

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ใน

ไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*



นางสาวเมธดา ศุภกิจนเรศรัฐ

นายสามารถ ต่ายขาว

รพ.
๘๓๙๙๗
๒๕๕๐

ตพหนุ..... 83997
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b. 11975324
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Study of Nucleotide Sequence of Large Subunit Diaphorase Gene in the
Nitrogen Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis***



**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 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ใน
ไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*
Study of Nucleotide Sequence of Large Subunit Diaphorase Gene in the
Nitrogen Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis*

ชื่อนักศึกษา เมลดา ศุภกิจนรเศรษฐ์ รหัสนักศึกษา 47050117
สามารถ ต่ายขาว รหัสนักศึกษา 47050168

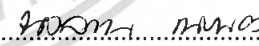
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย	


.....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i>	
นักศึกษา	เมลดดา ศุภกิจนรเศรษฐ์	รหัสนักศึกษา 47050117
	สามารถ ต่ายขาว	รหัสนักศึกษา 47050168
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	พ.ศ. 2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

บทคัดย่อ

Anabaena siamensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่สร้างเฮเทอโรซิสต์และตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีนิกเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนส และ เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส เอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อยที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupS* และ *hupL* ขณะที่เอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสประกอบด้วยเอนไซม์ไดอะพอเรสที่มีโปรตีนสองหน่วยย่อยที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีโปรตีนสองหน่วยย่อยที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxH* และ *hoxY* โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เริ่มต้นโดยออกแบบไพรเมอร์ของยีน *hoxF* จาก *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ทำการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11 และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxF* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากนั้น ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวกเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR pGEM-T Easy หลังจากนั้น ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α แล้วคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาว ตั้งชื่อว่า pFFAna4.1 pFFAna4.2 pFFAna4.3 และ pFFAna4.4 คัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 มาทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* ของ *A. siamensis* มีทั้งหมด 738 คู่เบส เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 246 ตัว และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม BLAST server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงสูงกับลำดับกรดอะมิโนของแอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ *Nodularia spumigena* สายพันธุ์ CCY9414 ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ถึง 89 เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Seminar Report Title	Study of Nucleotide Sequence of Large Subunit Diaphorase Gene in the Nitrogen Fixing Cyanobacterium <i>Anabaena siamensis</i>	
Student	Melada Supakijnoraset	Student ID. 47050117
	Samart Taikhao	Student ID. 47050168
Program	Biotechnology	
Department	Applied Biology	
Academic Year	2007	
Seminar Advisor	Assist. Prof. Saranya Phunpruch	

ABSTRACT

Anabaena siamensis is a N₂-fixing heterocystous filamentous cyanobacterium that possesses two NiFe-hydrogenases: an uptake hydrogenase and a reversible hydrogenase. Uptake hydrogenase comprises two protein subunits encoding by *hupS* and *hupL* whereas Reversible hydrogenase is composed of two diaphorase subunits encoding by *hoxF* and *hoxU* and two hydrogenase subunits encoding by *hoxH* and *hoxY*. This special project aims to study nucleotide sequence of *hoxF* encoding the large subunit diaphorase in the N₂-fixing cyanobacterium *A siamensis*. Degenerated primers of *hoxF* were designed from *Nostoc* sp. PCC 7120 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *A. siamensis* was cultivated in BG11 medium and genomic DNA was isolated by phenol-chloroform method. PCR product of *hoxF* gene was amplified by polymerase chain reaction. The PCR products was purified and ligated into PCR cloning vector pGEM-T Easy and transformed to competent *E. coli* DH5 α . Transformants were selected on ampicillin containing LB agar based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNAs were isolated from white colonies, giving name pFFAna4.1, pFFAna4.2, pFFAna4.3 and pFFAna4.4. Plasmid DNA pFFAna4.3 was selected for detection of PCR product by digestion of restriction enzyme *EcoRI*. A 738 bp of *hoxF* PCR product encoding 246 amino acids. Amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by BLAST server and showed the high similarity to the large subunit diaphorase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (95%), *Nostoc* sp. PCC 7120 (95%), *Nodularia spumigena* CCY9414 (93%) and *Synechocystis* sp. PCC 6803 (89%).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์ ประธานกรรมการโครงการพิเศษ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ และกรรมการโครงการพิเศษ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ยิ่งแก่ผู้จัดทำ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ ผู้จัดทำขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยอำนวยความสะดวกและคอยเอื้อเฟื้อ ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างปฏิบัติงาน ขอขอบคุณพี่ๆ ห้องปฏิบัติการ ที่ให้คำแนะนำในระหว่างการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณครอบครัว ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวเมลดา สุภกิจนรเศรษฐ์
นายสามารถ ต่ายขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	4
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	6
2.1 พลังงานไฮโดรเจน	6
2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย	7
2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส	9
2.3.1 เอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนส	9
2.3.2 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	13
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย	16
2.4.1 ชื่อสามัญและลักษณะโดยทั่วไป	16
2.4.2 ผนังเซลล์	16
2.4.3 ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง	17
2.4.4 ส่วนประกอบของเซลล์	17
2.4.5 รงควัตถุ	17
2.5 <i>Anabaena siamensis</i>	20
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 สารเคมี	24
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	24
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ	24
3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	25
3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA)	25
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม	25
3.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน	25
3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)	26
3.3 อุปกรณ์	26
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	27
3.4.1 วิธีเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย	27
3.4.2 วิธีการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i>	28
3.4.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส	28
3.3.4 วิธีการออกแบบไพรเมอร์	29
3.4.5 วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)	29
3.4.6 วิธีการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยชุดทดสอบ QIAquick PCR Purification Kit	31
3.4.7 วิธีการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์	31
3.4.8 วิธีการเตรียมเซลล์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (competent cell)	32
3.4.9 วิธีการทรานสฟอร์มเมชัน	32
3.4.10 วิธีการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.11 วิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ QIAprep Spin Miniprep Kit	33
3.4.12 วิธีการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	34
3.4.13 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง	36
4.1 ผลการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i>	36
4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วน ของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (<i>hoxF</i>)	38
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วน ของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (<i>hoxF</i>) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส	38
4.4 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	40
4.5 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ และทรานสฟอร์ม พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	41
4.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด (QIAprep Spin Miniprep Kit)	42
4.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	42
4.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก ก	56
ภาคผนวก ข	57
ภาคผนวก ค	58
ภาคผนวก ง	59
ภาคผนวก จ	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก ฉ

หน้า

61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	12
เปอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ของยีน <i>hupSL</i> ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด <i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 73102, <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Anabaena</i> สายพันธุ์ PCC 7120	
2.2	18
รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสง และสิ่งมีชีวิตที่มีรงควัตถุชนิดนั้นๆอยู่	
3.1	30
องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxF</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	
3.2	30
สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hoxF</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	
3.3	32
องค์ประกอบที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์	
3.4	34
องค์ประกอบที่ใช้ในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	
4.1	46
ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hoxF</i> ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	
4.2	46
ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของโปรตีน HoxF ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น	

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 การผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ไซยาโนแบคทีเรีย	8
2.2 แบบจำลองโครงสร้างของยีนฮัพเทคไฮโดรจีเนส	11
2.3 แผนที่การจัดเรียงตัวของยีน <i>hupSL</i> ของ <i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 73102 <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Anabaena</i> สายพันธุ์ PCC 7120	13
2.4 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	14
2.5 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803 <i>Anacyctis nidulans</i> และ <i>Anabaena variabilis</i>	15
2.6 รูปร่างของ <i>Anabaena siamensis</i>	21
3.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในสถานะเขย่า 120 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง	27
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. siamensis</i> จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน อะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์	37
4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hoxF</i> ของ <i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7120 และ <i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803	39
4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ ไดอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (<i>hoxF</i>)	40
4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ <i>A. siamensis</i> ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	41
4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม จากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit)	43
4.6 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม pFFAna4.3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	44
4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส ในส่วนของเอนไซม์ไดอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (<i>hoxF</i>) ของ <i>A. siamensis</i>	45

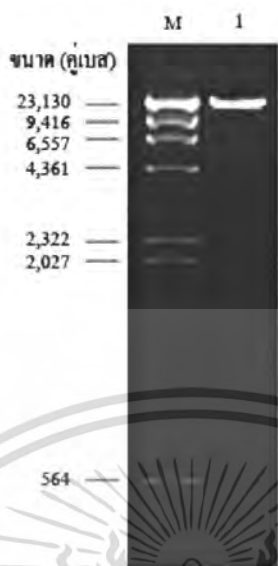
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในสูตรอาหาร BG11 เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยง นำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน *hoxF* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน *hoxF* ที่ได้ทำการออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมแล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน และนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

4.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็ง BG11 เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ทำการเก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่า ปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ที่มีขนาด 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 4.1) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอกับปริมาณของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Anabaena siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรส เจล 0.8 เปอร์เซ็นต์
 M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 1 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟเรซิสพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีคุณภาพดี เพราะปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เพียง 1 แถบ ไม่มีรอยป็นของจีโนมิกดีเอ็นเอที่เกิดจากการ ถูกย่อยและไม่ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอที่มีขนาดเล็กด้านล่างของเลนได้แถบของจีโนมิกดีเอ็นเอ อีกทั้ง ยังได้จีโนมิกดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นในปริมาณสูง แสดงให้เห็นว่าการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี ฟีนอล-คลอโรฟอร์มตามวิธีของ Tamagnini และคณะ (1997) เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิก ดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ได้ มีรายงานพบว่าการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นี้สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* และไซยาโนแบคทีเรียสาย พันธุ์อื่นๆ ได้ด้วย เช่น *A. variabilis*, *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Tamagnini *et. al.* 1997) และ *Gloeothece* สายพันธุ์ ATCC 27152 (Oliveira *et. al.* 2004) จากนั้น จึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิล ไฮโดรจีนเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์

ไคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*)

