โดยใช้ความต่างศักย์เป็น 1 โวลต์/เซนติเมตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์สูงๆ เพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 °C แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ 4°C ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำลงจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น



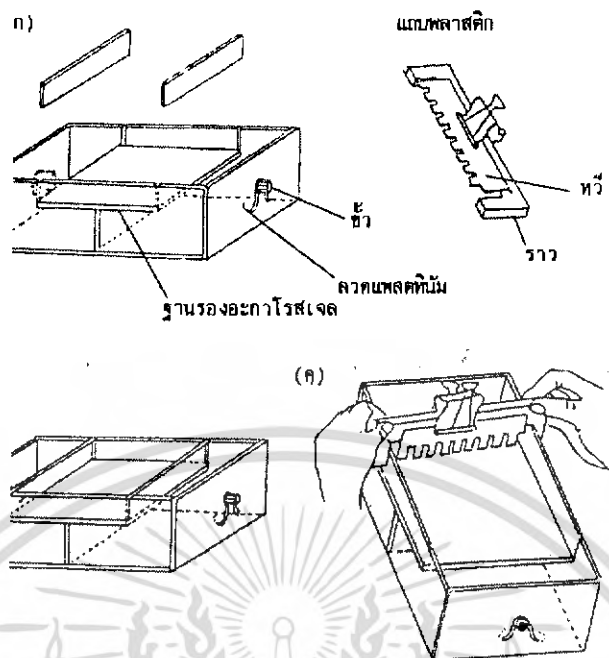
รูปที่ 2.12 ขนาดของดีเอ็นเอและระยะทางการเคลื่อนที่ในการสวามไฟฟ้าที่ความเข้มข้นของเจลเปอร์เซ็นต์ต่างๆ

ที่มา : นภา, 2547

เจลแอมเบอร์จะทำจากพลาสติก มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมมีขนาดต่างๆ กัน ประกอบขึ้นด้วยส่วนต่างๆ คือ (ดูรูปที่ 2.13)

1. ขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว เป็นส่วนที่จะต่อกับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า จากขั้วไฟฟ้าจะมีลวดแพลตตินัม (platinum wire) คือไปย้งค้ำในของเจลแอมเบอร์
2. แผ่นพลาสติกซึ่งจะใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แผ่นพลาสติกนี้ยึดติดแน่นกับขอบสองด้านของเจลแอมเบอร์ ระดับของแผ่นพลาสติกนี้จะอยู่ต่ำกว่าขอบบนสุดของเจลแอมเบอร์ 2 – 3 เซนติเมตร แต่อยู่สูงกว่าลวดแพลตตินัม (ส่วนของขั้วไฟฟ้า)
3. แถบพลาสติก 2 แถบ ซึ่งมีขนาดพอดีกับปลายเปิดของแผ่นพลาสติกที่ใช้เป็นฐานรองอะกาโรสเจล แถบพลาสติกนี้สามารถใส่หรือถอดจากเจลแอมเบอร์ได้เมื่อต้องการ
4. ราวพลาสติกรูปตัวยู 1 อัน ราวนี้สามารถครอบลงพอดีกับด้านกว้างของเจลแอมเบอร์ใช้เป็นที่ยึดขวนหวี (comb)
5. หวีเป็นอุปกรณ์ที่จะทำให้เกิดช่องหรือหลุมบนอะกาโรสเจลเพื่อใช้สำหรับหยอดสารตัวอย่างที่ต้องการแยก หวีแต่ละอันจะมีจำนวนซี่หวีและขนาดกว้างยาวของซี่หวีต่างๆ กันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับความต้องการในการใช้สอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 ก. ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของเจลแอมเบอร์

ข. ภาพแสดงการประกอบแถบพลาสติก

ค. ภาพแสดงการประกอบราวและหัว

ที่มา : นภา, 2547

2.10.2 ส่วนประกอบของเทคนิคอะกาโรสเจลิอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.10.2.1 บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสเจลิอิเล็กโตรโฟรีซิส มีหลายชนิด ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.3 โดยปกติเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ไประยะเวลาหนึ่งขั้วบวกจะเพิ่มความเป็นด่าง (pH สูงขึ้น) ส่วนขั้วลบจะเพิ่มความเป็นกรด (pH ต่ำลง) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งจะเกิดขึ้นให้ได้มากที่สุด จึงนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุ (capacity) สูง แต่เมื่อจำเป็นที่จะต้องใช้บัฟเฟอร์ที่มีความจุน้อย ระหว่างอิเล็กโตรโฟรีซิส จะต้องทำการผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองเข้าด้วยกันโดยสม่ำเสมอหรือตลอดเวลา เพื่อปรับให้ pH ของบัฟเฟอร์ที่ขั้วทั้งสองเท่ากัน

ตารางที่ 2.3 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ที่มา : นภา, 2547

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้น	จำนวนสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่เข้มข้น 1 ลิตร
Tris-acctate, pH 8.0 (TA)	40 mM Tris-OH 20 mM acetic acid 2 mM EDTA	50X* : 242 g tris base 57.1 ml glacial acetic acid 37.2 g Na ₂ EDTA
Tris-borate, pH 8.3 (TB)	89 mM Tris-OH 89 mM boric acid 2.5 mM EDTA	10X** : 108 g tris base 55 g boric acid 9.3 g Na ₂ EDTA
Tris-phosphate, pH 8.5 (TP)	40 mM Tris-OH 20 mM phoaphoric acid 2.5 mM EDTA	10X** : 108 g Tris base 15.5 ml 85เปอร์เซ็นต์ H ₃ PO ₄ (1.679 g/ml) 9.3 g Na ₂ EDTA

* 50X คือบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 50 เท่าของความเข้มข้นปกติที่ใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

**10X คือบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นปกติที่ใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มักจะเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่จะใช้จริง 10 เท่า (10X) ขึ้นไป เมื่อต้องการใช้จึงจะนำมาทำให้เจือจางลง จำนวนสารที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงจำนวน 1 ลิตร แสดงไว้ในตารางที่ 2.3

Tris-borate (TB) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แอมบิเอินเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำโดยทั่วไป

Tris-phosphate (TP) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูงคล้าย Tris-borate แถบดีเอ็นเอที่แยกโดยใช้บัฟเฟอร์นี้จะคมชัดดีเช่นใช้ Tris-borate แต่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 เท่า จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้จึงเก็บไว้ไม่ได้นาน

Tris-acetate (TA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ ดังนั้นระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิส จะต้องคอยผสมบัฟเฟอร์ระหว่างหัวสองเข้าด้วยกัน เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญในบัฟเฟอร์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นการที่จะช่วยให้เก็บบัฟเฟอร์นี้ได้ยาวนานขึ้น มักทำให้ไว้เชื้อโดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อนที่จะนำไปเก็บที่ 4 °C การใช้บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีข้อดีเหนือบัฟเฟอร์อื่นๆ คือ สามารถทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงๆ ได้ โดยที่อะกาโรสเจลจะไม่ร้อน

2.10.2.2 อะการ์ (agar) และอะกาโรส (agarose)

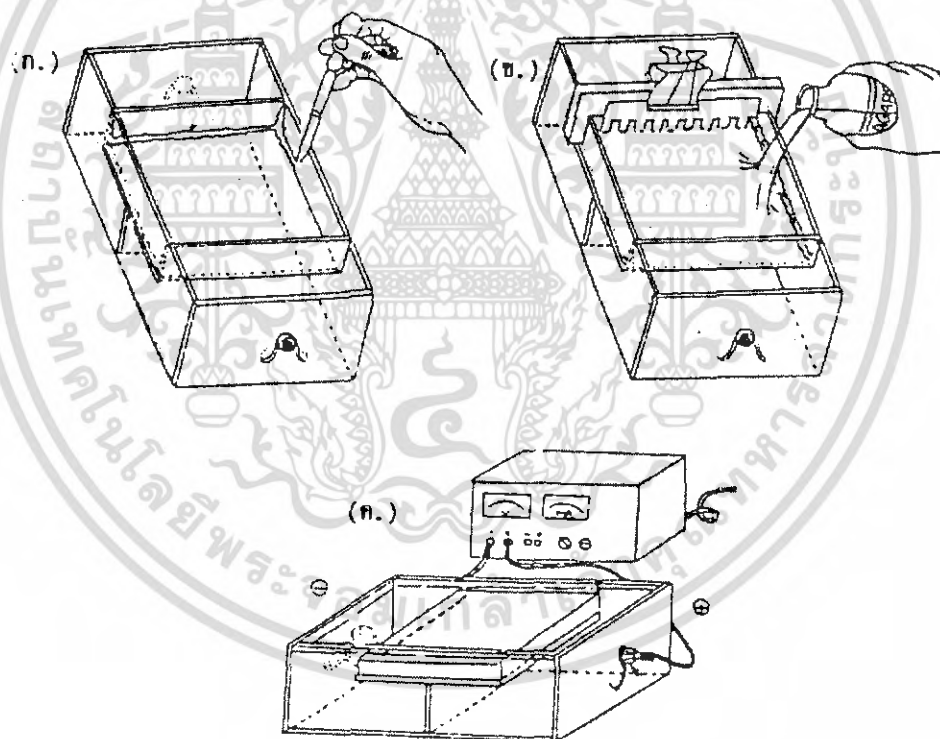
อะการ์ที่มีขายอยู่ทั่วไปแยกได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายชนิดต่างๆ ความบริสุทธิ์ และองค์ประกอบทางเคมีของอะการ์แต่ละชนิดที่เตรียมได้จะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการที่ใช้เตรียม และชนิดของเซลล์ที่ใช้เตรียม ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบ โครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนของอะการ์ แต่ทราบว่าประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) อย่างน้อย 2 ชนิดคือ อะกาโรส (agarose) และอะกาโรเพกติน (agarpectin) ซึ่งสามารถแยกจากกันได้หลังการทำอะเซทิลเลชัน (acetylation) เพราะเฉพาะอะกาโรสอะซิเตต (agarose acetate) เท่านั้นที่ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม (chloroform)

