

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp. โดย  
วิธี Southern Blot Hybridization



เลข หน้.....  
เลข ทะเบียน..... 72617  
วัน,เดือน,ปี... 2 0 ส.ย. 2550

b. 117 70065  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Searching for Hydrogenase Gene in the Halophilic Cyanobacterium**

***Aphanothece* sp. by Southern Blot Hybridization**



**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 2006**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม <i>Aphanothece</i> sp. โดยวิธี Southern Blot Hybridization
นักศึกษา	นายคณพล วิเศษศรีสกุล รหัสนักศึกษา 46050121 นางสาวพิสิณี พัฒนศิริ รหัสนักศึกษา 46050131
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรวิญญา พันธุ์พุกภัย

### บทคัดย่อ

ในไซยาโนแบคทีเรีย เอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอ็นไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอ็นไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* เอ็นไซม์อีกชนิดหนึ่งรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับโดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอ็นไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp. โดยวิธี Southern Blot Hybridization และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเริ่มต้นโดยเพาะเลี้ยง *Aphanothece* sp. ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีด้วยฟินอล-คลอโรฟอร์ม จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำแผ่นเจลไปทำการบลอตกับเมมเบรนเพื่อให้ดีเอ็นเอย้ายไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน และนำเมมเบรนไปบ่มกับตัวติดตามที่ได้จากชิ้นส่วนของยีน *hupL* และ *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. พบว่าไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอเมื่อใช้ชิ้นส่วนของยีน *hupL* เป็นตัวติดตาม แต่พบแถบของดีเอ็นเอเมื่อใช้ชิ้นส่วนของยีน *hoxH* เป็นตัวติดตาม นอกจากนี้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาชนิดของยีนไฮโดร- จีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือก ทรานสฟอร์มแมนที่บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาวและตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสมเป็นพลาสมิดลูกผสม pRhyd1.2 ระหว่างเวกเตอร์ pGEM-T Easy และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Arthrospira platensis* และ *Spirulina subsalsa* ถึง 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Special Project</b>	Searching for Hydrogenase Gene in the Halophilic Cyanobacterium <i>Aphanothece</i> sp. by Southern Blot Hybridization	
<b>Student</b>	Danupon Wisatesisakun	Student ID 46050121
	Pisinee Phattanasiri	Student ID 46050131
<b>Degree</b>	Bachelor of Science	
<b>Department</b>	Applied Biology	
<b>Programme</b>	Biotechnology	
<b>Academic Year</b>	2006	
<b>Advisor</b>	Assist.Prof. Dr. Saranya Phunpruch	

### Abstract

In cyanobacteria, hydrogenase enzymes can be divided into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Another enzyme, reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hoxH*. This study aims to search and study nucleotide sequence of hydrogenase gene in the halophilic cyanobacterium *Aphanothece* sp. by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction technique. *Aphanothece* sp. was cultivated in BG11 containing Turk Island Salt Solution medium. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform extraction method, digested with restriction enzyme *HindIII* and analyzed by agarose gel electrophoresis. Agarose gel was blotted on the nylon membrane in order that DNA was transferred to the membrane. Membrane was incubated with DIG-labeled *hupL* and *hoxH* probes of *Anabaena siamensis*. It was found that no signal of *Aphanothece* sp. was detected with *hupL* probe. On another hand, a signal DNA of *Aphanothece* sp. was found with *hoxH* probe. In addition, *hupL* and *hoxH* genes of *Aphanothece* sp. were tested by polymerase chain reaction method and found that a 1,300 bp of *hoxH* PCR product was shown, corresponding to the result of Southern blot hybridization. Then the PCR product of *hoxH* *Aphanothece* sp. was ligated to plasmid pGEM-T Easy and the recombinant plasmid was transformed to the competent cell *E coli* DH5 $\alpha$ . Transformants were selected on ampicillin containing LB agar and based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNA was isolated from a white colony and digested by restriction enzyme *EcoRI*. The result showed that pRhyd1.2 is a recombinant plasmid of pGEM-T Easy vector and *hoxH* PCR product of *Aphanothece* sp. The Nucleotide sequence was analyzed and its amino acid sequence was

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by blast server. It was shown that HoxH of *Aphanothece* sp. had the similarity to the reversible hydrogenase of *Arthrospira platensis* (89%) and *Spirulina subsalsa* (88%).



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษย์ ในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดีในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ นักศึกษารู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นักศึกษาขอขอบพระคุณคณะกรรมการตรวจสอบโครงการพิเศษ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ และ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไข และปรับปรุงให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณชุติมา ภาพสิงห์ คุณศรินยา ใจตรง และคุณวิชาณี แบนศิริ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุน เข้าใจ และเป็นกำลังใจและคอยเฝ้าดูความสำเร็จในการศึกษามาโดยตลอด

นายคนุพล วิเศษศรีสกุล  
นางสาวพิสิณี พัฒนศิริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	6
2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส	7
2.3 เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส	8
2.4 เอนไซม์วีเวอร์สซิมเบิลไฮโดรจีเนส	11
2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย	13
2.6 เทคนิค Southern Blot Hybridization	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
3.2 สารเคมี	21
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ	21
3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	22
3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และ ตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด	22
3.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน	22
3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)	22
3.3 อุปกรณ์	23
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.4.1 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate technique	23
3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย	24
3.4.3 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp.	24
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	25
3.4.5 การศึกษาการมียีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	25
3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่	27
3.4.7 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล	28
3.4.8 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์	28
3.4.9 การเตรียมเซลล์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (competent cell)	29
3.4.10 การทรานสฟอร์มเมชัน	29
3.4.11 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม	29
3.4.12 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)	30
3.4.13 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	30
3.4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	31
 บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	 32
4.1 ผลการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate technique	32
4.2 ผลการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณจีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย ชอบเต็ม <i>Aphanothece</i> sp.	33
4.3 ผลการศึกษายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Aphanothece</i> sp. โดยใช้วิธี Southern blot hybridization	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1 ผลการติดตามตัวติดตามและการตรวจสอบประสิทธิภาพการติดตาม	35
4.3.2 ผลการตรวจสอบการมียีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece</i> sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	37
4.3.3 ผลการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece</i> sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	38
4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส	40
4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส	40
4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส	40
4.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล	42
4.6 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์ม เข้าสู่เซลล์โฮสต์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$	43
4.7 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มแมนท์ด้วยค้าง	44
4.8 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.9 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRhyd1.2	45
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	51
5.1 การศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece</i> sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization	51
5.2 การศึกษาไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece</i> sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซส (PCR)	51
5.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Aphanothece</i> sp.	51
บรรณานุกรม	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก	59
ภาคผนวก ข	60
ภาคผนวก ค	61
ภาคผนวก ง	62
ภาคผนวก จ	63



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hupSL</i> ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด <i>Nostoc</i> sp. PCC 73102, <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	11
2.2 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary	16
2.3 ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้	17
3.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	28
4.1 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>Aphanothece</i> sp. กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน	50
4.2 ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ <i>Aphanothece</i> sp. กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย	7
2.2 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส	10
2.3 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Alcaligenes eutrophus</i>	12
2.4 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803, <i>Anacytis nidulans</i> และ <i>Anabaena variabilis</i>	13
2.5 เซลล์สำหรับยีสี่เหลี่ยมเกมน้ำเงินจำพวกคอคคอยด์ (coccooid form)	14
2.6 เซลล์สำหรับยีสี่เหลี่ยมเกมน้ำเงินจำพวกเส้นสาย (filamentous form)	14
2.7 เซลล์สำหรับยีสี่เหลี่ยมเกมน้ำเงิน <i>Aphanothece</i> sp.	18
2.8 เทคนิคอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส	19
2.9 เทคนิค Southern Blot Hybridization	20
4.1 <i>Aphanothece</i> sp. บนอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution	32
4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Aphanothece</i> sp. และจีโนมิกดีเอ็นเอ <i>Anabaena</i> sp. จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์	34
4.3 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด pUTA1.1	36
4.4 ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในพลาสมิด pRVA1.1	36
4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII	37
4.6 ผลการตรวจสอบยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสของ <i>Anabaena siamensis</i> เป็นตัวติดตาม	38
4.7 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII	39
4.8 ผลการตรวจสอบยีนรีเวอร์สซิบิลด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ <i>Anabaena siamensis</i> เป็นตัวติดตาม	40
4.9 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 (ก) และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 (ข)	41
4.10 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป	43
4.11 พลาสมิด pRhyd1.2 ที่สกัดด้วยต่าง	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 ผลการตัดพลาสมิด pRhyd1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	45
4.13 โครมาโตแกรมของการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มาจากพลาสมิด pRhyd1.2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ T7	47-48
4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่ของ <i>Aphanothece</i> sp.	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

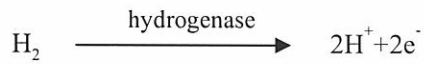
### 1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ในโลกแห่งปัจจุบันนี้อาจกล่าวได้ว่า พลังงานเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง พลังงานเปรียบเสมือนเป็นตัวขับเคลื่อนเศรษฐกิจให้ก้าวเดินไปข้างหน้า โดยพลังงานหลักที่นิยมนำมาใช้กันก็คือ พลังงานที่มาจากก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน น้ำมันดิบ แต่พลังงานหลักที่แท้จริงคือ พลังงานจากน้ำมัน จากสถานการณ์ปัจจุบันที่ราคาน้ำมันดิบทั่วโลกได้พุ่งตัวสูงขึ้นอันเนื่องมาจากปริมาณน้ำมันสำรองของโลกได้ใกล้หมดลง จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลก นอกจากนี้ผลจากการใช้พลังงานจากน้ำมันยังก่อให้เกิดมลภาวะบนโลก เช่น ภาวะเรือนกระจก มลพิษทางอากาศอันเนื่องมาจากการปล่อยออกไซด์ที่เกิดจากการสันดาปภายในของเครื่องยนต์ที่ไม่สมบูรณ์ การรณรงค์และการใส่ใจกับสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในด้านการใช้พลังงาน ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าและวิจัยเพื่อที่จะหาพลังงานรูปแบบใหม่ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนพลังงานรูปแบบเก่าๆ ตัวอย่างเช่น พลังงานนิวเคลียร์ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจจะบรรเทาปริมาณการตั้งซื้อน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับการสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจาก พลังงานไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น เมื่อทำการสันดาปด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศ เกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธีด้วยกัน เช่น การผลิตที่ได้จากกระบวนการสตีมีรีฟอร์มมิง (steam reforming) หรือเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทางปิโตรเลียมและทางเคมี กระบวนการสตีมีรีฟอร์มมิงใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบของคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล อีกวิธีหนึ่งคือการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis) โดยที่อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้น้ำเกิดการแตกตัวเป็นโมเลกุลไฮโดรเจนและออกซิเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) โดยเฉพาะจากสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย

การผลิตไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิตเป็นการอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ปฏิกิริยาผันกลับแสดงดังสมการ