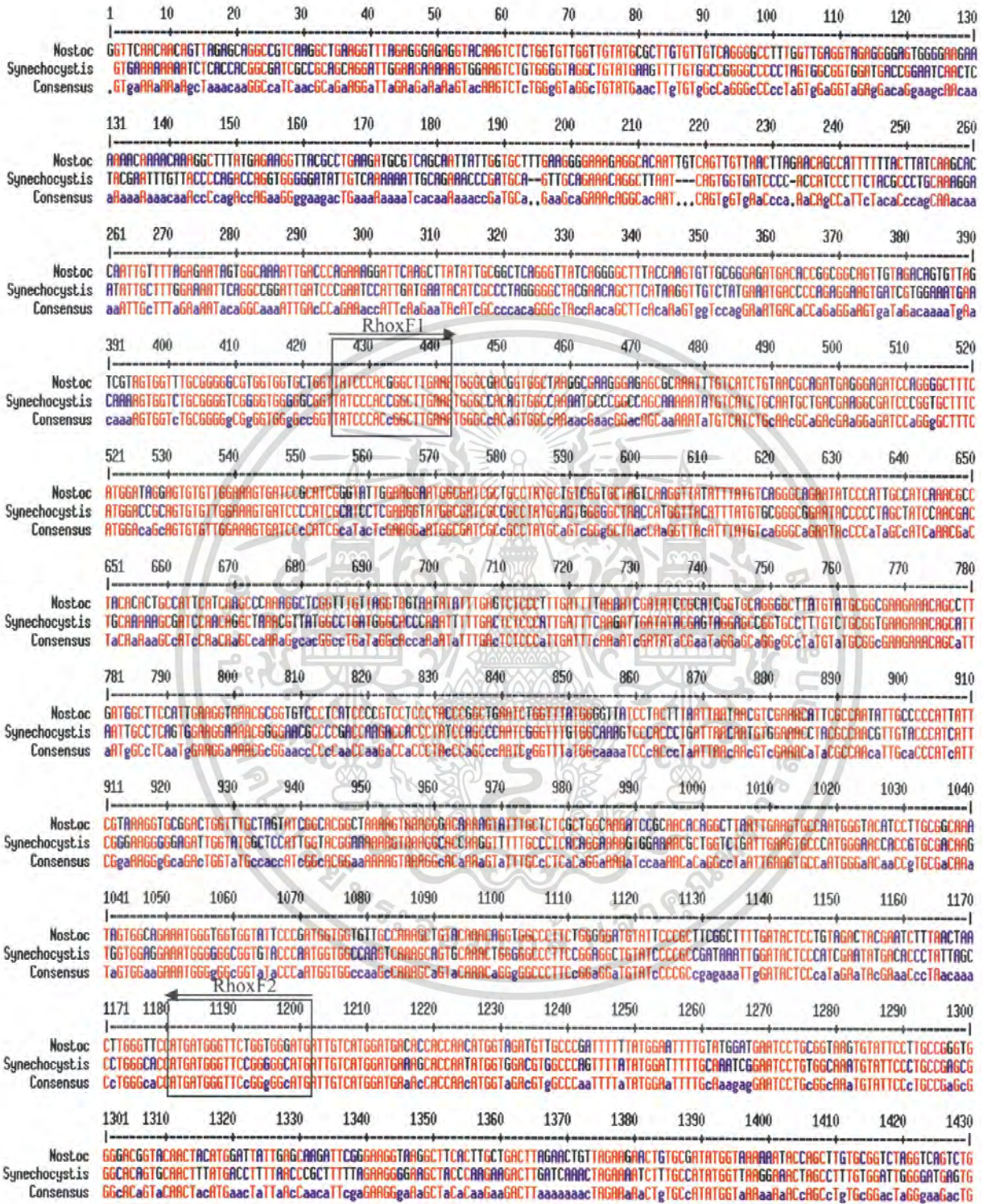
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* ทำโดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* จากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ที่มีรายงานไว้แล้วในธนาคารยีนมาทำการเปรียบเทียบและคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 425 ถึง 442 ให้ชื่อว่าไพรเมอร์ RhoxF1 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TATCCCAC(G/C)GGCTTGAAA-3' (รูปที่ 4.2) มีค่า Tm (melting temperature; อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 48 องศาเซลเซียส สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 1,181 ถึง 1,201 ให้ชื่อว่าไพรเมอร์ RhoxF2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-CAT(G/C)CC(A/C)CC(A/G)GAACCCATCAT-3' (รูปที่ 4.2) มีค่า Tm เท่ากับ 56 องศาเซลเซียส เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 738 คู่เบส

4.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์

ไคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

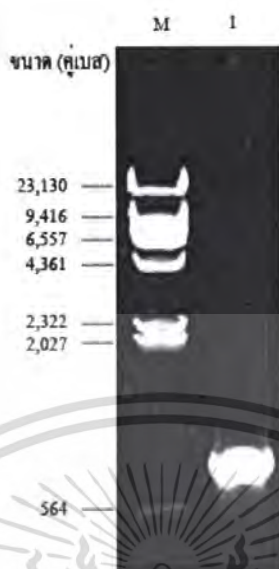
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโอโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่แบบและใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 และอุณหภูมิการจับตัว (annealing temperature) ที่ 45 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ไปวิเคราะห์หับนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* ของ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 อักษรสีแดง สีน้ำเงิน และสีดำ แสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกันตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยม

แสดงบริเวณที่เลือกในการออกแบบไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ในวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลผลิต PCR ของยีน *hoxF* ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2

M คือเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 ผลผลิต PCR ของคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ที่อุณหภูมิ annealing 45 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผลผลิต PCR ที่ได้ของคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 มีความจำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะและขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดหวังไว้ดังที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2 หลังจากนั้น นำผลผลิต PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.4 ผลการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

จากการนำผลผลิต PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส จากข้อ 4.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดทำให้บริสุทธิ์แบบสำเร็จรูป (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ใช่ผลผลิต PCR ออกไป ตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลผลิต PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบผลผลิต PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนส

เอกภพและอวกาศที่เต็มไปด้วยสิ่งมีชีวิตที่ต่างออกไปจากที่เราเห็น ไม่มีผู้คิดค้นใช้ประโยชน์จากคาร์บอนที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างออกไปจากที่เราเห็น ไม่มีผู้คิดค้นใช้ประโยชน์จากคาร์บอนที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างออกไปจากที่เราเห็น ไม่มีผู้คิดค้นใช้ประโยชน์จากคาร์บอนที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างออกไปจากที่เราเห็น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (รูปที่ 4.4) โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.3) เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR มีปริมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าวเป็นการป้องกันไม่ให้อำนาจเป็นไปรบกวนปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์



รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. siamensis* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxF* เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2

4.5 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ และทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอ ถูกผสมเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

นำชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (ภาคผนวก จ) การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ทั้งสองอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วน ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10 : 1 จากนั้น นำพลาสมิดที่ถูกผสมที่ได้มาทำการ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG จากผลการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์ PCR มา 4 โคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

4.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin

Miniprep Kit)

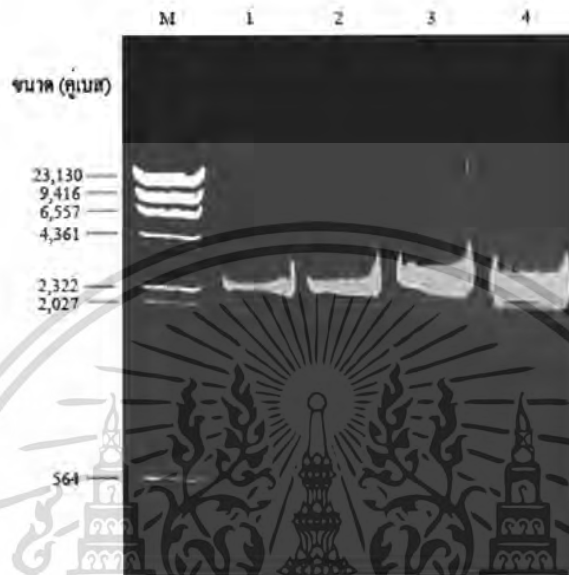
จากการนำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอ ดังนี้ pFFAna4.1, pFFAna4.2, pFFAna4.3 และ pFFAna4.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝางแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 มีแถบของดีเอ็นเอ (band) ที่สูงกว่าพลาสมิดอื่น ๆ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ และมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.5) จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ที่สกัดได้ไปตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป

4.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

*Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 จากข้อที่ 4.6 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่โปรเมอร์ *RhoxF1* และ *RhoxF2* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส และ 3,000 คู่เบส (รูปที่ 4.6 ช่องที่ 2) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด

3,000 คู่เบส เป็นแถบของเวกเตอร์ pGEM-T Easy เนื่องจากในเวกเตอร์ pGEM-T Easy มีบริเวณจดจำของ

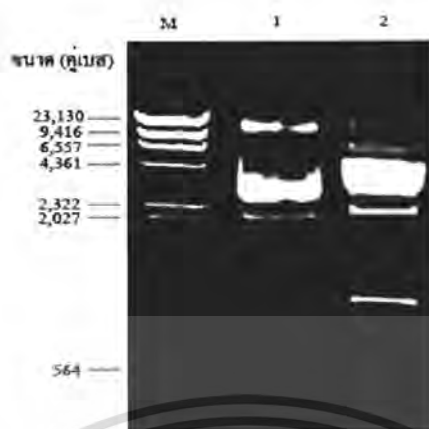


รูปที่ 4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมจากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit)

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

- 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.1
- 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.2
- 3 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3
- 4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.4

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ภายในบริเวณ multicloning site ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดที่ถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเวกเตอร์ pGEM-T Easy คือ 3,015 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 800 คู่เบส เป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป โดยมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 (738 คู่เบส) จึงสรุปได้ว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีนเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- รูปที่ 4.6** ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pFFAna4.3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- 1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3
- 2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

4.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ที่ผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ขนาด 738 คู่เบส (รูปที่ 4.7) จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของ *A. siamensis* ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนจะได้กรดอะมิโน 246 ตัว เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์โคอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของ *A. siamensis* ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่า มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* สูงสุดใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ถึง 83 และ 83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีความคล้ายคลึงกันกับลำดับของกรดอะมิโนสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1	TGGGCAACGG W A T V	TAGCAAAATC A K S	CGCAGGTGAG A G E	AAAAATGTTG K N V V	TCATTTGTAA I C N	50
51	TGCTGATGAA A D E	GGTGATCCTG G D P G	GCGCATTTCAT A F M	GGATCGAAGT D R S	GTGCTGGAGA V L E N	100
101	ATGACCCCA D P H	TCGAATTTTA R I L	GAAGGAATGG E G M A	CGATCGCTGC I A A	CTATGCCATC Y A I	150
151	GGTGCCACCC G A T Q	AAGGTTACAT G Y I	TTATGTTAGG Y V R	GCAGAATATC A E Y P	CCATTGCCAT I A I	200
201	TAAACGTTTG K R L	CAAACGCTA Q T A I	TCCAGCAAGC Q Q A	CCAACGGTTG Q R L	GGTTTATTAG G L L G	250
251	GTTCCCAAGT S Q V	CTTTGAATCA F E S	CCCTTTGATT P F D F	TTAAAGTAGA K V E	AATCCGCATT I R I	300
301	GGTGCTGGGG G A G A	CTTATGTATG Y V C	CGGTGAAGAA G E E	ACAGCGTTAA T A L M	TGGCTTCCAT A S I	350
351	TGAAGGTAAA E G K	CGCGGTGTTC R G V P	CCCATCCCCG H P R	TCCACCCTAT P P Y	CCAGCAGAAT P A E S	400
401	CTGGATTATG G L W	GGGCTATCCC G Y P	ACTTTAATTA T L I N	ACAACGTAGA N V E	AACATTTGCG T F A	450
451	AATATAGCGC N I A L	TGATTATTCG I I R	TAACGGTGCT N G A	GACTGGTTTG D W F A	CGAGTATCGG S I G	500
501	CACAGAGAAA T E K	AGCAAAGGGA S K G T	CAAAAATATT K V F	TGCCCTAGCG A L A	GGGAAAATCC G K I L	550
551	TCAACACAGG N T G	CTTAATTGAA L I E	GTTCCCATGG V P M G	GGACAACCTT T T L	ACAGCAAATC Q Q I	600
601	GTTGAAGAAA V E E M	TGGGCGGCGG G G G	TGTTCTGAT V P D	GGCGGTATTG G G I A	CTAAAGCGAT K A I	650
651	ACAGACAGGC Q T G	GGCCCTTCCG G P S G	GGGGATGTAT G C I	ACCCGCCTCT P A S	GCCTTTGATA A F D T	700
701	CACCTGTAGA P V D	TTATGAATCC Y E S	TTGACGGCTT L T A L	TAGGTTCC G S	738	