อะกาโรสเป็นสายพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยกาแลคโตส (galactose) และอนุพันธ์ของกาแลคโตส โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลอิสระของน้ำตาลดังกล่าว ทำให้สายอะกาโรสพันไขว้ (crosslinked) กันได้ เป็นเหตุให้อะกาโรสในสารละลายกลายเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ความเข้มข้นของอะกาโรสในสารละลายจะเป็นตัวกำหนดขนาดของรูพรุน กล่าวคือถ้าความเข้มข้นสูงขนาดรูพรุนจะเล็ก อะกาโรสที่เตรียมจากแหล่งที่ต่างกันจะมีคุณสมบัติด้านต่างๆ เช่น ความหยุ่น จุดหลอม ความยืดหยุ่น และปริมาณสารอื่นๆ ที่ปะปน โดยเฉพาะซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ (sulfate polysaccharide) แตกต่างกันไป อะกาโรสที่เตรียมขามีหลายเกรด แม้แต่ในเกรดเดียวกันแต่เตรียมคนละรุ่นก็อาจจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปบ้าง สารซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ที่ปนอยู่ในอะกาโรสมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้ดีเอ็นเอเป็นซับสเตรท เช่น ดีเอ็นเอไลเกส ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสและเรสทริกชันเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชะ (elute) ออกจากอะกาโรสเจลจะต้องทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยกำจัดซัลเฟตพอลิแซคคาไรด์ออกไปก่อนที่จะนำไปใช้เป็นซับสเตรทสำหรับเอนไซม์บางชนิด

2.10.2.2.1 การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะมีความเข้มข้นระหว่าง 0.5 – 1.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมอะกาโรสเจลได้โดยเติมผงอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ นำไปต้มในอ่างน้ำจนเดือด (ไม่ควรต้มสารละลายอะกาโรสบนเตาโดยตรงเพราะจะไหม้หรือเดือดล้นภาชนะได้ง่าย) ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C จึงนำไปเทในเจลแชนเบอร์

การเทเจลลงในเจลแชนเบอร์เริ่มโดยใส่แถบพลาสติกปิดด้านปลายเปิดทั้งสองของฐานรองเจล ขาขอบรอบๆ บริเวณที่จะเทเจลด้วยเจลจำนวนน้อยแล้วทิ้งให้เจลแข็งตัว (รูปที่ 2.14 ก.) ใส่หัวโดยให้ปลายชี้หัวสูบจากฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.14 ข.) แล้วจึงค่อยๆ ดึงหัวและแถบพลาสติกออกจากเจลแชนเบอร์ ถึงขั้นตอนนี้จะได้อะกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการแยก (รูปที่ 2.14 ค.) ก่อนที่จะหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมที่เตรียมไว้ เทบัฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1-3 มิลลิเมตร



รูปที่ 2.14 ภาพแสดงการเทอะกาโรสเจลลงในเจลแชนเบอร์

- (ก.) เทเจลจำนวนน้อยรอบๆ บริเวณที่จะเทเจล
- (ข.) ใส่หัวและเทเจล
- (ค.) อะกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอ

ที่มา : นภา, 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.2.2 การหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอ

เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่างดีเอ็นเอที่หยอดลงหลุมพุ่งขึ้นมา และเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุลบและมีขนาดโมเลกุลเล็กในสนามไฟฟ้าระหว่างเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงจะผสมสารตัวอย่างดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) ซึ่งประกอบด้วยสารที่ให้ความหนืดซึ่งอาจเป็นกลีเซอรอล (glycerol) ซูโครสหรือไฟคอลล์ (Ficoll) โดยให้กลีเซอรอลมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3-9 เปอร์เซ็นต์ ซูโครสมีความเข้มข้นเป็น 6-10 เปอร์เซ็นต์ และไฟคอลล์มีความเข้มข้นเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สีติดตามยังประกอบไปด้วย 0.025 เปอร์เซ็นต์ ของสารมีสีที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีประจุลบ ซึ่งอาจจะเป็นบรอมฟินอลบลู (bromphenol blue) หรือบรอมฟินอลกรีน (bromphenol green) และสารที่ดีเนเจอร์ (denature) โปรตีน เช่น SDS หรือยูเรีย สีติดตามมักจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้จะผสมกับสารตัวอย่างดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:5 แล้วจึงนำไปหยอดลงในหลุมอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้โดยใช้ไมโครปิเปต

โดยปกติบรอมฟินอลบลูจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุดในสนามไฟฟ้าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ แต่เมื่อใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบสหรือ 0.5 กิโลเบส ดีเอ็นเอเหล่านั้นจะเคลื่อนที่ได้เท่ากับหรือเร็วกว่าบรอมฟินอลบลู เนื่องจากบรอมฟินอลบลูสามารถดูดแสงที่เกิดจากการวาวแสงของเอทidium โบรไมด์ (ethidium bromide) ที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่ จึงทำให้แถบดีเอ็นเอบริเวณที่มีสี บรอมฟินอลบลูไม่สามารถตรวจโดยการช้อมด้วยเอทidium โบรไมด์ได้ ฉะนั้นกรณีที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์มีขนาดเล็ก (ต่ำกว่า 0.5 กิโลเบส) การหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอจะทำโดยไม่ใช่บรอมฟินอลบลูลงในสีติดตาม

ปริมาณของดีเอ็นเอที่จะใช้แยกควรจะไม่ต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ จึงจะเห็นแถบวาวแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าหลังช้อมด้วยเอทidium โบรไมด์ แต่ปริมาณที่ใช้อาจต่ำลงเป็น 1-10 นาโนกรัมต่อหนึ่งแถบ เมื่อตรวจแถบของดีเอ็นเอโดยการถ่ายรูป ถ้าใส่ดีเอ็นเอต่อหนึ่งแถบมากเกินไป (> 300 นาโนกรัม) แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะไม่คมชัดและเกิดหาง (tailing) ขึ้นได้ ผลของการใส่สารตัวอย่างดีเอ็นเอมากเกินไปนี้จะแสดงผลกับชั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่าขนาดเล็ก

2.10.2.3 การหาขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ

เมื่อดีเอ็นเอชนิดต่างๆ อยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเหล่านั้นระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดังนั้นวิธีที่ง่ายที่สุดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่การเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอนั้นๆ กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล กราฟมาตรฐานซึ่งเขียนขึ้นจากค่าระยะทางของการเคลื่อนที่ และค่า \log ของน้ำหนักหรือขนาดโมเลกุล อาจจะมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลที่หาจากบริเวณที่เป็นส่วนโค้งจะคลาดเคลื่อนได้มากกว่าที่หาได้จากช่วงที่เป็นเส้นตรง

ในการหาขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์และดีเอ็นเอมาตรฐานจะต้องอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้กันส่วนใหญ่เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของเฟจแลมบ์ดา (λ phage) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานเหล่านี้จะอยู่ในรูปปลายเปิด ฉะนั้นการหาขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของพลาสมิดโดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานดังกล่าว จะต้องทำโดยตัดพลาสมิดเพียงหนึ่งแห่งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเสียก่อน เพื่อเปลี่ยนให้พลาสมิดอยู่ในรูปปลายเปิดเช่นกัน



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรุณ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อาหารเพาะเลี้ยงและสารเคมี

- 3.2.1 อาหารเพาะเลี้ยง *Aphanothece* sp. คืออาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium (ภาคผนวก ก)
- 3.2.2 สารละลาย Break Buffer (ภาคผนวก ข)
- 3.2.3 สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร
- 3.2.4 สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.2.5 สารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.6 สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.7 สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์
- 3.2.8 อะกาโรส (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.9 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-boric EDTA
- 3.2.10 เจลสตาร์ (gel star) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.11 สีซ้อมติเอ็นเอ (Tracking Dye)
- 3.2.12 น้ำที่มีสารละลาย Diethylpyrocarbonate 0.1% (DEPC)
- 3.2.13 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (Promega, USA)
- 3.2.14 สารละลายดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Promega, USA)

3.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 เอนไซม์

- 3.4.1 สารละลายเอนไซม์ *Taq* Polymerase (Promega, USA)
- 3.4.2 สารละลายเอนไซม์ DNaseI (Promega, USA)
- 3.4.3 สารละลายเอนไซม์ RNase Inhibitor (Promega, USA)
- 3.4.4 สารละลายเอนไซม์ MMuLV Reverse transcriptase (Promega, USA)

3.5 อุปกรณ์

- 3.5.1 เครื่องแก้ว (Glass equipment)
- 3.5.2 เม็ดแก้ว (Glass bead)
- 3.5.3 หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.5.4 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.5.5 เครื่องเขย่า (Rotary shaker) สำหรับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย
- 3.5.6 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (ISSCO, HS123, Thailand)
- 3.5.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Hirayama, Hiclave HV-50, Japan)
- 3.5.8 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.5.9 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genies 2, USA)
- 3.5.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle, 2383K, Germany)
- 3.5.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง
- 3.5.12 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1601, Japan)
- 3.5.13 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer, DNA thermal cycler480, USA)
- 3.5.14 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Pharmacia, GNA100, Sweden)
- 3.5.15 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Power supply) (Bio-Rad, model 1000, USA)
- 3.5.16 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Cyberscan, 2000, Singapore)
- 3.5.17 กล้องถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) (SynGene, Bts-20.M, Germany)
- 3.5.18 โปรแกรมวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจล GeneTools (SynGene, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *hoxH* และ ยีน 16S rRNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxH* ของ *Aphanothece* sp. มาทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน และใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน โดยในการทดลองได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ Rhyd-Apha1 ไพรเมอร์ Rhyd-Apha2 และไพรเมอร์ Rhyd-Apha3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 3 แสดงดังตารางที่ 3.1 โดยในการทดลองจะใช้ไพรเมอร์ Rhyd-Apha3 เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนสาย mRNA ให้เป็นสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน (RT-Primer) และใช้ไพรเมอร์ Rhyd-Apha1 และ ไพรเมอร์ Rhyd-Apha2 เป็น Forward primer และ Reverse primer ในปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน *hoxH* ตามลำดับ ซึ่งจะทำได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 291 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไซยาโนแบคทีเรียมาทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ Ana16 และไพรเมอร์ AnaR ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้ง 2 แสดงดังตารางที่ 3.1 โดยในการทดลองจะใช้ไพรเมอร์ AnaR เป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนสาย mRNA ให้เป็นสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน (RT-Primer) และใช้ไพรเมอร์ Ana16 เป็น Forward primer และไพรเมอร์ AnaR เป็น Reverse primer ในปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน 16S rRNA ซึ่งจะทำได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 288 คู่เบส

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Rhyd-Apha1 (Forward primer)	5'-TAA AGG ACC GAC GCG ATA CA-3'
Rhyd-Apha2 (Reverse primer)	5'-AAT GGT GAA AGA GGG TTC CC-3'
Rhyd-Apha3 (RT-primer)	5'-CAA TGA TCA GGT TCA CTT TT-3'
Ana16 (Forward primer)	5'- ACC CGT ACC CGA AAC CGA -3'
AnaR (Reverse primer)	5'- CCG CCG TTC TCC GGG GCT -3'

