สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษายีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นางสาวปารัช ศิริฤดีภรณ์
นางสาวปาริฉัตร สลัดทุกข์
นางสาวันทนีย์ เขตต์กรณ์

วพ.
ว5ว37
2549

เลข...
เลขทะเบียน 72594
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

b 11769837
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of Hydrogenase Gene of Cyanobacteria and Green Algae by Polymerase Chain Reaction

Parach Sirirudeeporn

Parichat Salutthuk

Wanthanee Khetkorn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษายีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ชื่อนักศึกษา นางสาวปารัช ศิริฤดีภรณ์ รหัสนักศึกษา 46050127

นางสาวปาริฉัตร สลัดทุกข์ รหัสนักศึกษา 46050128

นางสาวันทนีย์ เขตต์กรณ์ รหัสนักศึกษา 46050141

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษายีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส
นักศึกษา	นางสาวปารัช ศิริฤดีภรณ์ รหัสนักศึกษา 46050127
	นางสาวปาริฉัตร สลัดทุกข์ รหัสนักศึกษา 46050128
	นางสาววันทนีย์ เขตต์กรณ์ รหัสนักศึกษา 46050141
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนได้เป็นโปรตอน หน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* และเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ หน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxH* โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีนไฮโดรจีเนสในไซโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยศึกษาไซยาโนแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ คือ *Anabaena siamensis, Fischerella muscicola, Hapalosiphon delicatulus, Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 และสาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์ คือ *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522, *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557 โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหาร BG11 และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena siamensis, Fischerella muscicola, Hapalosiphon delicatulus* และพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Anabaena siamensis, Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* ของ *Hapalosiphon delicatulus* มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากการนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Hapalosiphon delicatulus* มีทั้งหมด 906 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำมาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Nostoc* sp. PCC 7422 (80%), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (79%), *Nostoc punctiforme* (79%), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (79%), *Nostoc* sp. PCC 7120 (77%), *Anabaena* sp. (77%), *Anabaena siamensis* TISTR 8012 (77%), *Gloeothece* sp. PCC 6909 (75%), *Lyngbya* sp. PCC 8106 (75%), *Lyngbya aestuarii* (75%) และ *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 (74%)

คำสำคัญ : ยีนไฮโดรจีเนส, ไซยาโนแบคทีเรีย, สาหร่ายสีเขียว, เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project	Study of Hydrogenase Gene of Cyanobacteria and Green Algae by Polymerase Chain Reaction	
Student	Miss Parach Sirirudeeporn	Student ID 46050127
	Miss Parichat Salatthuk	Student ID 46050128
	Miss Wanthanee Khetkorn	Student ID 46050141
Degree	Bachelor of Science	
Major	Biotechnology	
Academic year	2006	
Advisor	Assist. Prof. Dr. Saranya Phunpruch	
Co-advisor	Dr. Suwannee Junyapoon	

Abstract

The hydrogenase enzymes can be divided into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of hydrogen molecule to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of hydrogen molecule to protons. The large subunit of the latter enzyme is encoded by *hoxH*. This special project aims to study hydrogenase gene of cyanobacteria and green algae by polymerase chain reaction technique (PCR). Six strains of cynobacteria (*Anabaena siamensis, Fischerella muscicola, Hapalosiphon delicatulus, Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803) and three strains of green algae (*Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 and *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557) were investigated. Cyanobacteria and green algae were cultivated in BG 11 medium. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform extraction method and PCR products of hydrogenase gene were amplified by polymerase chain reaction. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. It was found that PCR product of uptake hydrogenase gene was found in *Anabaena siamensis, Fischerella muscicola* and *Hapalosiphon delicatulus*. PCR product of reversible hydrogenase gene was found in *Anabaena siamensis, Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. The PCR product of *Hapalosiphon delicatulus* was ligated to pGEM-T Easy vector and the recombinant plasmid was transformed to competent cell *E. coli* DH5α. Transformants were selected. Plasmid DNAs were isolated and detected by using the restriction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

detected by using the restriction enzyme *Eco*RI. A 906 bp of uptake hydrogenase PCR product was sequenced and its amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in Genbank by BLAST server. It was shown that amino acid sequence of *Hapalosiphon delicatulus hupL* showed high similarity to the uptake hydrogenase of *Nostoc* sp. PCC 7422 (80%), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (79%), *Nostoc punctiforme* (79%), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (79%), *Nostoc* sp. PCC 7120 (77%), *Anabaena* sp. (77%), *Anabaena siamensis* TISTR 8012 (77%), *Gloeothece* sp. PCC 6909 (75%), *Lyngbya* sp. PCC 8106 (75%), *Lyngbya aestuarii* (75%) and *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 (74%).