รูปที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิตไฮโดรจีเนสในส่วนของ
เอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของ *A. siamensis* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ
ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ชื่อว่า
RhoxF1 และ RhoxF2

ตารางที่ 4.1 ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)
<i>Anabaena siamensis</i>	100
<i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7120	83
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	82
<i>Anabaena variabilis</i>	78

ตารางที่ 4.2 ความเหมือนกันและความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของโปรตีน HoxF ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือนกันของกรดอะมิโน (%)	ความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน (%)
<i>Anabaena siamensis</i>	100	100
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	89	95
<i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7120	89	95
<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414	85	93
<i>Anabaena variabilis</i>	83	93
<i>Nostoc</i> สายพันธุ์ PCC 7422	83	90
<i>Cyanothece</i> สายพันธุ์ ATCC 51142	80	91
<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	79	89
<i>Synechocystis</i> สายพันธุ์ PCC 6803	76	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

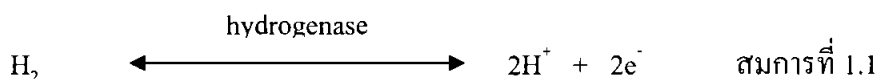
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการพิเศษ

ในโลกปัจจุบันนี้อาจกล่าวได้ว่าพลังงานเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง พลังงานเปรียบเสมือนเป็นตัวขับเคลื่อนเศรษฐกิจให้ก้าวเดินไปข้างหน้า โดยพลังงานหลักที่นิยมนำมาใช้กันก็คือ พลังงานที่มาจากก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ แต่พลังงานหลักที่แท้จริงคือพลังงานจากน้ำมัน เนื่องจากสถานการณ์ปัจจุบัน ราคาน้ำมันดิบทั่วโลกได้พุ่งตัวสูงขึ้นอันเนื่องมาจากปริมาณน้ำมันสำรองของโลกได้ใกล้หมดลง ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลก นอกจากนี้ ผลจากการใช้พลังงานจากน้ำมันยังก่อให้เกิดมลภาวะบนโลก เช่น ภาวะเรือนกระจก มลพิษทางอากาศอันเนื่องมาจากการปล่อยมลพิษที่เกิดจากการสันดาปภายในของเครื่องยนต์ที่ไม่สมบูรณ์ การรณรงค์และการใส่ใจกับสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในด้านการใช้พลังงาน ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อที่จะหาพลังงานรูปแบบใหม่ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมาทดแทนพลังงานรูปแบบเก่า ๆ ตัวอย่างเช่น พลังงานนิวเคลียร์ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานจากแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจจะช่วยลดปริมาณการสั่งซื้อน้ำมันดิบจากต่างประเทศ

พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากพลังงานไฮโดรเจนมีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เป็นก๊าซที่ไม่มีกลิ่น เมื่อทำการสันดาปด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศเกิดเป็นออกไซด์ของไนโตรเจนซึ่งเป็นพิษน้อยกว่าพลังงานอื่นๆ การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีมีรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นการผลิตไฮโดรเจนจากผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการทางปิโตรเคมี โดยใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบของคาร์บอนในมีเทน การผลิตไฮโดรเจนอีกวิธีหนึ่งได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis) โดยทำที่อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีดังกล่าว ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) โดยเฉพาะจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนในสิ่งมีชีวิต เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันและปฏิกิริยาผันกลับ ดังสมการที่ 1.1



เอนไซม์ไฮโดรจีเนส พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้ง โปรคาริโอตและยูคาริโอต เอนไซม์ส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้nikelในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

1. Unidirectional หรือ uptake hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. Bidirectional หรือ reversible hydrogenase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและเร่งปฏิกิริยารีดักชันโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

ในงานวิจัยหลายชนิดที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ไฮยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสามารถนำเอาพลังงานจากแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้มวลชีวภาพและได้ไฮโดรเจนเป็นผลพลอยได้ แต่เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในสาหร่ายสีเขียวนั้นจะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ไม่สอดคล้องกับความต้องการ ดังนั้นไฮยาโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในฐานะที่สามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นกัน และมีเอนไซม์ที่ไวต่อออกซิเจนไม่มากนัก นอกจากนี้ไฮยาโนแบคทีเรียมีคุณลักษณะเด่นที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นคือ สามารถหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสังเคราะห์ด้วยแสงได้ออกซิเจนในออร์แกนัลเดียวกัน ไฮยาโนแบคทีเรียยังมีระบบการสังเคราะห์ด้วยแสงและการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่คล้ายพืช เอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไฮยาโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนที่มากเกินไปในเซลล์ มีรายงานการศึกษาเมตาบอลิซึมของไฮโดรเจนและเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไฮยาโนแบคทีเรียหลายชนิด (Kerfin and Boger, 1982; Houchins, 1984; Boichenko and Hoffmann, 1994; Schulz, 1996; Appel and Schulz,

1998) อีกทั้งมีรายงานการใช้ไบโอไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ (Hall *et al.*, 1995; Schulz, 1996)

ในไซยาโนแบคทีเรียพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดข้างต้นคือ เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส (uptake hydrogenase) และเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (reversible hydrogenase) ชนิดแรกคือ เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ทุกชนิดและไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวบางชนิดที่ไม่ตรึงไนโตรเจน เช่น *Anacystis nidulana* (Peschek, 1979a,b) เอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสทุกชนิดมีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Ni-Fe hydrogenase) Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัฟเทคไฮโดรจีเนสของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 และอธิบายโปรแกรมการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอ (programmed DNA rearrangement) ที่เกิดขึ้นในยีนหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโครงสร้างของอัฟเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et al.*, 1998) *Anabaena variabilis* (Happe *et al.*, 2000) และ *Gloeotheca* สายพันธุ์ PCC 6909 (Oliveira *et al.*, 2004) เอนไซม์ไฮโดรจีเนสชนิดที่สองคือ เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส พบในไซยาโนแบคทีเรียทั่วไป เอนไซม์ชนิดนี้มีนิคเกิลและเหล็กเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับชนิดแรก และทำงานได้ดีในสถานะที่ไม่มีอากาศ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. (Frenkel *et al.*, 1950) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirulina maxima* (Llama *et al.*, 1979) และ *Oscillatoria* sp. (Belkin and Paden, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or *et al.*, 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris, 1981a,b) จนกระทั่งปัจจุบัน มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *A. variabilis* (Schmitz *et al.*, 1995) *A. nidulans* (Boison *et al.*, 1996) *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996) *Prochlorothrix hollandica* (Mitin and Bullerjahn, 1997) *Arthrospira platensis* (Zhang *et al.*, 2004) และ *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 (Marina *et al.*, 2002)

Anabaena siamensis เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทยและเจริญได้อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีแสงจำกัด เซลล์ของ *A. siamensis* มีรูปร่างเป็นแบบถักเปียร์หรือรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสทรงกระบอกขนาดสม่ำเสมอเรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมด *A. siamensis* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการยินยอมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สูง (Antarikanonda, 1982a,b) โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย และแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดด้วยกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ให้เป็นไนโตรท หรือสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเต็มที่และตายไปจะให้อินทรีย์วัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืช การทำนาได้ผลดี จากประโยชน์ของ *A. siamensis* ดังที่ได้กล่าวมา จึงทำให้มีการนำ *A. siamensis* มาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตในการเพาะปลูกข้าวในปัจจุบัน

ในโครงการพิเศษนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เพื่อจะได้มีข้อมูลเกี่ยวกับยีนโคอะฟอเรสที่อยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* นอกเหนือจากยีนไฮโดรจีเนสที่ได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปบ้างแล้วนั่นก็คือ ยีน *hoxH*, *hupL* และ *hupS* และยังคงขาดยีน *hoxY*, *hoxF* และ *hoxU* อยู่ซึ่งจะทำให้เกิดประโยชน์ในการวิจัยโดยมุ่งสู่การค้นหาน้ำที่การทำงานของยีนและแบบแผนการแสดงออกของยีน *hoxF* ซึ่งจะมีผลในการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งจะใช้ในการผลิตพลังงานสะอาดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* สามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. siamensis* ทำการเก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงและนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณขึ้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hoxF ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ บริเวณอนุรักษ์ของยีน *hoxF* ที่ได้ทำการออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น จากนั้นทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วย เอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ X-gal และ IPTG นำทรานสฟอร์มแมนท์มาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม และแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจินเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เพื่อนำไปใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่และให้ผู้สนใจนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้อ้างอิงต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ในการค้นคว้าวิจัยโดยมุ่งสู่การค้นหาน้ำที่การทำงานของยีนและแบบแผนการแสดงออกของยีน *hoxF* ซึ่งจะมีผลในการขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งจะใช้ในการผลิตพลังงานสะอาดต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลังงานไฮโดรเจน

วิกฤตการณ์พลังงานในช่วงทศวรรษที่ 70 ที่ราคาน้ำมันพุ่งสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจโลก ทำให้มีการค้นคว้าหาแหล่งพลังงานอื่นๆ มาทดแทนการใช้ น้ำมัน ซึ่งในขณะนั้น ก๊าซไฮโดรเจน ได้ก้าวเข้ามาเป็นตัวเลือกที่จะนำมาทดแทนน้ำมันในอนาคตด้วยคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น ให้พลังงานต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ จึงใช้เป็นเชื้อเพลิงในจรวดขับเคลื่อนสำหรับส่งยานอวกาศและสามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษอันเป็นจุดเด่นของการเป็นพลังงานสะอาด (clean energy) ผลผลิตที่เกิดจากการเผาไหม้มีเพียงน้ำเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ในเวลาต่อมาเมื่อราคาน้ำมันลดลง ความสนใจในการใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงก็ลดลงไป ต่อมาในทศวรรษที่ 90 เมื่อโลกตื่นตัวกับปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปรากฏการณ์เรือนกระจก (greenhouse effect) ทำให้ก๊าซไฮโดรเจนกลับมาเป็นที่สนใจอีกครั้ง เพราะเป็นพลังงานสะอาดและเผาไหม้แล้วไม่ปล่อย green house gas เหมือนอย่างก๊าซมีเทน แต่การกลับมาของก๊าซไฮโดรเจนในครั้งนี้ต่างไปจากเดิม เพราะไม่ได้มองไฮโดรเจนในฐานะเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้แบบเดียวกับน้ำมันหรือก๊าซธรรมชาติ แต่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) เพื่อผลิตกระแสไฟฟ้า โดยที่เซลล์เชื้อเพลิงสามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้จากปฏิกิริยาเคมีระหว่างก๊าซไฮโดรเจนกับก๊าซออกซิเจนจากอากาศโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งต่างไปจากการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยใช้พลังงานความร้อนจากการเผาไหม้เชื้อเพลิง เช่น ถ่านหิน น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ หรือแม้แต่พลังงานนิวเคลียร์(เกรียงศักดิ์, 2546)

การผลิตไฮโดรเจนมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีมนิฟอร์มมิง (steam reforming) หรือจากผลพลอยได้จากกระบวนการทางปิโตรเคมี กระบวนการสตีมนิฟอร์มมิงเป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนในการแยกไฮโดรเจนออกจากองค์ประกอบของคาร์บอนในมีเทนและเมทานอล โดยขั้นแรกของปฏิกิริยา เชื้อเพลิงถูกสลายไปเป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปโดยเปลี่ยนคาร์บอนมอนอกไซด์และน้ำให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 392 องศาฟาเรนไฮต์ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการผลิตไฮโดรเจนได้คือ การแยกน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis) โดยทำที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

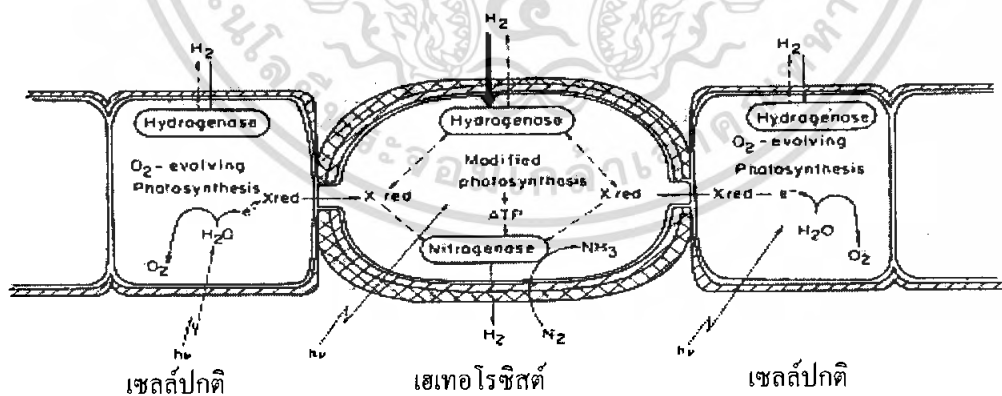
อุณหภูมิ 77 องศาฟาเรนไฮต์ กระแสไฟฟ้าจะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจน ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าในการสลายพันธะเคมีระหว่างไฮโดรเจนกับออกซิเจน 1.24 โวลต์และใช้ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยเหตุที่วิธีการผลิตพลังงานไฮโดรเจนดังกล่าวต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสี่ยงต่อการระเบิด ทำให้มีการคิดค้นและพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen) โดยเฉพาะจากสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย พลังงานแสงจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางไฟฟ้าเคมีของแสง (photoelectrochemical process) และได้ผลผลิตเป็นไฮโดรเจน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต

2.2 การผลิตไฮโดรเจนจากสาหร่าย

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสาหร่าย (algae) ที่รู้จักกันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยูคาริโอตที่สังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล และโพรคาริโอตที่มีกลไกการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบเดียวกับพืชที่เรียกกันว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae หรือ cyanobacteria) สาหร่ายพวก microalgae มีข้อดีตรงที่มีต้นทุนวัตถุดิบราคาถูกมากคือน้ำและแสงแดด เพราะสาหร่ายสามารถใช้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมาสร้างพลังงาน ไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และยังดูดซับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศกลับมาสร้างชีวโมเลกุลในเซลล์ได้อีก การใช้สาหร่ายจึงเป็นกระบวนการสังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมาก ประสิทธิภาพการเปลี่ยนพลังงานจากแสงอาทิตย์ให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายสีเขียวอยู่ระหว่าง 10-20 เปอร์เซ็นต์ (ขึ้นกับค่า Photosynthetically Active Radiation; PAR) และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ข้อดีของพวกสาหร่ายอีกประการคือ มีผลพลอยได้ที่มีมูลค่าสูงและเป็นที่ต้องการของตลาด เช่น Docosahexaenoic acid (DHA) ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่นำไปเติมในนมผงเด็ก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงเป็นที่สนใจของอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ แต่ปัญหาใหญ่ของพวกสาหร่าย คือ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งโดยออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของตัวเอง เมื่อ 60 กว่าปีก่อนมีการค้นพบว่า สาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยวที่เลี้ยงในสภาพไร้ออกซิเจนและไม่มีแสงจะสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกมาได้ทันทีเมื่อได้รับแสงแต่ทว่า การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะหยุดลงหลังจากเวลาผ่านไปไม่กี่นาที เนื่องจากออกซิเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงจะไปยับยั้งเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในเซลล์ ปัญหานี้ทำให้ปิดโอกาสในการนำสาหร่ายไปใช้ในงานวิจัย ซึ่งมีการค้นหามหาหนทางที่จะแก้ปัญหานี้โดยในอนาคตอาจจะใช้กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมมาดัดแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรีย สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง สามารถพบได้ทั้งในเซลล์เฮเทอโรซิสต์และเซลล์ปกติ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจนได้แก่ เอนไซม์ไนโตรจีเนสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโมเนีย โดยปฏิกิริยาดังกล่าวต้องอาศัยพลังงาน ATP และรีดิวซิงเพาเวอร์ (reducing power) ซึ่งในระหว่างการตรึงไนโตรเจนจะได้ก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ใช้สังเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนถูกยับยั้งโดยออกซิเจนได้เช่นเดียวกับกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของสาหร่ายสีเขียว แต่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดจะมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่าเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งมีหน้าที่ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนและไม่มีระบบสังเคราะห์ด้วยแสง ดังนั้นในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จึงไม่มีออกซิเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบธรรมดาที่มีทั้งแสงและออกซิเจนแต่ผลผลิตที่ได้ยังต่ำอยู่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นโปรคาริโอตเช่นเดียวกับแบคทีเรีย ดังนั้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจึงเร็วกว่าในสาหร่ายสีเขียว อีกทั้งการคัดแปลงตัดแต่งพันธุกรรมก็ทำได้ง่ายกว่า โอกาสในการนำไปใช้งานจึงเปิดกว้างกว่า ส่วนเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในเซลล์ปกติ จะเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจากน้ำไปยังตัวรับอิเล็กตรอนและผ่านเข้าสู่เซลล์เฮเทอโรซิสต์ จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งให้กับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เพื่อทำหน้าที่สร้างก๊าซไฮโดรเจน และในเซลล์ปกติก็มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 การผลิตไฮโดรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : Tel-Or et. al., 1978

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เอนไซม์ไฮโดรจีเนส

กระบวนการเมตาบอลิซึมของโมเลกุลไฮโดรเจนในจุลินทรีย์ถูกค้นพบตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 19 และต่อมาพบว่าเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอนไปเป็นไฮโดรเจนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ดังสมการที่ 2.1



เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 ชนิด

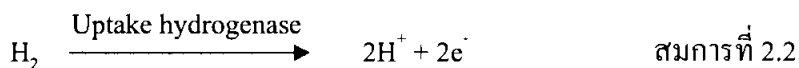
1. Unidirectional หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน
2. Bidirectional หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นโปรตอน และปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน

การจำแนกเอนไซม์จากชนิดของโลหะที่ศูนย์กลางบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กและนิกเกิลเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ปราศจากโลหะ (Vignais *et. al.*, 2001)

2.3.1 เอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า membrane-bound hydrogenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสซึมเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือในไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakoid membrane) ของเซเทอโรซิสต์ (Appel and Schulz, 1998; Eisbrenner *et. al.*, 1978; Vignais *et. al.*, 2001) เอนไซม์อัทเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสได้รับความสนใจศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิด 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 เอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสนอกจากจะพบในแบคทีเรียแล้ว ยังสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกชนิด (Houchins, 1984; Lambert and Smith, 1981; Tamagnini *et. al.*, 2000) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* สายพันธุ์ PCC 6301 (*Anacystis nidulans*) (Peschek, 1979a,b,c; Boison *et. al.*, 1996; Eisbrenner *et. al.*, 1978)

หน้าที่หลักของเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสเกี่ยวข้องกับการสลายไฮโดรเจน ซึ่งไฮโดรเจนเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเฮเทอโรซิสต์จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิสต์ จึงได้รับความสนใจนำมาศึกษาเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Lambert and Smith, 1981; Oxelfelt *et. al.*, 1995; Wolk *et. al.*, 1994) โดยสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์ (Eisbrenner *et. al.*, 1978) และในเซลล์ปกติ (Houchins and Burris, 1981a; Lindblad and Sellstedt, 1990; Rai *et. al.*, 1992) ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ในการเกิดเฮเทอโรซิสต์ (Tamagnini *et. al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าปัจจัยภายนอกได้แก่ แสง นิกเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลต่อปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน (Oxelfelt *et. al.*, 1995) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะที่ให้อากาศที่มีการเติมไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศจะมีสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศปกติ (Eisbrenner *et. al.*, 1978) ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 มีการศึกษาพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ปกติที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ (Troshina *et. al.*, 1996) และจากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (1984) ที่ศึกษาผลของนิกเกิลต่อการสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ IF พบว่าการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงไปในการ ซึ่งนอกเหนือจาก *Anabaena* sp. แล้วยังมีรายงานอื่นที่ยืนยันว่าในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกหลายสายพันธุ์ กิจกรรมของการสลายไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน (Daday *et. al.*, 1985; Daday and Smith, 1987; Oxelfelt *et. al.*, 1995; Papen *et. al.*, 1986; Shravan and Polasa, 1991; Tredici *et. al.*, 1990)

ไนไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัปเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอร์ิกเอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 2 หน่วยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.2) โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตันและถอดรหัสมาจากยีน *hupL* (*hup* มาจาก *hydrogen uptake*) ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตันและถอดรหัสมาจากยีน *hupS* (Carrasco *et. al.*, 1995; Happe *et. al.*, 2000; Lindberg *et. al.*, 2000; Lindblad and Sellstedt, 1990; Oxelfelt *et. al.*, 1998; Tamagnini *et. al.*, 1995)



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

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์อัปเทคไฮโดรจีเนสในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียด้วยกัน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง (similarity) กันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.1) แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 กับลำดับกรดอะมิโนของแบคทีเรีย *Desulfovibrio gigas* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน HupL เพียง 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่ง HupL ของไซยาโนแบคทีเรียมีบริเวณจับของนิกเกิลที่ปลายอะมิโน (N-terminal) ที่มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็น FRGFE(I/V)ILRGKDPQAGLIVTPRI-C⁶²GIC⁶⁵G(A/G)SH ส่วนบริเวณจับของนิกเกิลที่ปลายคาร์บอกซี (C-terminal) มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็น DPVEVGHVARSFDS C⁵⁰⁹LVC⁵¹²TVHAH (Tamagnini *et. al.*, 2002)