3.6.2 การเพาะเลี้ยงและการชักนำแบบต่างๆ

3.6.2.1 การชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยง *Aphanothece* sp. ในอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium (ภาคผนวก ก) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 3 ส่วน โดยแบ่งสารละลายเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วจึงนำสารละลายเซลล์ไปชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังนี้

- หลอดที่ 1 ชักนำด้วยอากาศ (หลอดควบคุม)
- หลอดที่ 2 ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- หลอดที่ 3 ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน

จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายส่วนของเซลล์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ เพื่อนำไปสกัด Total RNA ต่อไป

3.6.2.2 การชักนำโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเหล็ก

ทำการเพาะเลี้ยง *Aphanothece* sp. ในอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium ที่ปราศจากเหล็ก นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 5 ภาชนะเท่าๆ กัน แล้วนำสารละลายเซลล์มาเติมเหล็ก จนมีความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเป็น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อสกัด Total RNA ต่อไป

3.6.2.3 การชักนำโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของนิกเกิล

ทำการเพาะเลี้ยง *Aphanothece* sp. ในอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 4 ภาชนะเท่าๆ กัน แล้วนำมาเติมสารละลายนิกเกิล จนมีความเข้มข้นของนิกเกิลในอาหารเป็น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อสกัด Total RNA ต่อไป

3.6.3 การสกัด Total RNA

3.6.3.1 การเก็บเกี่ยวเซลล์

ทำการย้ายสารละลายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงย้ายเซลล์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการย้ายส่วนของสารละลายออก

3.6.3.2 การสกัดดีเอ็นเอและ Total RNA

ทำการเติมเม็ดแก้ว (glass bead) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีเซลล์ จากนั้นเติมสารละลาย break buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลายสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 3 นาที 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที ทำเช่นนี้สลับกันจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการย้ายส่วนของสารละลายใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ สกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร อีก 1 ครั้ง นำไป vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนชั้นน้ำใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ซึ่งจะทำได้สารละลายที่มีดีเอ็นเอและ Total RNA ทำการเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และสารละลายเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 เท่า ของสารละลายดีเอ็นเอและ Total RNA ลงในสารละลายดีเอ็นเอและ Total RNA ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงทำการบีบอัดส่วนของสารละลายออก ทำการล้างตะกอนที่ได้โดยใช้สารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบีบอัดส่วนของสารละลายออกแล้วปล่อยให้ตะกอนของดีเอ็นเอและ Total RNA แห้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.6.3.3 การตกตะกอน Total RNA

นำสารละลายดีเอ็นเอและ Total RNA มาทำการตกตะกอน Total RNA โดยเติมสารละลายลิเทียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายดีเอ็นเอและ Total RNA ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เปิดส่วนของสารละลายทิ้ง ทำการล้างตะกอน Total RNA ด้วยสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเปิดย้ายส่วนของสารละลายทิ้ง แล้วปล่อยให้ตะกอนของ Total RNA แห้ง จากนั้นทำการละลายตะกอน Total RNA ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และความบริสุทธิ์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA โดยเจือจางสารละลาย Total RNA ลงในคิวเวตควอดซ์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารละลาย Total RNA (ภาคผนวก จ)

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยสารละลาย Total RNA ที่มีความบริสุทธิ์ จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าวอยู่ในช่วง 1.8-2.0

3.6.5 การย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA อาจทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เป็นผลจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมิใช่ผลจากอาร์เอ็นเอที่ผ่านการเปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอ จึงต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ให้หมดก่อน โดยนำ Total RNA ปริมาตร 10 ไมโครกรัม มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน โดยใช้เอนไซม์ DNaseI โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 3.2 และเติมน้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์ จนมีปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปตรวจสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยปฏิกิริยาลูคิเฟอไรสในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI

สารละลาย	ปริมาณ
Total RNA	10 ไมโครกรัม
บัฟเฟอร์ 10 เท่า	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ RNase Inhibitor (4 units/ μ L)	2 ไมโครลิตร
เอนไซม์ DNaseI (1 units/ μ L)	3 ไมโครลิตร

3.6.6 การทดสอบการย่อยด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการตรวจสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยนำสารละลาย Total RNA ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ DNaseI มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวมีปริมาณมาก ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังที่แสดงใน ตารางที่ 3.3 และใช้สภาวะดัง ตารางที่ 3.4 โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. แทนสารละลาย Total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris boric EDTA (TBE buffer) 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย รองนอุณหภูมิกลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมเจลสตาร์ (gel star) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยแกว่งเบาๆ เทใส่แม่พิมพ์ ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลใส่ลงในอ่าง (chamber) เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้ 100 bp ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจล

ตารางที่ 3.3 แสดงองค์ประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์

สารละลาย	ปริมาณ
สารละลาย Total RNA ที่ผ่านการย่อย	1 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
MgCl ₂	0.075 ไมโครโมล
dNTPs	0.010 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ Ana16 (Forward primer)	0.0125 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ AnaR (Reverse primer)	0.0125 ไมโครโมล
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Taq</i> Polymerase	2.5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	55	30 วินาที
Extension	72	15 วินาที
Final Extension	72	10 นาที

3.6.7 การสร้างสาย cDNA โดยใช้เทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชัน

นำสารละลาย Total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการสังเคราะห์สาย cDNA โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 2 ยีนคือ ยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* โดยนำสารละลาย Total RNA มาผสมกับสารละลายไพรเมอร์ AnaR (RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA) และสารละลายไพรเมอร์ Rhyd-Apha3 (RT-primer mujจำเพาะต่อยีน *hoxH*) โดยมีองค์ประกอบของสารละลายแสดงดังตารางที่ 3.5 จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแบ่งสารละลายใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์จำนวน 2 หลอด ปริมาณหลอดละ 5 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันดังแสดงในตารางที่ 3.6 นำสารละลายผสมดังกล่าวไปปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้สารละลายมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส MMuLV RT (200 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เกิดปฏิกิริยาและเติมน้ำที่มีสารละลาย DEPC ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แทนสารละลายเอนไซม์ลงในหลอดควบคุม จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ และนำไปปั่นต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วจึงนำสารละลายที่เอื้อนเอื้อที่ได้ไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบของสารละลาย Total RNA และไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน

สารละลาย	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
Total RNA/DNase I	8
น้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์	1
ไพรเมอร์ AnaR 5 มิลลิโมลาร์	1
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha3 5 มิลลิโมลาร์	1
ปริมาตรสุทธิ	11

3.6.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอติเมอเรส โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ส่วนประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA แสดงดังตารางที่ 3.7 และตารางที่ 3.8 ตามลำดับ และส่วนประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* แสดงดังตารางที่ 3.9 และตารางที่ 3.10 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ปฏิกิริยาจะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดตัวควบคุม (positive control)

ตารางที่ 3.6 สารละลายต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน

สารละลาย	หลอดที่เกิดปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)	หลอดควบคุม (ไมโครลิตร)
สารละลายผสม Total RNA และไพรเมอร์	5	5
MMuLV RT 10x buffer	2	2
RNase Inhibitor 4 units/ μ L	1	1
dNTPs 10 มิลลิโมลาร์	1	1
MMuLV RT 20 units/ μ L	1	-
น้ำที่มีสารละลาย DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์	-	1
ปริมาตรสุทธิ	10	10

ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA

สารละลาย	ปริมาณ
สารละลายดีเอ็นเอ	1 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
MgCl ₂	0.075 ไมโครโมล
dNTPs	0.010 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ Ana16 (Forward primer)	0.0125 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ AnaR (Reverse primer)	0.0125 ไมโครโมล
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Taq</i> Polymerase	2.5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.8 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที } 35 รอบ
Annealing	55	
Extension	72	
Final Extension	72	10 นาที

ตารางที่ 3.9 ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสที่จำเพาะต่อยีน *hoxH*

สารละลาย	ปริมาณ
สารละลายดีเอ็นเอ	8 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
MgCl ₂	0.075 ไมโครโมล
dNTPs	0.010 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha1 (Forward primer)	0.0125 ไมโครโมล
ไพรเมอร์ Rhyd-Apha2 (Reverse primer)	0.0125 ไมโครโมล
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	27.5 ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>Taq</i> Polymerase	2.5 ยูนิต
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

3.6.9 การวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 1 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris boric EDTA (TBE buffer) ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย รอจนอุณหภูมิตกลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเจลสตาร์ (gel star) ผสมให้เข้ากันโดยแกว่งเบาๆ เทใส่แม่พิมพ์ ที่ไว้จนกระทั่งเจลแข็ง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลใส่ลงในอ่าง (chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ TBE จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายรูปเจล

ตารางที่ 3.10 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial Denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	50	30 วินาที
Extension	72	30 วินาที
Final Extension	72	10 นาที

3.6.10 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

นำภาพถ่ายอะกาโรสเจลที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Gene Tools ในการเปรียบเทียบความเข้มของแถบของดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรสกับความเข้มของแถบแบนของดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งทราบปริมาณดีเอ็นเอที่แน่นอน จากนั้นนำปริมาณดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมดังกล่าวมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* และยีน 16S rRNA เพื่อใช้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *hoxH* ของ *Aphanothece* sp. ซึ่งถูกชักนำด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aphanothece* sp. ด้วยอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ภาคผนวก ฉ) พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันแล้วนำไปชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ ได้แก่ อากาศ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซอาร์กอน ตามลำดับ โดยเป่าก๊าซลงในสารละลายเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการสกัด Total RNA แล้วจึงนำสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ต่อไป

4.1.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิกและโปรตีนดูดกลืนไว้ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ Total RNA พบว่าสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะมีปริมาณ Total RNA ดังแสดงในตารางที่ 4.2 นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะ มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 ซึ่งยอมรับได้ว่ามีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย จึงนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

เนื่องจากขั้นตอนการสกัด Total RNA ทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ทำให้ปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ชนิดของก๊าซที่ใช้ในการชักนำ	ปริมาณสารละลาย Total RNA (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
อากาศ	1	0.072	0.038
ไนโตรเจน	1	0.050	0.026
อาร์กอน	1	0.054	0.028

