สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษายีนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำธรรมชาติ

นางสาวสมกมล ดีรีพฤกษ์

นางสาวสริญญา สินธุระหัฐ

วพ.
ว2317
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83990
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

ล.119 ว2317
ก.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of Reversible Hydrogenase Gene and Enzyme Activity of Cyanobacteria Isolated from Natural Pond

Somkamon Keereepruk

Sarinya Sintorahut

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

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษายีนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำธรรมชาติ

Study of Reversible Hydrogenase Gene and Enzyme Activity of Cyanobacteria Isolated from Natural Pond

นักศึกษา นางสาวสมกมล คีรีพฤกษ์ รหัส 47050692

นางสาวสริญญา สินธุระหัฐ รหัส 47050693

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ ดร. สุวรรณี จรรยาพูน	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษายีนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำธรรมชาติ

นักศึกษา นางสาวสมกมล คีรีพฤกษ์ รหัส 47050692

นางสาวสริญญา สินธุระหัฐ รหัส 47050693

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สุวรรณี จรรยาพูน

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษายีนและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ จากการทดลองคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียได้ 2 ชนิด คือไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร BG11 และนำมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตพบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันโดยมีระยะการเจริญเติบโตเร็วที่สุดเหมือนกันคือในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 แต่ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยวัดอัตราการเกิดไฮโดรเจนโดยใช้เมทิลไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวซ์ด้วยโซเดียมไดไทโอไนต์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี พบกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 และไซยา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายสูงสุดในชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.16 และ 7.08 ไมโครโมล ไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที ตามลำดับ จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน *hoxH* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีน *hoxH* ที่ออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปเชื่อมกับพลาสมิด pDrive แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน, X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าพลาสมิด pRhydNC เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project	Study of Reversible Hydrogenase Gene and Enzyme Activity of Cyanobacteria Isolated from Natural Pond
Student	Miss Somkamon Keereepruk Student ID 47050692
	Miss Sarinya Sintorahut Student ID 47050693
Degree	Bachelor of Science
Department	Applied Biology
Programme	Biotechnology
Academic Year	2007
Advisor	Assist.Prof. Dr. Saranya Phunpruch
Co- advisor	Dr. Suwannee Junyapoon

ABSTRACT

Cyanobacteria can produce hydrogen gas from the reaction of hydrogenase enzyme. Hydrogenases found in cyanobacteria are able to classified into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of hydrogen molecule to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Another enzyme, reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of hydrogen molecule to protons. The large subunit of latter enzyme is encoded by *hoxH*. This special project aims to study of hydrogenase genes and enzyme activity of cyanobacteria isolated from natural pond. Two isolates (unicellular and filamentous forms) of cyanobacteria were found and cultivated in BG11 medium. Both isolates had a similar growth rate but the growth rate of the unicellular cyanobacteria was better than that of the filamentous cyanobacteria. Reversible hydrogenase activity was determined by a H_2-evolution assay using sodium dithionite reduced methylviologen as electron donor by Gas chromatography. It was found that the reversible hydrogenase activity of a unicellular cyanobacteria showed the highest activity in 3rd hour after anaerobic adaptation with 1.16 $\mu molH_2 mgChla^{-1} min^{-1}$ whereas the reversible hydrogenase activity of filamentous cyanobacteria showed the highest activity in 1st hour after an anaerobic adaptation with 7.08 $\mu molH_2 mgChla^{-1} min^{-1}$. Using degenerated primers of cyanobacterial *hoxH* encoding large subunit of reversible hydrogenase of the unicellular cyanobacteria was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of *hoxH* was analyzed by agarose gel electrophoresis. It was found that PCR product of *hoxH* was approximately 1,300 bp. It was ligated into pDrive vector and then transformed to competent cell *E.coli* DH5α. Transformant was selected on LB agar containing kanamycin, X-Gal and IPTG. Plasmid DNAs were isolated and detected by digesting with the restriction enzyme *Eco*RI. It was found that plasmid pRhydNC was the recombinant plasmid containing *hoxH* PCR product of unicellular cyanobacteria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ เป็นอย่างสูงที่คอยให้ความรู้ ความช่วยเหลือรวมทั้งคำแนะนำในการปฏิบัติโครงงานพิเศษ ผศ. ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี คณะกรรมการโครงงานพิเศษ และ ดร. สุวรรณี จรรยาพูน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษร่วมที่ให้ความกรุณาและช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆจนโครงงานพิเศษเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร และคุณอนิทัศน์ ทองจันทร์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณ คุณชุติมา ภาพสิงห์ คุณศรินยา ใจตรง คุณวิชาณี แบนคีรี คุณรุ่งอรุณ สุขสำราญและคุณสุรัตติพร รัตนะ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำเพื่อให้เกิดความถูกต้องในการปฏิบัติงาน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนมาโตย ตลอดจนเพื่อนๆทุกคนและผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่เป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยเหลือในทุกๆด้านจนโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

นางสาวสมกมล คีรีพฤกษ์
นางสาวสริญญา สินธุระหัฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	4
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน	7
2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	8
2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล	9
2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า	9
2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry)	10
2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen)	11
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน	11
2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟีคยูคาริโอต (Phototrophic eukaryote)	11
2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟีคโปรคาริโอต (Phototrophic prokaryote)	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีออกซิเจน	13
2.3.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบไม่มีออกซิเจน	15
2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย	16
2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว	16
2.5.1 จำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา	17
2.5.1.1 Unidirectional หรือ uptake hydrogenase	17
2.5.1.2 Bidirectional หรือ reversible hydrogenase	17
2.5.2 จำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่ศูนย์กลางเร่งปฏิกิริยา	18
2.5.2.1 NiFe–hydrogenase	18
2.5.2.2 Fe-hydrogenase	18
2.5.2.3 Metal-free hydrogenase	18
2.6 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส	18
2.7 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	21
2.8 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	22
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	30
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ	30
3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์	30
3.1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α	30
3.2 สารเคมี	30
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	30
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	31
3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	31
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	31
3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดลูกผสม	32
3.2.7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน	32
3.2.8 ชุดทดสอบ (Kit)	32
3.3 อุปกรณ์	32
3.4 วิธีการดำเนินการ	33
3.4.1 การเก็บตัวอย่างและคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติ	33
3.4.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย	35
3.4.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α	36
3.4.4 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย	36
3.4.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยใช้เมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์	36
3.4.6 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย	38
3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	39
3.4.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	39
3.4.9 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	40
3.4.10 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์	41
3.4.11 การเตรียม competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์DH5α สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน	41
3.4.12 การทรานสฟอร์มเมชัน	42
3.4.13 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.14 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ	42
3.4.15 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	43
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	44
4.1 ผลการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์	44
4.2 ผลการวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้	46
4.3 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	47
4.4 ผลการศึกษายีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	49
4.4.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม	49
4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและอัพเทคไฮโดรจีเนส	50
4.4.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล	51
4.4.4 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α	52
4.4.5 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit)	53
4.4.6 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	53
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	55
5.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้	55
5.2 การศึกษายีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	55
5.2.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส	56
เอกสารอ้างอิง	57
ภาคผนวก	60
ภาคผนวก ก	60
ภาคผนวก ข	61
ภาคผนวก ค	62
ภาคผนวก ง	63
ภาคผนวก จ	64
ภาคผนวก ฉ	65
ภาคผนวก ช	67
ภาคผนวก ซ	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย 15

2.2 เปอร์เซ็นต์ของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 20

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph Thermal conductivity Detector (GC-TCD) 37

3.2 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 40

4.1 ปริมาณไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน 8

2.2 ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ 9

2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า 10

2.4 วิถีของสังเคราะห์ด้วยแสง และการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย สาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย 12

2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์ เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย 14

2.6 แผนที่ยีน *hup* และยีน *hox* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 17

2.7 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส 20

2.8 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส 22

2.9 ขั้นตอนของ Polymerase Chain Reaction 23

2.10 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสและย้อมด้วย เอทิเดียมโบร์ไมด์ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 25

2.11 โครงสร้างของยีน *hupL* ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 28

2.12 โครงสร้างของยีน *hupSL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 สายพันธุ์ปกติ (wild type) และมิวแตนท์ (mutant AMC 414) 28

3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (ก) และการดูดเชื้อ ภายใต้กล้อง inverted microscope (ข) 34

3.2 ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11 35

3.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ 35

4.1 บ่อน้ำธรรมชาติที่ใช้ในการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย 45

4.2 ไซยาโนแบคทีเรียนบนอาหารแข็ง BG11 45

4.3 ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 46

4.4 อัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมและเส้นสาย 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ 50

4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 51

4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล 52

4.8 พลาสมิด pRhydNC ที่สกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด 53

4.9 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบัน มนุษย์ได้นำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้ในการดำรงชีวิตเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงาน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน และน้ำมันดิบ ฯลฯ พลังงานดังกล่าวนี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดและอาจหมดไปในอนาคตหากมนุษย์ยังคงใช้พลังงานอย่างฟุ่มเฟือย นอกจากนี้ การใช้พลังงานเชื้อเพลิงเหล่านี้ยังอาจส่งผลกระทบตามมา ได้แก่ ปัญหามลพิษ ความร้อน และภาวะเรือนกระจก เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อมนุษย์ ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานต่างๆ จึงได้มีความพยายามในการศึกษาและพัฒนาพลังงานทดแทนในหลายรูปแบบ เพื่อเป็นพลังงานทดแทนที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือ พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน

พลังงานไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส มีพลังงานสะสมสูงถึง 120.7 กิโลจูลต่อกรัม เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาไหม้ในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ ปัจจุบันมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงและเสี่ยงต่อการระเบิดของก๊าซไฮโดรเจน ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen)

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตมีรายงานพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้ดังนี้

1. แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Phototrophic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น Anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ (1) Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) Sulfur purple

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. (3) Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. โดยการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวคือ แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ไธโอซัลเฟต สารประกอบอินทรีย์เป็นสารให้อิเล็กตรอน

2. สาหร่าย (Algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการปรับตัวที่ไม่มีออกซิเจนและมีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น Photohydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้แก่ *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp., *Codium* sp. และ *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

3. ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สังเคราะห์แสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน (Oxygenic phototrophic prokaryote) ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบและมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายและพืชสีเขียว กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคล้ายกับสาหร่าย แต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) เช่น *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. และ *Nostoc* sp. เป็นต้น

ในจำนวนสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากเป็นการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ผลพลอยได้ในวิถีเป็นพลังงานไฮโดรเจน ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศอีกด้วย แบคทีเรียก็สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกันแต่จำเป็นต้องมีสารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

ในสิ่งมีชีวิตการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ดังสมการที่ 1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$H_2 \xleftrightarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 1.1}$$

Stepheson และ Stickland (1931) ได้บัญญัติศัพท์ "hydrogenase" ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการเกิดไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทธิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์นี้พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอตซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้นิกเกิลในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

1. "unidirectional" หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

2. "bidirectional" หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

ในไซยาโนแบคทีเรียจะพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในสายพันธุ์ที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้และในสายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เช่น *Anacystis nidulans* (Peschek, 1979a,b) ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ดังสมการ 1.2 และหลังจากนั้นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 1.3

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \xleftrightarrow{\text{nitrogenase}} 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi \qquad \text{สมการที่ 1.2}$$

$$2H^+ + 2e^- \xleftrightarrow{\text{uptake hydrogenase}} \qquad \text{สมการที่ 1.3}$$

Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรก และอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของหน่วยย่อยใหญ่ (Large subunit) ของยีน uptake hydrogenase *(hup*L*)* ในระยะที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 และใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxefelt และคณะ, 1998) และ *Anabaena siamensis* (ชมาภรณ์, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสพบทั่วไปในไซยาโนแบคทีเรียเกือบทุกชนิด จนกระทั่งถึงปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์คือ *Anacystis nidulans* (Schmitz และคณะ, 1995), *Synechococcus* sp. (Boison และคณะ, 1996), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6830 (Appel และ Schulz, 1996) และ *Anabaena siamensis* (ชมาภรณ์, 2547)

สำหรับในสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นร่วมกับการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์จาก NADH ไปสู่ ferredoxin และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ส่วนภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เลย แต่เมื่อมีความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