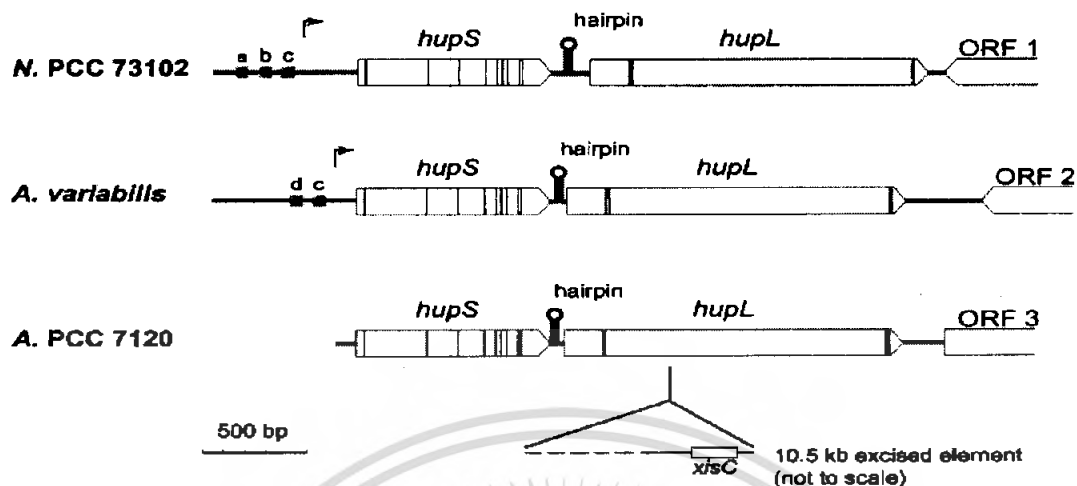
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เปรอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120

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

ที่มา : Tamagnini *et. al.*, 2000

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนส เริ่มต้นโดย Carrasco และคณะ (1995) ได้อธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ และต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัทเทคไฮโดรจีเนสทั้งหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt *et. al.*, 1998) และ *Anabaena variabilis* (Happe *et. al.*, 2000) นอกจากนี้ยังได้มีการเปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 (รูปที่ 2.3)

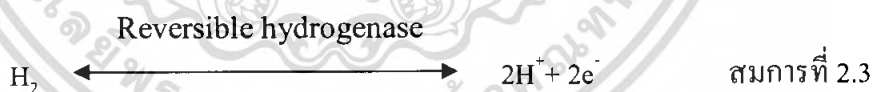


รูปที่ 2.3 แผนที่การจัดเรียงตัวของยีน *hupSL* ของ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120

ที่มา : Tamagnini *et. al.*, 2002

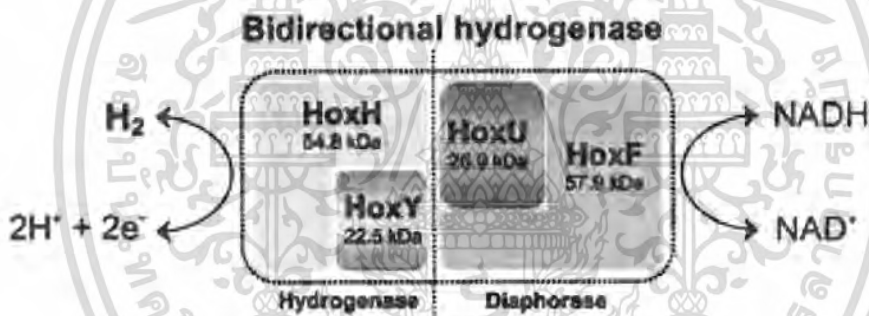
2.3.2 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยรีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการที่ 2.3



รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน (Hansel and Lindblad, 1998; Kentemich *et. al.*, 1989; 1991; Lindblad and Tamagnini, 2001; Serebryakova *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 Padan, 1978; Lambert and Smith, 1980) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. และ *Mastigocladus* sp. (Tel-Or *et. al.*, 1978; Lambert and Smith, 1980; Houchins and Burris, 1981a,b) และเมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจนและคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่าเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส (Houchins, 1984; Serebryakova *et al.*, 1996) กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยที่สองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส (diaphorase) (รูปที่ 2.4) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ (*hox* มาจาก hydrogen oxidation) ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส α และ γ ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NAD(P)^+



รูปที่ 2.4 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

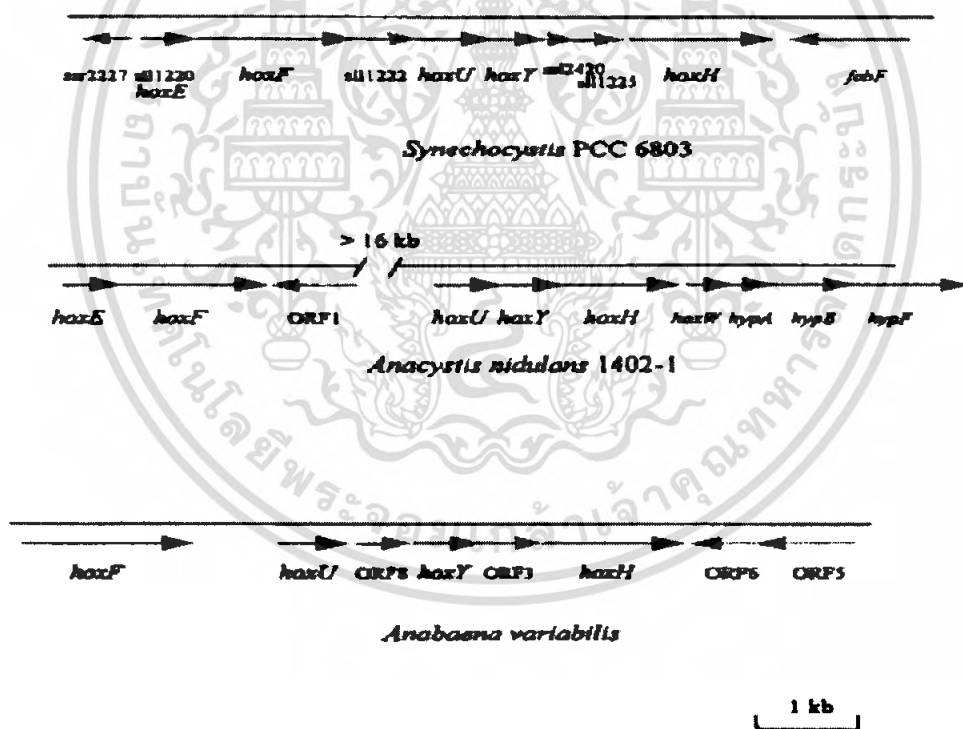
ที่มา : Tamagnini *et al.*, 2002

จนกระทั่งปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* (Ewart *et al.*, 1990) *A. variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 (Schmitz *et al.*, 1995), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel and Schulz, 1996) และ *A. nidulans* (Boison *et al.*, 1996) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียกับแบคทีเรียอื่นๆ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 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* สามารถถอดและแปลรหัสเป็น

เอกลสารที่มีโครงสร้างและหน้าที่เหมือนกับยีน *hoxE* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 และ *Anacystis nidulans* อีกด้วย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังไดอะพอเรส ดังนั้นจึงจัดเป็น *hoxE* เป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสของ *A. variabilis* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มียีน *hoxFUYH* ที่เรียงต่อกันและแทรกด้วย open reading frame สำหรับ *A. nidulans* ยีน *hoxEF* จะแยกจากยีน *hoxUYH* เป็นระยะทางถึง 16 กิโลเบสทำให้การถอดรหัสของยีน *hoxEF* แยกจากการถอดรหัสของยีน *hoxUYH* (รูปที่ 2.5) (Boison *et. al.*, 1998) การศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากยีนของแอนไซมรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสใน *A. variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 *A. nidulans* และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่าระหว่าง *Anabaena* ด้วยกันจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และ *Anabaena* ทั้งสองชนิดจะมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน 58 ถึง 71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่น (Tamagnini *et. al.*, 2002)



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนรีเวอร์สซิมิลไฮโดรจีเนสใน *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 *Anacytis nidulans* และ *Anabaena variabilis*

ที่มา : Boison *et. al.*, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย (ยูวดี, 2546)

2.4.1 ชื่อสามัญและลักษณะโดยทั่วไป

ไชยาโนแบคทีเรียมีชื่อสามัญว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน อยู่ในคิวิชัน Cyanochloronta ไชยาโนแบคทีเรียเป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างออกไป คือ ไชยาโนแบคทีเรียมีคลอโรฟิลล์เอจึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ และมีออกซิเจนซึ่งเกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในพวกแบคทีเรียนอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรียยังมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ บางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ เปลี่ยนสีของเซลล์ได้ สามารถขึ้นอยู่ได้ทั่วทุกแห่งในโลกทั้งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน และยังพบว่า ไชยาโนแบคทีเรียอาจขึ้นรวมอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ทั้งพืชและสัตว์

ในไชยาโนแบคทีเรียนี้ไม่มีคลอโรพลาสต์ชัดเจน แต่มีไทลาคอยด์ ซึ่งจะอยู่เดี่ยวๆ ไม่มีเยื่อบางๆ หุ้ม และไม่มีการจัดเรียงตัวกันเป็นชั้นๆ จะพบเป็นอิสระทั่วไปในเซลล์หรือบริเวณรอบนอกของตัวเซลล์ จึงเรียกบริเวณที่มีรงควัตถุเหล่านี้ว่า โครโมพลาสต์ (chromoplasm) บริเวณไทลาคอยด์นี้เป็นที่อยู่ของคลอโรฟิลล์เอ ส่วนรงควัตถุอื่นๆ จะเกาะอยู่บนผิวของไทลาคอยด์ในลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งเราเรียกว่า ไฟโคบิลิโซม รงควัตถุทั้งหลายที่กล่าวมาแล้วจะไม่รวมกันเป็นพลาสติด (plastid) เหมือนพืชชั้นสูง เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่แบบร่างแหกระจายอยู่ทั่วไป

การที่ไชยาโนแบคทีเรียมีทั้งคลอโรฟิลล์ และซี-ไฟโคไซยานิน จึงทำให้มองเห็นเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้าสาหร่ายชนิดไหนมีซี-ไฟโคอิทรินมากอาจจะมองเห็นเป็นสีแดงปนอยู่ด้วย สัดส่วนของรงควัตถุดังกล่าวมีต่างหากัน ซึ่งทำให้สาหร่ายชนิดนี้มีสีแตกต่างกันไป เช่น มีตั้งแต่สีเขียว (grass-green) ไปจนถึงดำหรือแดง และสีที่เป็นสีกึ่งกลางของสีเหล่านี้

2.4.2 ผนังเซลล์

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

ส่วนที่หก หอสมุดกลาง พระจอมเกล้าฯ เทพระยะ

2.4.3 ผลผลิตของการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic product)

ผลผลิตของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารพวกแป้งชนิดหนึ่ง คือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) ลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปเรียกว่า ไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับ ไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