Keywords : hydrogenase gene, cyanobacteria, green algae, polymerase chain reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษร่วม ดร.สุวรรณี จรรยาพูน และคณะกรรมการโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และประสบการณ์ที่เป็นประโยชน์ยิ่งแก่ผู้จัดทำ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ ผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยอำนวยความสะดวก และคอยเอื้อเฟื้อ ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ คุณชุติมา ภาพสิงห์ คุณศรินยา ใจตรง และคุณวิชาณี แบนดีรี ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำเพื่อให้เกิดความถูกต้องในการปฏิบัติงาน ตลอดจนผู้ที่ไม่สามารถกล่าวนามได้หมดไว้ ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนโครงงานพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นางสาวปารัช ศิริฤดีภรณ์
นางสาวปาริฉัตร สลัดทุกข์
นางสาววันทนีย์ เขตต์กรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันมีการใช้ทรัพยากรพลังงานอย่างมากมายในด้านการผลิตและการบริโภคในทุกประเทศทั่วโลกไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ พลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่จำกัดและคาดว่าแหล่งพลังงานดังกล่าวจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก การใช้เชื้อเพลิงเหล่านี้ยังทำให้เกิดผลเสียตามมาคือ ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการเผาผลาญเชื้อเพลิงเหล่านี้นำไปสู่การเกิดมลพิษ ความร้อน ฝนกรด และภาวะเรือนกระจก ฯลฯ ซึ่งเป็นปัญหากระทบโดยตรงต่อมนุษย์ ด้วยเหตุนี้หน่วยงานต่างๆ ทั่วโลกจึงได้มีความพยายามในการค้นหาและศึกษาพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและเพื่อใช้เป็นเป็นพลังงานทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลในอนาคต

แหล่งพลังงานทดแทนทางเลือกหนึ่งสำหรับอนาคตก็คือพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส มีพลังงานสะสม 52,000 บีทียูต่อปอนด์ (British thermal units per pound) เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวดและใช้ในการขับดันยานอวกาศ ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการ steam reforming เพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ในประเทศต่างๆ ได้มีการผลิตรถยนต์ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน อย่างไรก็ตาม วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการนี้ยังคงนำมาจากก๊าซธรรมชาติหรือถ่านหิน ด้วยเหตุนี้นักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต หรือที่เรียกว่า ไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากระบวนการทางเคมี

ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตมีรายงานพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ได้ ดังนี้

1. สาหร่าย (algae)

สาหร่ายสีเขียวบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะการปรับตัวที่มีแสงและขาดออกซิเจนได้ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยสาหร่ายสีเขียวจึงจัดเป็น photo-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydrogen production สาหร่ายสีเขียวที่มีคุณสมบัติในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ได้แก่ *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. เป็นต้น

2. ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็น oxygenic phototrophic prokaryote ที่ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ มีกระบวนการสังเคราะห์แสง และชนิดของคลอโรฟิลล์เหมือนสาหร่ายและพืชสีเขียว กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนคล้ายกับสาหร่ายแต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดร-เจนผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) เช่น *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Aphanocapsa* sp., *Calothrix* sp., *Mastigocladus* sp. เป็นต้น

3. แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสง (phototrophic bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้จัดเป็น anoxygenic phototrophic bacteria สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) non-sulfur purple bacteria ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. (2) sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceaes* sp. (3) green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. โดยการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ หรือ ไทโอซัลเฟต เป็นสารให้อิเล็กตรอน

ในสิ่งมีชีวิตการผลิตไฮโดรเจนเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและอิเล็กตรอน การสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ดังสมการ

$$H_2 \xrightleftharpoons{\text{hydrogenase}} 2H^+ + 2e^-$$

Stepheson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ “ไฮโดรจีเนส” ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมทธิลีนบลู (methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์นี้พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้นิกเกิลในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจำแนกได้ 2 ชนิดตามทิศทางการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

1. unidirectional หรือ uptake hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. bidirectional หรือ reversible hydrogenase เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดร-เจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน

ในจำนวนสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาข้างต้น ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมีข้อได้เปรียบในการผลิตไบโอไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากเป็นการนำเอาพลังงานแสงอาทิตย์ที่มีอยู่อย่างไม่จำกัดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ผลพลอยได้ในวิถีเป็นพลังงานไฮโดรเจน นอกจากนี้ก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวยังช่วยลดมลพิษทางอากาศอีกด้วย แบคทีเรียก็สามารถผลิตไฮโดรเจนได้เช่นกัน แต่จำเป็นต้องมีการเติมแหล่งคาร์บอนหรือสารอาหารเพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโต

ในไซยาโนแบคทีเรียจะพบเอนไซม์ไฮโดรจีเนส 2 ชนิด ชนิดแรกคือ uptake hydrogenase ซึ่งพบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst) และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ไม่ตรึงไนโตรเจน *Anacystis nidulans* จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน ไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) เอนไซม์ uptake hydrogenase จะเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเป็นโปรตอน ดังสมการ

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

$$H_2 \xrightarrow{\text{uptake hydrogenase}} 2H^+ + 2e^-$$

Carrasco และคณะ (1995) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์นี้เป็นครั้งแรก และอธิบายการจัดเรียงดีเอ็นเอของหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) ของยีน uptake hydrogenase (*hupL*) ในระยะที่เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ใน *Anabaena* สายพันธุ์ PCC 7120 และใน *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 (Oxefelt และคณะ, 1998) ส่วนเอนไซม์ชนิดที่สอง reversible hydrogenase พบทั่วไปในไซยาโนแบคทีเรีย จนกระทั่งถึงปัจจุบันมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Anacystis nidulans* (Schmitz และคณะ, 1995; Boison และคณะ, 1996) และ *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (Appel และ Schulz, 1996)

สำหรับสาหร่ายสีเขียวภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสง การผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นร่วมกับการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์จาก NADH ไปสู่เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) และเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย และสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

1.2.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีรายงานในธนาคารยีน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร BG11 เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงและนำไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR; polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสแต่ละชนิดและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบค-ทีเรียที่ไม่มีรายงานในธนาคารยีน

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.4.1 ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว BG11 ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที และให้แสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงต่อวัน

1.4.2 ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการแยกเชื้อลงบนอาหารแข็ง

1.4.3 นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมาเพาะเลี้ยง เก็บเซลล์และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction

1.4.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสที่ออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์

1.4.5 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิเคราะห์ในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

1.4.6 เชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy

1.4.7 ทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5α และตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ X-gal และ IPTG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.8 นำทรานสฟอร์มแมนท์ที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

1.4.9 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบชนิดของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่นำมาศึกษา

1.5.2 ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

1.5.3 เพื่อเป็นแนวทางเริ่มต้นในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว เพื่อนำไปใช้ในการผลิตพลังงานไฮโดรเจนจากวิธีการสังเคราะห์ด้วยแสง

1.5.4 ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของพลังงานไฮโดรเจน

พลังงานมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ นอกจากจะใช้เพื่อให้เกิดความสะดวกสบายแล้ว พลังงานส่วนใหญ่ยังถูกนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม การคมนาคมและการผลิตกระแสไฟฟ้า ไม่ว่าจะเป็นพลังงานจากน้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ซึ่งพลังงานเหล่านี้เป็นพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด และคาดว่ากำลังจะหมดไปในระยะเวลาอีกไม่นานนัก การเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของพลังงานเหล่านี้ก่อให้เกิดมลพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ก่อให้เกิดสภาวะเรือนกระจก ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เถ้าและฝุ่นละออง เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีปริมาณพลังงานสำรองซึ่งเป็นทรัพยากรเชื้อเพลิงภายในประเทศ ดังนี้ปริมาณน้ำมัน 0.714 พันล้านบาร์เรล สามารถใช้ได้อีกประมาณ 20 ปี ปริมาณก๊าซธรรมชาติ 33 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต สามารถใช้ได้อีกประมาณ 30 ปี และปริมาณถ่านหิน 0.984 พันล้านตัน ซึ่งใช้ได้อีกประมาณ 60 ปี ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการนำเข้าสินค้าทั้งหมด โดยพลังงานส่วนใหญ่ที่นำเข้าคือ น้ำมันเชื้อเพลิง (มนตรี, 2542) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เพื่อลดอัตราการนำเข้า และเป็นพลังงานที่ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น พลังงานลม พลังงานความร้อนใต้พิภพ น้ำพุร้อน พลังงานในมหาสมุทร พลังงานคลื่นทะเล รวมถึงพลังงานจากก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งเป็นพลังงานที่ได้รับความสนในอย่างมากในปัจจุบัน

ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและไม่มีรส เมื่อทำการเผาผลาญด้วยออกซิเจนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและความร้อน และเมื่อทำการเผาผลาญในอากาศจะผลิตออกไซด์ของไนโตรเจน ซึ่งก่อให้เกิดมลพิษน้อยกว่าเมื่อใช้พลังงานอื่นๆ

ปัจจุบันมีการใช้พลังงานจากก๊าซไฮโดรเจนในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนจรวด และใช้ในการขับดันยานอวกาศ ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมและจากกระบวนการแยกสลายด้วยไฟฟ้า (electrolysis process) นอกจากนี้ในหลายประเทศยังมีการผลิตรถยนต์ที่ใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการขับเคลื่อน อย่างไรก็ตามการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีดังกล่าวยังมีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นนักวิจัยทั่วโลกจึงหันมาสนใจศึกษาพลังงานไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิต หรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

ก๊าซไฮโดรเจนจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาด ไม่ก่อมลพิษแก่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ในปัจจุบันกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี บางวิธีก็สามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมและบางวิธีก็อยู่ในขั้นตอนของการวิจัยและพัฒนา ดังนี้

2.2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล

เป็นกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากก๊าซธรรมชาติซึ่งจัดเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมปิโตรเลียม โดยกระบวนการสตีมรีฟอร์มมิง (steam reforming) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างสารไฮโดรคาร์บอนกับน้ำในรูปไอน้ำ อาศัยพลังงานความร้อนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการทางอุตสาหกรรมที่นิยมใช้ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เรียกว่า coal gasification (รูปที่ 2.1)

ข้อเสียของกระบวนการดังกล่าว คือ การก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากสารตกค้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ คาร์บอนไดออกไซด์และซัลเฟอร์ เป็นต้น

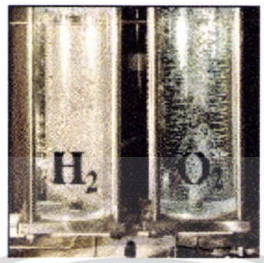
รูปที่ 2.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล
ที่มา : http://www.rmi.org/sitepages/pid557.php

2.2.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีการแยกโมเลกุลของน้ำด้วยกระแสไฟฟ้า

เป็นวิธีการในการใช้กระแสไฟฟ้าแยกโมเลกุลของน้ำ (water electrolysis) โดยตรงทำให้ได้ไฮโดรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอม ทั้งนี้อาศัยอิเล็กโทรด (electrode) 2 ขั้วที่ตรงข้ามกัน คือ อิเล็กโทรดขั้วบวก (positive electrode) และอิเล็กโทรดขั้วลบ (negative electrode) วิธีการเตรียมคือ จุ่มอิเล็กโทรดลงในน้ำที่ทำให้มีความเป็นตัวนำมากขึ้นโดยการเติมสารพวกอิเล็กโตรไลท์ (electrolyte) เช่น กรดซัลฟูริค (H_2SO_4) หรือ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลงไปโดยไฮโดรเจนอะตอมจะไปเกาะที่อิเล็กโทรดขั้วลบและออกซิเจนอะตอมจะไปเกาะอิเล็กโทรดขั้วบวก วิธีนี้ต้องการกระแสไฟฟ้าถึง 90 กิโลวัตต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ถึง 1,000 ลูกบาศก์ฟุตและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง (รูปที่ 2.2) ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ ต้องการกระแสไฟฟ้าจำนวนมากและมีการสูญเสียพลังงานไฟฟ้าไปในแต่ละขั้นตอนของการแยกสลายด้วยน้ำ และจะต้องทำในสภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า 2,500 องศาเซลเซียส เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำให้ได้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม



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

2.2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีเทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry)

เป็นกระบวนการที่มีการพัฒนาการผลิตโดยการใช้สารประกอบเรดโบรไมด์ในกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้โดยอาศัยความร้อนสูงที่อุณหภูมิประมาณ 200-780 องศาเซลเซียส ขั้นตอนในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนดังกล่าวเรียกว่า เทอร์โมเคมิสทรี (thermochemistry) ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถใช้ความร้อนในช่วงที่ถังปฏิกรณ์นิวเคลียร์ผลิตพลังงานนิวเคลียร์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ พลังงานทั้งหมดถูกนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และผลผลิตที่ได้สามารถแยกออกได้ง่าย แต่ข้อเสียก็คือ ปัญหามลพิษจากการใช้สารประกอบโลหะหนักอันได้แก่ ปรอท และโบรไมด์

2.2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (biohydrogen)