ในโครงงานพิเศษนี้จึงได้สนใจศึกษาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ และศึกษาความสามารถในการผลิตไบโอไฮโดรเจนรวมทั้งศึกษายีนที่เกี่ยวข้องเพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงสายพันธุ์ให้เหมาะสมในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนสำหรับรองรับและแก้ปัญหาพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติให้บริสุทธิ์
2. ศึกษาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. ศึกษาชนิดและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำธรรมชาติแล้วนำมาคัดแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงและศึกษาปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยใช้สารเมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์ หลังจากนั้น นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสโคลนเข้าสู่เวคเตอร์เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติและทราบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในปริมาณสูง
    1). เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติแล้วนำมาทำการส่องดูตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อทำการแยกเชื้อตัวอย่างออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11 ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาทีและให้แสงความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน
    2). ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง BG11
    3). วัดการเจริญเติบโตโดยวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC)
    4). วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสโดยใช้สารเมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์
2. ศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้
    1). เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหาร BG11 เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์
    2). สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ
    3). วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส
    4). เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับไพรเมอร์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส
    5). เชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์ pDrive
    6). ทำการทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7). คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ X-Gal และ IPTG

8). สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR

9). วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

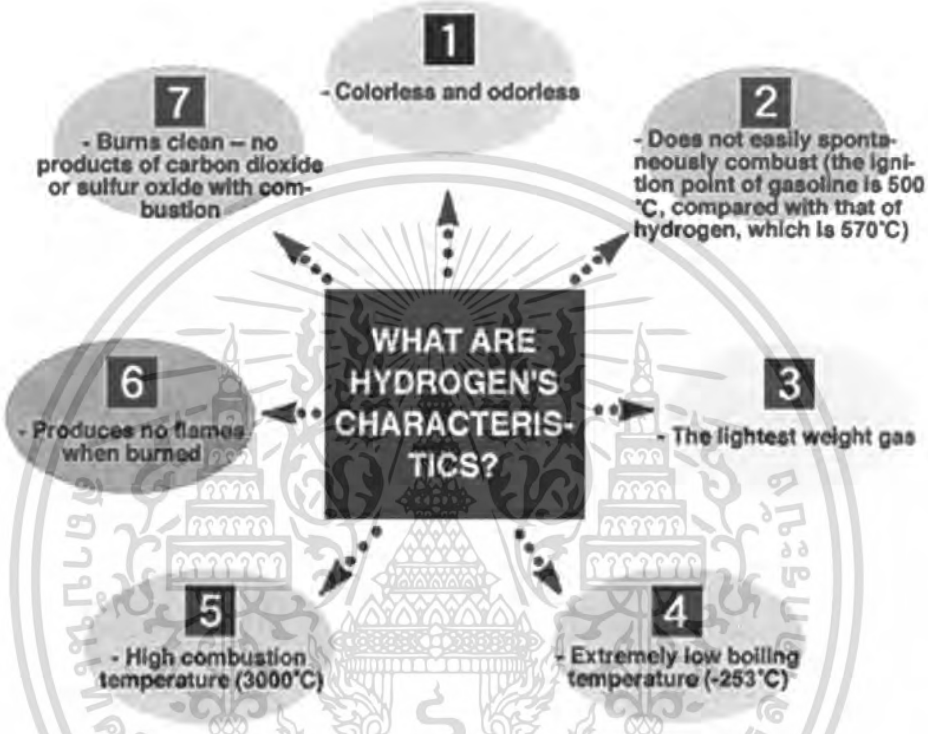
พลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์อย่างมาก นอกจากจะใช้เพื่อให้เกิดความสะดวกสบายแล้ว พลังงานส่วนใหญ่ยังถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจก ก๊าซคาร์บอนมอนออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับประเทศไทย ปริมาณพลังงานสำรองทรัพยากรเชื้อเพลิงภายในประเทศ พบว่า มีปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล สามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี ปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต สามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตัน ซึ่งใช้ได้อีกประมาณ 60 ปี ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด พลังงานที่นำเข้าส่วนใหญ่คือ น้ำมันเชื้อเพลิง ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆเพราะพลังงานที่มีอยู่กำลังจะหมดไปและเป็นพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นพลังงานที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (ชัยชาญ, 2547)

ไฮโดรเจนมีคุณสมบัติดังรูป 2.1 เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส ให้พลังงาน 52,000 บีทียูต่อปอนด์ เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ จึงมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนต่อหน่วยได้สูงสุดในบรรดาเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ

ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและใช้ในการขับดันยานอวกาศ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและจากกระบวนการแยกสลายน้ำด้วยไฟฟ้า (electrolysis process) นอกจากนี้ ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี ยังมีการผลิตรถยนต์ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน อย่างไรก็ตาม ค่าใช้จ่ายในการผลิตมีราคาค่อนข้างสูง ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต หรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) มากขึ้น

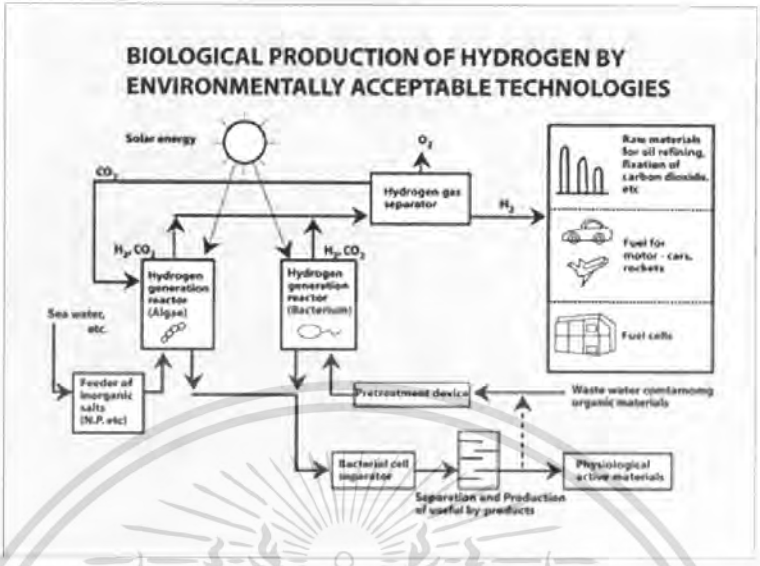


รูปที่ 2.1 คุณสมบัติของก๊าซไฮโดรเจน
ที่มา : http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อมลพิษแก่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ในปัจจุบัน กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายวิธีดังรูป 2.2 บางวิธีก็สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมและบางวิธีก็อยู่ในขั้นตอนของการวิจัยและพัฒนา ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ภาพรวมของกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพ
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติ ซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารไฮโดรคาร์บอนกับน้ำในรูปไอน้ำ ที่อาศัยพลังงานความร้อนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนกระบวนการทางอุตสาหกรรมที่นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เรียกว่า coal gasification

ข้อเสียของกระบวนการดังกล่าว คือ การก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ เป็นต้น

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นวิธีการในการใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำ (water electrolysis) โดยตรงทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมดังรูปที่ 2.3 ทั้งนี้อาศัยอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้วบวก (positive electrode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (negative electrode) วิธีการเตรียมคือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้ความเป็นตัวนำมากขึ้น โดยการเติมสารพวกอิเล็กโตรไลท์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) หรือ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไปโดยไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก วิธีนี้ต้องการกระแสไฟฟ้าถึง 90 กิโลวัตต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุต โดยวิธีนี้จะให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง

ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำและจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม

รูปที่ 2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรีเป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาการผลิตโดยการใช้สารประกอบปรอทโบรไมด์ และแคลเซียมในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ขั้นตอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดังกล่าวเรียกว่า เทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry)

ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถใช้ความร้อนในช่วงที่ถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์ที่ใช้ผลิตไฟฟ้าพลังงานทั้งหมดถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสียก็คือ ปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนักอันได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต (biohydrogen)

นอกจากนี้วิธีการข้างต้นที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เรียกว่าไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) จุลินทรีย์หลายชนิดมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไฮโดรเจนได้เป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน หรือรีดิวซ์โปรตอนและปลดปล่อยไฮโดรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนปลดปล่อยสู่บรรยากาศประมาณการกันว่ามีก๊าซไฮโดรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศปีละ 200 ล้านตัน

ข้อดีของกระบวนการนี้คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าวิธีอื่นๆ

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

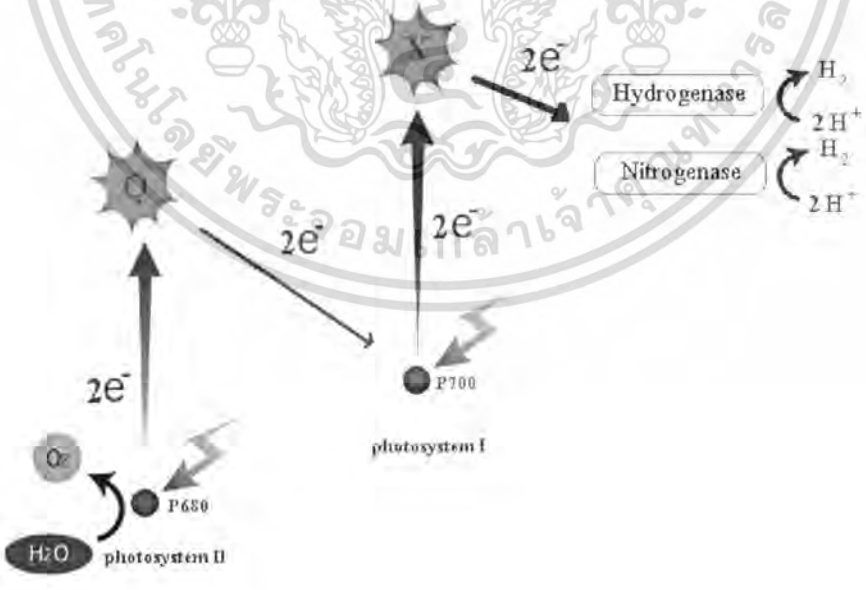
2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิคยูคาริโอต (Phototrophic eukaryote)

2.3.1.1 สาหร่าย (algae)

สาหร่ายบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ตารางที่ 2.1) โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อมีการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไม่ออกซิเจน ซึ่งระยะเวลาในการปรับตัวนั้นจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 30 นาทีจนถึง 4 ชั่วโมง ซึ่งในระหว่างที่มีการปรับตัวนั้นจะมีการกระตุ้นหรือสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านจากเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยปฏิกิริยาดังกล่าวถูกเร่งการทำงานด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านระบบแสง (photosystem) 2 ระบบ คือ ระบบแสงที่ 1 (photosystem I : PS I) ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (P700) และระบบแสงที่ 2 (photosystem II : PSII) ที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (P680) ไปยังตัวพาอิเล็กตรอน (electron carrier) ตัวพาอิเล็กตรอนจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์รีดอกซินจากนั้นจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอร์รีดอกซิน ออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ในกระบวนการตรึงหรือให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) และไทโอซัลโฟเนตรีดักเทส (thiosulfonate reductase) สำหรับปฏิกิริยาไนเทรตและซัลเฟตรีดักชัน ส่วนก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์เฟอร์รีดอกซินออกซิโดรีดักเทส อิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้มาจากกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในระบบแสงที่ 2 และการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 1 (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 วิถีของการสังเคราะห์ด้วยแสงและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย (ไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้นที่มีเอนไซม์ไนโตรจีเนส)
ที่มา: http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของ Graffron และ Rubin (1942) พบว่า *Scenedesmus* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่ไม่เพียงแต่สามารถผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่มีแสงเท่านั้น แต่ยังสามารถผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนด้วย โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งปฏิกิริยาการคะตะไลส์ของการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แสดงดังสมการที่ 2.1

$$2H^{+} + 2X_{reduced} \longrightarrow H_2 + 2X_{oxidized}$$ สมการที่ 2.1

ตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่เพียงได้มาจากอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำเท่านั้น แต่ยังได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่สะสมในเซลล์ เช่น แป้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิคโปรคาริโอต (phototrophic prokaryote)