2.4.4 ส่วนประกอบของเซลล์

เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วย ผนังเซลล์ 2 ชั้น และรอบนอกมีซีท ซึ่งเป็นสารเมือกหุ้มอยู่ ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อต่างๆ เรียกว่า เยื่อพลาสมา (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่จำนวนมาก ฉะนั้น จึงเรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียส จึงเรียกส่วนนี้ว่า เซนโตรพลาสซึม เนื่องจากส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้ม จึงถือว่าไม่ใช่ นิวเคลียสที่แท้จริงในส่วนของโครโมพลาสซึมจะมีไซยาโนไฟซินแกรนูล ซึ่งเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เม็ดเล็กๆนี้ เป็นอาหารสะสมพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซียน นอกจากไซยาโนไฟซินแกรนูลแล้ว ยังมี ก๊าซแวกิวโอล (gas vacuole) ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็กกระจายอยู่ในโครโมพลาสซึม ก๊าซแวกิวโอลนี้ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (40 เท่า) จะเห็นเป็นเม็ดสีดำ แต่เมื่อใช้กำลังขยายสูงๆ (ตั้งแต่ 100 เท่าขึ้นไป) จะเห็นเป็นเม็ดสีแดงเนื่องจากการสะท้อนแสง โดยทั่วไปก๊าซแวกิวโอลมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจมีลักษณะเป็นถุงกลม เช่น ในสกุล Oscillatoria ถูงนี้มีเยื่อต่างๆหุ้ม เยื่อนี้ประกอบด้วยสารจำพวกโปรตีนซึ่งสามารถให้ออกซิเจนซึมผ่านได้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการหายใจ ส่วนก๊าซที่บรรจุภายในถึงคาดว่าเป็นก๊าซไนโตรเจน หรือสารประกอบของไนโตรเจนจำพวกเอมีน (amine)

2.4.5 รงควัตถุ (pigment)

รงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และไฟโคบิลิน (phycobilin) รงควัตถุในสาหร่ายแต่ละชนิดมีผลทำให้สาหร่ายเหล่านั้นมีสีที่แตกต่างกันไป เช่น สีเขียว สีเขียวแกมน้ำเงิน สีน้ำตาล และสีแดง เป็นต้น รงควัตถุเหล่านี้อาจกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม เช่น ที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน หรือในพลาสมาพวกคลอโรพลาสต์ หรือโครโมพลาสต์ เช่น ที่พบในสาหร่ายสีอื่นๆ รงควัตถุทั้ง 3 ชนิด มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

2.4.5.1 คลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักในคลอโรพลาสต์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงสีแดงและสีน้ำเงินมาก และสะท้อนแสงสีเขียว คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี ซี ดี และอี คลอโรฟิลล์ เอ มีสีเขียวแกมน้ำเงิน คลอโรฟิลล์ บี มีสีเขียวแกมเหลือง สำหรับทุกชนิดมีคลอโรฟิลล์เอเป็นรงควัตถุหลัก ส่วนคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ นั้นก็กระจายอยู่ในสาหร่ายแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.2 คลอโรฟิลล์เหล่านี้จะรวมอยู่กับโปรตีน และฝังอยู่ระหว่างโปรตีนกับไขมันของเยื่อคลอโรพลาสต์

ตารางที่ 2.2 รงควัตถุชนิดต่างๆ ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ด้วยแสงและสิ่งมีชีวิตที่มีรงควัตถุชนิดนั้นๆอยู่

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

ที่มา : ยิวดี, 2546

คลอโรฟิลล์เอ นั้นเป็นรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงขั้นต้น สามารถดูดพลังงานด้วยตนเอง ส่วนคลอโรฟิลล์ชนิดอื่นๆ จัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นที่ 2 คือ จะทำหน้าที่ดูดเอกลำแสงที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลังงานแสงแล้วส่งต่อไปยังคลอโรฟิลล์อีกครั้งหนึ่ง คลอโรฟิลล์ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ร้อนหรือเย็น อะซีโตน (acetone) ปีโตรเลียมสปิริต (petroleum spirit) หรือส่วนผสมของเมทานอล (methanol) และปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร

2.4.5.2 แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

เป็นรงควัตถุที่พบในเซลล์ที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสงทุกชนิด รงควัตถุกลุ่มนี้จะดูดแสงสีน้ำเงินบริเวณความยาวช่วงคลื่น 400-550 นาโนเมตร และสะท้อนแสงสีเหลืองและส้ม ในพืชชั้นสูงโดยทั่วไปสีของคลอโรฟิลล์จะบังสีของแคโรทีนอยด์ในใบไว้ ยกเว้นในตอนที่ยังไม่แก่ใกล้จะร่วง เมื่อคลอโรฟิลล์สลายไปก็อาจจะเห็นสีเหลือง หรือส้มของแคโรทีนอยด์ในใบได้อย่างชัดเจน สภาพเช่นนี้อาจเห็นได้บ้างในสาหร่าย แต่ไม่ชัดเจนเท่าพืชชั้นสูง แคโรทีนอยด์อยู่ในเยื่อของคลอโรพลาสต์ติดกับคลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ประกอบด้วย แคโรทีน (carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ซึ่งจะแยกกล่าวไว้ดังนี้

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

2.4.5.2.2 แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) เป็นรงควัตถุที่สะท้อนแสงสีเหลือง จึงมองเห็นเป็นสีเหลือง แซนโทฟิลล์นี้อาจจะเรียกว่า แคโรทีนอล (carotenol) หรือออกซีแคโรทีน (oxycarotene) เพราะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเพิ่มเข้ามาโดยเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) แซนโทฟิลล์ประกอบด้วย ลูเทอิน (lutein) ฟลูโคแซนทิน (flucoxanthin) และมิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) แคโรทีนอยด์ละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์ ดังนั้นในการจะแยกแคโรทีนอยด์จากคลอโรฟิลล์เริ่มแรกต้องสกัดรงควัตถุทั้งหมดด้วยการใช้แอลกอฮอล์ร้อนแล้วปล่อยให้เย็นลง เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) และน้ำกลั่นลงไปเพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ แล้วเขย่าเบาๆ สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนจะเป็นชั้นของแอลกอฮอล์ ซึ่งมีแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ ชั้นล่างจะเป็นคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ซึ่งมีคลอโรฟิลล์ละลายอยู่ สามารถแยกนำไปศึกษาได้ ถ้าจะแยกแคโรทีนออกจากแซนโทฟิลล์ ให้เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ลงไป แคโรทีนจะละลายในปีโตรเลียมอีเทอร์ แยกนำไปศึกษาต่อไป

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

2.4.5.3.1 ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) พบในสาหร่ายสีแดงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิด รงควัตถุชนิดนี้จะดูดแสงสีเขียวเหลือง ซึ่งคลอโรฟิลล์ไม่ดูด และไม่ดูดแสงสีแดงจึงเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง ด้วยเหตุผลนี้พวกสาหร่ายสีแดงจึงอาศัยอยู่ใต้น้ำระดับลึกที่แสงสีแดงส่องลงไปไม่ถึง ยังเป็นสาหร่ายที่อยู่ลึกมากก็จะมีปริมาณของไฟโคอีริทรินมากเมื่อเปรียบเทียบกับคลอโรฟิลล์ ทำให้สีของสาหร่ายเหล่านี้มีสีแดงยิ่งขึ้น

2.4.5.3.2 ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และ อัลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) ทั้ง 2 ชนิดเป็นรงควัตถุสีน้ำเงิน พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีแดงดูดแสงช่วงคลื่นที่ยาวกว่ารงควัตถุสีแดง ทั้งแคโรทีนอยด์และไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุเสริม (accessory pigment) ทำหน้าที่ดูดพลังงานแสงแล้วถ่ายทอดไปให้คลอโรฟิลล์เอ เสมอ

2.5 *Anabaena siamensis*

จากการจำแนก *A. siamensis* ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary พบว่า *A. siamensis* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

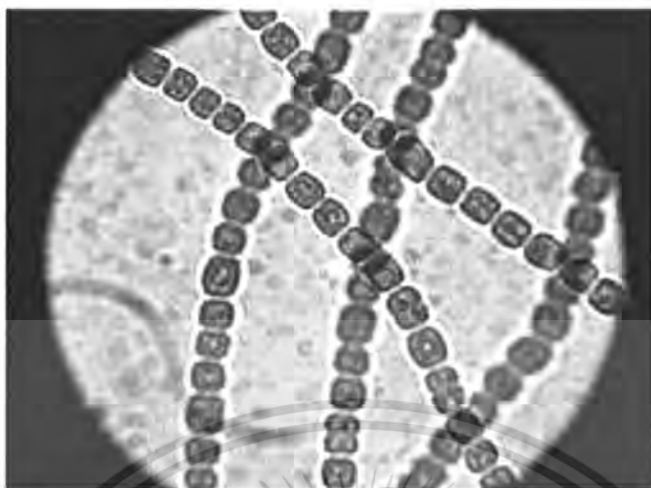
Family Nostocaceae

Genus *Anabaena*

Specie *Anabaena siamensis*

เซลล์ของ *A. siamensis* มีรูปร่างเป็นแบบถังเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยมจตุรัสทรงกระบอก ขนาดสม่ำเสมอ เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกปัด และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ตำแหน่งของการเกิดเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณตอนปลายด้านหัวและท้ายของเซลล์ (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 รูปร่างของ *Anabaena siamensis*

ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สูง (Antarikanonda, 1982a,b) โดยไนโตรเจนที่ตรึงได้จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแอมโมเนียและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ให้เป็นไนไตรท์ ไนเตรท หรือสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตเต็มที่และตายไป จะให้อินทรีย์วัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำการไร่ได้ผลดี จากประโยชน์ของ *A. siamensis* ดังที่ได้กล่าวมา *A. siamensis* จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตในการเพาะปลูกข้าวในปัจจุบัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Appel และ Schulz (1996) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ NAD(P)-reducing hydrogenase operon ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 พบว่าโอเปอรอนของ NAD(P)-reducing hydrogenase ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 ประกอบด้วยยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็ก ยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ และ open reading frame (ORF) โดยเรียงลำดับต่อกันดังนี้ *hoxE*, *hoxF*, *hoxU*, *hoxY*, *hoxH* และมี ORF3 แทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxF* กับ *hoxU* และ ORF6 กับ ORF7 แทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxY* และ *hoxH* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 กับสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ HoxE ใน *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มีความคล้ายคลึงกับ HndA ของ *Desulfovibrio fructosovorans* 33 เปอร์เซ็นต์ ลำดับไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนของ HoxF มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน HoxF ของ *A. variabilis* ถึง 65 เปอร์เซ็นต์และ HndC ของ *D. fructosovorans* 45 เปอร์เซ็นต์ ลำดับกรดอะมิโน HoxU คล้ายคลึงกับ HndD ของ *D. fructosovorans* 34 เปอร์เซ็นต์และ HoxU ของ *A. variabilis* ถึง 61 เปอร์เซ็นต์ ลำดับกรดอะมิโน HoxY มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโน HoxY ของ *A. variabilis* และ *Alcaligenes eutrophus* เท่ากับ 65 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ HoxH ของ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 มีความคล้ายคลึงกันกับลำดับกรดอะมิโน HoxH ของ *A. variabilis* สูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์

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

Axelsson และคณะ (1999) ศึกษาการควบคุมการถอดรหัสของอ็อปเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc muscorum* พบว่าหลังเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจากสภาวะที่มีไนโตรเจนไปเป็นสภาวะที่ไม่มีไนโตรเจน การถอดรหัสของยีน *hupL* สามารถพบในช่วงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการถอดรหัสของยีน *hoxH* สามารถพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกของ การเพาะเลี้ยง ต่อมา Axelsson และ Peter (2002) ศึกษาผลของออกซิเจน ไฮโดรเจนและนิกเกิลต่อการควบคุมการถอดรหัสของไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 และ *N. muscorum* พบว่าความเข้มข้นออกซิเจนในระดับต่ำและการเติมนิกเกิลจะชักนำให้การถอดรหัสของยีนไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดในระดับสูงขึ้น ส่วนไฮโดรเจนจะมีผลต่อการถอดรหัสของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสเท่านั้น