นอกจากนี้วิธีการข้างต้นที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยอาศัยความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนที่เรียกว่า ไบโอ-ไฮโดรเจน (biohydrogen) จุลินทรีย์หลายชนิดมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไฮโดรเจนได้เป็นโปรตอนและอิเล็กตรอน หรือรีดิวซ์โปรตอนและปลดปล่อยไฮโดรเจน จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนสู่บรรยากาศ ประมาณการกันว่ามีก๊าซไฮโดรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศน์ปีละ 200 ล้านตัน ข้อดีของกระบวนการนี้คือ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้เป็นเชื้อเพลิงที่สะอาด (clean fuel) ไม่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.3.1 กลุ่มโฟโตโทรฟิคยูคาริโอต (phototrophic eukaryote) ได้แก่ สาหร่าย (algae)

สาหร่ายบางชนิดมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ตารางที่ 2.1) โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อมีการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไม่ออกซิเจน ซึ่งระยะเวลาในการปรับตัวนั้นจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 30 นาทีจนถึง 4 ชั่วโมง ซึ่งในระหว่างที่มีการปรับตัวนั้นจะมีการกระตุ้นหรือสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านจากเฟอร์รีดอกซิน (ferredoxin) เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นก๊าซไฮโดรเจนโดยปฏิกิริยา ดังกล่าวถูกเร่งการทำงานด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

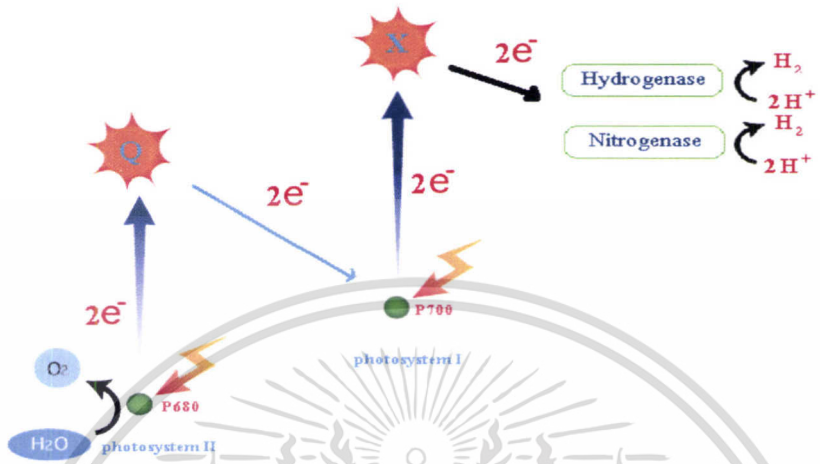
ตารางที่ 2.1 สาหร่ายที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

สาหร่ายสีเขียว	สาหร่ายสีแดง
Ankistrodesmus sp.	*Ceremium* sp.
Chlamydononas sp.	*Chrondrus* sp.
Chlorella sp.	*Corallina* sp.
Codium sp.	*Callithamnion* sp.
Coelastrum sp.	*Porphyridium* sp.
Scenedesmus sp.	

ภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการกระตุ้นให้มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อความเข้มแสงเพิ่มสูงขึ้น กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจะถูกยับยั้งด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงที่มีการผลิตก๊าซออกซิเจน โดยออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของสาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรีย 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) ตัวพาอิเล็กตรอนจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับเฟอร์รีดอกซิน จากนั้นจะถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่เอนไซม์เฟอริดีอกซิน ออกซิโดรีดักเทส (ferredoxin oxidoreductase) ในกระบวนการตรึงหรือให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แก่เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase) และไทโอซัลโฟเนตรีดักเทส (thiosulfonate reductase) สำหรับปฏิกิริยาไนเทรตและซัลเฟตรีดักชัน ส่วนก๊าซไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์เฟอร์ริดอกซินออกซิโดรีดักเทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นได้มาจากกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในระบบแสงที่ 2 (photosystem II) และการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตที่สะสมภายในเซลล์โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะเข้าสู่ระบบแสงที่ 1 (photosystem I) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยสาหร่ายสีเขียวและไซยาโนแบคทีเรีย (เอนไซม์ไนโตรจีเนสมีเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรีย)