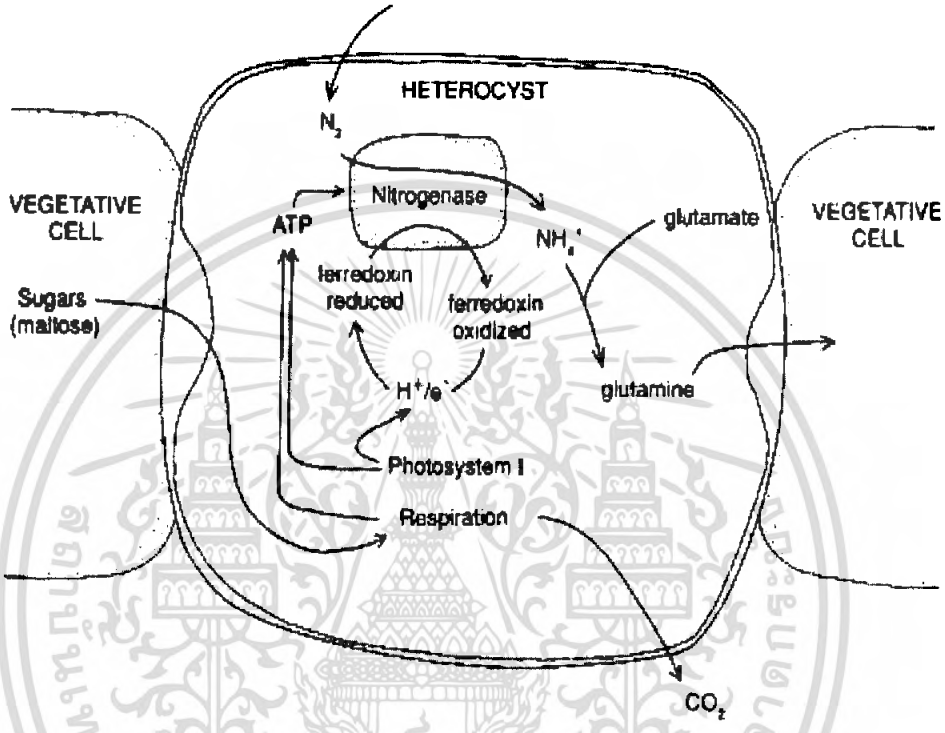
2.3.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีออกซิเจน

กลุ่มนี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย หรือแบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green bacteria) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน จัดเป็นโปรคาริโอดสามารถสังเคราะห์แสงแบบมีออกซิเจน (oxygenic phototrophic prokaryote) ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีชนิดของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เหมือนสาหร่ายสีเขียวและพืช

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่าย แต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงก๊าซไนโตรเจน (nitrogen fixation) ไซยาโนแบคทีเรียชนิดที่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) นั้นไม่มีระบบแสงสามารถตรึงไนโตรเจนผ่านทางเอนไซม์ไนโตรจีเนสและผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะมีการตรึงโมเลกุลไนโตรเจนพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการผลิตกลูตามีน โดยกลูตามีนที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (vegetative cells) (รูปที่ 2.5) เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์นั้นไม่มีระบบแสงจึงไม่มีกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำ ดังนั้นจึงไม่มีการสร้างก๊าซออกซิเจนไปยับยั้งการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยเฮเทอโรซิสต์จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า membrane bound hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสมิคเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakiod membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ซึ่งจะช่วยป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยการรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนไปเป็นน้ำ



รูปที่ 2.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา: http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction

นอกจากนี้ กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการผลิตก๊าซออกซิเจนและมีการสะสมพอลิแซคคาไรด์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีก๊าซออกซิเจนเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกสร้างขึ้นและกระตุ้นให้ทำงาน และมีการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ดังนั้น ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่แตกต่างกันดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 รายงานการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย

สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้
Heterocystous nitrogen fixing	
Nostoc linkia	22 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrica	1.91 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrical	1 μmol / mg dry weight / h
Non-heterocystous nitrogen fixing	
Oscillatoria sp.	260 μmol / mg dry weight / h
Oscillatoria sp.	5-6 μmol / mg dry weight / h
Non-nitrogen fixing	
Synechococcus sp.	0.05-1.38 μmol / mg dry weight / h
Microcystis sp.	11.3 nmol μmol / mg dry weight / h
Gloeobacter sp.	1.38 μmol / mg dry weight / h
Synechocystis sp.	0.07 μmol / mg dry weight / h
Aphanocapsa sp.	0.40 μmol / mg dry weight / h

ที่มา : Fernando และคณะ (2002)

2.3.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ 1) Non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. 2) Sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ 3) Green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียว คือมีรงควัตถุเป็นแบคเทอริโอ-คลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide), ซัลเฟอร์ (sulfur), ไทโอซัลเฟต (thiosulfate), สารประกอบอินทรีย์ (organic compound) หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารให้อิเล็กตรอนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ คือ

1. มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigment) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน

2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ชั้น มีองค์ประกอบสำคัญคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (Gram negative) ที่เรียกว่ามิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) ส่วนรอบนอกผนังเซลล์มักจะเป็นเมือกใสๆ ที่เรียกว่า ชีท (sheath) หุ้มอยู่โดยรอบชีทนี้มีความหนาบางต่างกัน อาจมีสีหรือไม่มีสีหรือแบ่งออกเป็นชั้นๆ

3. ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา ไซยาโน-แบคทีเรียทั่วไปมีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

4. ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟ-เซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปที่เรียกว่าไซยาโนไฟซิน-แกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

5. จัดเป็นโปรคาริโอต แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือสารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

2.5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99.1) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ปฏิกิริยาที่ผันกลับของเอนไซม์ ดังสมการที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

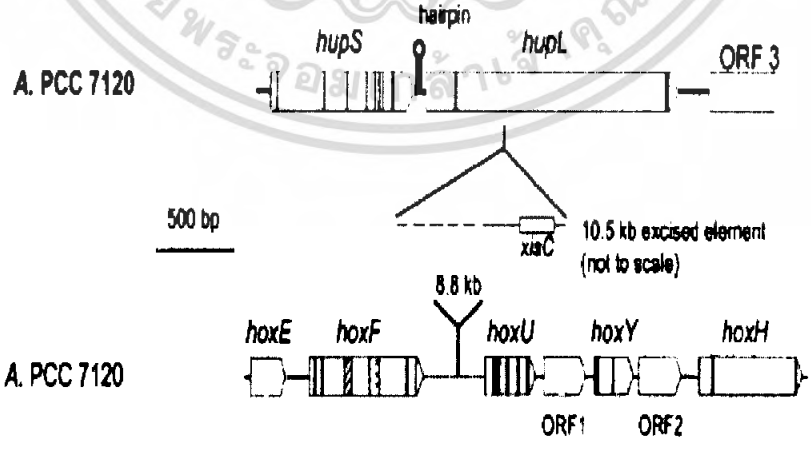
$$H_2 \xleftarrow{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 2.2}$$

Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ hydrogenase ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทธิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์นี้พบกระจายทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้นิกเกิลในการเร่งปฏิกิริยา ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกชนิดได้ตามปัจจัยในการพิจารณา ดังนี้

2.5.1 จำแนกตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา

2.5.1.1 Unidirectional หรือ uptake hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน เอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup* (*hup* มาจาก hydrogen uptake) ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน คือ ยีน *hupL* และยีน *hupS* (รูปที่ 2.6)

2.5.1.2 Bidirectional หรือ reversible hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน เอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hox* (*hox* มาจาก hydrogen oxidation) ซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย ยกตัวอย่างดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แผนที่ยีน *hup* และยีน *hox* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120

ที่มา : Tamagnini และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83990

2.5.2 จำแนกตามองค์ประกอบของโลหะที่ศูนย์กลางเร่งปฏิกิริยา

2.5.2.1 NiFe–hydrogenase ประกอบด้วยนิกเกิลและกลุ่มเหล็กและซัลเฟอร์ (Fe-S cluster) ในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.5.2.2 Fe-hydrogenase ประกอบด้วยกลุ่มเหล็กที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.5.2.3 Metal-free hydrogenase ซึ่งไม่พบโลหะใดที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.6 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า membrane-bound hydrogenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสมิคเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakiod membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการที่ 2.4

$$H_2 \xrightarrow{\text{Uptake hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 2.4}$$

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้รับความสนใจศึกษาในแบคทีเรียอีกหลายชนิด ได้แก่ *Azotobacter* sp. และ *Rhizobium* sp. เป็นต้น โดยพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจน นอกจากมีการค้นพบในแบคทีเรียแล้ว สามารถพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกชนิด (Houchins, 1984; Lambert และ Smith, 1981) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* sp. PCC 6301 (*Anacystis nidulans*)

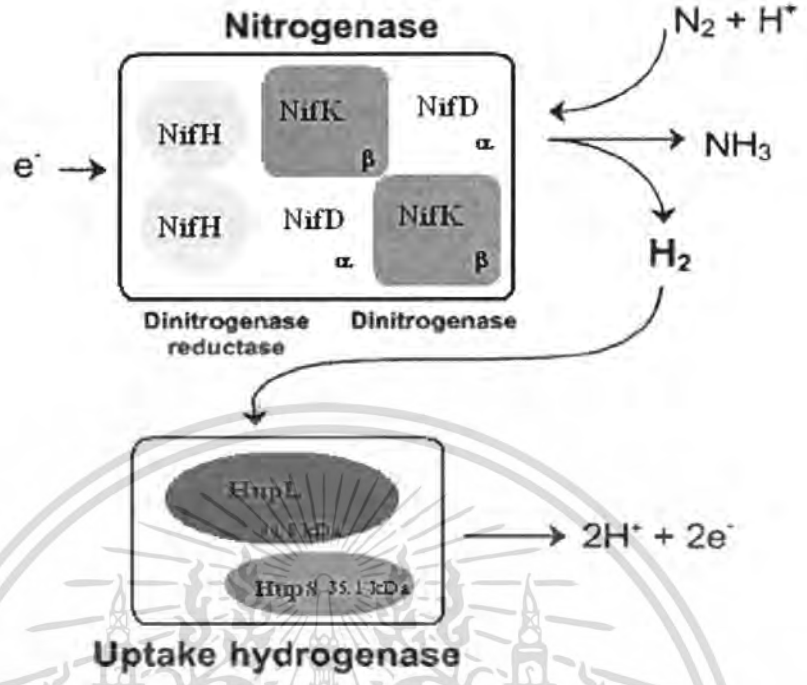
เนื่องจากเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสมีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ จึงได้รับความสนในนำมาศึกษาเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส โดยสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์และในเซลล์ปกติ (vegetative cell) ระดับกิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ในการเกิดเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าปัจจัยภายนอก ได้แก่ แสง นิกเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลต่อปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน (Oxelfelt และคณะ, 1995) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัพ-เทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะอาการที่มีการเติมไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศจะมีสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศปกติ ใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413 มีการศึกษาพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ปกติที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโร-ซิสต์ และจากงานวิจัยที่ศึกษาผลของนิกเกิลต่อการสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F พบว่าการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงไปในอาหาร ซึ่งนอกเหนือจาก *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F แล้วยังมีรายงานอื่นที่ยืนยันว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ อีกหลายสายพันธุ์ที่กิจกรรมของการสลายไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอริค เอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.7) โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60.8 กิโลดาลตันซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตันซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupS* (รูปที่ 2.7) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นไซ-ยาโนแบคทีเรียด้วยกัน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง (similarity) กันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.2) แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 กับแบคทีเรีย *Desulfovibrio gigas* พบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน HupL จะลดลงเป็น 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส
ที่มา : Tamagnini และคณะ (2002)

ตารางที่ 2.2 เปอร์เซ็นต์ของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด *Nostoc* sp. PCC 73102, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* sp. PCC 7120

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

ที่มา : Oxelfelt และคณะ (1998) และ Happe และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส เริ่มต้นโดย (Carrasco และคณะ, 1995) ซึ่งอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ ต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสทั้งหน่วยย่อยเล็ก (*hupS*) และหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) ใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxelfelt และคณะ, 1998) และ *Anabaena variabilis* (Happe และคณะ, 2000)