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสพบทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้มักเกิดในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

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

ในจำนวนสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ไชยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้ชีวมวล (biomass) และได้ไฮโดรเจนเป็นผลผลิตพลอยได้ แต่หากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียว นั้นสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วในสถานะที่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ไม่สอดคล้องกับความต้องการ ดังนั้น ไชยาโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในฐานะที่สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นกันและมีเอนไซม์ที่ไวต่อออกซิเจนไม่มากนัก นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียมีคุณลักษณะเด่นที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นคือ สามารถหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสังเคราะห์ด้วยแสงได้ออกซิเจนในออร์แกเนลล์เดียวกัน และ ไชยาโนแบคทีเรียยังมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายพืช โดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน ไชยาโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่มากเกินไปในเซลล์ระหว่างการสังเคราะห์แสง ได้มีรายงานศึกษาเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนและไฮโดรจีเนสใน ไชยาโนแบคทีเรียหลายชนิด (Houchins, 1984; Boichenko and Hoffmann, 1994; Schulz, 1996; Appel และ Schulz, 1998) อีกทั้งมีการรายงานการใช้ไบโอไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ (Hall *et al.*, 1995; Schulz, 1996)

ใน ไชยาโนแบคทีเรียสามารถพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ 2 ชนิด ชนิดแรก อัพเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) พบเฉพาะใน ไชยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน หรือที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และใน ไชยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* (Pescheck 1979a; 1979b) เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทุกชนิดที่พบใน ไชยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยนิกเกิล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเหล็ก ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนซึ่งผลิตมาจากเอนไซม์ไนโตร-  
 จีเนส (nitrogenase) ในกระบวนการตรึงรูปไนโตรเจน (nitrogen fixation) อิเล็กตรอนที่ได้จาก  
 ปฏิกิริยาของ uptake hydrogenase จะถูกถ่ายทอดไปยังลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนของกระบวนการ  
 สังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจ Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และ  
 อธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีน uptake hydrogenase (*hupL*) ที่สังเคราะห์หน่วยย่อยใหญ่ (large  
 subunit) ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรกในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7210 ในระยะที่  
 เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของนิกเกิล ไฮโดรเจน  
 และไนโตรเจนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ใน *Nostoc* sp. strain PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1995)  
 และมีรายงานลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของเอนไซม์ใน *Nostoc* สายพันธุ์ดังกล่าว  
 (Oxelfelt *et al.*, 1998)

ส่วนเอนไซม์ชนิดที่ 2 รีเวอร์ซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) พบในไซยาโน  
 แบคทีเรียทั่วไป ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างและสลายไฮโดรเจน เอนไซม์นี้เร่งการผลิต  
 ไฮโดรเจนได้เมื่อได้รับอิเล็กตรอนมาจากเมทิลไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวซ์ด้วยไดไทโอไนท์  
 (dithionite) มาก่อน โดยเอนไซม์ชนิดนี้ที่พบในไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นชนิดที่มีนิกเกิลและเหล็ก  
 เป็นองค์ประกอบ กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโต โดยสามารถวัด  
 กิจกรรมได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *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) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์ซิเบิลไฮโดรจีเนสจะเพิ่มขึ้นในหลายสายพันธุ์  
 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic adaptation) *Spirulina maxima* และ *Synechocystis* สายพันธุ์  
 PCC 6803 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับสูงเมื่อเจริญภายใต้สภาวะโพโตออโตโทรป (Llama  
*et al.*, 1979) เอนไซม์ชนิดนี้ไวต่อออกซิเจนมากกว่าอิมเพคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984) แต่  
 อย่างไรก็ตาม ยังมีความไวน้อยกว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่าย จนกระทั่งปัจจุบัน เอนไซม์  
 รีเวอร์ซิเบิลไฮโดรจีเนสถูกทำให้บริสุทธิ์ใน *Anabaena cylindrica* (Hallenback and Benemann,  
 1978; Ewart and Smith, 1989), *Microcystis aeruginosa* (Asada *et al.*, 1987) และ *Synechococcus*  
 สายพันธุ์ PCC 6301 (Kentemich *et al.*, 1989) และมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้าง  
 เอนไซม์นี้ใน *Anabaena cylindrica* (Ewart *et al.*, 1990), *Anabaena variabilis* ATCC 29413  
 (Schmitz *et al.*, 1995), *Anacystis nidulans* (Schmitz *et al.*, 1995; Boison *et al.*, 1996) และ  
*Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Aphanothece* sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มเซลล์เดียว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกแบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเชื้อหุ้มเซลล์หนา มีลักษณะที่สำคัญคือ ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถทนเค็มสูง โดยสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ถึง 4.0 โมลาร์ นอกจากนี้ ลักษณะของเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยวทำให้การศึกษาคุณลักษณะของยีน รวมถึงการแสดงออกของยีนทำได้ไม่ยากนัก จากการที่ *Aphanothece* sp. สามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงนี้ จึงมีความมุ่งหวังในการค้นหายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็มนี้เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสและเป็นแนวทางในการประยุกต์นำไซยาโนแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ผลิตไฮโดรเจนต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

ค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aphanothece* sp. จากนั้นสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส นำแผ่นเจลไปทำการ blot เพื่อให้จีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยย้ายไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปไฮบริดซ์กับตัวติดตามของยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) และยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) จากเชื้อ *Anabaena siamensis* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime เพื่อตรวจสอบการมียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนส และยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Aphanothece* sp. นอกจากนี้ยังทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ชื่อ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาว นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp. เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตและสะสมไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานสะอาดเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพลังงานต่อไปในอนาคต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

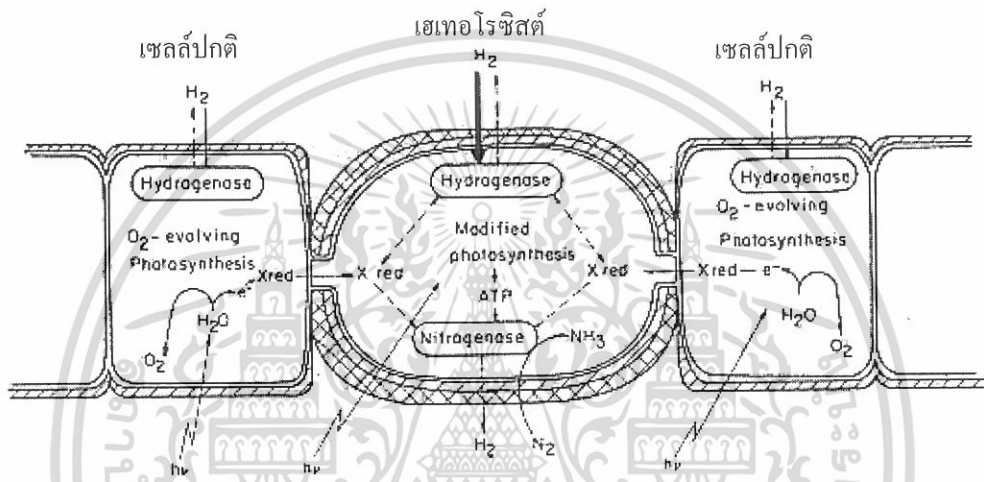
### 2.1 พลังงานไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่มีมากที่สุดในระบบจักรวาล แต่พบมากเป็นอันดับ 3 บนโลก สามารถพบอยู่ในโครงสร้างของสารประกอบกับธาตุอื่นๆ เช่น น้ำ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่อยู่ในเชื้อเพลิงจำพวกน้ำมันเบนซิน ก๊าซธรรมชาติ โพรเพน เมทานอล ฯลฯ ในปัจจุบัน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเมื่อเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะให้พลังงานสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ นอกจากนี้ ก๊าซไฮโดรเจนยังมีน้ำหนักเบาจึงใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนจรวดและยานอวกาศ ในธรรมชาติไฮโดรเจนอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และเป็นส่วนประกอบของน้ำ การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ในประเทศสหรัฐอเมริกา ไฮโดรเจนในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) หรือเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการทางปิโตรเลียมและทางเคมี กระบวนการสตีมรีฟอร์มมิงใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล โดยขั้นแรกของปฏิกิริยา เชื้อเพลิงถูกสลายไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปโดยเปลี่ยนคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 392 องศาฟาเรนไฮต์ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้คือ การแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrolysis) โดยที่อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการสลายพันธะเคมีระหว่างไฮโดรเจนกับออกซิเจน 1.24 โวลต์ และใช้ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยเหตุที่วิธีการผลิตพลังงานไฮโดรเจนดังกล่าว ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) เช่น การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมักในสภาวะไร้อากาศโดยใช้เชื้อ *Clostridium* sp. หรือการผลิตไฮโดรเจนจากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ในสภาวะไร้อากาศ โดยเฉพาะไฮโดรเจนที่ผลิตจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงโดยพลังงานแสงจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีของแสง (photoelectrochemical process) และได้ผลิตเป็นไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้

ในไซยาโนแบคทีเรีย การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถพบได้ทั้ง

ในเซลล์เฮเทอโรซิสต์และในเซลล์ปกติ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนสพบในเฮเทอโรซิสต์ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย โดยปฏิกิริยาดังกล่าวต้องอาศัยพลังงาน ATP และรีดิวซิงพาวเวอร์ (reducing power) ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้ไฮโดรเจนเกิดขึ้น ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในเซลล์ปกติ จะเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจากน้ำไปยังตัวรับอิเล็กตรอนและผ่านเข้าสู่เซลล์เฮเทอโรซิสต์ จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อทำหน้าที่สร้างไฮโดรเจนต่อไป (รูปที่ 2.1)

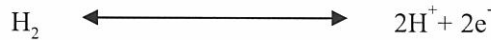


รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย  
ที่มา : Tel-Or *et al.*, 1978

## 2.2 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสได้ถูกค้นพบในช่วงปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 และในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา นักวิจัยจำนวนมากศึกษาเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ใช้มีเทน (methanogenic bacteria) แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ซัลเฟต (sulfate-reducing bacteria) แบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์ไฮโดรเจน ( $H_2$ -oxidizing bacteria) แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ (nitrogen-fixing bacteria) สาหร่ายสีเขียว (green algae) และไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นไฮโดรเจนและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ในปี ค.ศ. 1931 Stephenson และ Stickland บัญญัติศัพท์คำว่า “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นเป็นครั้งแรก ภายหลังจากพบการสร้างและสลายไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความไว (sensitive) ต่อออกซิเจน เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด ดังนี้

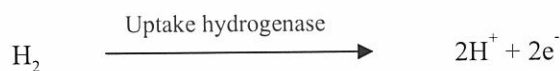
1. อัปเดตไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) เร่งทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

นอกจากนี้ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสยังสามารถจำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่มีอยู่ในศูนย์กลางของบริเวณกระตุ้นได้เป็น