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

จากรายงานของ Graffron และ Rubin (1942) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวที่ไม่เพียงแต่สามารถผลิตไฮโดรเจนโมเลกุลได้ในสภาวะที่มีแสงเท่านั้น แต่ยังสามารถผลิตไฮโดรเจนโมเลกุลได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีออกซิเจนอีกด้วย โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมเลกุลไฮโดรเจนคือเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งปฏิกิริยาการเร่งการผลิตไฮโดรเจนโมเลกุลโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส แสดงดังสมการ 2.1

$$2H^{+} + 2X_{reduced} \longrightarrow H_2 + 2X_{oxidized} \qquad (2.1)$$

ตัวพาอิเล็กตรอนซึ่งคือเฟอริดอกซินถูกรีดิวซ์ด้วยโมเลกุลของน้ำในกระบวนสังเคราะห์ด้วยแสง อย่างไรก็ตามยังพบว่าตัวให้อิเล็กตรอนสำหรับเอนไซม์ไฮโดรจีเนสไม่เพียงได้มาจากอิเล็กตรอนที่ได้จากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำเท่านั้น แต่ยังได้มาจากการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่สะสมในเซลล์ เช่น แป้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กลุ่มโฟโตโทรฟิคโปรคาริโอต (phototrophic prokaryote) ได้แก่

2.3.2.1 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงและได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 2.2 และตารางที่ 2.3 ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงโดยมีออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ (oxygenic phototrophic prokaryote) ประกอบด้วยระบบแสง 2 ระบบ และมีกระบวนการสังเคราะห์แสงและชนิดของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) เหมือนสาหร่ายและพืชสีเขียว

ตารางที่ 2.2 ไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

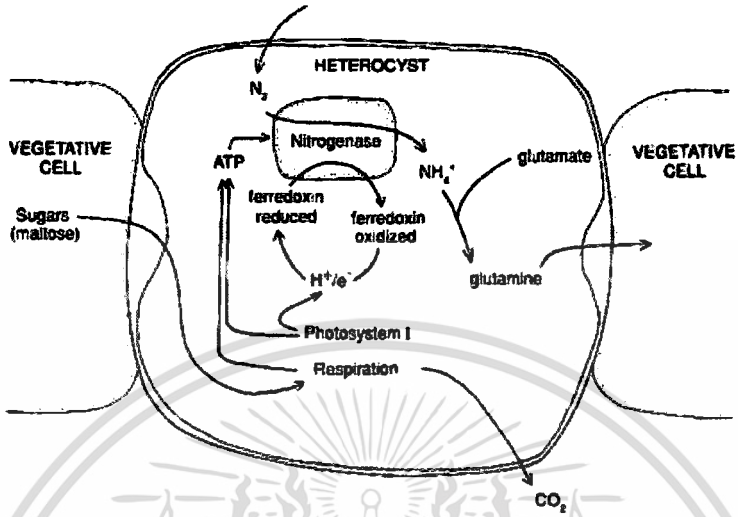
ไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน	
Anabaena sp.	*Nostoc* sp.
Aphanocapsa sp.	*Oscillatoria* sp.
Gloeobacter sp.	*Spirulina* sp.
Gloeocapsa sp.	*Scygonema* sp.
Lyngbya sp	*Synechococcus* sp.
Mastigocladus sp.	*Synechocystis* sp.
Microcystis sp.	*Tolypothrix* sp.

กระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียคล้ายกับสาหร่าย แต่ไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนผ่านทางกระบวนการตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) ของไซยาโนแบคทีเรียนั้นไม่มีระบบแสง แต่สามารถตรึงไนโตรเจนผ่านทางเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้และสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จะมีการตรึงโมเลกุลไนโตรเจนพร้อมกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการผลิตกลูตามีน โดยกลูตามีนที่ผลิตได้จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเซลล์ปกติ (รูปที่ 2.4) เนื่องจากเฮเทอโรซิสต์นั้นไม่มีระบบแสง จึงไม่มีกระบวนการแตกตัวของโมเลกุลน้ำ ดังนั้นจึงไม่มีการสร้างก๊าซออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยเฮเทอโรซิสต์จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส ซึ่งจะช่วยป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยการรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนไปเป็นน้ำ

นอกจากนี้กลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสงจะมีการผลิตก๊าซออกซิเจนและมีการสะสมพอลิแซคคาไรด์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงและไม่มีก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจน เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกสร้างขึ้นและกระตุ้นให้ทำงาน และมีการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์เพื่อให้ได้อิเล็กตรอนสำหรับกระบวนการตรึงไนโตรเจนและกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจน



รูปที่ 2.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและการตรึงไนโตรเจนในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ของไซยาโนแบคทีเรีย

ที่มา : http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%205%20%20%20hydrogen%20production

ตารางที่ 2.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยไซยาโนแบคทีเรีย (Fernando และคณะ, 2002)