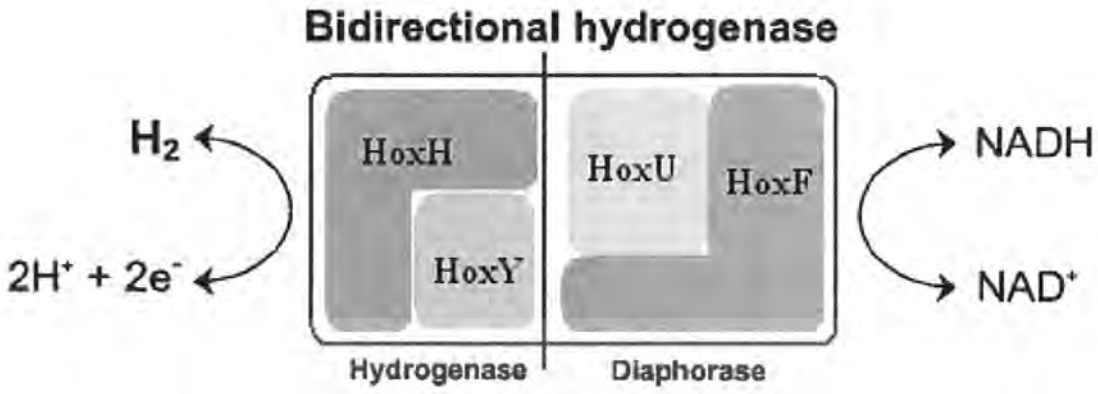
2.7 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการที่ 2.4

$$H_2 \xleftrightarrow{\text{reversible hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad \text{สมการที่ 2.4}$$

รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน โดยก่อนหน้านี้ มีรายงานการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Spirulina maxima* รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เมื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน และคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยมีสองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และมีอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่าไดอะฟอเรส (diaphorase) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส α และ γ ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NADH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส
ที่มา : Tamagnini และคณะ (2002)

2.8 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Polymerase chain reaction (PCR) หรือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการที่ง่าย รวดเร็ว ที่จะเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอใดๆ ทำให้เกิดการพัฒนาต่างๆขึ้นอย่างมาก

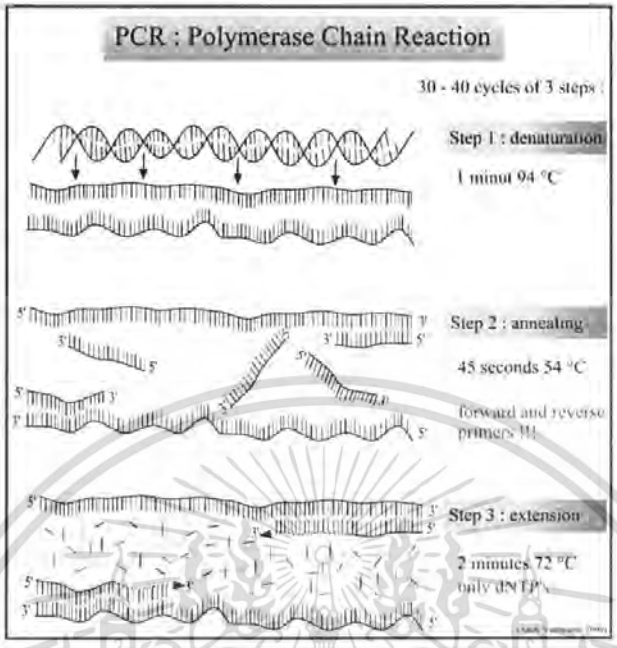
ในปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยโมเลกุลต้นแบบ (template molecule) ซึ่งอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ สายนิวคลีโอไทด์เส้นเดี่ยวสั้นๆที่มีลำดับเบสจำเพาะคู่สมกับโมเลกุลต้นแบบ (primer molecule) เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณโมเลกุลต้นแบบ ขั้นตอนของ PCR ดังรูปที่ 2.9 ซึ่งประกอบด้วย

1) denaturation การทำให้สายคู่ของดีเอ็นเอแยกจากกันด้วยความร้อน 90-96 องศาเซลเซียส

2) hybridization หรือ annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ ที่มีลำดับเบจำเพาะคู่สมไปจับกับสายเดี่ยวดีเอ็นเอที่แยกจากกันในข้อ 1 เกิดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส

3) ดีเอ็นเอสายใหม่ถูกสร้างด้วยเอนไซม์พอลิเมอเรสที่ทนต่อความร้อน คือ *Taq* polymerase เกิดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ทำให้ได้สายใหม่ของดีเอ็นเอจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นสองคู่ ขั้นตอนที่ 1-3 รวมเรียกว่า 1 รอบ การทำซ้ำขั้นตอน 1-3 หลายๆ ครั้ง (หลายรอบ) ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ขยายเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามลำดับเป็นแบบ exponential คือเป็นสองเท่าในแต่ละครั้งของรอบแต่ละรอบใช้เวลา 1-3 นาที ดังนั้นในเวลาเพียง 45 นาที ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มเป็นล้านเท่า กุญแจสำคัญของ PCR คือ เอนไซม์ *Taq polymerase* โดยที่ *Taq* คือชื่อย่อของ *Thermus aquaticus* แบคทีเรียที่อาศัยและเพิ่มจำนวนในบ่อน้ำพุร้อน ทำให้สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนของ Polymerase Chain Reaction
ที่มา : http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสถูกนำมาใช้ในวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ด้านต่างๆ ได้แก่ การตรวจหาจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะจุลชีพที่มีการเพาะเลี้ยงยาก หรือมีปริมาณน้อยในสิ่งส่งตรวจ การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเฉพาะยีนมนุษย์สำหรับการชันสูตรทางนิติเวชและโรคพันธุกรรมต่างๆ การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแต่ละครั้งจะทำในปริมาตรที่น้อยเพียง 50-100 ไมโครลิตรใน PCR tube ขนาด 500 ไมโครลิตรที่ทำด้วยพลาสติกบาง นำความร้อนได้ดี ซึ่งจะถูกนำไปวางในเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงต่อครั้ง อย่างไรก็ตาม ได้มีการพัฒนาการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสใน capillary tube ปริมาตรเพียง 1-2 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้ประหยัดค่าเอนไซม์ และทำได้ในเวลารวดเร็วประมาณ 30 นาที เครื่องมือที่ใช้เป็นของบริษัท Roche และ Perkin Elmer

ดังนั้นวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจึงเป็นวิธีทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่ทำให้สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ แม้จะมีปริมาณแค่หนึ่งชิ้นท่ามกลางดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีมากถึง 10^5 เซลล์ และทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนั้นมีมากถึง No x 2n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ No คือปริมาณดีเอ็นเอที่ตั้งต้น วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจึงเป็นขบวนการที่ใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอณูชีววิทยา (molecular diagnostic)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยสารเคมีและเอนไซม์ที่ไม่ซับซ้อนและเตรียมได้เอง ส่วนประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

1. บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ประกอบด้วย 2,000 มิลลิโมลาร์ Tris – HCl พีเอช 8.3, 500 มิลลิโมลาร์ KCl_2 0.8%, 20 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ บางบริษัทอาจจะแยก $MgCl_2$ ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 25–50 มิลลิโมลาร์ แยกออกมาอีกหลอด เพราะฉะนั้นเวลาเตรียมปฏิกิริยาต้องศึกษาก่อนว่าบัฟเฟอร์มี $MgCl_2$ หรือยัง ถ้าหากไม่เติม $MgCl_2$ จะทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน

2. ไพรเมอร์ (Primer) เป็นสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอสายเดียว ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน (amplify) ประกอบด้วย Forward และสาย Reverse จะเป็นสายเดียวที่อยู่บนสาย complement (คู่สม) ของยีน

การเขียนไพรเมอร์จะเขียนจากทิศ 5' → 3' ตัวอย่างเช่น Forward และ Reverse primer ของ outer membrane protein (OMP) ของเชื้อ *Caditatus liberoacter asiaticus* คือ:

Forward : OMP1 5' GAAGTTGATAAGGGTATGGGCGTAGAAGGG3'

Reverse : OMP2 5' CTACATGCGATTACCTATACGAAAACCAAA 3'

ไพรเมอร์จะใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.5-1.0 ไมโครโมลาร์และเตรียมเป็น 20 ไมโครโมลาร์สำหรับใช้เป็น Stock solution

3. dNTPs คือหน่วยประกอบย่อย deoxy nucleotide triphosphate ประกอบด้วยเบส 4 ชนิด คือ dATP , dGTP, dTTP, และ dCTP ในปฏิกิริยาจะใช้อย่างละ 100-200 ไมโครโมลาร์ dNTPs จะขายในรูปใช้ของเกลือ Na^+ หรือ Li^+ ซึ่งทั้งสองรูปจะใช้ได้เหมือนกัน บริษัทที่ผลิตจำหน่าย dNTPs จะขายเป็นชุด 4 หลอด ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และจะเตรียมเป็น 2.5 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้เป็น stock solution

4. เอนไซม์ DNA Polymerase ทนร้อนซึ่งแยกออกมาจากแบคทีเรียในปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะใช้ *Taq Thumus aquaticus* (*Taq*) เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร จะใช้ 1 ยูนิตต่อปฏิกิริยา จะใส่เป็นสารสุดท้ายหลังเติม DNA ต้นแบบแล้ว

5. ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อสาเหตุเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวน ถ้ายีนที่เพิ่มจำนวนมีชุดเดียวบนจีโนม จะใช้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ดีเอ็นเอต้นแบบถ้ามีคุณภาพดีคือไม่ขาด (Shear) หรือสกปรกจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR มาก

6. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่าอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตร้าไวโอเลต ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้นดังรูปที่ 2.10

รูปที่ 2.10 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสและย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต
ที่มา : http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm

ประโยชน์ของ PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรค ปัจจุบันนี้นับได้ว่า PCR เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของ PCR ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น โรคเอดส์, วัณโรค, มาเลเรีย การตรวจหายีนก่อมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งประโยชน์ของ PCR ทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ประโยชน์ของ PCR ทางด้านการเกษตร PCR มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรคสายพันธุ์พืชต้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมทั้งศึกษายีนกับตัวอื่น ๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ ซึ่งเทคนิค PCR นี้ช่วยให้เข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชและ พืชอาศัย ตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ

ขณะนี้เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็น อุตสาหกรรมส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย 4-5 หมื่นล้านบาทต่อปี แต่ในปัจจุบันนี้เกษตรกรเริ่มประสบปัญหาจากโรคระบาดในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีผลต่อผลผลิตกุ้งส่งออกทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ถึงปีละ 1-2 หมื่นล้านบาท สาเหตุของโรคระบาดในกุ้งที่พบ ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งต้องใช้เทคนิคPCRในการตรวจสอบ ทำให้สามารถป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันท่วงที นอกจากนี้การคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่ดีเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ซึ่งมีความแปรปรวนพันธุกรรม (genetic diversity หรือ Variation) สูงจะไม่สามารถดำเนินไปได้ถ้าไม่ใช้วิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ และถูกต้องถึงระดับพันธุกรรม

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Daday และ Smith (1979) ศึกษาวิธีการวัดการผลิตไฮโดรเจนภายในเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena cylindrica* พบว่าเมื่อเติมเมทิลไวโอโลเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1-10 มิลลิโมลาร์) ให้แก่เชื้อที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะทำให้เชื้อมีการผลิตไฮโดรเจน แต่สภาวะนี้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้น ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นใน *A. cylindrica* จึงเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์และถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อยโดยอะเซทิลีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Houchins และ Burris (1981a) ศึกษาบริเวณของการพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่แตกต่างกัน 2 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถพบได้ทั้งในเซลล์ปกติและเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์นี้ไม่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมไฮโดรเจนในเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยง สำหรับเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสพบเฉพาะในเฮเทอโรซิสต์ของเชื้อที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีอากาศ แต่กิจกรรมของเอนไซม์สามารถพบได้เล็กน้อยในเซลล์ปกติของเชื้อที่เจริญในสภาวะที่ให้อากาศเพียงเล็กน้อย (microaerobic) และมีไฮโดรเจน 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Houchins และ Burris (1981b) ยังศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่แตกต่างกันทั้ง 2 ชนิดของ *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่าปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสไม่สามารถผันกลับได้ แต่การทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถผันกลับได้ นอกจากนี้เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสยังมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสลายไฮโดรเจนโดยรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส คือ พีเอช 6 และ 9 ตามลำดับ

Tamagnini และคณะ (1997) ตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม Av1 และ Av3 ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena variabillis* สายพันธุ์ ATCC 29413 สำหรับศึกษายีนรีเวอร์สซิเบิล-ไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็กและหน่วยย่อยใหญ่ ตามลำดับ และตรวจสอบการมียีนอัพเทคไฮโดร-จีเนส ใน *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม *hup2* ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 พบว่า *Nostoc* sp. สายพันธุ์ PCC 73102 มียีนอัพเทคไฮโดรจีเนสแต่มีมีรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส ต่อมาในปี ค. ศ. 2000 Tamagnini และคณะ ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยเลือกศึกษาในส่วนที่เป็นยีน *hup*, *hox* และ *xisC* (*xisC* เป็นบริเวณที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *hupL)* พบว่าสามารถพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดร-จีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดที่ตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและยีน *xisC* พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้น