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

### 2.3 เอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนส

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



เอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนสได้รับความสนใจศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Azotobacter* sp. (Smith *et al.*, 1976), *Rhizobium* sp. (Dixon, 1972), *Rhodospseudomonas capsulata* (Colbeau *et al.*, 1980) และ *Clostridium pasteurianum* (Adams *et al.*, 1981) โดยพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจน นอกจากมีการค้นพบในแบคทีเรียแล้ว สามารถพบเอนไซม์อัปเดตไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกชนิด (Houchins, 1984; Lambert and Smith,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

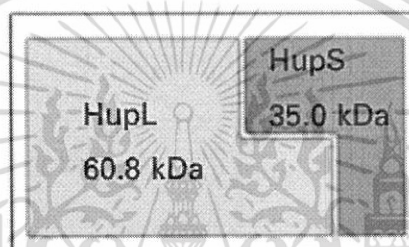
1981; Tamagnini *et al.*, 2000) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 และ *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a; 1979b; 1979c; Boison *et al.*, 1996; Elisbrenner *et al.*, 1978)

เนื่องจากเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสมีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายไฮโดรเจน ซึ่งไฮโดรเจนเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเฮเทอโรซิสต์จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ จึงได้รับความสนใจนำมาศึกษาเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Lambert and Smith, 1981; Oxelfelt *et al.*, 1995; Wolk *et al.*, 1994) โดยสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ในเฮเทอโรซิสต์ (Eisbrenner *et al.*, 1978) และในเซลล์ปกติ (Houchins and Burris, 1981a; Lindblad and Sellstedt, 1990; Rai *et al.*, 1992) ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ในการเกิดเฮเทอโรซิสต์ (Tamagnini *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าปัจจัยภายนอกได้แก่ แสง นิกเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลต่อปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน (Oxelfelt *et al.*, 1995) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะอากาศที่มีการเติมไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศจะมีสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศปกติ (Eisbrenner *et al.*, 1978) ใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413 มีการศึกษาพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ปกติที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ (Troshina *et al.*, 1996) และจากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (1984) ที่ศึกษาผลของนิกเกิลต่อการสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ IF พบว่าการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน (Daday *et al.*, 1985; Daday and Smith, 1987; Oxelfelt *et al.*, 1995; Papen *et al.*, 1986; Shravan and Polasa, 1991; Tredici *et al.*, 1990)

ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอร์ิกเอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 2 หน่วยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.2) โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน และถอดรหัสมาจากยีน *hupL* (*hup* มาจาก *hydrogen uptake*) ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน และถอดรหัสมาจากยีน *hupS* (Carrasco *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 2000; Lindberg *et al.*, 2000; Lindblad and Sellstedt, 1990;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oxelfelt *et al.*, 1998; Tamagnini *et al.*, 1995) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดของ อีแพคไฮโดรจีเนสในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียด้วยกัน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความ คล้ายคลึง (similarity) กันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 2.1 แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับ กรดอะมิโนของอีแพคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 กับแบคทีเรีย *Desulfovibrio gigas* พบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน HupL จะ ลดลงเป็น 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่ง HupL ของไซยาโนแบคทีเรียมีบริเวณจับของนิคเกิลที่ปลาย เอ็น (N-terminal) ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น FRGFE(I/V)ILRGKDPQAGLIVTPRIC<sup>62</sup>GIC<sup>65</sup>G (A/G)SH ส่วนบริเวณจับของนิคเกิลที่ปลายซี (C-terminal) มีลำดับกรดอะมิโนเป็น DPVEVGH VARSFDSC<sup>509</sup>LVC<sup>512</sup>TVHAH (Tamagnini *et al.*, 2002)



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

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอีแพคไฮโดรจีเนส เริ่มต้นโดย Carrasco และคณะ (1995) ได้อธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของอีแพคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ และต่อมาได้มีการศึกษา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอีแพคไฮโดรจีเนสทั้งหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1998) *Anabaena variabilis* (Happe *et al.*, 2000) และ *Anabaena siamensis* (Phunpruch *et al.*, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

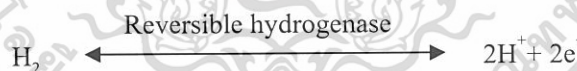
**ตารางที่ 2.1** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด *Nostoc* sp. PCC 73102, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* sp. PCC7120

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

ที่มา : Tamagnini *et al.*, (2002)

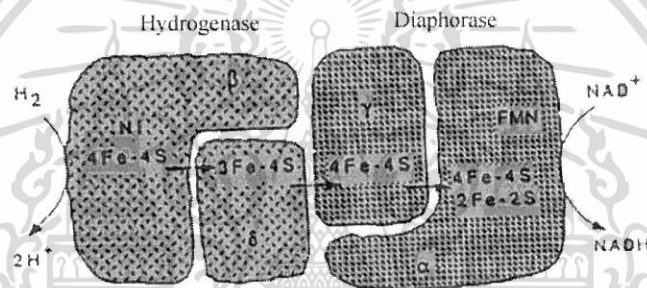
## 2.4 เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการ



รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน (Hansel and Lindblad, 1998; Kentemich *et al.*, 1989; 1991; Lindblad and Tamagnini, 2001; Serebriakova *et al.*, 1994) โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (Frenkel *et al.*, 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* (Llama *et al.*, 1979) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or *et al.*, 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burriss, 1981a; 1981b) เมื่อศึกษาคูณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Serebryakova *et al.*, 1996) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่า ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส (diaphorase) (รูปที่ 2.3) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส  $\delta$  และ  $\beta$  ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ (*hox* มาจาก *h*ydrogen *o*xidation) ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส  $\alpha$  และ  $\gamma$  ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง  $\text{NAD}^+$  หรือ  $\text{NAD(P)}^+$

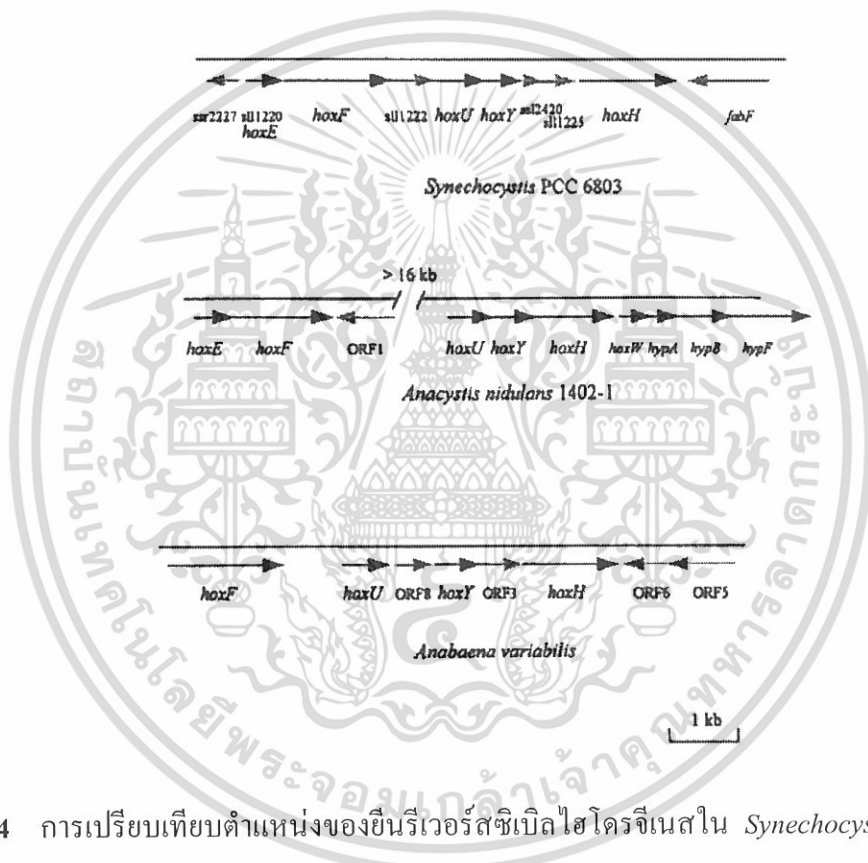


รูปที่ 2.3 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Alcaligenes eutrophus*

ที่มา : Friedrich และ Schwartz, (1993)

จนกระทั่งปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* (Ewart *et al.*, 1990), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Schmitz *et al.*, 1995), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel และ Schulz, 1996) และ *Anabaena nidulans* (Boison *et al.*, 1996) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่เรียกว่าแบคทีเรียอื่นๆ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน  $\text{NAD}^+$ -reducing hydrogenase ของ *Alcaligenes eutrophus* และยีน methylviologen-reducing hydrogenase ของ *Methanococcus voltae* (Schmitz *et al.*, 1995) เป็นที่น่าสนใจว่า นอกจากยีน *hoxFUYH* แล้ว ยังมีการพบยีน *hoxE* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anacystis nidulans* อีกด้วย ยีน *hoxE* สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังไดอะฟอเรส ดังนั้นจึงจัดยีน *hoxE* เป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มของยีน *hox* กลุ่มของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena variabilis* และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มียีน *hoxFUYH* ที่เรียงต่อกันและแทรกด้วย open reading frame สำหรับ *Anabaena nidulans* ยีน *hoxEF* จะแยกจากยีน *hoxUYH* เป็นระยะทางถึง 16 กิโลเบส ทำให้การถอดรหัสของยีน *hoxEF* แยกจากการถอดรหัสของยีน *hoxUYH* (รูปที่ 2.4) (Boison *et al.*, 1998) การศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากยีนของเอนไซม์รีเวิร์สซิทิลไฮโดรจีเนสใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120, *Anabaena nidulans* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่าระหว่าง *Anabaena* ด้วยกันจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และ *Anabaena* ทั้งสองชนิดจะมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน 58 ถึง 71 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น (Tamagnini *et al.*, 2002)



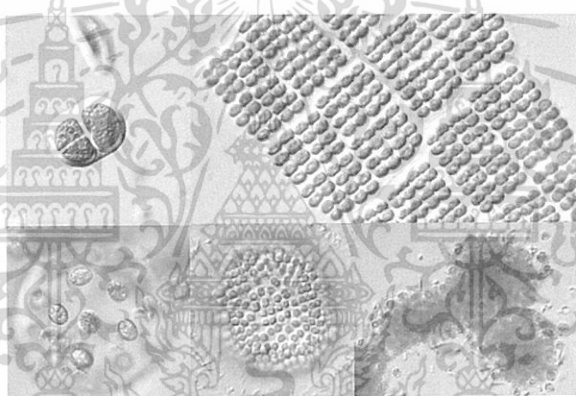
รูปที่ 2.4 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวิร์สซิทิลไฮโดรจีเนสใน *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803, *Anacyctis nidulans* และ *Anabaena variabilis* ที่มา : Boison *et al.*, 1998