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

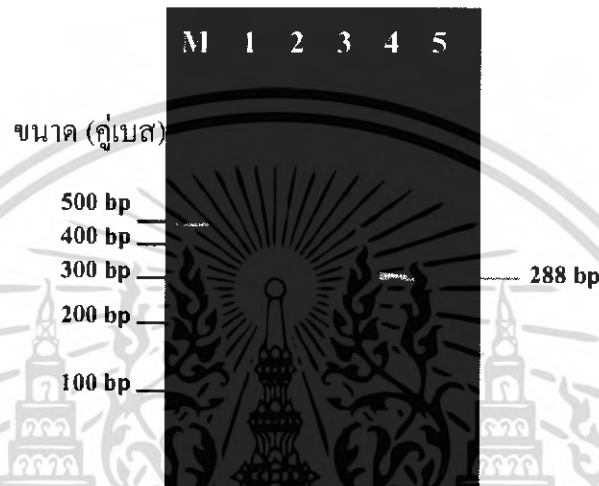
ชนิดของก๊าซที่ใช้ในการชักนำ	ปริมาณ Total RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร
อากาศ	2.88	1.89
ไนโตรเจน	2.00	1.92
อาร์กอน	2.16	1.93

4.1.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย Total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.5 จากนั้นจึงนำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. แทนสารละลาย Total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพเจล ซึ่งให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากรูปจะพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย Total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบเพียงแถบ 1 แถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาด 288 คู่เบส จากรูปแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป แต่ถ้ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น แสดงว่าการย่อยสายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด



รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- | | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยอากาศ |
| 2 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน |
| 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน |
| 4 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 5 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

เมื่อนำสารละลาย Total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และ ยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจล ผลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA แสดงดังรูปที่ 4.2 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส และแต่ละแถบมีความเข้มค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 เท่านั้น และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, และ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นในหลอดควบคุมปฏิกิริยาแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ผลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* แสดงดังในรูปที่ 4.3 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 เท่านั้น และแต่ละแถบมีความเข้มแตกต่างกัน โดยในเลนที่ 1 จะมีความเข้มน้อยกว่า เลนที่ 3 และ 5 ซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำด้วยอากาศ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซอาร์กอนตามลำดับ ส่วนเลนที่ 7 คือผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จิโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanotheca* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4 และ 6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในหลอดควบคุมปฏิกิริยาเกิดขึ้นแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากผลการทดลองจึงสามารถนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- | | |
|---------|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ |
| 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน |
| 5 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน |
| 7 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 8 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |
| 2, 4, 6 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วย อากาศ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซอาร์กอนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ |



รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยอากาศ
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน
- 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 8 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วย อากาศ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซอาร์กอนเป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

4.1.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

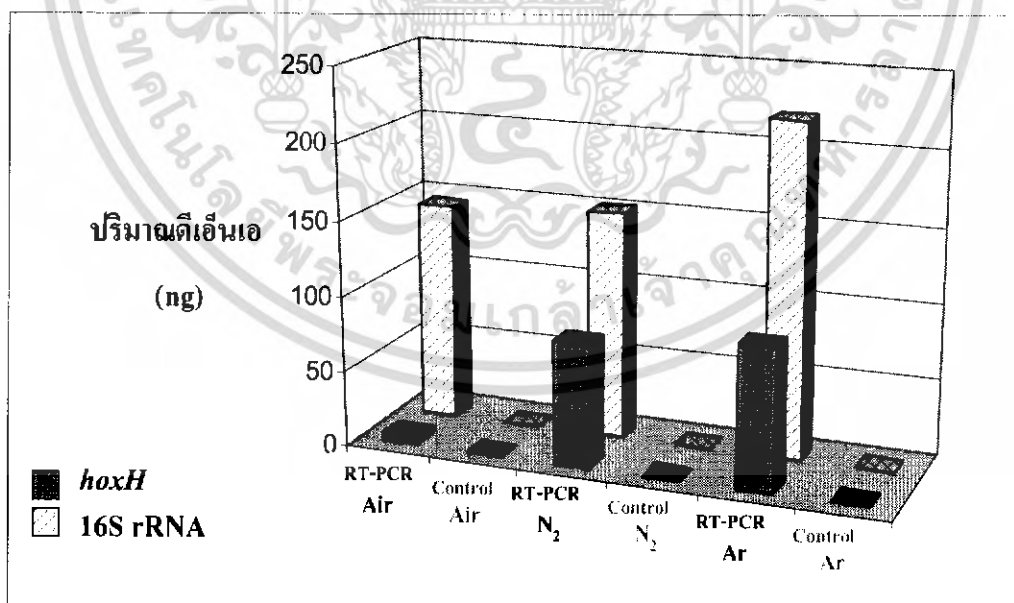
นำรูปถ่ายอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools จะให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 และนำค่าไปวาดกราฟแสดงดังรูปที่ 4.4 โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน ที่ถูกชักนำด้วยก๊าซต่างชนิดกันจะมีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5 จากรูปจะพบว่าในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนจะมีค่าของอัตราส่วนดังกล่าวสูงกว่าสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนและอากาศ ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะการเป่าก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอนลงในสารละลายเซลล์ ทำให้เกิดสถานะที่ปราศจากออกซิเจน จึงมีผลให้ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน

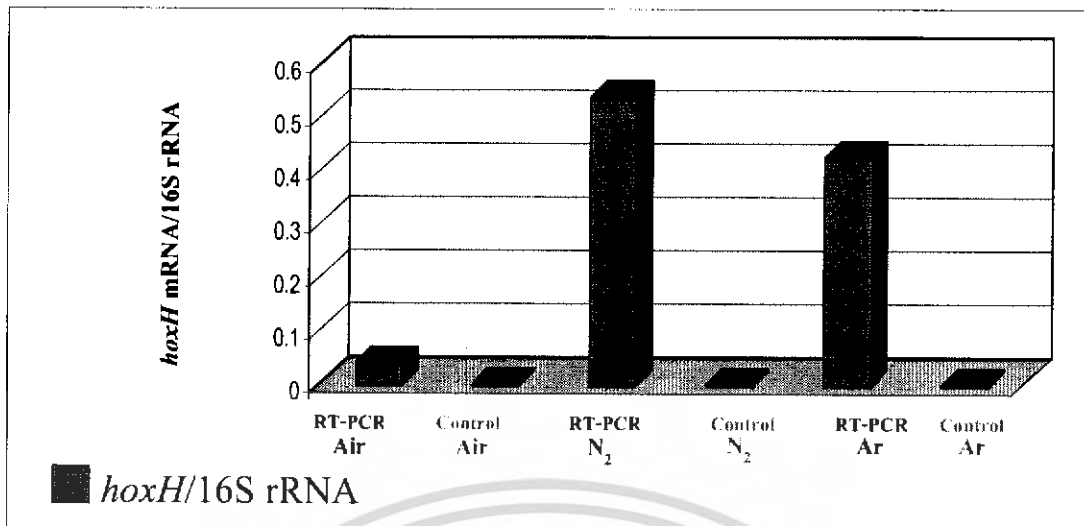
ตารางที่ 4.3 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซต่างชนิดกัน

ชนิดของ ก๊าซ	ปริมาณดีเอ็นเอของ ยีน 16S rRNA (ng)	ปริมาณดีเอ็นเอของ ยีน <i>hoxH</i> (ng)	อัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของ ยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA
อากาศ	145.0	5.31	0.037
ไนโตรเจน	151.52	81.45	0.538
อาร์กอน	220.32	93.50	0.424



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสถานะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณจีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ

4.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aphanothece* sp. ด้วยอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 2.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 4 ฟลาस्क แล้วนำไปชักนำด้วยนิกเกิลที่ปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเติมนิกเกิลในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นของนิกเกิลในอาหารเป็น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการสกัด Total RNA ออกจากเซลล์ จากนั้นจึงนำสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ต่อไป

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิกและโปรตีนดูดกลืนไว้ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ Total RNA พบว่าสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะ มีปริมาณ Total RNA ดังแสดงในตารางที่ 4.5 นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากการแปรผันความเข้มข้นของนิกเกิลทั้ง 4 ความเข้มข้น มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 ซึ่งยอมรับได้ว่ามีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย จึงนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

เนื่องจากขั้นตอนการสกัด Total RNA ทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ทำให้ปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วย นิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ นิกเกิลในอาหาร (ไมโครโมลาร์)	ปริมาณสารละลาย Total RNA (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
0	3	0.061	0.034
1	5	0.061	0.033
2	5	0.076	0.041
5	3	0.060	0.033

4.2.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย Total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.5 จากนั้นจึงนำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. แทนสารละลาย Total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพเจล ซึ่งให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.6 จากรูปจะพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย Total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบเพียง 1 แถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 288 คู่เบส จากรูปแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป แต่ถ้ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น แสดงว่าการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

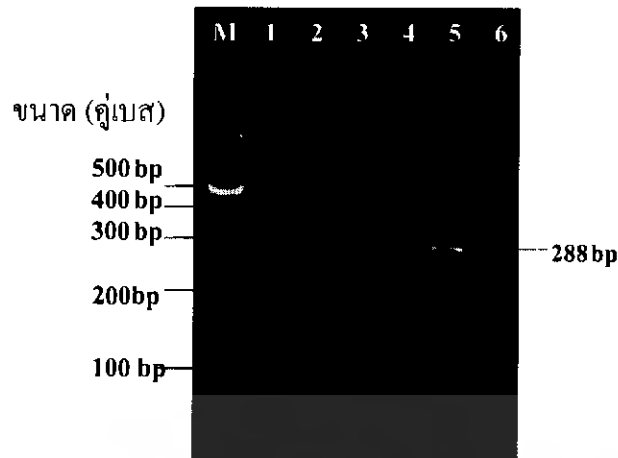
ความเข้มข้นของนิกเกิล ในอาหาร (ไมโครโมลาร์)	ปริมาณ Total RNA (ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร)	อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโน เมตรต่อ 280 นาโนเมตร
0	0.810	1.79
1	0.488	1.85
2	0.608	1.85
5	0.800	1.82

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

เมื่อนำสารละลาย Total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และ ยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนดังกล่าวโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังแสดงในวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายรูปเจล ผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA แสดงดังรูปที่ 4.7 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะ

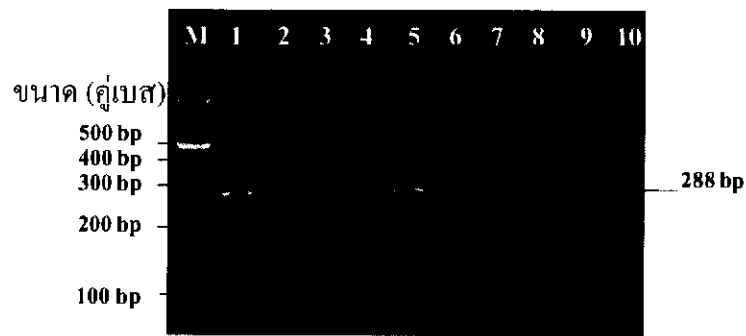
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 เท่านั้น โดยเลนที่ 1, 3, 5 และ 7 คือดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิเกิลความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 5 ตามลำดับ ส่วนเลนที่ 9 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6 และ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยาแต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* แสดงดังในรูปที่ 4.8 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* 1 แถบที่มีขนาดเท่ากันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 3 และเลนที่ 9 เท่านั้น โดยในเลนที่ 3 คือปริมาณดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ส่วนเลนที่ 9 คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6 และ 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยาแต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ในเลนที่ 1, 5, และ 7 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิเกิลความเข้มข้น 0, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ จากผลการทดลองจึงนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



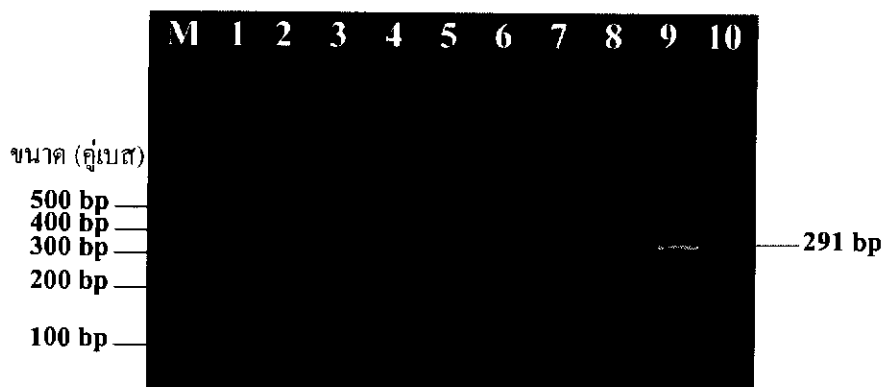
รูปที่ 4.6 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- | | |
|---|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0 μM |
| 2 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 μM |
| 3 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 2 μM |
| 4 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 5 μM |
| 5 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 6 | ผลิตรหัสจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- | | |
|------------|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ |
| 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ |
| 5 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ |
| 7 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ |
| 9 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 10 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อนำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |
| 2, 4, 6, 8 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสภาวะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ |



รูปที่ 4.8 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอ
ต้นแบบต่างๆ

M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair Ladder
1	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย นิกเกิลความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์
3	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย นิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์
5	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย นิกเกิลความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์
7	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย นิกเกิลความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์
9	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
10	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
2, 4, 6, 8	ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน <i>hoxH</i> เมื่อใช้สารละลายจาก หลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

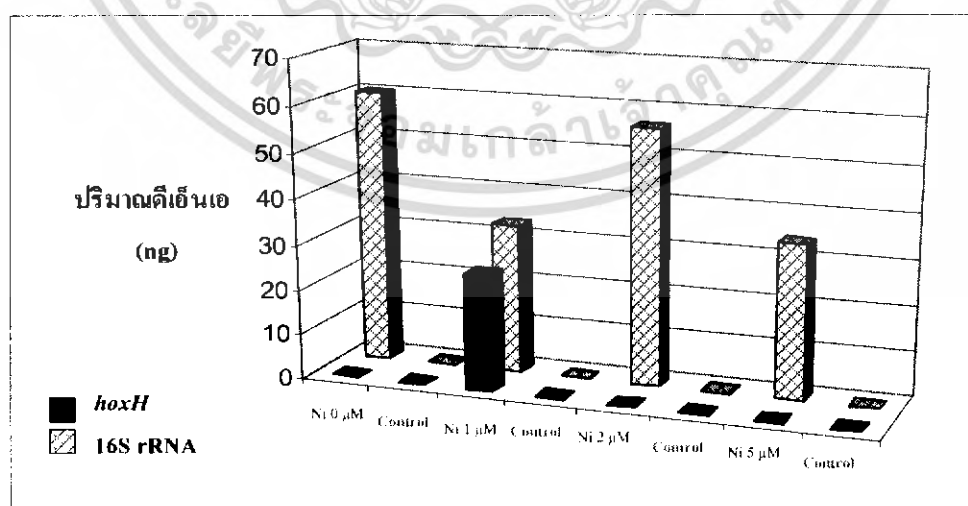
4.2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลดด้วยโปรแกรม Gene Tools

นำรูปถ่ายอะกาโรสเจลดของผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และ
ยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools จะให้ผลดังแสดงในตาราง
ที่ 4.6 นำค่าไปวาดกราฟ แสดงดังรูปที่ 4.9 โดยพบปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ในสถานะที่มี
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์เท่านั้น และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน มาหาค่าอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ต่อยีน *hoxH* แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.10 จะพบว่าในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าว แต่ในสภาวะที่ชักนำด้วยนิกเกิลระดับความเข้มข้น 0, 2 และ 5 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นดังกล่าวมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมาก หรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ Total RNA ที่ใช้ในการทดลองให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

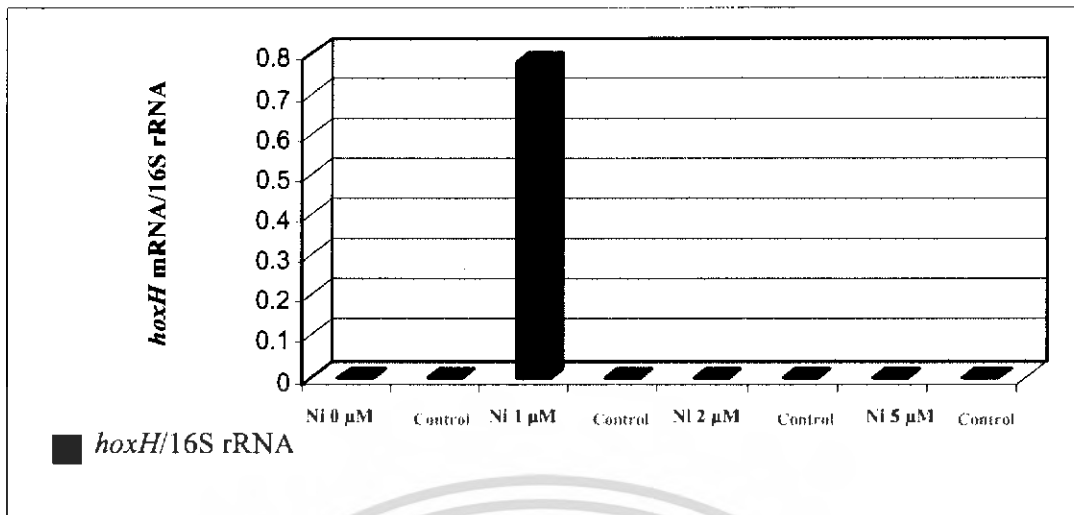
ตารางที่ 4.6 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของนิกเกิล (μM)	ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA (ng)	ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> (ng)	อัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA
0	60.20	-	-
1	33.19	25.93	0.781
2	56.34	-	-
5	34.19	-	-



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยด้วยนิกเกิลความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ *Aphanothece* sp. ด้วยอาหารเหลวสูตร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁ medium ที่ปราศจากเหล็ก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำสารละลายเซลล์ส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ พบว่าสารละลายเซลล์ดังกล่าวมีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 1.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 5 ฟลาस्क แล้วนำไปชักนำโดยเติมสารละลายเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยง โดยให้ความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเป็น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการสกัด Total RNA ออกจากเซลล์ จากนั้นจึงนำสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรตีนโดยนำสารละลายดังกล่าวมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

เนื่องจากขั้นตอนการสกัด Total RNA ทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ทำให้ปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิกและโปรตีนดูดกลืนไว้ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ Total RNA จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8 นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะ มีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วงประมาณ 1.8-2.0 ซึ่งยอมรับได้มีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย จึงนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

ตารางที่ 4.7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็ก ความ

เข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของเหล็ก (นาโนโมลาร์)	ปริมาณสารละลาย Total RNA (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
0	5	0.052	0.027
12.5	10	0.058	0.028
25	7	0.072	0.035
50	5	0.088	0.048
100	5	0.084	0.045

4.3.2 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย Total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.5 จากนั้นจึงนำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนแล้วมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanotheca* sp. แทนสารละลาย Total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจล ซึ่งให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.11 จากรูปจะพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้สารละลาย Total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบเพียง 1 แถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาดของผลิตภัณฑ์ประมาณ 288 คู่เบส จากรูปแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป แต่ถ้ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นแสดงว่าการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตรที่สกัดได้จากเซลล์ที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

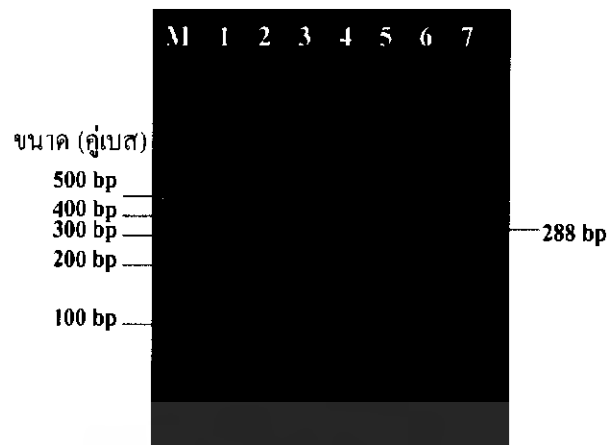
ความเข้มข้นของเหล็ก (นาโนโมลาร์)	ปริมาณ Total RNA (ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร)	อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโน เมตรต่อ 280 นาโนเมตร
0	0.416	1.93
12.5	0.232	2.07
25	0.411	2.06
50	0.704	1.83
100	0.672	1.87

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

เมื่อนำสารละลาย Total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และ ยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังแสดงในขั้นตอนการทดลองที่ 3.6.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