Happe และคณะ (2000) วิเคราะห์การถอดรหัสและการกลายพันธุ์ของยีนอัพเทคไฮโดร-จีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern hybridization พบว่ายีน *hupSL* ถอดรหัสได้ชิ้นส่วนที่มีขนาด 2.7

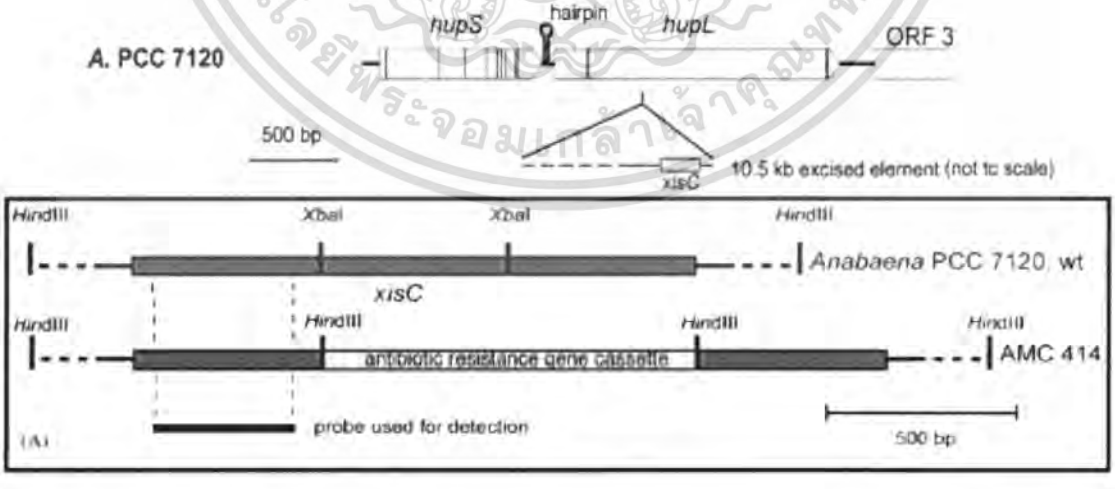
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิโลเบสและพบการถอดรหัสในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ภายใต้สภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตและสะสมไฮโดรเจนมากกว่าสายพันธุ์ปกติถึง 3 เท่า

Tamagnini และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413 ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (mutant AVM13) โดยเกิดจากการขาดหายไป (deletion) ของบริเวณปลายยีน *hupL* ทำให้ยีน *hupL* ไม่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพ-เทคไฮโดรจีเนสได้ แสดงโครงสร้างของยีน *hupL* (รูปที่ 2.11)

รูปที่ 2.11 โครงสร้างของยีน *hupL* ใน *Anabaena variabilis* สายพันธุ์ ATCC 29413
ที่มา : Tamagnini และคณะ (2002)

Lindblad และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพใน *Anabaena* sp. สายพันธุ์ PCC 7120 ชนิดที่เป็นสายพันธุ์ปกติและที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (mutant AMC 414) โดยการทำให้ให้กลายพันธุ์แสดงได้ (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของยีน *hupSL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 สายพันธุ์ปกติ (wild type) และมิวแตนท์ (mutant AMC 414)
ที่มา : Lindblad และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปจะเห็นได้ว่า โครงสร้างของยีน *hupL* จะมีบริเวณยีน *xisC* อยู่ ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ มีหน้าที่ช่วยทำให้ยีน *hupL* และ *hupS* ที่อยู่ห่างไกลกันอยู่ใกล้กันมากขึ้นและสามารถทำงานร่วมกันได้ดีขึ้นในการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส การทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นเกิดจากการตัด *xisC* ออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังรูปและใส่ยีนต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปแทนที่ดังรูป จะทำให้ยีน *hupL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ไม่สามารถทำงานได้และไม่มีการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้

Gutthann และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยการยับยั้งกระบวนการหายใจและการตรึงไนโตรเจนซึ่งมีส่วนช่วยทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำใน *Synechocystis* sp. สายพันธุ์ PCC 6803 และพบว่าการยับยั้งด้วยเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสในกระบวนการหมักสามารถทำให้ผลิตไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ดังนี้

3.1.1.1 ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่แยกได้ใหม่จากบ่อน้ำธรรมชาติ

3.1.1.2 ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเส้นสายที่แยกได้ใหม่จากบ่อน้ำธรรมชาติ

3.1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (*supE*44 Δ *lacU*169 (ϕ80 *lacZ* ΔM15) *hsdR* 17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหาร BG11 (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (ภาคผนวก ข)

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB (ภาคผนวก ข)

3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

3.2.2.1 เมทิลไวโอโลเจน (Methylviologen) (Sigma, Germany)

3.2.2.2 โซเดียมไดไทโอไนต์ (Sodium dithionite) (Sigma, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.2.3.1 กานามัยซิน (Kanamycin) (Sigma, USA)

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.2.4.1 เม็ดแก้ว (Glass bead) (Sigma, USA)

3.2.4.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (ภาคผนวก ง)

3.2.4.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.4.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (Sodium lauroyl sarcosine) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.4.5 ฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol)

3.2.4.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) (Phenol : Chlorofrom : Isoamylalcohol)

3.2.4.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chlorofrom : Isoamylalcohol)

3.2.4.8 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์

3.2.4.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% ethanol)

3.2.4.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.5.1 dNTPs (Deoxynucleotidetriphosphate) (Promega, USA)

3.2.5.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3.2.5.3 เอนไซม์ *Taq* (*Taq* DNA polymerase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3.2.5.4 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.5.5 เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.5.6 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ง)

3.2.5.7 สีผสมดีเอ็นเอ (Tracking Dye) (ภาคผนวก ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

3.2.6.1 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)

3.2.6.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Promega, USA)

3.2.6.3 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indodyl-β-D-galactoside) (Promega, USA)

3.2.6.4 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) (Promega, USA)

3.2.7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.7.1 ฝาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) (Promega, USA)

3.2.8 ชุดทดสอบ (Kit)

3.2.8.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวคเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany)

3.2.8.2 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany)

3.2.8.3 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit, Germany)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV- 50, Japan)

3.3.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (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 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Delta Laboratory,1375FX, Thailand)

3.3.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Hermle Labortech Z383K, Germany)

3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion Sartorius

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BP2215, Thailand)

3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument 215, USA)

3.3.9 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) (Amersham Pharmacia Biotech EPS30, Sweden)

3.3.10 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermoblock) (Biosan TDB-120, Thailand)

3.3.12 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.13 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswares)

3.3.14 กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (Bright field microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.3.15 แท่งแม่เหล็กคนสาร (magnetic bar)

3.3.16 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer 480, USA)

3.3.17 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech GNA100, Sweden)

3.3.18 ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมฝาปิด (National Scientific, USA)

3.3.19 เข็มฉีดแก๊ส (Scientific Glass Engineering, Australia)

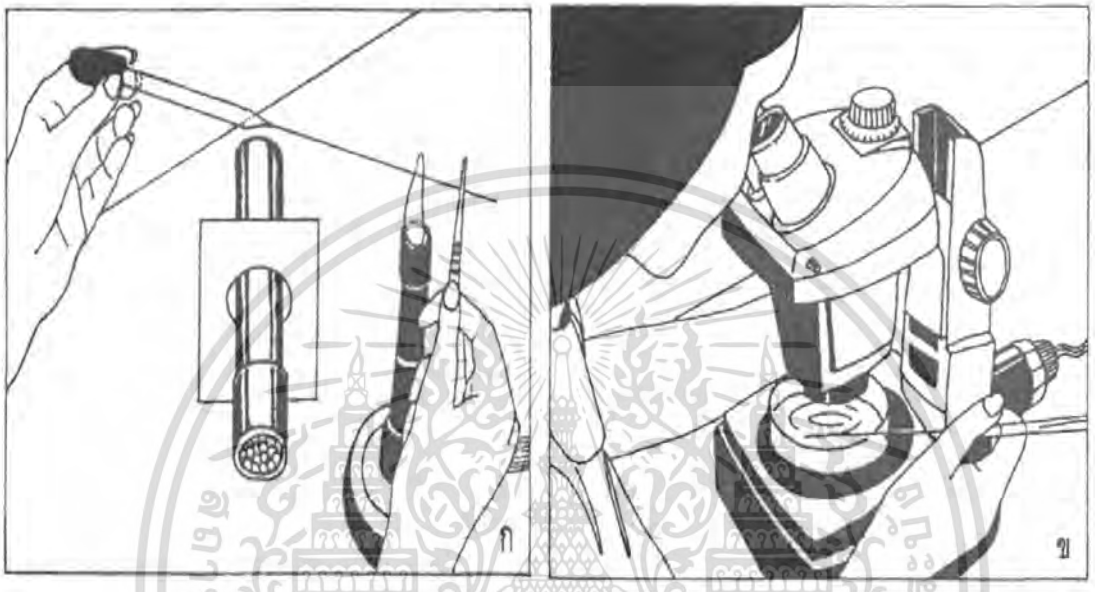
3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่างน้ำและคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำธรรมชาติโดยใช้ขวด duran จุ่มลงในน้ำจนกระทั่งน้ำเต็มขวดนำตัวอย่างน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียมาทำการแยกเชื้อ โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตเพื่อทำเป็นอุปกรณ์สำหรับดูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย วิธีทำ ใช้ปากคีบจับปลายด้านหนึ่งของพาสเจอร์ปิเปตแล้วเผาปลายหลอดด้วยตะเกียงบุนเส็นจนกระทั่งพาสเจอร์ปิเปตอ่อนตัว ขณะเดียวกันให้ใช้ปากคีบดึงหลอดแก้วเพื่อให้หลอดยาวขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดจะเล็กลง เมื่อได้ขนาดตามที่ต้องการแล้วใช้ปากคีบดึงส่วนที่ไม่ต้องการทิ้ง ส่วนอีกด้านหนึ่งใส่จุกยางเพื่อใช้ในการดูดเซลล์ นำตัวอย่างที่มีไซยาโนแบคทีเรียหยดลงบนสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบเซลล์ที่มีไซยาโนแบคทีเรียให้จุ่มปลายพาสเจอร์ปิเปตกะให้ปลายพาสเจอร์ปิเปตอยู่บนเซลล์พอดี แล้วใช้ปลายปิเปตกดลงบนเซลล์ที่ต้องการ เซลล์นั้นจะถูกดูดขึ้นมาอย่างอัตโนมัติ นำเซลล์ที่ถูกดูดขึ้นมาใส่ในหลุม Tissue culture plate ที่บรรจุอาหาร BG11 เรียบร้อยแล้ว ทำการดูดอาหารขึ้นลงอย่างน้อย 3-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

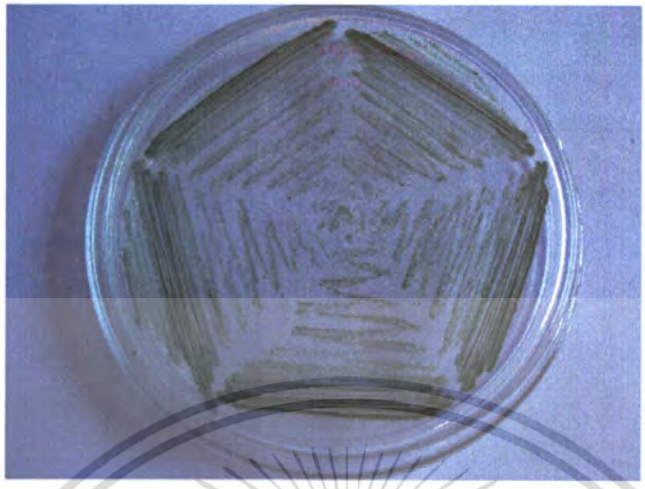
ครั้ง จากนั้นทำการล้างปิเปตโดยทำการดูดขึ้นลงในหลุมที่เตรียมไว้สำหรับการล้างพาสเจอร์ปิเปต วาง Tissue culture plate ที่แต่ละหลุมมีเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียแล้ววางในที่มีแสงสว่างเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยการเตรียมพาสเจอร์ปิเปต (ก) และการดูดเชื้อภายใต้กล้อง inverted microscope (ข)
ที่มา : ลัดดา (2542)

เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตใน Tissue culture plate สามารถเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ได้โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไปลนไฟ ทิ้งไว้สักพักให้เย็น แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อไปจุ่มในอาหารและนำมาลาก (streak) บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG11 นำจานเพาะเชื้อวางที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบเซลล์ที่เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว (รูปที่ 3.2) แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11

3.4.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว BG11 (Rippka และคณะ, 1979) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 7 ถึง 10 วัน (รูปที่ 3.3)

รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

นำแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสูตร LB (Luria-Bertani) (Sambrook และคณะ, 1989) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีของการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน สามารถคัดเลือกเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.4.4 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

ปีเปตไซยาโนแบคทีเรียใส่ลงในอาหาร BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.05 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.4.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใช้เมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์

3.4.5.1 การเตรียมสารเมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์

การเตรียมสารเมทิลไวโอโลเจนความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการชั่งสารเมทิลไวโอโลเจน หนัก 0.2572 กรัม ใส่ขวดแก้วปิดฝา จากนั้นใช้เข็มฉีดยา 2 เข็ม เจาะทางด้านบนของขวด เพื่อนำพ่นก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวดที่มีเมทิลไวโอโลเจนผ่านเข็มที่ 1 ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที การเตรียมสารโซเดียมไดไทโอไนต์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการชั่งสารโซเดียมไดไทโอไนต์ หนัก 0.1747 กรัมใส่ในขวดแก้ว จากนั้นทำการพ่นก๊าซอาร์กอนด้วยวิธีเช่นเดียวกันกับสารเมทิลไวโอโลเจน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติมน้ำที่ผ่านการพ่นก๊าซอาร์กอนลงไป 10 มิลลิลิตร และพ่นด้วยก๊าซอาร์กอนต่ออีก 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบค-ทีเรีย

นำไซยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลาย จากนั้น ทำการกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 4 มิลลิลิตร แล้วปิเปตใส่ขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดละ 2 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ปิดฝาขวด แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซพ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำขวดแก้วเปล่าขนาด 10 มิลลิลิตรมาปิดฝา แล้วใช้เข็มฉีดยาเข็มที่ 1 เจาะทางด้านบนของขวดเปล่าเพื่อนำก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวด ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดสารละลายเมทิลไวโอโลเจนและสารละลายโซเดียมไดไทโอไนต์ที่พ่นก๊าซอาร์กอนแล้วอย่างละ 1 มิลลิลิตร และไซยาโนแบคทีเรียที่พ่นก๊าซอาร์กอนแล้ว 2 มิลลิลิตร มาใส่ในขวดแก้วที่พ่นอาร์กอนแล้วเมื่อผสมกันแล้วให้คว่ำขวดแล้วนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ฉีดปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่อง Gas Chromatograph – Thermal conductivity Detector (GC-TCD)

พารามิเตอร์	สภาวะในการเดินระบบ
Gas Chromatograph	Varian model GC-CP 3800
Detector	Thermal Conductivity Detector (TID)
Column	Plot Fused Silica coating Molecular sieve 5A, 10 m x 0.53 mm i.d. x 50 μm (film thickness) column (fused-silica capillary column) (Varian, USA)
Temperature Program	Injector temperature : 100 °C Oven temperature : 50 °C (initial temperature), holding at 50 °C for 5 min, to 100 °C at 4 °C/min, holding at 100 °C for 2 min Detector temperature : 150 °C
He Carrier gas	Flow rate 5 ml/min (99.999 % purity) (Praxair, Korea, Co., Ltd.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่ผ่านการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรจีเนสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.1-0.5 ถ้ามากกว่า 0.5 ให้เจือจางโดยอาหารเหลว BG11 จากนั้น นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex) อย่างแรง 3 นาที จากนั้น นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 665, 665.5, 666, 666.5 และ 750 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับเมทานอลแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 3.1

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร}}{0.0844}$$

สมการที่ 3.1

3.4.6 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.4.2 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมเม็ดแก้ว (glass bead) 200 ไมโครลิตร โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โครซีน 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 นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเออยู่มาสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ในปริมาณ 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในปริมาณ 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้น นำส่วนใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร ตามด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัดปริมาณ 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.6 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนของอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาด จากนั้น หยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.4.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสและยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ PCR 1 เท่าที่มีดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมลาร์ upstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ downstream primer 0.25 มิลลิโมลาร์ จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 100 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 ยูนิต เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Machine) โดยมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	94	5 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	50	30 วินาที
Extension	72	90 วินาที
		35 รอบ
Final extension	72	10 นาที

3.4.9 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ทำการตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลและนำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลแบบสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) โดยนำหลอดทดลองที่มีเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการมาเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์แล้ว ปิเปตสารละลายใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก จ) ใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เป็น 10 : 1 และคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาตามสมการที่ 3.2

$$\text{ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR (นาโนกรัม)} = \frac{\text{นาโนกรัมของเวคเตอร์} \times \text{ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (กิโลเบส)}}{\text{ขนาดของเวคเตอร์ (กิโลเบส)}} \times \frac{10}{1}$$

สมการที่ 3.2

ปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 2 เท่า เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต ผลิตภัณฑ์ PCR และ pDrive 50 นาโนกรัม ผสมให้เข้ากัน และนำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

3.4.11 การเตรียม competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α สำหรับทรานส-ฟอร์มเมชัน

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ตั้งทิ้งในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งสารละลายแล้วเติมสาร RF1 (ภาคผนวก ค) ปริมาณ 1 ใน 3 เท่าของปริมาตรอาหารเหลวสูตร SOB ตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมสาร RF2 (ภาคผนวก ค) ปริมาณ 1 ใน 25 เท่าของปริมาตรอาหารเหลวสูตร SOB เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.12 การทรานสฟอร์มเมชัน

นำ competent cell จาก -70 องศาเซลเซียส หรือที่เตรียมได้ในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง ปิเปตเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีปฏิกิริยาไลเกชัน ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.10 นำไปวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาทีในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้น ย้ายไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มากระจายบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) 0.5มิลลิโมลาร์ บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

3.4.13 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มเมชัน

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส จากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินและทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลกโตซิเดส (β-galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้น นำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของกานามัยซิน 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.4.14 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

โคโลนีที่เจริญบนอาหารคัดเลือก มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตตามวิธีในข้อ 3.4.3 นำสารละลายเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป (QIAprep Spin Miniprep Kit, Germany) โดยกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้นกลับหลอดไปมา แล้วเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

350 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา หลังจากนั้น ปิเปตสารละลายใส่ใน QIAprep spin column ที่เสียบใน Collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน QIAprep spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวใน 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 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.4.7

3.4.15 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.14 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 1 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 10 ยูนิตและน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษายีนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกจากบ่อน้ำธรรมชาติ เริ่มต้นจากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์ ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร BG11 นำเซลล์ที่ได้มานั้นมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสโดยใช้เมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์ จากนั้นศึกษายีนโดยการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและอัพเทคไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pDrive แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมแล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1 ผลการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์

จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากโครงการแก้มลิงตามแนวพระราชดำริ บึงพังพวย ถนนสุขาภิบาล 1 จังหวัดกรุงเทพมหานคร (รูปที่ 4.1) เมื่อวันที่ 15 เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2550 มาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียพบว่าบ่อน้ำที่ทำการเก็บตัวอย่างมีสีเขียวเข้มจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำโดยจุ่มขวด duran ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในบ่อน้ำจนกระทั่งน้ำเต็มขวด นำตัวอย่างน้ำที่มีไซยาโนแบคทีเรียมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรีย 2 ชนิดคือไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย จากนั้นใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย 1 เซลล์ไปเพาะเลี้ยงใน Tissue culture plate ที่มีอาหารเหลว BG11 จนกระทั่งไซยาโนแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีสีเขียวเข้มจึงนำไซยาโนแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง BG11 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ให้แสงที่มีความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ได้ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ดังรูปที่ 4.2

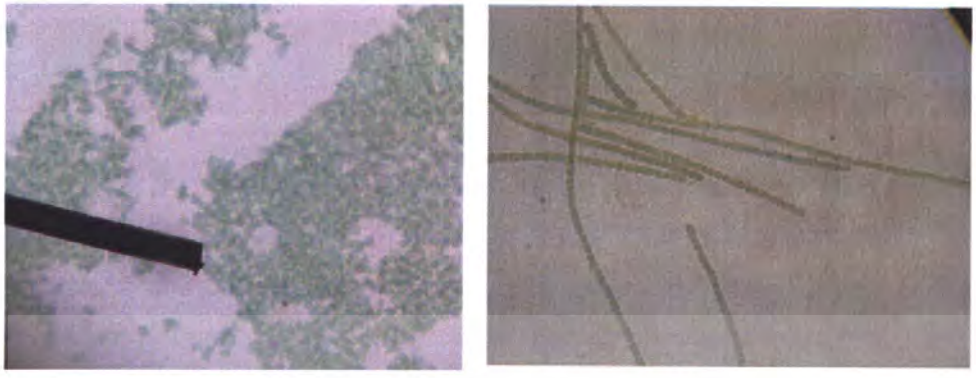
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 บ่อน้ำธรรมชาติที่ใช้ในการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย

รูปที่ 4.2 ไซยาโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง BG11

หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ทั้ง 2 ชนิดไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างกลมเป็นเซลล์เดี่ยวและมีสีเขียวแกม-น้ำเงิน (รูปที่ 4.3ก) และไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นเส้นสายมีเซลล์รูปร่างทรงกระบอกต่อกันและมีสีเขียวแกมน้ำเงิน (รูปที่ 4.3ข) จากนั้นนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

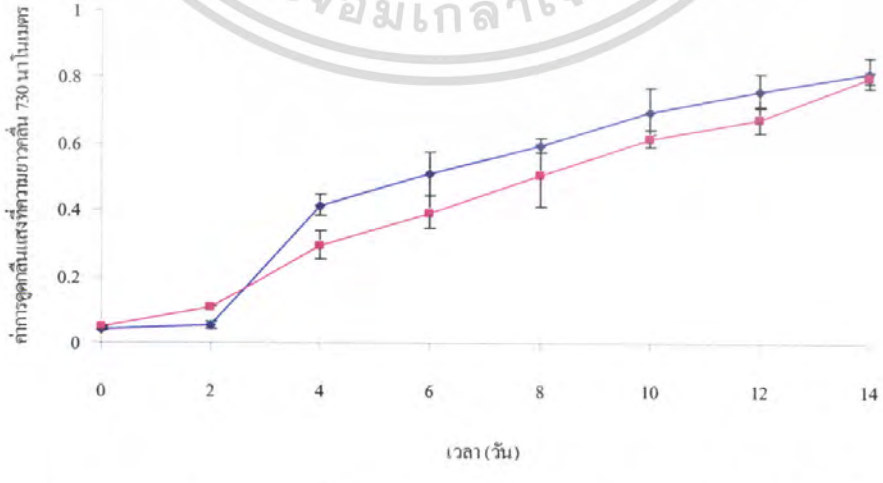


(ก) (ข)

รูปที่ 4.3 ไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
(ก) ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม (ข) ไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย

4.2 ผลการวัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ 2 ชนิด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG11 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรแล้วทำการศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันโดยไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม (◆) มีระยะพักตัว (lag phase) นานกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย (■) แต่มีระยะการเจริญเติบโตเร็วที่สุด (log phase) เหมือนกันคือในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 (รูปที่ 4.4) จากนั้นนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสต่อไป