### 2.5 ไซยาโนแบคทีเรีย

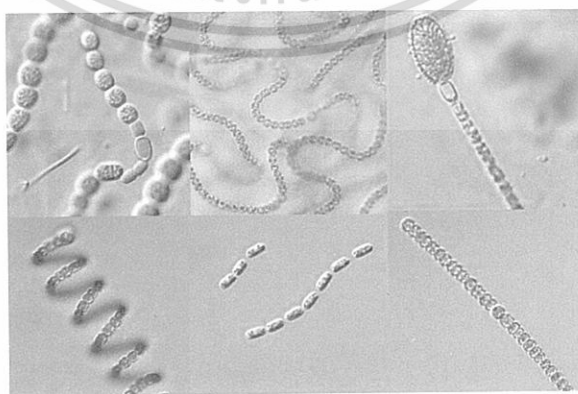
ไซยาโนแบคทีเรียหรือที่เรารู้จักกันในชื่อ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) จัดอยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) และจัดเป็นโพรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ ไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ออกซิเจนออกมาเป็นผลผลิต เนื่องจากมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ เอ แคโรทีนอยด์ และ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟโคบลิน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของเซลล์ทำให้ทราบว่า ไชยาโนแบคทีเรียมีรูปร่าง 2 แบบด้วยกัน พวกแรกคือ พวกคอคคอยด์ (coccoïd form) พบว่ามีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปร่างกลม ทรงกระบอก กระสวย เป็นต้น พบได้ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) และอยู่รวมกัน โดยเซลล์มักจะมีซีทหรือสารเมือกหุ้ม (รูปที่ 2.5) พวกที่สองเป็นพวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous form) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงกันเป็นแถว มีทั้งที่ไม่สร้างกิ่งแขนง (unbranched filament) และสร้างกิ่งแขนง (branched filament) (ลัดดา, 2542) (รูปที่ 2.6) นอกจากนี้ บางสายพันธุ์ของ ไชยาโนแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเส้นสายยังสามารถสร้างเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งเป็นเซลล์พิเศษที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจากเซลล์ปกติ (vegetative cell)

เฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ผนังหนา ภายในเซลล์มีลักษณะใสเป็นสีเหลืองจางๆ ในสภาพธรรมชาติสามารถพบ ไชยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่อย่างอิสระเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ



รูปที่ 2.5 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกคอคคอยด์ (coccoïd form)  
ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>



รูปที่ 2.6 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจำพวกเส้นสาย (filamentous form)  
ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.1 ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

2.5.1.1. สารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigment) ประกอบด้วย

1. คลอโรฟิลล์ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ
2. แคโรทีนอยด์ ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ออสซิลลาแซนทิน (oscillaxanthin) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) ลูเทอีน (lutein) ฟลาวินิน (flavicin) อะฟานิโซฟิลล์ (aphanizophyll) และอะฟานิซิน (aphanicin)
3. ไฟโคบิลิโปรตีน ในไซยาโนแบคทีเรียมีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ ซี-ไฟโคไซยานิน (c-phycoyanin) ซี-อัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycoyanin) ไฟโคอิริโทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซี-ไฟโคอิริทริน (c-phycoerythrin)

2.5.1.2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอก (outer membrane) ก่อนข้างหนาและนิ่มกว่าได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลลาตินหรือเมือก ถัดเข้ามาเป็นชั้นที่ประกอบด้วยสารประเภทเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีองค์ประกอบเหมือนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ชั้นในสุดเป็นชั้นที่เรียกว่า cytoplasmic membrane หรือเมมเบรนชนิดที่ติดกับไซโตพลาสซึม ภายในไซโตพลาสซึมประกอบด้วย 2 ส่วน คือส่วนที่มีรงควัตถุเรียกว่า โปรโตพลาสซึม (protoplasm) และส่วนที่มีสารพันธุกรรมเรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) ซึ่งอยู่ใจกลางของเซลล์ (กาญจนาภรณ์, 2527)

2.5.1.3. แฟล็กเจลลา (flagella) เซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทุกชนิดไม่มีแฟล็กเจลลา ชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

2.5.1.4. ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product) เป็นสารจำพวกแป้ง ไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เรียกเม็ดเล็กๆ ว่า ไซยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule) ซึ่งแป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดง

2.5.1.5. ลักษณะพิเศษประจำดิวิชันไซยาโนไฟตา คือ เป็นพืชชั้นต่ำจำพวกโพรคาริโอต ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ สารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติด แต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม ไม่มีนิวเคลียสที่แท้จริงและสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างหลายแบบ มีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวและชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นสายบางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างเฮเทอโร-เอกซาร์เป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิสต์ได้ ดังนั้นจึงได้มีการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรียมีหลายระบบ แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ระบบของ Desikachary (1959) ได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียออกเป็น 5 อันดับ แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การจัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรียตามระบบของ Desikachary

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ไชยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

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

ที่มา : Kaplan *et al.*, 1986

72617

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาสำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดทนเค็ม *Aphanothece* sp. ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aphanothece* sp. มีลำดับอนุกรมวิธานดังนี้

Division Cyanophyta

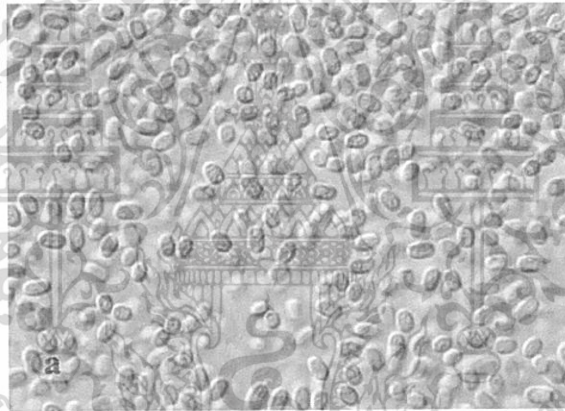
Class Cyanophyceae

Order Chlorococcales

Family Chroococcaceae

Genus *Aphanothece*

*Aphanothece* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทนเค็มเซลล์เดี่ยว มีลักษณะเซลล์เป็นรูปทรงกระบอก แบ่งตัวตามขวาง มักพบเป็นกลุ่ม มีเยื่อหุ้มเซลล์หนาที่มีลักษณะเป็นวุ้น โปร่งแสงหุ้มเซลล์อยู่ (ถัดดา, 2532) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Aphanothece* sp.

ที่มา : <http://protist.i.hosei.ac.jp/>

ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. สามารถเจริญได้ในที่มีสภาวะที่มีค่าความเข้มข้นของเกลือได้หลายค่าด้วยกัน โดยอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ถึง 3.0 โมลาร์ (Wutipraditkul and Waditee, 2005) ซึ่ง *Aphanothece* sp. มักเจริญเติบโตได้ดีในค่าความเข้มข้นของเกลือที่ 3.3 โมลาร์ และเซลล์ถูกไลซิสเมื่อเซลล์อยู่ในน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 เทคนิค Southern Blot Hybridization (Southern, 1975)

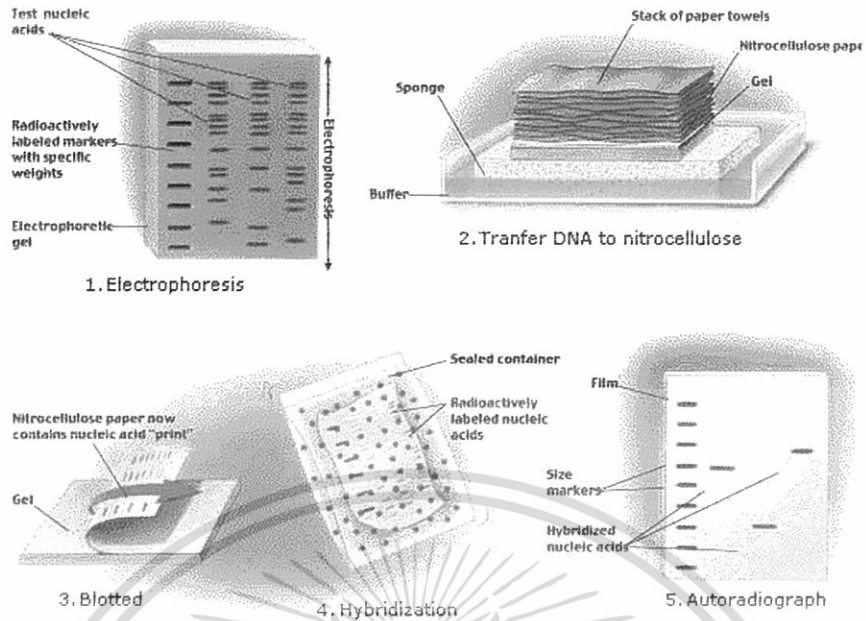
เป็นเทคนิคที่มักใช้ในงานชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของดีเอ็นเอหรือยีนจากจีโนมทั้งหมด เทคนิคนี้ถูกตั้งชื่อตามผู้ค้นพบและพัฒนา คือ ศาสตราจารย์ เซอร์เอ็ดเวิร์ด เมลเลอร์ เซาเทิร์น (Professor Sir Edwin Mellor Southern) การทำเทคนิค Southern blot hybridization เริ่มจากตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้นสั้นๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากกันด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 2.8) จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงสู่แผ่นเมมเบรนฟิวเตอร์ (membrane filter) เช่น แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือแผ่นไนลอนเมมเบรน แล้วนำไปทำปฏิกิริยา hybridization เพื่อให้เกิดการจับตัวกันใหม่ของดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนกับดีเอ็นเอจำเพาะที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบ (DNA probe) ซึ่งติดฉลาก (label) ด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเคมีบางชนิด หลังการ hybrid จะปรากฏเป็นแถบบนแผ่นเมมเบรนตรงตำแหน่งที่โพรบเข้าไปจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (รูปที่ 2.9) ถ้าโพรบติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี สามารถตรวจสอบการจับกันของเบสคู่สมโดยทำอโตเรดิโอกราฟี



รูปที่ 2.8 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ที่มา : <http://www.thirawat.com/moodle/mod/resource/view.php?id=39>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 เทคนิค Southern Blot Hybridization

ที่มา : [pirun.ku.ac.th/~fsciwcc/lecture1.ppt](http://pirun.ku.ac.th/~fsciwcc/lecture1.ppt)

ในการทำงานเดียวกัน เมื่อนำอาร์เอ็นเอ (RNA) มาแยกขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้ายแถบอาร์เอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนพิวเตอร์ นำไป hybridize กับ โพรบเพื่อตรวจหาอาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสตามต้องการ เรียกวิธีนี้ว่า Northern blot Hybridization ส่วนโปรตีน เมื่อนำมาแยกโดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว สามารถตรวจหาได้ด้วยวิธีการคล้ายกัน แต่ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเป็นตัวตรวจสอบ เรียกว่า Western blot Hybridization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 3.1.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรัญญา อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ* M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)

#### 3.2 สารเคมี

##### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Turk Island Salt Solution (ภาคผนวก ข)
- 3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ค)

##### 3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

- 3.2.2.1 เม็ดแก้ว (glass bead)
- 3.2.2.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (ภาคผนวก ง)
- 3.2.2.3 โซเดียมโคเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (sodium lauroyl sarcosine) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.5 ฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol)
- 3.2.2.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)  
(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.8 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) 3 โมลาร์
- 3.2.2.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% ethanol)
- 3.2.2.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