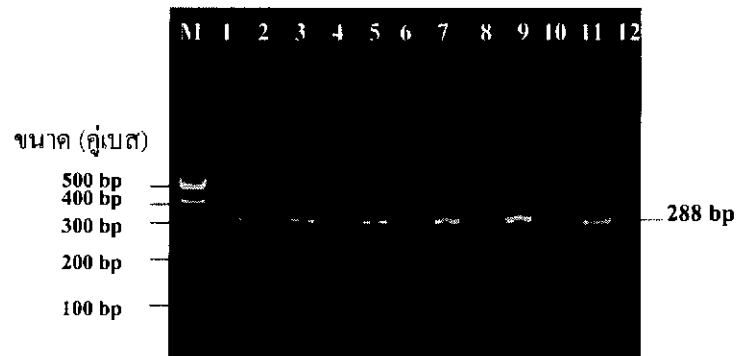
เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจด ผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA แสดงดังรูปที่ 4.12 โดยพบแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA 1 แถบ ที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 เท่านั้น โดยเลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 คือ ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับ ส่วนเลนที่ 11 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* แสดงดังในรูปที่ 4.13 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* ที่มีขนาดเท่ากันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 7 และเลนที่ 11 เท่านั้น โดยในเลนที่ 7 คือดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ ส่วนเลนที่ 11 คือผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้นแสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ยังไม่พบแถบในเลนที่ 1, 3, 5 และ 9 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของสภาวะที่มีชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 นาโนโมลาร์ตามลำดับ จากผลการทดลองจึงนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.11 ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอ
ต้นแบบต่างๆ

- | | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0 nM |
| 2 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 12.5 nM |
| 3 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 25 nM |
| 4 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 nM |
| 5 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 100 nM |
| 6 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 7 | ผลิตรหัส PCR จากปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอ
ต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0 นาโนโมลาร์
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 12.5 นาโนโมลาร์
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 25 นาโนโมลาร์
- 7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์
- 9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์
- 11 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 12 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6, 8, 10 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ



รูปที่ 4.13 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 0 นาโนโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 12.5 นาโนโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 25 นาโนโมลาร์
- 7 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์
- 9 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสถานะที่ถูกชักนำด้วย เหล็กความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์
- 11 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 12 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4, 6, 8, 10 ผลิตรหัส PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลาย จากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของสถานะที่ถูกชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 นาโนโมลาร์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ

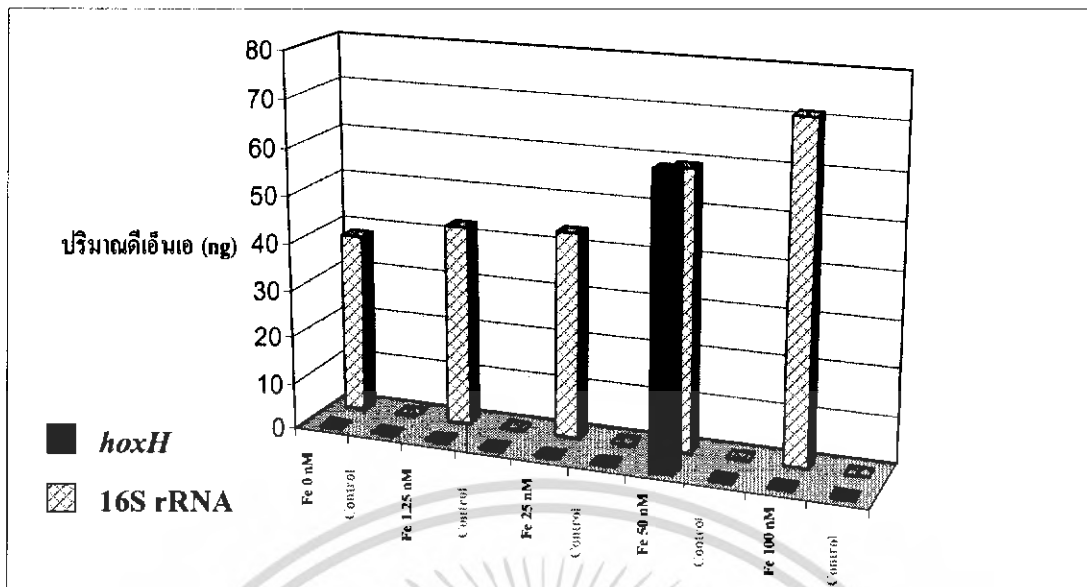
4.3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

นำรูปถ่ายอะกาโรสเจลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools จะให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 และนำไปวาดกราฟแสดงดังรูปที่ 4.14 โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าจะพบปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์เท่านั้น และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.15 จะพบว่าในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ จะมีค่าอัตราส่วนดังกล่าว แต่สภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 นาโนโมลาร์ ไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้น 0, 12.5, 25 และ 100 นาโนโมลาร์ มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมากหรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ Total RNA ที่ใช้ในการทดลองให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

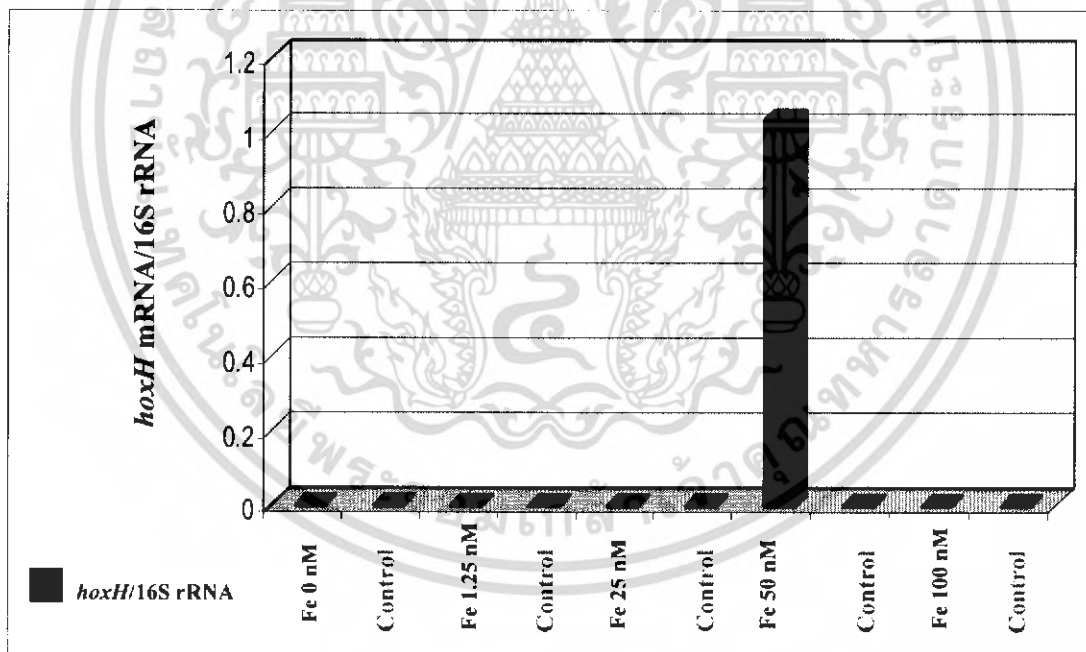
ตารางที่ 4.9 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเหล็ก (μM)	ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA (ng)	ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> (ng)	อัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA
0	38.38	-	-
12.5	42.70	-	-
25	43.81	-	-
50	59.34	61.55	1.037
100	71.31	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เมื่อทำการชักนำหลายสภาวะ ร่วมกันเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ที่มีชักนำด้วยก๊าซ การชักนำด้วยนิกเกิล และการชักนำด้วยเหล็ก พบว่า ก๊าซไนโตรเจน นิกเกิลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เหล็กความเข้มข้น 50 นาโนโมลาร์ มีผลทำให้มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เพิ่มสูงขึ้น จึงทำการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ของการเพาะเลี้ยงที่มีการชักนำหลายสภาวะร่วมกันเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ โดยนำสารละลายเซลล์ *Aphanothece* sp. มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวและล้างเซลล์ด้วยอาหารที่ปราศจากเหล็ก โดยแบ่งสารละลายเซลล์ออกมาบางส่วนเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์พบว่าสารละลายเซลล์มีปริมาณคลอโรฟิลล์เท่ากับ 3.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงเจือจางเซลล์ลงในอาหารใหม่ที่ปราศจากเหล็กแบ่งสารละลายเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปเติมสารละลายเหล็ก จนมีความเข้มข้นของเหล็กเป็น 23 นาโนโมลาร์ (เทียบเท่ากับความเข้มข้นของเหล็กในอาหารเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ) ส่วนสารละลายเซลล์ส่วนที่ 2 นำไปเติมสารละลายเหล็กและสารละลายนิกเกิล จนมีความเข้มข้นของเหล็กและนิกเกิลเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายเซลล์ทั้ง 2 ส่วนไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวสารละลายเซลล์ส่วนที่ 1 เพื่อทำการสกัด Total RNA ต่อไป ส่วนสารละลายเซลล์ส่วนที่ 2 นำไปชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการสกัด Total RNA ต่อไป

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวมาทำการเจือจางและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิกและโปรตีนดูดกลืนไว้ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรมาคำนวณหาปริมาณ Total RNA ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.11 จากนั้นนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

เนื่องจากขั้นตอนการสกัด Total RNA ทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงช่วยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ RNase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ทำให้ปริมาณ Total RNA ที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Total RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติและเซลล์ที่ถูกชักนำ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

สภาวะ	ปริมาณสารละลาย Total RNA (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	
		ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
สภาวะปกติ	1	0.060	0.030
สภาวะที่มีการชักนำ	1	0.066	0.027

ตารางที่ 4.11 ปริมาณ Total RNA และอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร ที่สกัดได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงที่สภาวะปกติและเซลล์ที่ถูกชักนำ

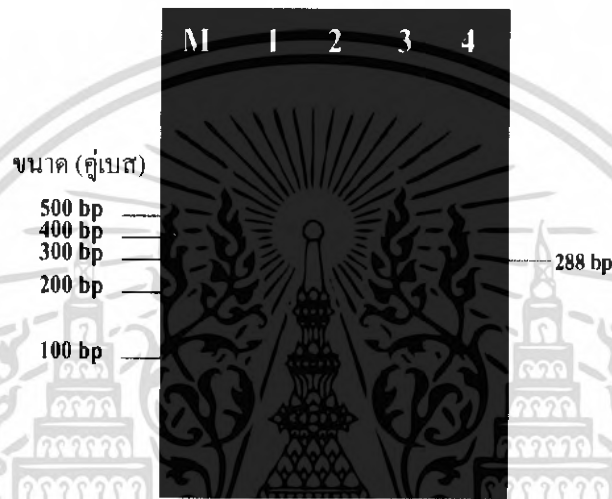
สภาวะ	ปริมาณ Total RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร
สภาวะปกติ	2.40	2.00
สภาวะที่มีการชักนำ	2.64	2.44