รูปที่ 4.4 อัตราการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม (◆) และไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย (■)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการนำขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรมาปิดฝาแล้วใช้เข็มฉีดยา 2 เข็มเจาะเข้าไปด้านบนของขวด พ่นก๊าซอาร์กอนเข้าสู่ขวดที่มีสารละลายผสมของเมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอ-ไนต์ผ่านเข็มที่ 1 ส่วนเข็มที่ 2 ให้เป็นทางออกของก๊าซ พ่นก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่พ่นก๊าซอาร์กอนแล้ว 2 มิลลิลิตรในขวดแก้ว เมื่อผสมกันแล้วให้คว่ำขวดทันทีหลังจากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดก๊าซภายในขวดแก้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph พบว่าในไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมเมื่อนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนชั่วโมงที่ 1 ปรากฏก๊าซไฮโดรเจนที่เวลา (Retention time) 0.792 นาทีโดยมีปริมาณไฮโดรเจน 10 ไมโครโมล คิดเป็น 0.25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้ 0.73 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที และเมื่อนำมาวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่ 2 และ 3 จะปรากฏก๊าซไฮโดรเจนที่เวลา (Retention time) 0.803 และ 0.793 นาที ตามลำดับโดยมีปริมาณไฮโดรเจน 4 และ 16 ไมโครโมล คิดเป็น 0.11 และ 0.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้ 0.29 และ 1.16 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที ตามลำดับ ส่วนในไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสายเมื่อนำไปวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนชั่วโมงที่ 1 จะปรากฏก๊าซไฮโดรเจนที่เวลา (Retention time) 0.791 นาที โดยมีปริมาณไฮโดรเจน 20.82 ไมโครโมล คิดเป็น 0.51 เปอร์เซ็นต์และสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้ 7.08 ไมโครโมลไฮ-โดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที และเมื่อนำมาวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนที่ชั่วโมงที่ 2 และ 3 จะปรากฏก๊าซไฮโดรเจนที่เวลา (Retention time) 0.805 และ 0.929 นาที ตามลำดับโดยมีปริมาณไฮโดรเจน 0.18 และ 0.15 ไมโครโมล คิดเป็น 0.44 และ 0.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้ 6.12 และ 5.10 ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที ตามลำดับ ดังตาราง 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไฮโดรเจนและกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ชนิดของไซยาโน-แบคทีเรีย	เวลา (ชั่วโมง)	Retention time (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ	ปริมาณไฮโดรเจน (เปอร์เซนต์)	ปริมาณไฮโดรเจน (ไมโครโมล)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์ส-ซิเบิลไฮโดรจีเนส (ไมโครโมลไฮโดรเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์เอต่อนาที)
ไซยาโน	1	0.792	28	0.25	10	0.23	0.73
แบคทีเรีย	2	0.803	12	0.11	4	0.23	0.29
รูปร่างกลม	3	0.793	44	0.39	16	0.23	1.16
ไซยาโน	1	0.791	57	0.51	20.82	0.049	7.08
แบคทีเรีย	2	0.805	49	0.44	18	0.049	6.12
รูปร่างเส้นสาย	3	0.929	41	0.37	15	0.049	5.10

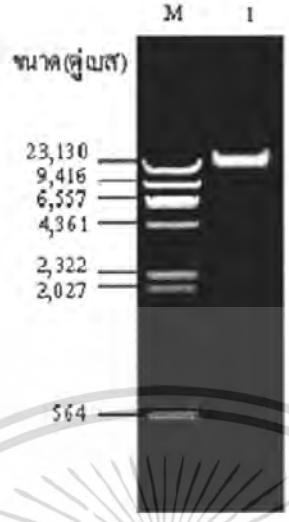
จากผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสที่ได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมมีกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลน้อยกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมและไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายสามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนได้เนื่องจากมีเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสสามารถรีดิวซ์โปรตอนและอิเล็กตรอนให้กลายเป็นก๊าซไฮโดรเจน แต่ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้น ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายจึงมีกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมากกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม

4.4 ผลการศึกษายีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

4.4.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม

จากการนำไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง BG11 เป็นเวลา 1–2 สัปดาห์ และนำเซลล์ที่ได้นั้นมาทำการมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้ว (glass bead) และสกัดด้วยฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE วิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่า ปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบ ดังรูป 4.5 เมื่อเปรียบเทียบแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดสูงกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23,130 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

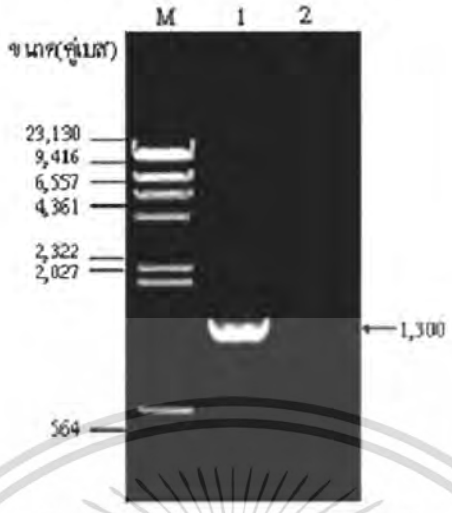


รูปที่ 4.5 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมบริสุทธิ์จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลและอัพเทคไฮโดรจีเนส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่สกัดได้จากข้อ 4.4.1 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลและอัพเทคไฮโดรจีเนส ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 ที่จำเพาะต่อยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส และไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd 2 ที่จำเพาะต่อยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส (ชมาภรณ์, 2547) และใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัว (annealing) เป็น 50 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (รูปที่4.6) และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd2 และ Uhyd3 (รูปที่ 4.6) หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์ส-ซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

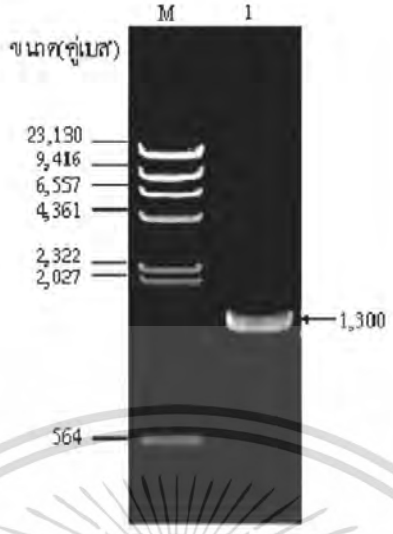
1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3

2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd 2

4.4.3 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 ที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (ข้อ 4.4.2) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร และเปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 มี 1 แถบและมีขนาดใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.6) คือ แถบที่ได้มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.7) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีปริมาณดีเอ็นเอ 12 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำไปเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3

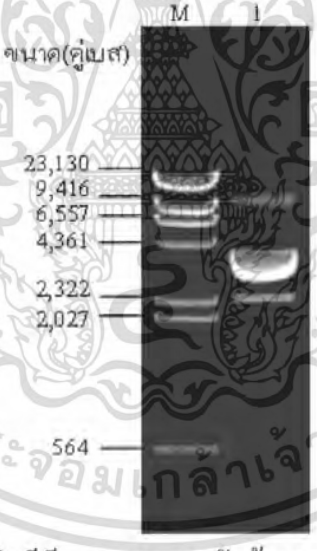
4.4.4 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมเมื่อใช้ไพรเมอร์ Rhyd1 และ Rhyd3 ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมต่อเข้าไปในเวคเตอร์ pDrive โดยใช้อัตราส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α พบว่าประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficientcy) เท่ากับ 1.5×10^7 ซีเอฟยูต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ จากนั้น คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีสีขาว เนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน หลังจากนั้น นำโคโลนีที่คัดเลือกมา 1 โคโลนีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.5 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAprep Spin Miniprep Kit)

จากการนำโคโลนีสีขาว 1 โคโลนีที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบแถบพลาสมิดดีเอ็นเอซึ่งมีขนาด 4,151 คู่เบสจึงตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่า pRhydNC ซึ่ง NC ย่อมาจาก New Cyanobacteria (รูปที่ 4.8) จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ต่อไป



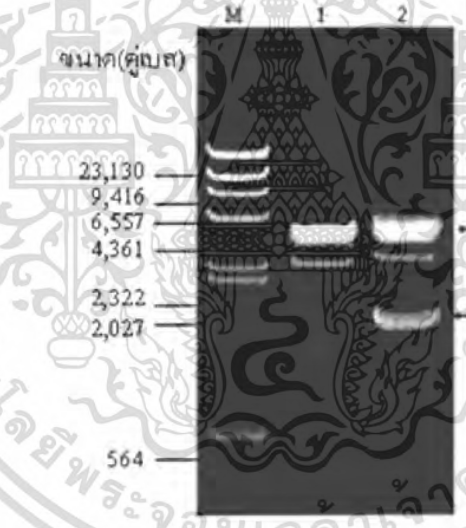
รูปที่ 4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอของโคโลนีสีขาวจากการสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป
M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III
1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC

4.4.6 การตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากนำพลาสมิดดีเอ็นเอของ pRhydNC ที่สกัดได้จากข้อ 4.4.5 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhyd1 และ Rhyd3 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pRhydNC ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 3,851 คู่เบส และ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.9) แถบที่ปรากฏ 2 แถบนี้ แถบบนมีขนาด 3,851 คู่เบส จะเป็นแถบของเวคเตอร์ pDrive ที่ไม่มี Insert เนื่องจากมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในบริเวณ multicloning site ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ก็จะได้เวคเตอร์ pDrive ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 3,851 คู่เบส และแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งอยู่ด้านล่างมีขนาด 1,300 คู่เบส จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าพลาสมิด pRhydNC เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3



รูปที่ 4.9 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pRhydNC ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติให้มีความบริสุทธิ์และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียจากบ่อน้ำธรรมชาติ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำมาคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียพบว่าสามารถคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียได้ 2 ชนิดคือไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างกลมเป็นเซลล์เดี่ยวและมีสีเขียวแกมน้ำเงิน และไซยาโนแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นเส้นสายมีเซลล์รูปร่างทรงกระบอกต่อกันและมีสีเขียวแกมน้ำเงิน จากนั้นนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันโดยมีระยะการเจริญเติบโตเร็วที่สุดเหมือนกันคือ ในวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 แต่ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายจากนั้นนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยใช้สารเมทิลไวโอโลเจนและโซเดียมไดไทโอไนต์พบว่าไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสแต่ไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมมีกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสน้อยกว่าไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสาย เนื่องจาก ในไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศจึงทำให้สามารถเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียและก๊าซไฮโดรเจนได้ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้สูงกว่า

5.2 การศึกษายีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

5.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 และไพรเมอร์คู่ Uhyd2 และ Uhyd3 โดยใช้อุณหภูมิในช่วงการจับตัว (annealing) เป็น 50 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ Rhyd1 และ Rhyd3 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส แสดงว่ามียีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd2 และ Uhyd3 แสดงว่าไม่มียีนอัพเทคไฮโดรจีเนสในดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่คัดแยกได้

5.2.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ Rhyd1 และ Rhyd3 ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปต่อเชื่อมเข้าไปในเวคเตอร์ pDrive แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชื่อ pRhydNC ซึ่ง NC ย่อมาจาก New Cyanobacteria มาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบการมีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมอยู่ในเวคเตอร์ที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ กานามัยซิน X-Gal และ IPTG พบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* ที่มีอยู่ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชัยชาญ ฤทธิเกริกไกร. 2547. พลังงานชีวมวลกับศักยภาพในประเทศไทย. **โลกพลังงาน**. 7, 22-29.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชมาภรณ์ ธงเพ็ง. 2547. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

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.

Carrasco, C. D., Buettner J. A., and Golden J. W. (1995). Programed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA. 92 : 791-795.

Daday, A.and Smith, D. (1979). The hydrogenase-nitrogenase relationship in a symbiotic cyanobacterium isolation from *Macrozamia communis* L. Johnson. **Aust. J. Plant Physiol**. 131 : 231-238.

Fernando, J ., Hundeshagen , B., and Bothe, H. (2002). Evidence for the occurrence of the alternative ,vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **FEMS Microbiol Lett**. 51 : 19-24.

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. (1984). The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. **Biochim Biophys Acta.** 768 : 227–255.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Houchins, J. P., and Burris R. H. (1981)a. 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. (1981)b. Comparative characterization of two distinct hydrogenase from *Anabena* sp. strain 7120. **J. Bacteriol**. 146 : 215-221.

Gutthann, F., Egert, M., Marques, A. and Appel, J . (2006). Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogene volution under low oxygen concentrations in Synechocystis sp. PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1767 : 161–169

Lambert, G. R. and Smith, G. D. (1981). The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). **Biol**. Rev 56 : 589–660.

Lindblad, P. Christensson, K. Lindberg, P. Pinto, F. and Tsygankov, A. (2002). Photoproduction of H_2 by wildtype *Anabaena* PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. **International Journal of Hydrogen Energy** 27 : 1271- 1281.

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

Peschek, G. A. (1979)a. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. H_2-dependent photoreduction and related reactions. **Biochim. Biophys. Acta**. 548 : 187-202.

Peschek, G. A. (1979)b. Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction. **Biochim. Biophys. Acta**. 548 : 203-215.

Rippka, R., Duruelles, J., Waterbury, B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. (1979). Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.** 111 : 1-61.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning**. 2nd ed. Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Stephenson, M. and Stickland, L. H. (1931). Hydrogenase. II. The reduction of sulphate to sulphide by molecular hydrogen. **Biochem J**. 25 : 215-220.

Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. (1997). Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme. **Appl. Environ. Microbiol**. 63(5) : 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., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. **Microbiol. Molec. Biol**. Rev. 66(1) : 1-20.

http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

http://www.enaa.or.jp/WE-NET/suiso/suiso1_e.html

http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%20hydrogenproduction

http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Rippka และคณะ, 1979)

ส่วนประกอบ Trace metal mix 1000 เท่า

กรดบอริก (H_3BO_3)	46.30	มิลลิโมลาร์
แมงกานีส (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	4.15	มิลลิโมลาร์
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.77	มิลลิโมลาร์
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	1.61	มิลลิโมลาร์
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.32	มิลลิโมลาร์
โคบอลต์ (II) ไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบอาหาร BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 6H_2O$)	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีทีดีเอ (Na_2EDTA)	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบอาหาร BG11

อาหาร BG11 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	1	มิลลิลิตร
(2 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	มิลลิลิตร
(3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)		
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot Citrate$)	1	มิลลิลิตร
(0.60 กรัม/100มิลลิลิตร)		
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 สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร LB ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตรแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

ส่วนประกอบอาหาร

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
น้ำ	950	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตร โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

RF1 100 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมแอซิเตท (KoAC)	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายกรดแอซิติกแล้วกรองผ่านตัวกรอง

RF2 100 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบ

MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	75	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วกรองผ่านตัวกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

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

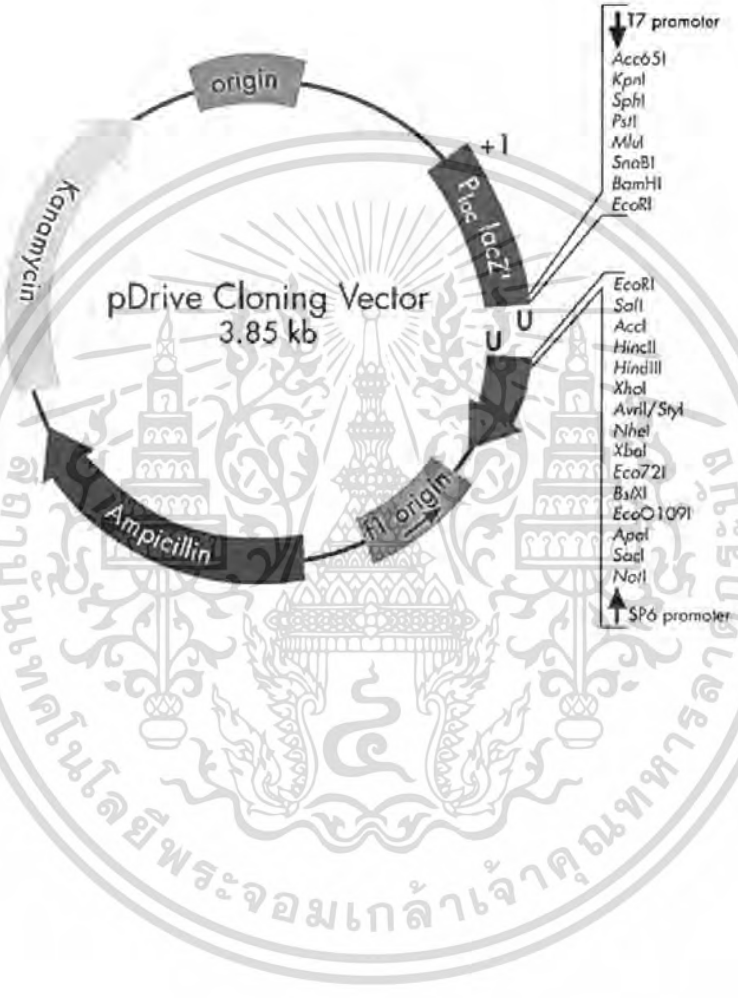
ซูโครส (sucrose) หรือกลีเซอรอล (glycerol)	40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

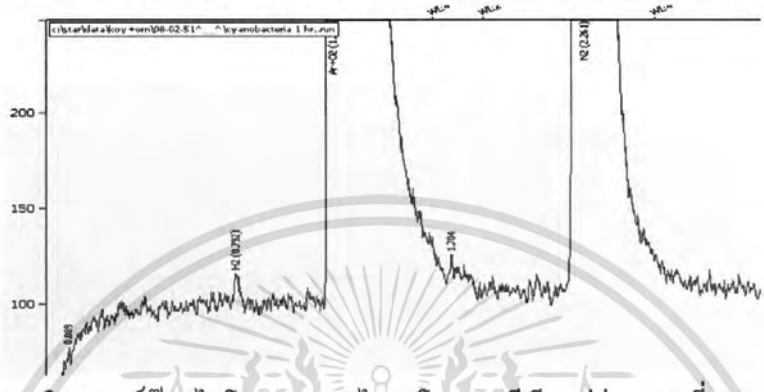
เวคเตอร์ pDrive สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR



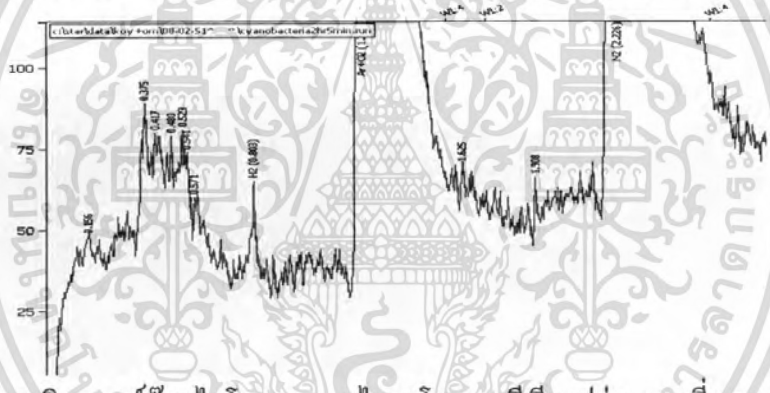
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

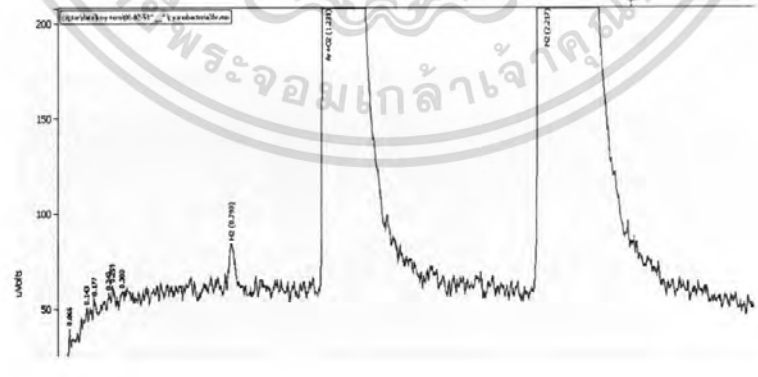
โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่เวลา 1 ชั่วโมง



โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่เวลา 2 ชั่วโมง

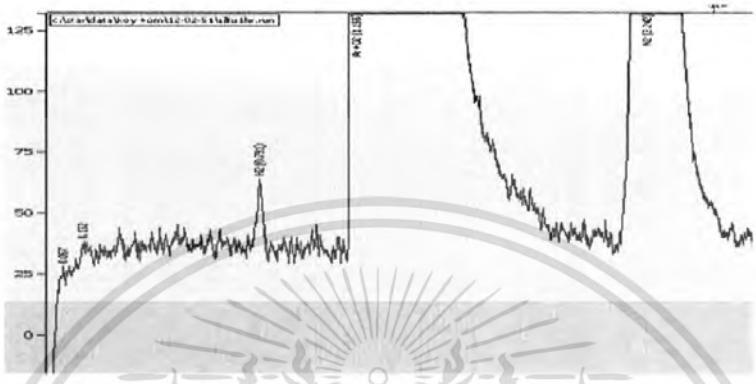


โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลมที่เวลา 3 ชั่วโมง

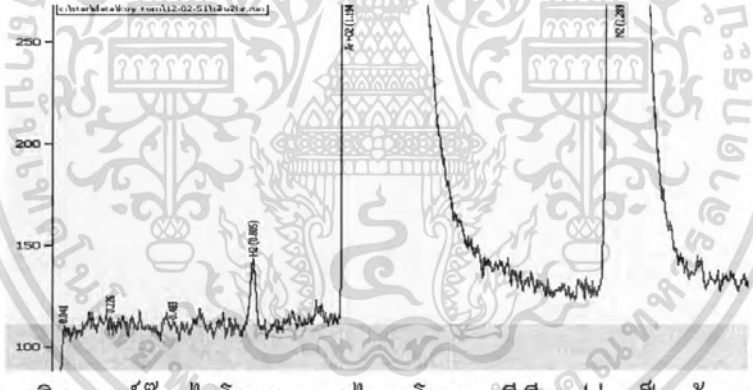


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

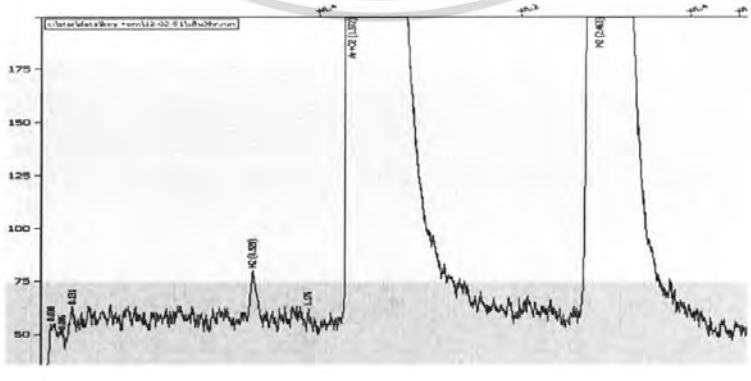
โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย ที่เวลา 1 ชั่วโมง



โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย ที่เวลา 2 ชั่วโมง



โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ก๊าซไฮโดรเจนจากไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย ที่เวลา 3 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

ผลการวัดการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม

วัน	ชุดข้อมูล 1	ชุดข้อมูล 2	เฉลี่ย
0	0.044	0.043	0.044
2	0.053	0.054	0.054
4	0.445	0.385	0.415
6	0.542	0.475	0.508
8	0.662	0.528	0.595
10	0.715	0.679	0.697
12	0.789	0.732	0.760
14	0.825	0.803	0.814

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย

วัน	ชุดข้อมูล 1	ชุดข้อมูล 2	เฉลี่ย
0	0.052	0.047	0.050
2	0.117	0.103	0.110
4	0.273	0.316	0.295
6	0.348	0.441	0.395
8	0.490	0.521	0.506
10	0.568	0.666	0.617
12	0.637	0.709	0.673
14	0.768	0.834	0.801

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

ผลการสกัดคลอโรฟิลล์

ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม

OD 730 nm	เจือจาง 2 เท่า	เจือจาง 4 เท่า	เจือจาง 8 เท่า	เจือจาง 16 เท่า	เจือจาง32เท่า
2.867	2.438	2.187	1.699	0.828	0.419

ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นต่างๆของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างกลม

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
665	0.365
665.5	0.365
666	0.366
666.5	0.365
750	0.059

คำนวณค่าคลอโรฟิลล์= $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร}}{0.0844}$

$= \frac{0.366 - 0.059}{0.0844}$

= 3.637 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 32

= 116.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

= 116.38×10^{-3} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ปริมาตร 2 มิลลิลิตรดังนั้นค่าคลอโรฟิลล์จึงเท่ากับ 232.76×10^{-3} ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย

OD 730 นาโนเมตร	เจือจาง 2 เท่า	เจือจาง 4 เท่า	เจือจาง 8 เท่า	เจือจาง 16 เท่า
2.323	1.964	1.365	0.870	0.482

ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นต่างๆของไซยาโนแบคทีเรียรูปร่างเป็นเส้นสาย

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
665	0.187
665.5	0.187
666	0.186
666.5	0.187
750	0.058

คำนวณค่าคลอโรฟิลล์= $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร}}{0.0844}$

$= \frac{0.187 - 0.058}{0.0844}$

= 1.528 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 16

= 24.448 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

= 24.448×10^{-3} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากนำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ดังนั้นค่าคลอโรฟิลล์จึงเท่ากับ 48.896×10^{-3} ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้