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้
Heterocystous nitrogen fixing	
Nostoc linkia	22 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrica	1.91 ml / mg dry weight / h
Anabaena cylindrica	1 µmol / mg dry weight / h
Non-heterocystous nitrogen fixing	
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 / 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแต่ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียที่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) non-sulfur purple ได้แก่ *Athiorhodaceae* sp. และ *Rhodospirillaceae* sp. 2) sulfur purple bacteria ได้แก่ *Chromatiaceae* sp. และ *Thiorhodaceae* sp. และ 3) green sulfur bacteria ได้แก่ *Chlorobiaceae* sp. โดยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเหล่านี้มีรงควัตถุที่ต่างไปจากไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชสีเขียว คือมีรงควัตถุแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (bacteriochlorophyll) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide) ซัลเฟอร์ (sulfur) ไทโอซัลเฟต (thiosulfate) สารประกอบอินทรีย์ (organic compound) หรือไฮโดรเจนโมเลกุลเป็นสารให้อิเล็กตรอน

2.4 ลักษณะสำคัญของไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียจัดเป็นโปรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย คุณสมบัติที่สำคัญของไซยาโนแบคทีเรียคือ มีรงควัตถุที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจนซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในแบคทีเรียทั่วไป (ลัดดา, 2542)

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ 5 ประการ คือ

1. มีสารสีสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic pigments) ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน

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

3. ไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement)

4. ผลผลิตจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นสารประเภทแป้งชนิดหนึ่งคือ แป้งไซยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเรียกว่าไซยาโนไฟซินแกรนูล (cyanophycin granule) แป้งไซยาโนไฟเซียนนี้แตกต่างจากแป้งชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะได้สีน้ำตาลปนแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงิน

5. จัดเป็นโปรคาริโอต แตกต่างจากพืชชั้นสูงจำพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือสารสีไม่ได้อยู่ในพลาสติดแต่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 อนุกรมวิธานของไซยาโนแบคทีเรีย (ลัดดา, 2542)

นักแบคทีเรียวิทยาได้จัดจำแนกไซยาโนแบคทีเรีย โดยใช้หลักของ International Code of Nomenclature of Bacteria ดังนี้

Kingdom	:	Prokaryotae
Division	:	Gracilicutes
Class	:	Photobacteria
Subclass	:	Oxyphotobacteria
Order	:	Cyanobacteriales

2.5.1 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเซลล์เดียว (unicellular cyanobacteria)

มักอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กันที่เรียกว่า binary fission หรือโดยการแตกหน่อ เช่น *Chamaesiphon* sp. มีความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง มีการตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ศึกษาในโครงงานพิเศษที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Gloeocapsa* sp., *Synechococcus* sp. , *Synechocystis* sp.

2.5.1.1 *Synechococcus* sp.

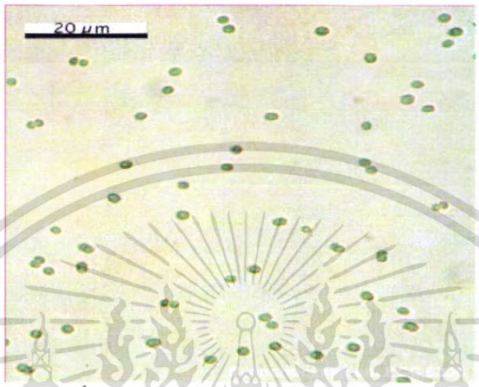
จัดอยู่ใน Order Chroococcales และ Family Chroococcaceae มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงแบบมีออกซิเจนได้ เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ เอ และยังมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ ลักษณะของ *Synechococcus* sp.แสดงดังรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.5 ลักษณะของ *Synechococcus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 *Synechocystis* sp.

จัดอยู่ใน Order Chroococcales และ Family Chroococcaceae มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ขยายพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน มีความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยแสง แต่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ ลักษณะของ *Synechocystis* sp. แสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 26 ลักษณะของ *Synechocystis* sp.