Boison และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anacystis nidulans* และ *Anabaena variabilis* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าในไซยาโนแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เดี่ยว *A. nidulans* กลุ่มของยีน *hox* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ยีน *hoxEF* และยีน *hoxUYHWhypAB* โดยถอดรหัสแยกกัน ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *A. variabilis* ยีน *hox* จะอยู่เรียงต่อกันเป็นกลุ่มโดย ORF8 และ ORF3 จะแทรกอยู่ระหว่างยีน *hoxU* กับ *hoxY* และ *hoxY* กับ *hoxH* ตามลำดับ และมีการถอดรหัสของยีน *hoxFUYH* ร่วมกัน สำหรับการถอดรหัสของยีน *hupL* ของ *A. variabilis* สามารถพบได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์และพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติ

Happe และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสและการกลายพันธุ์ของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern blot hybridization พบว่ายีน *hupSL* ถอดรหัสได้ชิ้นส่วนที่มีขนาด 2.7 กิโลเบสและพบการถอดรหัสในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน เชื้อสายพันธุ์กลายผลิดและสะสมไฮโดรเจนมากกว่าสายพันธุ์แท้ถึง 3 เท่า

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ข)

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB (ภาคผนวก ข)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.2.2.1 เม็ดแก้ว (Glass bead) (Sigma, USA)

3.2.2.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (ภาคผนวก ก)

3.2.2.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauroyl sarcosine) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.5 ฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol)

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

(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)

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

3.2.2.8 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์

3.2.2.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% Ethanol)

3.2.2.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Ethanol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

- 3.2.3.1 dNTPs (Deoxynucleotidetriphosphate) (Promega, USA)
- 3.2.3.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Promega, USA)
- 3.2.3.3 บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)
- 3.2.3.4 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)
- 3.2.3.5 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.3.6 เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)
- 3.2.3.7 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ค)
- 3.2.3.8 สีผสมดีเอ็นเอ (Tracking Dye) (ภาคผนวก ค)

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA)

- 3.2.4.1 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม

- 3.2.5.1 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)
- 3.2.5.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)
- 3.2.5.3 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.4 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) (Promega, USA)
- 3.2.5.5 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) (Sigma, Germany)

3.2.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

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

3.2.7 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.2.7.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy System I (Promega, USA)
- 3.2.7.2 ชุดการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Germany)
- 3.2.7.3 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Germany)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)
- 3.3.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Scientific Promotion, Binder, Thailand)
- 3.3.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Gallenkamp T490188, UK)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)
- 3.3.5 ตู้อบไอร้อน (hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hermle-Labortechnik Z383K, Germany)
- 3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion, Sartorius BP2215, Thailand)
- 3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)
- 3.3.9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer 480, USA)
- 3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) (Amersham Pharmacia Biotech EPS301, Sweden)
- 3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech GNA100, Sweden)
- 3.3.12 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)
- 3.3.13 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)
- 3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Digital dry bath) (Labnet, D1100, USA)
- 3.3.15 ไมโครปิเปต (Micropipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.16 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรีย

3.4.1.1 วิธีเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 (ภาคผนวก ก) (Rippka *et. al.*, 1979) หรือในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG11 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.1.2 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB (Luria – Bertani) (Sambrook *et. al.*, 1989) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนในกรณีของการแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทำ PCR หรือการโคลนนิ่ง และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สามารถคัดเลือกเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลินเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.4.2 วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis*

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็งตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์โดยนำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น กระจายตะกอนเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเม็ดแก้ว (glass bead) 200 ไมโครลิตร โซเดียมโคเคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 10 วินาที แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเออยู่มาสกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร ตามด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE

3.4.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.2 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติม Gel star ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาด จากนั้น หยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที่ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้เครื่องชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation)

3.4.4 วิธีการออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (GenBank) มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hoxF* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 จากนั้นเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน และนำมาใช้สร้างไพรเมอร์ คำนวณค่า T_m (melting temperature) และความเป็นไปได้ในการเข้าจับกันของไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ทั้งสองไปใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

3.4.5 วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนไฮโดรจีเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ของ *Anabaena siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่แบบ องค์กรประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส แสดงดังตารางที่ 3.1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal Cycler) ซึ่งตั้งโปรแกรมให้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามข้อ 3.4.3 และทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทดสอบ PCR Purification Kit ต่อไป

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxF* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hoxF* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	45°C	30 วินาที
	Extension	72°C	90 วินาที
3	Final Extension	72°C	10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 วิธีการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยชุดทดสอบ QIAquick PCR Purification Kit

นำดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ในขั้นตอนที่ 3.4.5 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดทำให้บริสุทธิ์แบบสำเร็จรูป (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) โดยนำหลอดทดลองที่มีผลิตภัณฑ์ PCR อยู่มาเติมบัฟเฟอร์ PBI ในปริมาณ 5 เท่าของปริมาตรของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเปิดสารละลายใส่ใน QIAquick spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAquick spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAquick spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.3

3.4.7 วิธีการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะเฟอไรสหน่วยย่อยใหญ่ และมีขนาดตรงตามต้องการพร้อมทั้งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.6 มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) ใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เป็น 10:1 และคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาตามสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณดีเอ็นเอ (นาโนกรัม)} = \frac{\text{ปริมาณของเวกเตอร์ (นาโนกรัม)} \times \text{ขนาดของดีเอ็นเอ (กิโลเบส)} \times 10}{\text{ขนาดของเวกเตอร์ (กิโลเบส)} \times 1}$$

สมการที่ 3.1

ปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ ligation 2 เท่า เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต ผลิตภัณฑ์ PCR และเวกเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม โดยปริมาตรสารต่างๆ ที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ ligation 2 เท่า	7.5 ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต	1 ไมโครลิตร
เวกเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์ PCR (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	15 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน และนำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสเพื่อที่จะได้ทำการทรานสฟอร์มต่อไป

3.4.8 วิธีการเตรียมเซลล์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (competent cell)

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 1 โคลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร SOB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 มิลลิิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมสาร RF1 (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 1/3 เท่าของปริมาตรอาหารเหลวสูตร SOB ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมสาร RF2 (ภาคผนวก ง) ปริมาณ 1/25 เท่าของปริมาตรอาหารเหลวสูตร SOB เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

3.4.9 วิธีการทรานสฟอร์มเมชัน

นำเซลล์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.8 หรือที่ได้เตรียมในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง ปิเปิดเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีส่วนผสมที่เตรียมไว้สำหรับไลเกชัน ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.7 จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปปั่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้น ย้ายไปวางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) 0.5 มิลลิโมลาร์ บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

3.4.10 วิธีการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโครจินเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอ็นไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอ็นไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลินเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องเพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดพลาสมิด (QIAprep Spin Miniprep Kit, Germany)

3.4.11 วิธีการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ QIAprep Spin Miniprep Kit

นำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.4.10 มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตและปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAprep Spin Miniprep Kit, Germany) โดยกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติบบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้นกลับหลอดไปมา แล้วเติบบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา หลังจากนั้นปีปเตสสารละลายใส่ใน QIAprep spin column ที่วางบน Collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ห้องของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติบบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAprep spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ห้องของเหลวใน

Collection tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย QIAprep spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาด ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.3

3.4.12 วิธีการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.11 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 15 ยูนิต โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) 10 เท่า และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร โดยปริมาตรสารต่างๆ ที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบที่ใช้ในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
พลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> 10 เท่า	1 ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> 15 ยูนิต	1 ไมโครลิตร
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) 10 เท่า	1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	10 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI* กับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.4.3

3.4.13 วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนผลิตภัณฑ์ PCR พลาสมิดลูกผสมที่มียีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของยีน *hoxF* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โคอะฟอเรสหน่วยย่อยใหญ่ของ *Anabaena siamensis* จาก BigDye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับยีน *hoxF* ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของ เอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 ที่มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 738 คู่เบส ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ คือ ประมาณ 800 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบมีความจำเพาะสูง

5.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของไพรเมอร์ RhoxF1 และ RhoxF2 มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของ *A. siamensis* มีทั้งหมด 738 คู่เบส และแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 246 ตัว เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pFFAna4.3 ไปเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่ (*hoxF*) ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในส่วนของเอนไซม์ไดอะพอเรสหน่วยย่อยใหญ่

(*hoxF*) ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ *Nostoc* สายพันธุ์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCC 7120 สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ *Nodularia spumigena* สายพันธุ์ CCY9414 สูงถึง 93 เปอร์เซ็นต์
และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 สูงถึง 89 เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ยูวดี พิรพรพิศาล 2546 สาขาวิชาวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่: ภาววิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เกรียงศักดิ์ เลิศประภามงคล 2546 งานวิจัยการสังเคราะห์แบบไม่สมมาตร: Biohydrogen พลังงานสะอาดจากเทคโนโลยีชีวภาพ (ตอนที่ 1 : เทคโนโลยีชีวภาพพลังแสงอาทิตย์-Solar Biotechnology) LAB.TODAY : 19-24.

Adams, M. W. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S. 1981. Hydrogenase. BioChem. Biophys. Acta. 594 : 105-176.

Antarikanonda, P. 1982a Influence of N₂-fixing blue-green alga *Anabaena* sp. TA1 on yield and protein quality of highly yielding rice cultivar (Khao Dowk Mali 4-2-105). Final report of research No.10680, Submitted to German Research Society(DFG) (In German).

Antarikanonda, P. 1982b Influence of protreating the seed with extract of *Anabaena* sp. TA1 on germination and growth of some rice varieties from Thailand. Int. Rice Comm. Newsletter 31(2) : 37-39.

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

Appel, J. and Schulz, R. 1998. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis : hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising J. Photochem. Photobiol. Ser. B. 47 : 1-11.

Axelsson, R., Oxelfelt, F. and Lindblad, P. 1999. Transcriptional regulation of *Nostoc* uptake hydrogenase. FEMS Microbiol Lett. 170 : 77-81.

Axelsson, R., and Peter, L., 2002. Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases : effects of oxygen, hydrogen and nickel. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 444-447

Belkin, S. and Padan, E. 1978. Sulfide-dependent hydrogen evolution in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica* FEBS Letters. 94 : 291-294.

Boichenko, V. A. and Hoffmann, P. 1994. Photosynthetic hydrogen production in procaryotes and eucaryotes: occurrence, mechanism, and function, Photosynthetica. 30 : 527-552.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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., Schmitz, B. and Bothe, H. 1998. Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Curr. Microbiol. 36 : 253–258.
- Boison, G., Bothe, H. and Schmitz, O. 2000. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. Curr. Microbiol. 40 : 315–321.
- Carrasco, C. D., Buettner, J. A. and Golden, J. W. 1995. Programed DNA rearrangment 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 capsulate* : relationship with nitrogenase activity”. J. Bacterial. 144:1441-1448.
- Daday, A., Mackerras, A. H. and Smith, G. 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, G. D. 1987. The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolated from *Macrozamia communis* L. Johnson. Aust. J. Plant Physiol. 14 : 319–324.
- Desikachary, T. V. 1959. Indian Council of Agariculture Research. NewDelhi.
- Dixon, R. O. D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Arch. Mikrobiol. 85:193-201.
- Eisbrenner, G., Distler, E., Floener, L. and Bothe, H. 1978. The occurrence of the hydrogenase in some blue-green algae. Arch. Microbiol. 118 : 177–184.
- Ewart, G. D., Reed, K. C. and Smith, G. D. 1990. Soluble hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. Cloning and sequencing of a potential gene encoding the tritium exchange subunit. Eur. J. Biochem. 187 : 215–223.