- 3.2.3.1 dNTPs (deoxyribonucleotidetriphosphate)
- 3.2.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ )
- 3.2.3.3 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase
- 3.2.3.4 อะกาโรส (agarose)
- 3.2.3.5 เจลสตาร์ (gelstar)
- 3.2.3.6 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ง)
- 3.2.3.7 สีผสมดีเอ็นเอ (Tracking Dye) (ภาคผนวก ง)

### 3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

- 3.2.4.1 เอนไซม์ T4 DNA ligase

### 3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการถ่ายโอนยีน (transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม

- 3.2.5.1 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride)
- 3.2.5.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- 3.2.5.3 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)
- 3.2.5.4 IPTG (isopropyl-  $\beta$ -D-thiogalactoside)
- 3.2.5.4 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin)
- 3.2.5.4 ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin)

### 3.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.6.1 แลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ( $\lambda$ /*HindIII*)

### 3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.2.7.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.2 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Exyraction Kit (Qiagen, Germany)
- 3.2.7.3 ชุด DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
- 3.3.5 ตู้อบไอร้อน (hot air oven)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
- 3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance)
- 3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- 3.3.9 เครื่องเพิ่มปริมาณพันธุกรรม (PCR machine)
- 3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply)
- 3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment)
- 3.3.12 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (vortex)
- 3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo block)
- 3.3.15 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.3.16 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (glass wares)

### 3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.4.1 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate technique

การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ทำได้ด้วยเทคนิค streak plate (streak plate technique) โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไปลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้สักพักให้เย็น แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อไปเขี่ยเชื้อไซยาโนแบคทีเรียมาลาก (streak) บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5-7 วัน จะสังเกตพบเซลล์ที่เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

#### 3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp.

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7-10 วัน

#### 3.4.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  1 โคลนี มาเพาะเลี้ยงในในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB (Lauria-Bertani) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีของการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดด้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ใช้แอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของอาหาร

### 3.4.3 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp.

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ตามวิธีในข้อ 3.4.2.1 เมื่อเซลล์เจริญจึงทำการเก็บเซลล์ โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรดต่าง 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ เติมเม็ดแก้ว (glass bead) 200 ไมโครลิตร โซเดียมโคเคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียม-ลอริลซาร์โคซิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที สลับกับแช่ในน้ำแข็ง 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเออยู่แล้วมาสกัดด้วย ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนในด้านล่างที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 5.2 ในปริมาตร 0.1 เท่าของ ปริมาตร ตามด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

#### 3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.3 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ในอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนของอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาด จากนั้นหยดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฝาจกแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

#### 3.4.5 การศึกษาการมียีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียด้วยเทคนิค

##### Southern blot hybridization

เทคนิค Southern blot hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดและบ่งชี้การมีอยู่ของยีนที่สนใจโดยใช้โพรบที่จำเพาะเป็นตัวติดตามหาตำแหน่งของยีนที่อยู่บนจีโนมดีเอ็นเอ ในโครงการพิเศษนี้ โพรบที่ใช้ถูกออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนส (*hupL*) และยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส (*hoxH*) ซึ่งนำมาใช้ในการตรวจสอบการมียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. นำโพรบมาติดฉลากด้วย DIG-High Prime และตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก จากนั้นนำโพรบไปใช้เป็นตัวติดตามจีโนมดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. และ *Anabaena siamensis* ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ขั้นตอนการทำเทคนิค Southern blot hybridization มีดังนี้

##### 3.4.5.1 การติดฉลากตัวติดตาม

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือน *hupL* และ *hoxH* ของ *Anabaena siamensis* (ชมาภรณ์ ธงเพ็ง, 2547) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 3.4.13 วิเคราะห์ปริมาณและขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 307 คู่เบส และ 400 คู่เบส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อใช้เป็นตัวติดตามสำหรับยีน *hupL* และ *hoxH* ทำการติดฉลาก Dioxygenin ที่ปลายของดีเอ็นเอ โดยปีเปิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนอ็อปเทกไฮโครจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบีลไฮโครจีเนสของ *Anabaena siamensis* 1 ไมโครกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กและปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 16 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เติม DIG-High Prime ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม EDTA 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

#### 3.4.5.2 การตรวจสอบตัวติดตาม

เจือจางดีเอ็นเอที่  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  แล้วปีเปิดดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจางละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรนโดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต 3 นาที นำแผ่นเมมเบรนไปแช่บัฟเฟอร์มาเลอิก ปริมาตร 20 มิลลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างเมมเบรน 2 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween20 0.3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดต่าง 7.5 ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิตร ที่เติมไนโตรบลูเตตระโซเดียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบโรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิลฟอสเฟต (BCTP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มีเครื่องหมายทั้งหมดมีแถบสีปรากฏขึ้นจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยน้ำกลั่น

#### 3.4.5.3 การทำ Southern hybridization

นำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้วิธีในข้อ 3.4.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ในปฏิกิริยาประกอบด้วย จีโนมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* 10 เท่า และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่เจลใน Denaturation solution ที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และนำแผ่นเจลไปแช่ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.5 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ทำการ blot เพื่อให้ดีเอ็นเอไปอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาพิลลารี (capillary method) แล้วตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 3 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปบ่มในบัฟเฟอร์ Prehybridization ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวติดตามที่เตรียมสำหรับยีนไฮโดรจินเนส บ่มข้ามคืน แล้วล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ โซเดียมซิเตรท 30 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 0.1 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Washing buffer) ที่ประกอบด้วยกรดมาเลอิก 0.1 โมลาร์ และ Tween20 0.3 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดต่าง 7.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ล้าง 5 นาที แล้วเททิ้ง เติม Blocking solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเติมแอนติบอดี (Antibody solution) ลงในสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนอีก 2 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง ครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาตรวจสอบผล โดยแช่แผ่นเมมเบรนในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 9.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมไนโตรบลูเตตระโซเดียม (NBT) 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดลิลฟอสเฟต (BCIP) 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มีตรรจนกระทั่งมีแถบสีดำปรากฏขึ้นจึงหยุดปฏิกิริยาโดยการนำแผ่นเมมเบรนไปล้างด้วยน้ำกลั่น

#### 3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจินเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) ของ *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซ 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR 1 เท่า คือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมลาร์ upstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ downstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.3 ปริมาณ 100 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยมีขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.1 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามข้อ 3.4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
1	initial denaturation	94	5 นาที
2	denaturation	94	30 วินาที } 30 รอบ 1 นาที 2 นาที
	annealing	40-55	
	extension	72	
3	final extension	72	10 นาที

### 3.4.7 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล

นำดีเอ็นเอที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกกันอย่างชัดเจน ทำการตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลและนำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลแบบสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) โดยนำหลอดทดลองที่มีเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกับบัฟเฟอร์แล้ว ปิดฝาสารละลายใส่ใน spin column ที่วางอยู่ในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ถังของเหลวใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน Spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์และตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 3.4.4

### 3.4.8 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่มีขนาดตรงตามต้องการและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.7 มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เป็น 10:1 ปฏิบัติการเชื่อม (ligation) 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ PCR และเวกเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม ผสมให้เข้ากัน และนำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

### 3.4.9 การเตรียมเซลล์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (competent cell)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

### 3.4.10 การทรานสฟอร์มเมชัน

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.9 หรือที่เตรียมในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง เปิดเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีส่วนผสมที่เตรียมไว้สำหรับ ligation ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.8 นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นย้ายไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

### 3.4.11 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxH*) จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยค่า

#### 3.4.12 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)

นำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.4.11 มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายใน Solution I ที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาและวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยโพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร กลาเซียอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมา 10 วินาที และวางบนน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรที่ได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตากให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

#### 3.4.13 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.12 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะจะเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ชนิดจาก BigDye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>R</sup> 3700 DNA Analyzer



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

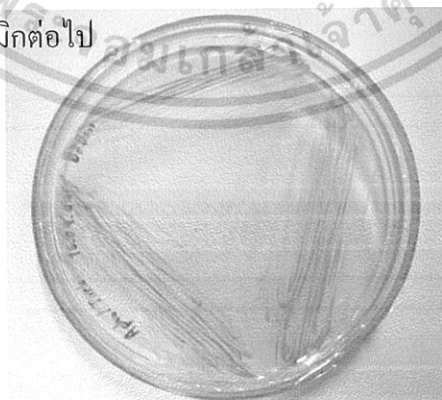
## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในสาหร่ายไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp. ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aphanothece* sp. แล้วสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและนำมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *Aphanothece* sp. ที่วิเคราะห์ได้มาทำการศึกษานิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Southern blot hybridization หลังจากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy และทำการทรานสฟอร์มเข้าไปในเซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมแล้วนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รับจากการแปลรหัสกับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

#### 4.1 ผลการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate technique

จากการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aphanothece* sp. ด้วยวิธี streak plate technique ทำให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่ปราศจากการปนเปื้อนจากไซยาโนแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยเชื้อจะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องให้แสงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากนั้น 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตเห็นกลุ่มสีเขียวของ *Aphanothece* sp. เจริญขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวอยู่บนอาหาร นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดจีโนมิกต่อไป



รูปที่ 4.1 *Aphanothece* sp. บนอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

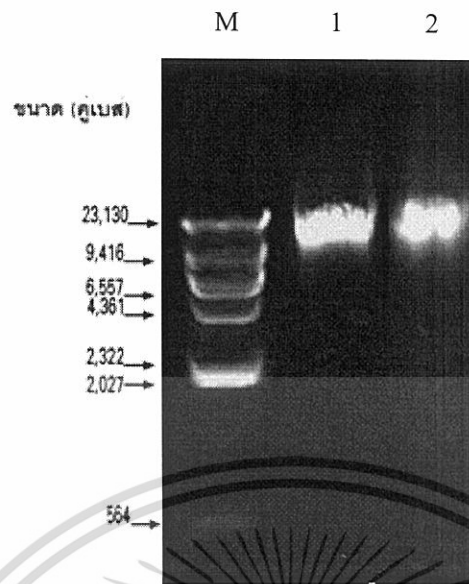
เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างทางด้านรูปร่าง ลักษณะ สี และขนาด รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ไซยาโนแบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสม ในการทดลองการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. นี้ เป็นการเตรียมเชื้อให้บริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิค streak plate ซึ่งเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ และเชื้อขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรียด้วย ในขั้นตอนของการ streak plate ทำโดยการใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่มาเชื้อโดยการลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นมาเขี่ยเชื้อ *Aphanothece* sp. ลงบนอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution ซึ่งอาหารแข็ง BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากในอาหารมีธาตุอาหารต่างๆ ที่ไซยาโนแบคทีเรียต้องใช้ ในการเจริญเติบโตนอกเหนือจากธาตุอาหารหลักที่สิ่งมีชีวิตทั่วไปใช้ในการเจริญ นอกจากนี้ เทคนิค streak plate ยังเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สะดวก และใช้อุปกรณ์น้อยชิ้น ดังนั้นการเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ให้บริสุทธิ์โดยใช้ streak plate จึงทำให้เชื้อ *Aphanothece* sp. ที่แยกได้ปราศจากการปนเปื้อนของทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไซยาโนแบคทีเรียอื่นๆ