4.4.2 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรส

เมื่อนำสารละลาย Total RNA มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.5 จากนั้นจึงนำสารละลายที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรสที่จำเพาะต่อยีน 16S rDNA และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. แทนสารละลาย Total RNA เป็นตัวควบคุม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจล ซึ่งให้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16 จากรูปจะพบว่าไม่มีแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรสเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้สารละลาย Total RNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จะพบเพียงแถบ 1 แถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้จีโนมดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีขนาด 288 คู่เบส จากรูปแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จึงสามารถนำสารละลาย Total RNA ดังกล่าวไปทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอในขั้นต่อไป แต่ถ้ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้น แสดงว่าการย่อยสลายดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด



รูปที่ 4.16 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rDNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

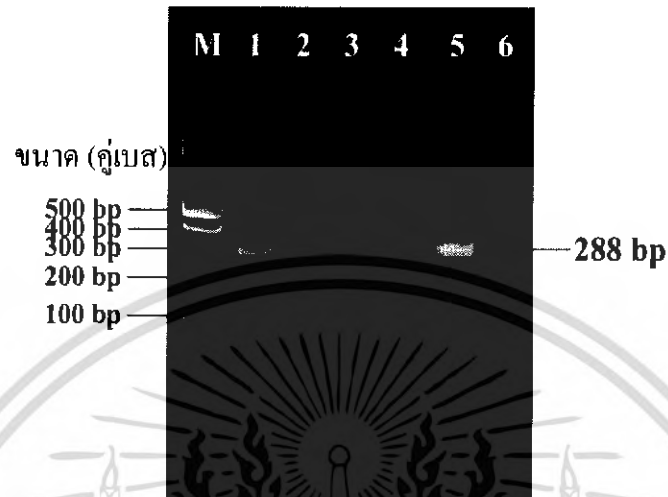
- | | |
|---|---|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน ด้วยเอนไซม์ DNaseI ในการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติ |
| 2 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของ Total RNA ที่ผ่านการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน ด้วยเอนไซม์ DNaseI ในสภาวะที่มีชักนำ |
| 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 4 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้น้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |

4.4.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH*

เมื่อนำสารละลาย Total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันเพื่อเปลี่ยน mRNA ให้เป็นดีเอ็นเอ โดยใช้ RT-Primer ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA (ไพรเมอร์ AnaR) และ ยีน *hoxH* (Rhyd-Apha3) จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน โดยใช้ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมกับยีนทั้งสองดังแสดงในวิธีการทดลองในขั้นตอนที่ 3.6.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 2.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปเจล ผลของผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA แสดงดังรูปที่ 4.17 จากรูปจะพบแถบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน 16S rRNA ที่มีขนาดเท่ากันคือมีขนาดประมาณ 288 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 1, 3 และ 5 เท่านั้น และไม่พบแถบในเลนที่ 2 และ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยาแต่ถ้าพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้น แสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอคั้นแบบ ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* แสดงดังในรูปที่ 4.18 จากรูปจะพบแถบแบนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* ที่มีระดับเดียวกันซึ่งมีขนาดประมาณ 291 คู่เบส โดยจะพบเฉพาะในเลนที่ 3 และ 5 เท่านั้น โดยเลนที่ 3 คือปริมาณดีเอ็นเอของสภาวะที่มีการชักนำ ส่วนเลนที่ 5 คือผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอคั้นแบบ และไม่พบแถบในเลนที่ 2 และ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้ใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ MMuLV RT ซึ่งทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสาย mRNA เป็นสายดีเอ็นเอ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมปฏิกิริยา แต่ถ้าผลการทดลองพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสเกิดขึ้น แสดงว่าสารละลาย Total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นผลของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย Total RNA ไม่ใช่ผลที่เกิดจากการใช้ดีเอ็นเอที่เปลี่ยนจากสาย mRNA เป็นดีเอ็นเอคั้นแบบ นอกจากนี้ยัง

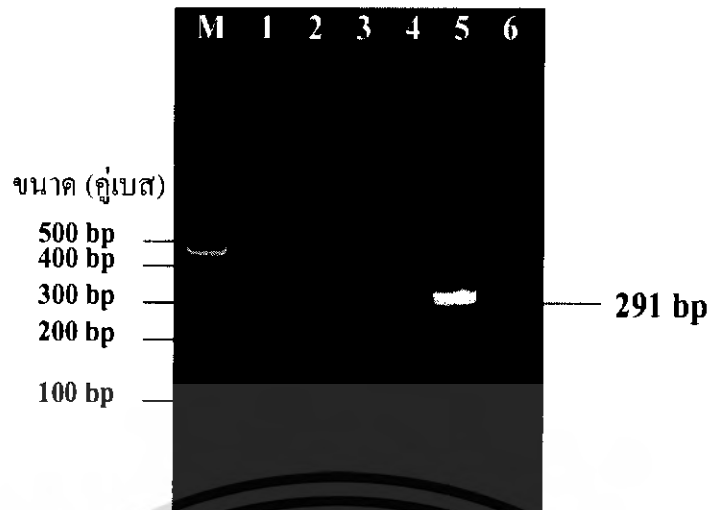
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่พบแถบในเลนที่ 1 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติ จากผลการทดลองจึงนำรูปอะกาโรสเจลทั้งสองรูปไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.17 ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันของยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ

- | | |
|------|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder |
| 1 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติ |
| 3 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA ในสภาวะมีการชักนำ |
| 5 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) |
| 6 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control) |
| 2, 4 | ผลิตภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติและสภาวะที่มีถูกชักนำเป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ |



รูปที่ 4.18 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *hoxH* จากดีเอ็นเอ
ต้นแบบต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ
- 3 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ในสภาวะที่มีการชักนำ
- 5 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control)
- 6 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเมื่อนำน้ำแทนดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2, 4 ผลึกภัณฑ์ PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* เมื่อใช้สารละลายจากหลอดควบคุมปฏิกิริยาของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่มีถูกชักนำเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ

4.4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากภาพถ่ายเจลอะกาโรสด้วยโปรแกรม Gene Tools

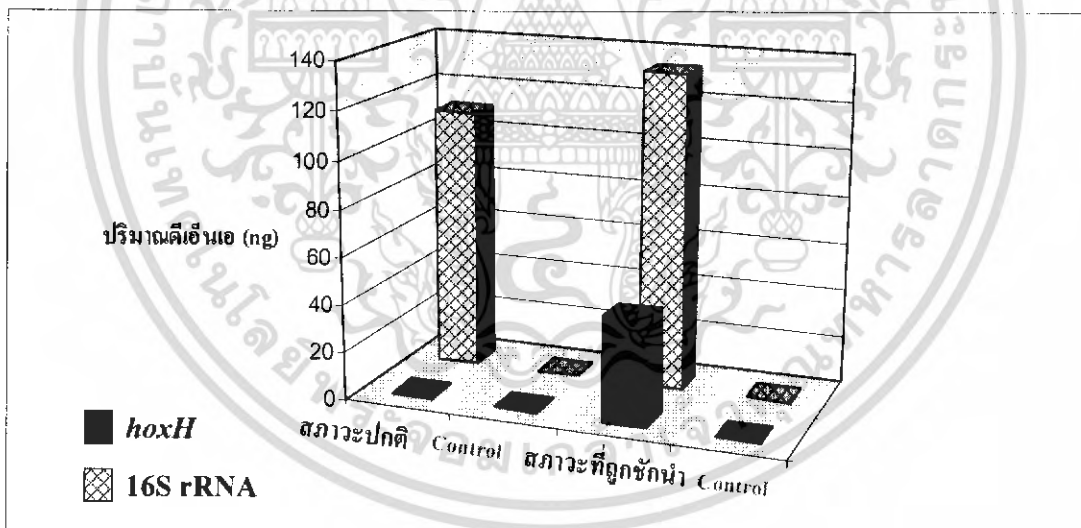
นำรูปถ่ายเจลอะกาโรสของผลึกภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน 16S rRNA และยีน *hoxH* ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools จะให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12 และนำค่าไปวาดกราฟ แสดงดังรูปที่ 4.19 โดยจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน ที่ถูกชักนำด้วยสภาวะที่แตกต่างกันจะมีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และเมื่อนำปริมาณดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีนมาหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อยีน 16S rRNA แสดงดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.20 จะพบว่าในสภาวะที่มีการชักนำจะมีค่าของอัตราส่วนดังกล่าวสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติไม่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ในสภาวะการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงปกติ มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ต่ำมากหรือไม่มีการถอดรหัส ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *hoxH* ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ Total RNA ที่ใช้ในการทดลองให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

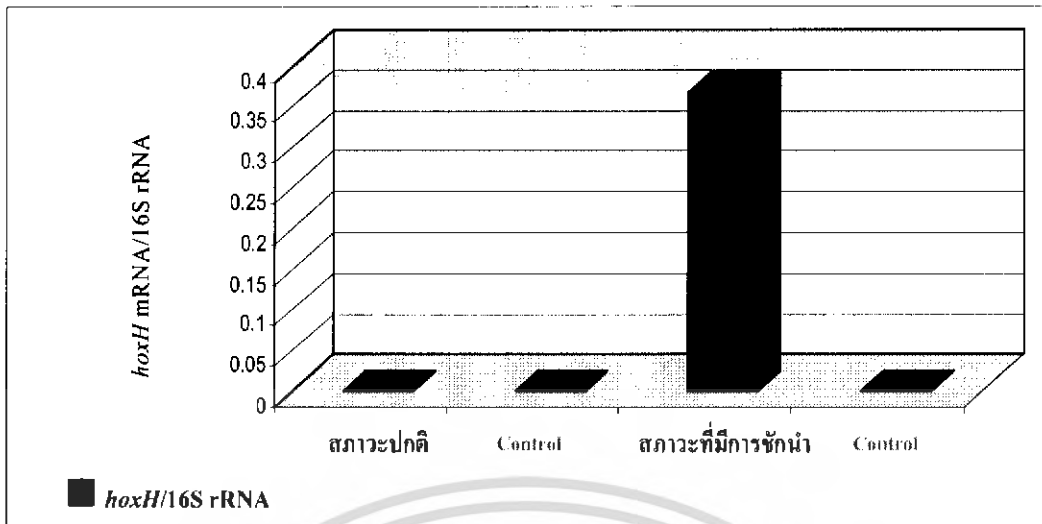
ตารางที่ 4.12 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene Tools และอัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่มีการชักนำ

สภาวะ	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng)		อัตราส่วนปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxH</i> ต่อ ยีน 16S rRNA
	ยีน 16S rRNA	ยีน <i>hoxH</i>	
สภาวะปกติ	110.58	-	-
สภาวะที่มีการชักนำ	133.09	43.84	0.329