- Frenkel, A., Gaffron, H. and Battley, E.H. 1950. Photosynthesis and photoreduction by the blue-green alga *Synechococcus elongatus* Näg, Biol. Bull., 99 : 157–162.
- Hall, D. O., Markov, S. A., Watanbe, Y. and Rao., K. K. 1995. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. Photosynth. Res. 46 : 159-167.
- Hansel, A. and Lindblad, P. 1998. Mini-Review : Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. Applied Microbiology and Biotechnology 50 : 153-160.
- Happe, T., Schütz, K. and Böhme, H. 2000. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J Bacteriol 182 :1624-1631.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981a. Occurrence and localization of two distinct hydrogenases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120. J. Bacteriol. 146 : 209–214.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. 1981b. Comparative characterization of two distinct 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.
- Kentemich, T., Bahnweg, M., Mayer, F. and Bothe, H. 1989. Localization of the reversible hydrogenase in cyanobacteria. Z. Naturforsch. 44c : 384–391.
- Kentemich, T., Haverkamp, G. and Bothe, H. 1991. The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Z Naturforsch 46c : 217-222.
- Kerfin, W. and Boger. 1982. light-induced hydrogenase evolution by blue-green algae (cyanobacteria). Physiol. Plant 54 : 93-98.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. 1980. Hydrogen metabolism by filamentous cyanobacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics 205 : 36-50.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. 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, p. 143–169. In J. Miyake, T. Matsunaga, and A. San Pietro (ed.), *Biohydrogen II*. Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 143-169.
- Llama, M. J., Serra, J. L., Rao, K. K. and Hall, D. O. 1979. Isolation and characterization of the hydrogenase activity from the non-heterocystous cyanobacterium *Spirulina maxima*. *FEBS Lett.* 98 : 342-346.
- Marina, E., Sheremetieva, O., Troshina, Y., Serebryakova, L. T. and Lindblad, P. 2002. Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions., *FEMS Microbiology Letters* 214 : 229-233.
- Masukawa, H., Mochimaru, M. and Sakurai, H. 2002. Disruption of uptake hydrogenase gene, but not of bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 : 618–624.
- Mitin. N. and Bullerjahn. GS. 1997. Nucleotide sequence of the *hox* operon encoding a bidirectional hydrogenase from *Prochlorothrix hollandica*. EMBL. GenBank. DDBJ databases.
- Oliveira, J. C., Yu, S. J. and Georganas, N. D. 2004. Enabling Embedded Worlds in Very Large Virtual Environments, *IEEE Computer Graphics and Applications*, 24(4) : 73-83.
- Oliveira, P., Leito, E., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. and Oxelfelt., F. 2004. Characterization and transcriptional analysis of *hupSLW* in *Gloeotheca* sp. ATCC 27152: an uptake hydrogenase from a unicellular cyanobacterium. *Microbiology*, 150 : 3647-3655.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. Hydrogen uptake in *Nostoc* strain PCC 73102: effects of nickel, hydrogen, carbon and nitrogen. *Plant Physiol. Biochem.* 33 : 617–623.

- Oxelfelt, F., Tamagnini, P. and Lindblad, P. 1998. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a *hupSL* homologue. Arch. Microbiol. 169 : 267-274.
- Papen, H., Kentemich, T., Schmülling, T. and Bothe, H. 1986. Hydrogenase activities in cyanobacteria. Biochimie 68 : 121-132.
- Peschek, G. A. 1979a. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H₂ dependent photoreduction and related reactions. Biochim. Biophys. Acta 548 : 187-202.
- Peschek, G. A. 1979b. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reactions. Biochim. Biophys. Acta 548 : 203-215.
- Peschek, G. A. 1979c. Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. 123 : 81-92.
- Rai, A. N., Borthakur, M., Söderbäck, E. and Bergman, B. 1992. Immunogold localization of hydrogenase in the cyanobacterial-plant symbioses *Peltigera canina*, *Anthoceros punctatus* and *Gunnera magellanica*. Symbiosis 12 : 131-144.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111 : 1-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2 nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur. J. Biochem. 233 : 266-276.
- Schulz, R. 1996. Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. J. Mar. Biotechnol. 4 : 16-22.
- Serebryakova, L., Zorin, N. A. and Lindblad, P. 1994. Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413: presence and localization in non-N₂-fixing cells. Arch. Microbiol. 161 : 140-144.
- Serebryakova, L. T., Medina, M., Zorin, N. A., Gogotov, I. N. and Cammack, R. 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, S. and Yates, M. G. 1976. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen fixing bacteria. Nature (London) 262 : 209-210.
- Tamagnini, P., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1995. Immunological characterization of hydrogenases in the nitrogen-fixing *Nostoc* sp. PCC 73102. Curr. Microbiol. 31 : 102-107.
- Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1997. Hydrogenase in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 1801-1807
- Tamagnini, P., Costa, J. L., Almeida, L., Oliveira, M. J., Salema, R. and Lindblad, P. 2000. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. Curr. Microbiol. 40 : 356–361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindblad, P., Oxelfelt, F. and Wonschiers, R. 2002. Hydrogenase and hydrogenase metabolism of cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66 : 1-20.
- Tel-Or, E., Luijk, L. W. and Packer, L. 1978. Hydrogenase in n₂-fixing cyanobacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics 185 : 185-194.
- Tredici, M. R., Margheri, M. C., De Philippis, R. and Materassi, R. 1990. The role of hydrogen metabolism in photoheterotrophic cultures of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain Cc isolated from *Cycas circinalis* L. J. Gen. Microbiol. 136 : 1009-1015.
- Troshina, O. Y., Serebryakova, L. T. and Lindblad, P. 1996. Induction of H₂-uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413: effects of hydrogen and organic substrate. Curr. Microbiol. 33 : 11–15.
- Vignais, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol Rev. 25 : 455–501.
- Wolk, C. P., Ernest, A. and Elthai, J. 1994. Heterocyst metabolism and development. In D.A. Bryant (ed), The molecular biology of cyanobacteria. Klower Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 769-823

- Zhang, X., Robert, T. and Chase Van, B. 1984. Nickel control of hydrogen production and uptake in *Anabaena* sp. Strain CA and 1F. *J. Gen Microbiology*. 130 : 1815-1818.
- Zhang, X., Zhang, X., Shiraiwa, Y., Mao, Y., Sui, Z. and Liu, J. 2004. Cloning and Characterization of *hoxH* Genes from *Arthrospira* and *Spirulina* and Application in Phylogenetic Study., *Springer Science Business Media*. 7 : 287–296.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

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

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

H_3BO_3	46.30	มิลลิโมลาร์
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	4.15	มิลลิโมลาร์
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.77	มิลลิโมลาร์
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	1.61	มิลลิโมลาร์
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.32	มิลลิโมลาร์
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

$NaNO_3$	1.76	โมลาร์
$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	30.40	มิลลิโมลาร์
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	24.50	มิลลิโมลาร์
Citric Acid	3.12	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	279	ไมโคร โมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
Na_2CO_3 (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4 (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
$FeNH_4 \cdot Citrate$ (0.60 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบอาหาร

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์ TBE 10 เท่า

ส่วนประกอบ

Tris	0.89	โมลาร์
กรดบอริก	0.89	โมลาร์
EDTA	25	มิลลิโมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายน้ำ ปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

บัฟเฟอร์ TE

ส่วนประกอบ

Tris-HCl	1	โมลาร์
EDTA	0.5	โมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

Tracking dye

ส่วนประกอบ

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

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

สารละลาย RF1

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK)	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter

สารละลาย RF2

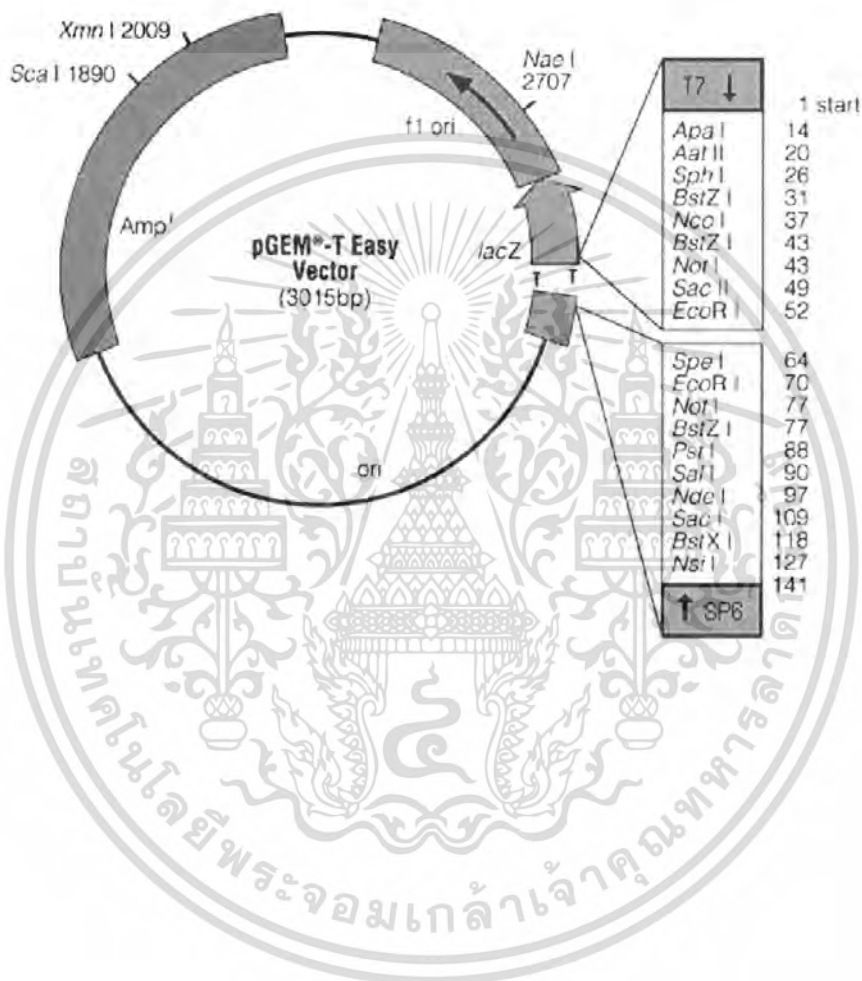
ส่วนประกอบ

MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย กรดอะซิติก แล้วกรองผ่าน filter

ภาคผนวก จ

เวกเตอร์ pGEM-T Easy



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

File: pFFAna_T7.ab1 Run Started: Jan 18, 2008, 5:07:09
Sample: pFFAna_T7 Lane: 7 Base spacing 15.75

Signal G:1341 A:982 T:921 C:993
1058 bases in 13084 scans

Comment:
Page 1 of 2



ပုံ ၁၂၂၂၂၂၂