#### 4.2 ผลการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียชอบแก้ม

##### *Aphanothece* sp.

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. บนอาหารแข็ง Turk Island Salt Solution เป็นเวลา 7-10 วันแล้วจึงนำเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้ว (glass bead) และสกัดด้วยฟีนอลอิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรส เจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร แล้วนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากการเปรียบเทียบแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ของ *Aphanothece* sp. กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบที่มีขนาดระหว่างแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23.1 กิโลเบสและ 9.4 กิโลเบส และมีปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นอกจากนี้ ยังได้ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมสำหรับการวิเคราะห์ชนิดของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิค Southern blot hybridization จากการวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *A. siamensis* จะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. และจีโนมิกดีเอ็นเอ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

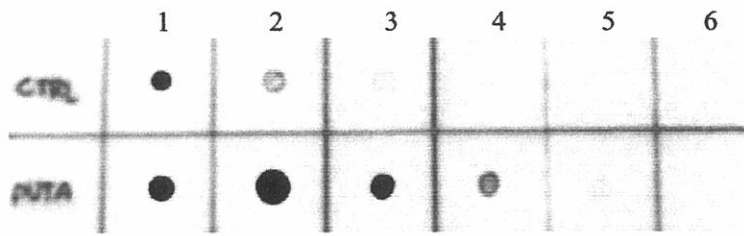
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Aphanothece* sp.

2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Anabaena siamensis*

จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แสดงให้เห็นว่าวิธีการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้วและสกัดด้วยฟีนอลอิมตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก เพราะสามารถใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีความบริสุทธิ์ เพราะปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase รวมถึงปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีปริมาณมาก ซึ่งปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่นำมาสกัด จากนั้นจึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในการศึกษาฮัยโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.3** ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอในพลาสมิด pUTA1.1

CTRL ดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลาก (DIG-labeled DNA control) ที่ระดับความเข้มข้น สูงต่ำ 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

pUTA ดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสที่ติดฉลาก



**รูปที่ 4.4** ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากด้วย DIG-High Prime ของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอพลาสมิด pRVA1.1

CTRL ดีเอ็นเอควบคุมที่ติดฉลาก (DIG-labeled DNA control) ที่ระดับความเข้มข้น สูงต่ำ 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

pRVA ดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่ติดฉลาก

- 1 ดีเอ็นเอเริ่มต้นติดฉลาก
- 2 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$
- 3 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง  $10^{-2}$
- 4 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$
- 5 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง  $10^{-4}$
- 6 ดีเอ็นเอที่ระดับความเจือจาง  $10^{-5}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ผลการศึกษาอินไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Aphanothece* sp. โดยใช้วิธี Southern blot hybridization

#### 4.3.1 ผลการติดฉลากตัวติดตามและการตรวจสอบประสิทธิภาพการติดฉลาก

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามสำหรับการศึกษายีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเตรียมได้จากการนำพลาสมิด pUTA1.1 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* และพลาสมิดของ pRVA1.1 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis* มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกา-โรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตัดแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 307 คู่เบสจาก pUTA1.1 และ 400 คู่เบส จาก pRVA1.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) และทำการติดฉลากที่ปลายของดีเอ็นเอทั้งสองด้วย Dioxygenin-11-dUTP เพื่อใช้สำหรับศึกษายีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสตามลำดับ จากนั้นจึงวาง ดีเอ็นเอที่ผ่านการติดฉลากที่ระดับความเจือจางต่างๆ และนำมาหยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนในตำแหน่งที่กำหนดไว้ตามรูป 4.3 และ 4.4 ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบตัวติดตามที่ติดฉลากในชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ติดฉลากกับ DIG ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 1,000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 พิโคกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ พบว่าประสิทธิภาพของการติดฉลากดีเอ็นเอนั้นเกิดขึ้นได้ดี เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทำให้โมเลกุลเกิดจุดสีดำนบนแผ่นเมมเบรนได้อย่างชัดเจนและ ดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดที่ติดฉลากมีปริมาณ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.3 และ 4.4)

#### 4.3.2 ผลการตรวจสอบการมียืนอู่พเทคไฮโดรจีนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

จากการตรวจสอบการมียืนอู่พเทคไฮโดรจีนส โดยนำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aphanothece* sp. และ *Anabeana siamensis* (ควบคุม) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III แล้ววิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของทั้งไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นปื้น มีขนาดต่ำกว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III สามารถย่อยจีโนมิกของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ได้



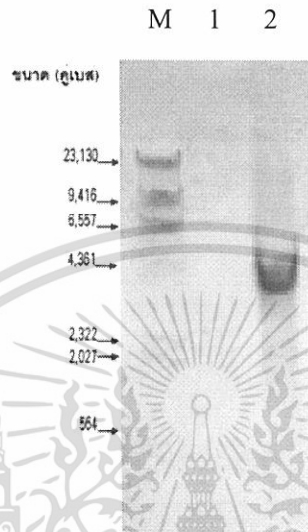
รูปที่ 4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III

- 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp.
- 2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis*

จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากอะกาโรสเจลไปที่แผ่นเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มา blot บนไนลอนเมมเบรนด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) แล้วตรวจสอบการมียืนอู่พเทคไฮโดรจีนส โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยืนอู่พเทคไฮโดรจีนสของ *Anabeana siamensis* ขนาด 307 คู่เบสที่ติดฉลากด้วย DIG ดังแสดงในหัวข้อ 4.3.1 จากการทดลอง พบแถบสีดำที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-Digoxigenin เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AP conjugate กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา NBT และ BCIP ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabeana siamensis* แต่ไม่พบแถบสีดำปรากฏในช่องที่มีดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. (รูปที่ 4.6) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า สามารถพบยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสได้ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabeana siamensis* แต่ไม่พบในไซยาโนแบคทีเรียชอบเค็ม *Aphanothece* sp.



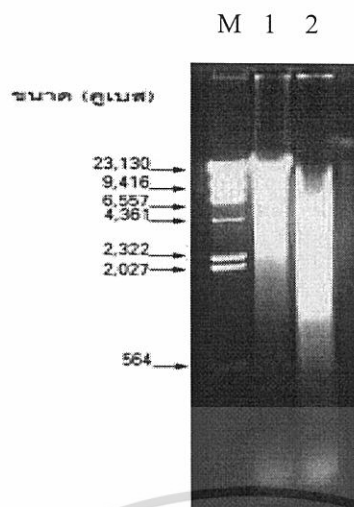
รูปที่ 4.6 ผลการตรวจสอบยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabeana siamensis* เป็นตัวติดตาม M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III

- 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp.
- 2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis*

#### 4.3.3 ผลการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

จากการตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยนำไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aphanothece* sp. และ *Anabeana siamensis* (ลวบคุม) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III แล้ววิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของทั้งไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นป็น มีขนาดต่ำกว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอก่อนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III สามารถย่อยจีโนมิกของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



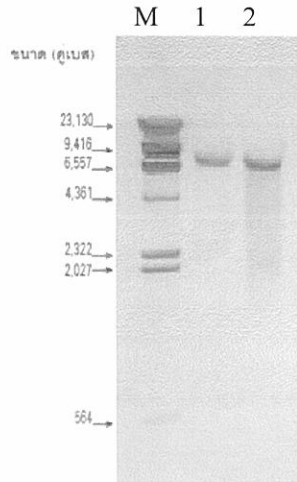
รูปที่ 4.7 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp.

2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis*

จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวและย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากอะกาโรสเจลไปที่แผ่นเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มา blot บนไนลอนเมมเบรนด้วยวิธีคาพิลลารี (capillary method) แล้วตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabeana siamensis* ขนาด 400 คู่เบสที่ติดฉลากด้วย DIG ดังแสดงในหัวข้อ 4.3.1 จากการทดลอง พบแถบสีดำที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-Digoxigenin AP conjugate กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา NBT และ BCIP ที่เกิดขึ้นในเลนของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. และ *Anabeana siamensis*. โดยแถบสีที่ปรากฏในเลนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis* จะเข้มกว่าอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.8) เนื่องจากการใช้ตัวติดตามที่เตรียมมาจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabeana siamensis* ซึ่งทำให้จำเพาะกับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis* มากกว่าจำเพาะกับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Aphanothece* sp. และ *Anabeana siamensis*



**รูปที่ 4.8** ผลการตรวจสอบยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabeana siamensis* เป็นตัวติดตาม

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III  
 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp.  
 2 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabeana siamensis*

#### 4.4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูโกโซ

##### 4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนส

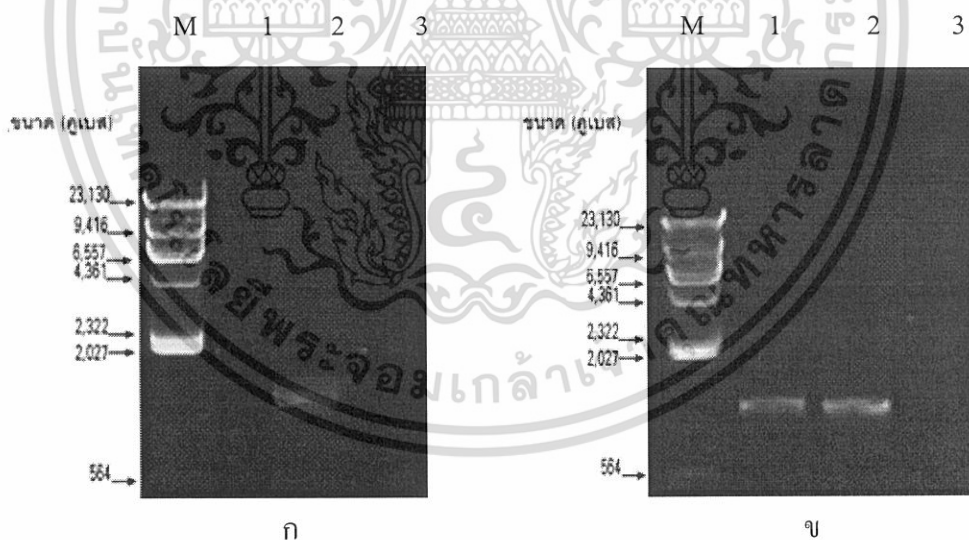
จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. ที่สกัดได้จากข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูโกโซ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และใช้อุณหภูมิในช่วงการปรับตัว (annealing) เป็น 50 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR (รูปที่ 4.9ก) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไม่พบยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp.