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และ ยีน *hoxH* ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะปกติกับสภาวะที่มีการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงอัตราส่วนของปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ต่อ ยีน 16S rRNA ที่ได้จากเทคนิค RT-PCR ของการเพาะเลี้ยงด้วยสถานะปกติกับสถานะที่มีการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* สูงที่สุดคือ การชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน การเติมเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำและสภาวะปกติ พบว่าเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีการชักนำเท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ของ RT-PCR ของยีน *hoxH*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลที่ได้จากการทดลองในโครงการนี้พบว่า การชักนำด้วยสภาวะที่ได้ทำการศึกษาามีผลทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิด *Aphanothece* sp. มีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* เพิ่มสูงขึ้น จึงสามารถนำผลการทดลองดังกล่าว ไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- ยูวดี พิรพรพิศาล. 2546. สาขาวิชา (Phycology). พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่:ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: หน้า 73-114
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: หน้า 114-121
- นภา ศิวรังสรรค์. 2547. ปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์: หน้า 21-31
- Albracht, S. P. J. 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim. Biophys. Acta* 1188:167-204.
- Appel, J., and Schulz, R. 1996. Sequence analysis of 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., S. Phunpruch, and R. Schulz. 2000. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173: 333-338
- Asada, Y., Kawamura, S., and H., K.K. (1987). Hydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry* 26:637-640. Boison, G., H. Bothe, A. Hansel, and P. Lindblad. 1999 Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in Cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:159-165
- Axelsson R., Lindberg P., Lindblad P., Oxelfelt F., Tamagnini P., Oxelfelt F. and Wunschiers R. 2002. Hydrogenase and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiol.* 66:1-20
- Belkin, S., and Paden, E. 1978. Sulfide dependent hydrogen evolution in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *FEBS Lett.* 94:291-294.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Belkin, S., Rao, K.K., and Hall, D.O. 1981. Partial purification and characterization of two hydrogenase forms from *Oscillatoria limnetica*. *Biochem. Int.* 3:301-309.
- Boison, G., H. Bothe, and O. Schmitz. 2000. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. *Curr. Microbiol.* 40:315-321.
- Boichenko, V.A., and Hoffmann, P. 1994. Photosynthetic hydrogen production in prokaryotes and eukaryotes: occurrence, mechanism and function. *Photosynthetica* 30:527-552.
- Boison, G., Schmitz, O., Mikheeva, L., Shestakov, S., and Bothe, H. 1996. Cloning, Molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 394:153-158.
- Cammack, R. 1999. Hydrogenase sophistication. *Nature* 397:214-215.
- Carrasco, C.D. Buettner, J.A., and Golden, J.W. 1995. Programmed DNA rearrangement of a cyanobacteria *hupL* gene in heterocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:791-795.
- Ewart, G.E., and Smith, G.D. (1989). Purification and properties of soluble hydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 268:327-337.
- Frenkel, A., Gaffron, H., and Battley, E.H. (1950). Photosynthesis and photoreduction by the blue green alga *Synechococcus elongatus*. *NAG. Biol. Bull.* 99:157-162.
- Hallenbeck, P.C., and Beneman, J.R. 1978. Characterization and partial purification of the reversible hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. *FEBS Lett.* 94:261-264.
- Hansel, A., and P. Lindblad. 1998. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:153-160.
- Houchins, J.P., and Burris, R.H. 1981a. Occurrence and localization of two distinct forms of hydrogenase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. 7120. *J. Bacteriol.* 146:209-214.

- Houchins, J.P., and Burris, R.H. 1981b. Comparative characterization of two distinct hydrogenase 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* 786:227-255.
- Howarth, C. A., and G. A. Codd. 1985. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131:1561-1569
- Kentemich, T., M. Casper, and H. Bothe. 1991. The reversible hydrogenase in *Anacystis nidulans* is a component of the cytoplasmic membrane. *Naturwissenschaften* 78:559-560.
- Kentemich, T., Bahnweg, M., Mayer, F., and Bothe, H. (1989). Localization of the reversible hydrogenase in cyanobacteria. *Z. Naturforsch.* 44:384-391.
- Kefin, W., and Böger, P. 1982. Light-induced hydrogen evolution by blue-green algae (cyanobacteria). *Physiol. Plant* 54:93-98
- Lambert, G.R., and Smith, G.D. 1980. Hydrogen metabolism by the filament cyanobacterium. *Arch. Biochem. Biophys.* 205:36-50.
- 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. Letter.* 98:342-346.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R., and Lindblad, P. 1995. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102: Effect of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen. *Plant Physiol. Biochem.* 33:617-623
- Oxelfelt, F., P. Tamagnini, and P. Lindblad. 1998. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. cloning and characterization of a *hupSL* homologue. *Arch. Microbiol.* 169:267-274.
- Przybyla, A. E., J. Robbins, N. Menon, and H. D. Peck, Jr. 1992. Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 88:109-136.

- Peschek, G.A. 1979a. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*.: H₂-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* 548:203-215.
- Roger L. M. 1999. *Applied Molecular Genetics*, 3rd, England :112-114
- Schmitz, O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich, and H. Bothe. H. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 233:266-276.
- Schulz, R. 1996. Hydrogenase and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. *J. Mar. Biotechnol.* 4:16-22
- Serebriakova, L., N. A. Zorin, and P. Lindblad. 1994. Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413: presence and localization in non-N₂-fixing cells. *Arch. Microbiol.* 161:140-144.
- Serebryakova, L. T., M. Medina, N. A. Zorin, I. N. Gogotov, and R. Cammack. 1996. Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres. *FEBS Lett.* 383:79-82.
- Serebryakova, L. T., M. E. Sheremetieva, and A. A. Tsygankov. 1998. Reversible hydrogenase activity of *Gloeocapsa alpicola* in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:89-94.
- Stephenson, M., and L. H. Stickland. 1931. XXVII. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. the properties of the enzyme. *Biochem. J.* 25:205-214.
- Tamagnini, P., O. Troshina, F. Oxelfelt, R. Salema, and P. Lindblad. 1997. Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102 a strain lacking a bidirectional enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1801-1807.
- Tamagnini, P., J.-L. Costa, L. Almeida, M.-J. Oliveira, R. Salema, and P. Lindblad. 2000. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Curr. Microbiol.* 40:356-361.

- Tredici, M. R., M. C. Margheri, R. De Philippis, and R. Materassi. 1990. The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas circinalis* L. J. Gen. Microbiol. 136:1009-1015.
- Tel-Or, E., Luijk, L.W., and Packer, L. 1978. Hydrogenase in N₂-fixing bacteria. Arch. Biochem. Biophys. 185:185-194.
- Vignais, P. M., B. Billoud, and J. Meyer. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol. Rev. 25:455-501.
- <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0g.htm#chapter%205%20%20hydrogen%20Production>
- <http://www.ipst.ac.th>
- <http://www.people.hofstra.edu/geotrans/eng/ch8en/conc8en/energycontent.html>
- http://www.thaiscience.com/lab_vol/p15/biohydrogens.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของ Trace element 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

ส่วนประกอบของอาหาร BG₁₁ 100 เท่า

โซเดียมไนเตรด ($NaNO_3$)	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 ($Na_2 \cdot EDTA$)	279	ไมโครโมลาร์
Trace element 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบของอาหาร Modified BG₁₁

อาหาร BG ₁₁ 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต($NaCO_3$)(2 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)(3.05กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต($FeNH_4$ Citrate)(0.60กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของอาหาร Turk Island Salt Solution

Stock A

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.09	โมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.27	โมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.10	โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stock Bแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0.06 โมลาร์

ส่วนประกอบของอาหาร Turk Island Salt Solution เสริมด้วย Modified BG₁₁**medium**

Stock A 100 มิลลิลิตร

Stock B 100 มิลลิลิตร

อาหาร Modified BG₁₁ 13 มิลลิลิตร

เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 28.16 กรัม

ปรับพีเอชให้มีค่าประมาณ 7.6 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ส่วนประกอบของสารละลาย Break buffer

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-EDTA 50/100 พีเอช 8 ปริมาตร 32 มิลลิลิตร
(ประกอบด้วย Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์และ EDTA 100 มิลลิโมลาร์)
2. สารละลาย Triton X-100 150 ไมโครลิตร
3. สารละลายโซเดียมลอร์ริซาร์โคซิน 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 600 ไมโครลิตร
4. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 600 ไมโครลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ส่วนประกอบสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-boric EDTA

Tris	0.89	โมลาร์
กรดบอริก (H_3BO_3)	0.89	โมลาร์
EDTA	25	มิลลิโมลาร์

วิธีการเตรียม

ชั่ง Tris 107.81 กรัม กรดบอริก 55.03 กรัม และ EDTA 9.31 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร และปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกจนมีพีเอช 8.3 หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ส่วนประกอบของ Tracking dye

กลีเซอรอล (Glycerol)	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue)	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
Tris-boric EDTA	1 เท่า	

วิธีการเตรียม

ชั่งกลีเซอรอล 4 กรัม และโบรโมฟีนอลบลู 0.25 กรัม ละลายใน Tris-boric EDTA 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณ Total RNA โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. ใส่น้ำลงในกิวเวตควอตซ์ และทำความสะอาดกิวเวตควอตซ์ นำไปไว้ในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และปรับความยาวคลื่นเป็น 260 นาโนเมตร กำหนดค่า blank ให้เป็นศูนย์
2. แทนที่กิวเวตที่เป็น blank ด้วยสารละลาย Total RNA ที่ต้องการวัดความเข้มข้น โดยนำสารละลาย Total RNA มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยปรับปริมาตรตามขนาดของกิวเวตที่ใช้
3. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาคำนวณหาปริมาณ Total RNA

การคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง

เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ของสารละลายอาร์เอ็นเอ ปริมาณ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 1 ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากสมการ

$$\text{ปริมาณอาร์เอ็นเอ} = A_{260} \times 40 (\mu\text{g/mL}) \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1. การสกัดคลอโรฟิลล์

- 1.1 ทำการเจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5
- 1.2 นำสารละลายเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- 1.3 เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายส่วนของสารละลายออก
- 1.4 เติมนเมทานอล 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
- 1.5 นำไป vortex เป็นเวลา 5 นาที
- 1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 665, 665.5, 666, 666.5 และ 750 นาโนเมตร ตามลำดับ

2. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

$x =$ (ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 665, 665.5, 666 และ 666.5 นาโนเมตร) – ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์} = X/0.0844 \text{ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}$$