##### 4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Aphanothece* sp. ที่สกัดได้จากข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกโซ่ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 และใช้อุณหภูมิในช่วงการปรับตัว (annealing) เป็น 50 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.9ข) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,189 คู่เบส ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความจำเพาะสูงต่อไพรเมอร์ที่ใช้ เนื่องจากไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่จำเพาะ เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มักพบในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ทั้งที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน ในการออกแบบไพรเมอร์ได้เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนและเลือกบริเวณอนุรักษ์ที่เป็นบริเวณของการจับนิกเกิล (Nickel-binding site) จึงทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาสามารถนำไปใช้ศึกษายีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสได้ทั้งในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน และในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Aphanothece* sp. ที่อุณหภูมิของการจับตัวที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสของ *Aphanothece* sp. ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 (ก) และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 (ข)

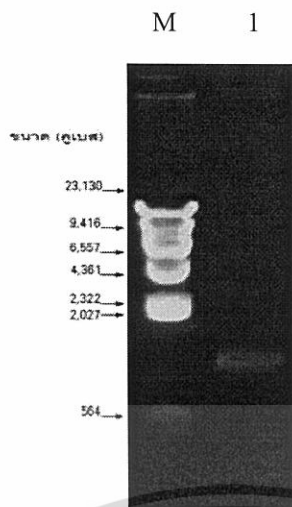
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Aphanothece* sp.
- 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena siamensis*
- 3 Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (ข้อ 4.4) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) ชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูปดังกล่าวออกแบบมาสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 70 คู่เบสจนถึง 10 กิโลเบส จึงสามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการได้ โดยอาศัยหลักการที่ใช้ความร้อนและบัฟเฟอร์ในการละลายเจลที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ แล้วทำการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากบัฟเฟอร์โดยใช้ Spin column ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR จะจับกับเมมเบรนของ Spin column จากนั้นล้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่อยู่บนเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ ทำให้สิ่งปนเปื้อนที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอถูกชะออกจากเมมเบรน แล้วทำการชะผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเมมเบรน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร และเปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.10) ซึ่งขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.9ข) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปริมาณดีเอ็นเอ 6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าวจึงเป็นการแยกเอาสิ่งปนเปื้อนจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่ออกจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้ไปรบกวนปฏิกิริยาการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.10 ผลิตรหัส PCR ที่แยกได้จากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 ผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

#### 4.6 ผลการเชื่อมผลิตรหัส PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

จากการนำผลิตรหัส PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ตรงบริเวณบริเวณปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตรหัส PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ซึ่งเซลล์ให้อาศัยมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficiency) เท่ากับ  $1.6 \times 10^7$  CFU ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีสีขาวเนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตรหัสที่มีสีน้ำเงิน จากการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีผลิตรหัส PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 1 โคโลนี จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

#### 4.7 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มแมนท์ด้วยต่าง

นำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์แล้วนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยต่าง (Alkali lysis) ตามข้อ 3.4.12 ตั้งชื่อพลาสมิดลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ว่า pRhyd1.2 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRhyd1.2 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (รูปที่ 4.11) นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 มาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



รูปที่ 4.11 พลาสมิด pRhyd1.2 ที่สกัดด้วยต่าง

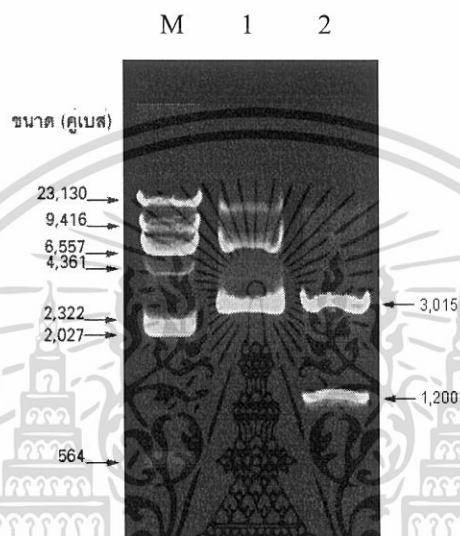
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

I พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2

#### 4.8 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pRhyd1.2 ที่สกัดได้จากข้อ 4.7 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pRhyd1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น 2 แถบ (รูปที่ 4.12 แถบที่ 2) แถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนสุดขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส เป็นเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอด้านล่างขนาดประมาณ 1,200 คู่เบสเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ซึ่งมีขนาด 1,200 คู่เบส ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า พลาสมิด pRhyd1.2 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการนำ pGEM-T Easy เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3



**รูปที่ 4.12** ผลการตัดพลาสมิด pRhyd1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*  
 M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*  
 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2  
 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

#### 4.9 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pRhyd1.2

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhyd1.2 ที่ผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีของ BigDye Terminator Reaction และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PIRSM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ T7 โครมาโดแกรมแสดงดังรูปที่ 4.13 สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ 756 คู่เบส และเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเป็นลำดับกรดอะมิโน ได้กรดอะมิโน 252 ตัว (รูปที่ 4.14) เมื่อนำกรดอะมิโนเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนริเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนสหหน่วยย่อยใหญ่ของ *Aphanothece* sp. มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ *Arthrospira platensis* สายพันธุ์ FACHB439 89 เปอร์เซ็นต์ และ *Spirulina subsalsa* สายพันธุ์ FACHB351 ดังแสดงในตารางที่ 4.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





```

1   S H L L A S A K T G D K I L A V K V S S
2   AGTCACCTCCTCGCTTCGGCAAAAACAGGCGATAAAAATTTCTTGCAGTCAAGGTTTCTCTCA
3       10         20         30         40         50         60
4
5   A G E K L R R L M N L G Q I T Q S H A L
6   GCAGGAGAAAAATTACGACGGTTGATGAACCTCGGACAGATTACCCAGTCTCACGCCCTG
7       70         80         90         100        110        120
8
9   S F F H L S S P D F L L G F D S D P Q S
10  AGTTTCTTCCATCTCAGCAGCCCTGACTTTTCTTGGGCTTTGACAGTGACCCGCAATCG
11      130        140        150        160        170        180
12
13  R N V F G L I Q S D P E L A R A G I R L
14  CGGAATGTGTTTTGGTTTAATCCAGTCTGATCCCGAACTAGCGCGGGCGGGTATTTCGCTTA
15      190        200        210        220        230        240
16
17  R Q F G Q K I I E I L G A R K I H A A W
18  CGGCAATTTGGACAAAAAATTATTGAGATTTTAGGGCGCACGAAAAATTCACGCTGCATGG
19      250        260        270        280        290        300
20
21  A V P G G V R T P L S E E G R N W I L E
22  GCGGTTCTGGTGGTGTGGGACTCCCTTATCGGAAGAGGGACGCAATTTGGATTTTAGAG
23      310        320        330        340        350        360
24
25  R L P E A R Q T T E Q A L A L F K K L L
26  CGTCTTCTGAAGCCCGACAAAACCACAGAGCAAGCACTGGCGTTATTTAAGAAACTCTTA
27      370        380        390        400        410        420
28
29  D Q F S T E A D V F G K F P S L F M G L
30  GACCAGTTTTCCACCGAAGCCGATGTTTTGGCAAATTTCCCTCTCTGTTTATGGGGTTA
31      430        440        450        460        470        480
32
33  V A P D G T W E H Y G G Q T R F M D S E
34  GTCCGCCCTGATGGCACTTGGGAACATTATGGCGGTCAGACTCGCTTTATGGATAGCGAA
35      490        500        510        520        530        540
36
37  G N I V A D G L H E D N Y A D F I G E A
38  GGCAATATTGTCGCTGATGGCTTACATGAGGACAATTACGCTGATTTTATCGGAGAAGCG
39      550        560        570        580        590        600
40
41  V E P W S Y L K F P Y Y K P M G Y P D G
42  GTTGAGCCTTGGTCTTACCTCAAATTCGCCCTACTATAAAACCCATGGGATATCCTGATGGG
43      610        620        630        640        650        660
44
45  M Y R V G P L A R V N I C E R F G T E A
46  ATGTATCGCGTCGGTCCTTTAGCGCGGGTGAATATCTGTGAACGGTTTGGCACAGAGGCT
47      670        680        690        700        710        720
48
49  A D R E L Q E L R D R A
50  GCGGATCGAGAATTACAAGAATTGCGCGATCGCGCT
51      730        740        750

```

#### รูปที่ 4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อย

ใหญ่ของ *Aphanothece* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *Aphanothece* sp. กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB351	49%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB439	33%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB341	31%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB791	31%
<i>Arthrospira maxima</i> FACHBSM	31%
<i>Arthrospira platensis</i> FACHBOUQDS6	31%
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	29%
<i>Gloeocapsa alpicola</i> str. CALU 743	25%
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 DNA	25%
<i>Synochocystis</i> sp.	25%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 การศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ด้วย

##### เทคนิค Southern blot hybridization

จากการนำพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* และ *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 307 คู่เบส และ 400 คู่เบส จากพลาสมิด pUTA1.1 และ pRVA1.1 ตามลำดับ มาทำการติดฉลากด้วย DIG เพื่อใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจสอบการมียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่และยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. สรุปได้ว่าพบยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนส แต่ไม่พบยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Aphanothece* sp.

#### 5.2 การศึกษาไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา

##### ลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR)

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece* sp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 และ Rhyd1-Rhyd3 พบว่า *Aphanothece* sp. มียีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนส แต่ไม่มียีนฮัพเทคไฮโดรจีเนส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสด้วยวิธี Southern blot hybridization

#### 5.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย

##### *Aphanothece* sp.

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม pRhyd1.2 ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 ที่มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 660 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของ *Aphanothece* sp. มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรด

อะมิโนของ *Arthrospira platensis* และ *Spirulina subsalsa* ถึง 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กาญจนพานิช ลีวมนันต์. 2527. สหราชอาณาจักร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. แพลงก์ตอนพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชมภรณ์ ชงเพลิง. 2547. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Adam, M. W. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S. 1981. Hydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta.* 594 : 105-176.
- Appel, J. and Schulz R. 1996. Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)-dehydrogenase (complex i). *Biochim. Biophys. Acta.* 1298 : 141-147.
- Appel, J. and Schulz, R. 1998. Hydrogenase metabolism in organism with oxy photosynthesis: hydrogenase as important regulatory devices for a proper redox posing?. *J. Photochem. Photobiol.* 47 : 1-11.
- Asada, Y., Sugio K. and Ho, K. 1987. Hydrogenase from the unicellular cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Phytochemistry.* 26 : 637-640.
- Belkin, S. and Paden, E. 1978. Sulfide-dependent hydrogen evolution in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *FEBS Lett.* 94 : 291-294.
- Boichenko, V.A., and Hoffmann, P. 1994. Photosynthetic hydrogen-production in prokaryotes and eukaryotes: Occurrence mechanism and functions. *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 genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 394 : 153-158.
- Boison, G., Schmitz, O. and Bothe, H. 1998. Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. *Curr. Microbiol.* 40 : 315-321.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Carrasco, C. D., J. A. Buettner, and J. W. Golden. 1995. Programed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 791-795.
- Colbeau, A., Kelley, B. C. and Vignais, P. M. 1980. Hydrogenase activity in *Rhodospseudomonas capsulata* : relationship with nitrogenase activity. *J. Bacteriol.* 144 : 141-148.
- Daday, A., Mackerras, A. H. and Smith, D. 1985. The effect of nickel on hydrogen metabolism and nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Gen. Microbiol.* 131 : 231-238.
- Daday, A. and Smith, D. 1987. The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolation from *Macrozamia communis* L. Johnson. *Aust. J. Plant Physiol.* 131 : 231-238.
- Desikachary, T. V. 1959. Indian Council of Agariculture Research. New Delhi.
- Dixon, R. O. D. 1987. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Microbiol.* 85 : 193-201.
- Eisbrenner, G., Distler, L. Floener, L. and Bothe, H. 1978. The occurrence of the hydrogenase in some blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 118 : 117-184.
- Ewart, G. D., and G. D. Smith. 1989. Immunochemical analysis of the soluble hydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 997 : 83-89.
- Ewart, G. D., Reed, K. C. and Smith, G. D. 1990. Soluble hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. Cloning and sequencing of a potential gene encoding the tritium exchange subunit. *Eur. J. Biochem.* 187 : 215-223.
- Frenkel, A., Gaffron, H. and Battley, E. H. 1950. Photosynthesis and photoreduction by the blue-green alga *Synechococcus elongates*. *Näg. Biol. Bull.* 99 : 157-162.
- Friedrich, B. and Schwartz, E. 1993. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 47 : 351-383.
- Hall, D. O., S. A. Markov, Y. Watanbe, and K. K. Rao. 1995. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynth. Res.* 46 : 159-167.
- Hallenbeck, P. C., and J. R. Benemann. 1978. Characterization and partial purification of the reversible hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. *FEBS Lett.* 94 : 261-264.
- Hansei, A. and Lindblad, P. 1998. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 : 153-160.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Happe, T., Schutz, K. and Bohme, H. 2000. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *CurL Microbiol.* 40 : 315-321.
- Houchins, J. P., and R. H. Burris. 1981. Comparative characterization of two distinct hydrogenases from *Anabaena* sp. strain 7120. *J. Bacteriol.* 146 : 215-221.
- Houchins, J. P., and R. H. Burris. 1981a. Occurrence and localization of two distinct hydrogenases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120. *J. Bacteriol.* 146 : 209-214.
- Houchins, J. P., and R. H. Burris. 1981b. Comparative characterization of two distinct hydrogenase from *Anabena* sp. strain 7120. *J. Bacteriol.* 146 : 215-221.
- Houchins, J. P. 1984. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 768 : 227-255.
- Kaplan, D, Richmond, A. E., Dubinsky, Z. and Aarson, S. 1986. Algal nutrition Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press Inc. Florida
- Kentemich, T., Bahnweg, M., Mayer, F. and Bothe, H. 1989 Location of the reversible hydrogenase. in cyanobacteria. *Z. Naturforsch.* 44c : 384-391.
- Kentemich, T., Casper, M. and Bothe, H. 1991. The reversible hydrogenase in *Anacystis nidulans* is a component of the cytoplasmic membrane, *Naturwissenschaften.* 78 : 559-560.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. 1980. Hydrogen metabolism by filamentous cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 205 : 36-50.
- Lambert, G. and Smith, G. 1981. The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). *Biol. Rev.* 56 : 589-660.
- Lindberg, P., Hansel, A and Lindblad, P. 2000. *hupS* and *hupL* constitute a transcription unit in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. *Arch. Microbiol.* 174: 129-133.
- Lindblad, P. and Sellstedt, A. 1990. Occurrence and localization of an uptake hydrogenase in the filamentous heterocystous cyanobacterium *Nostoc* PCC 73102. *Protoplasma.* 159: 9-15.
- Lindblad, P. and Tamagnini, P. 2001. Cyanobacterial hydrogenases and biohydrogen: Present status and future potential. In J. Miyake, Matsunga, T. and San Pietro, A.(ed). Biohydrogen II. ElsevierScience Ltd., Oxford, United Kingdom. 143-169.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. 1979. Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. *FEBS*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Letts*. 98 : 342-346.

- Oxelfelt, F., P. Tamagnini, R. Salema, and P. Lindblad. 1995. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102: effects 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.
- Papen, H., Kentemich, T., Schmulling, T. and Bathe, H. 1986. Hydrogenase activities in cyanobacteria. *Biochimie*. 68: 121-132.
- Peschek, G. A. 1979a. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H<sub>2</sub>-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.
- Peschek, G. A. 1979c. Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 123: 81-92.
- Phunpruch, S., Baebprasert, W., Thongpeng, C. and Incharoensakdi, A. 2006. Nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. *Journal of Applied Phycology.* 18 : 713-722.
- Rai, A. N., Borthakur, M., Soderback, E. and Bergman, B. 1992. Immunogold localization of hydrogenase in the cyanobacterial-plant symbioses *Peltigera canina*, *Anthoceros punctatus* and *Gunnera magellanica*. *Symbiosis.* 12 : 131-144.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmitz, O., G. Boison, R. Hilscher, B. Hundeshagen, W. Zimmer, F. Lottspeich, and H. Bothe. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 233 : 266-276.
- Schulz, R. 1996. Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. *J. Mar. Biotechnol.* 4 : 16-22.
- Serebriakova, L., Zorin, N. A. and Lindblad, P. 1994. Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413: presence and localization in non-N<sub>2</sub>-fixing cells. *Arch. Microbiol.* 161 : 140-144.
- Serebriakova, T. L., Milagros, M., Nikolay, A. Z., Ivan, N. G. and Richard, C. 1996. Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization

- of redox centres. *FEBS Lett.* 383 : 79-82.
- Shravan, K. C. and Polasa, H. 1991. Influence of nickel and copper on photobiological hydrogen production and uptake in *Oscillatoria subbrevis* strain 111. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* B57 : 281-285.
- Smith, L. A., Hill, Sand Yates, M. G. 1976. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature.* 262 : 209-210.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.
- Stephenson, M. and Stickland, L. H. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. *J. Biochem.* 25 : 205-214.
- Tamagnini, P., Oxelfell, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. Immunological characterization of hydrogenase in the nitrogen-fixing *Nostoc* sp. strain PCC 73102. *Curr. Microbiol.* 31 : 102-107.
- Tamagnini, P., Jose´ -Lui´ s, C., Ligia, A., Maria-Jos´ e, O., Roberto, S. and Peter, L. 2000. Diversity of cyanobacteria hydrogenases, a molecular approach. *Current Microbiology.* 40 : 356-361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindblad, P., Oxelfelt, F. and Wonschiers, R. 2002. Hydrogenase and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66 : 1-20.
- Tel-Or, E., Luijk, L. W. and Packer, L. 1978. Hydrogenase in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Archives of Biochem and Biophysics.* 185 : 185-194.
- Tredici, M. R., Margheri, M. C., De Philippis, R. and Materassi, R. 1990. The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas sirsinalis*. *L. J. Gen. Microbial.* 136 : 1009-1015.
- Troshina, O. Y., Larissa, T. S and Peter, L. 1996. Induction of H<sub>2</sub>-uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413: Effects of hydrogen and organic substrate. *Current Microbiol.* 33 : 11-15.
- Vignias, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbial. Rev.* 25 : 455-501.
- Watanabe, A., Nishigaka, Sand Konishi, C. 1951. Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature.* 168 : 748-749.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wolk, C. P ., Ernest, A. and Elhai, J. 1994. Heterocyst metabolism and development In D. A. Bryant (ed). The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 769-823.

Wutipraditkul, N., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takabe, Tetsuko. and Takabe, Teruhiro. 2005. Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains NapA-Type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters with novel ion specificity that are involved in salt tolerance at alkaline pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 : 4176-4184.

Zhang, X., Robert, T. and Chase Van, B. 1984. Nickel control of hydrogen production and uptake in *Anabaena* sp. strain CA and 1F. *J. Gen Microbiology*. 130 : 1815-1818.

<http://www.thirawat.com/moodle/mod/resource/view.php?id=39>

<http://pirun.ku.ac.th/~fsciwcc/lecture1.ppt>

<http://protist.i.hosei.ac.jp/>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

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

#### ส่วนประกอบ Trace metal mix 1,000 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
โซเดียม โมลิบเดตไดไฮเดรต ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ )	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ )	0.17	มิลลิโมลาร์

#### ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

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

#### ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ ) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ( $FeNH_4$ -Citrate) (0.60 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Turk Island Salt Solution

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า 10 มิลลิลิตร

#### ส่วนประกอบอาหารสต็อก A

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 89.40 มิลลิโมลาร์

แมกนีเซียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) 27.05 มิลลิโมลาร์

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) 99.73 มิลลิโมลาร์

#### ส่วนประกอบอาหารสต็อก B

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 30.37 มิลลิโมลาร์

#### ส่วนประกอบอาหารโซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 43.01 มิลลิโมลาร์

ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 7.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร Turk Island Salt Solution ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร

## ภาคผนวก ค

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

#### ส่วนประกอบอาหาร

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

ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร Turk Island Salt Solution ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### บัฟเฟอร์ TBE 10 เท่า

#### ส่วนประกอบ

Tris	0.89	โมลาร์
กรดบอริก	0.89	โมลาร์
EDTA	25	มิลลิโมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายน้ำ ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรให้มีปริมาตรเป็นสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

### บัฟเฟอร์ TE

#### ส่วนประกอบ

Tris-HCl	1	โมลาร์
EDTA	0.5	โมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายน้ำ ปรับความเป็นกรดต่างเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

### Tracking Dye

#### ส่วนประกอบ

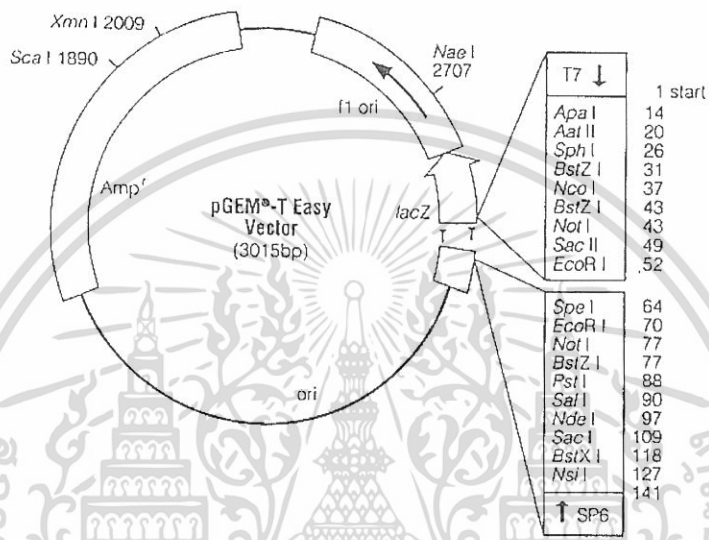
ซูโครส (sucrose) หรือกลีเซอรอล (glycerol)	40	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25	เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก จ

### เวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

#### pGEM-T Easy



ที่มา : Promega technical manual pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้