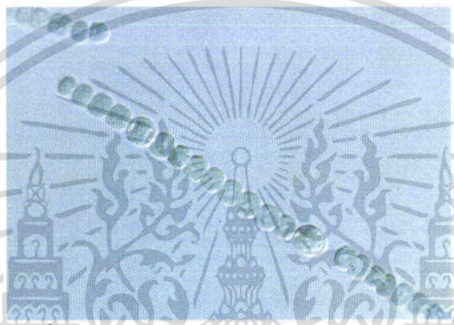
2.5.2 ไซยาโนแบคทีเรียชนิดเส้นสายที่มีเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst filamentous cyanobacteria)

มีการเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ตรงกลางเซลล์โดยเจริญไปในแนวระนาบ สายเซลล์มีเพียงสายเดียว ไม่สร้างกิ่งแขนง สามารถสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษที่เรียกว่า เฮเทอโรซิสต์ ซึ่งมีความสามารถตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ไม่มีแสงและออกซิเจนได้ บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ศึกษาในโครงงานพิเศษที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calotrix* sp. และ *Mastigocladus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.1 *Anabaena siamensis*

จัดอยู่ใน Order Nostocales และ Family Nostocaceae ภายในเส้นสายจะประกอบด้วยเฮเทอโรซิสต์และสปอร์ มีทรัยโคมชนิดเดี่ยวๆ รูปร่างกลมคล้ายลูกปัด อาจมีมีชีทบางๆ หุ้ม เส้นสายอาจตรงหรือโค้งเล็กน้อยหรือม้วนเป็นวงบิดเกลียว บางชนิดเซลล์มีรูปร่างแบบถังเบียร์ กลม หรือรูปสีเหลี่ยม มีเฮเทอโรซิสต์อยู่ระหว่างเซลล์ปกติ สืบพันธุ์โดยการสร้างอะคินีตอยู่ภายในเส้นสาย *Anabaena* มักพบในน้ำจืด อาจทำให้เกิดการบลูมเป็นครั้งคราว บางชนิดผลิตสารพิษที่เรียกว่า แอนาทอกซิน (anatoxin) ซึ่งเป็นพิษประเภท Neurotoxin ลักษณะของ *Anabaena* แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ลักษณะของ *Anabaena siamensis*

2.5.2.2 *Nostoc* sp.

จัดอยู่ใน Order Nostocales และ Family Nostocaceae ลักษณะทรัยโคมงอบิดเป็นเกลียว หรือรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ภายในชีทหนาและคงตัว แต่บางชนิดชีทจะยืดหยุ่นและเหนียว กลุ่มเซลล์มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก อาจมีลักษณะเป็นก้อนกลมหรือเป็นเส้น เซลล์มีรูปร่างกลม รูปถังเบียร์ รูปทรงกระบอก มีเฮเทอโรซิสต์อยู่ระหว่างกลาง และน้อยมากที่พบอยู่ที่ปลายทรัยโคม มีอะคินีตอยู่ใกล้กับเฮเทอโรซิสต์ ลักษณะของ *Nostoc* sp. แสดงดังรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.8 ลักษณะของ *Nostoc* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

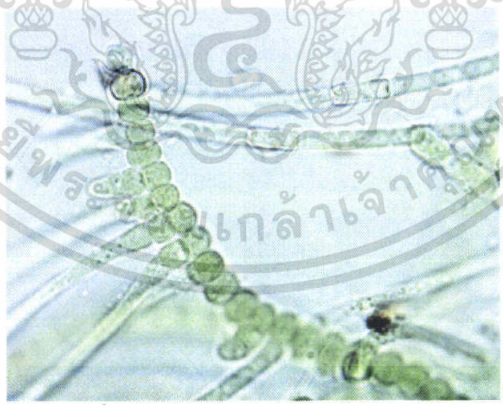
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.3 ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายและมีการแตกกิ่งแขนงแท้ (true branching filamentous cyanobacteria)

ไซยาโนแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลล์ตรงกลางสายเซลล์ ซึ่งเจริญได้หลายระบบในทรัยโคมหลายแถว มีการแตกกิ่งแขนงแท้และขยายพันธุ์โดยการขาดท่อน บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ โดยไซยาโนแบคทีเรียที่ได้ศึกษาในโครงงานพิเศษที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Fischerella* sp. และ *Hapalosiphon* sp.

2.5.3.1 *Fischerella* sp.

จัดอยู่ใน Order Hormogonales และ Family Stigonemataceae เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นเส้นสายและแตกกิ่ง มีรูปร่างค่อนข้างที่จะหลากหลาย โดยส่วนที่เป็นสายหลักจะเลื้อยไปกับสิ่งที่มันเกาะอยู่ และส่วนที่เป็นแขนงจะตั้งตรงออกมา ในส่วนของเส้นหลักนั้นเซลล์มักจะเรียงต่อกันหลายเซลล์ แต่ในเส้นแขนงมักจะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ รูปร่างของเซลล์เป็นแบบถังเบียร์ บางครั้งจะมีเจลอยู่ภายใน ทรัยโคมจะหนาและมีชีทที่มีสีหุ้ม และล้อมรอบด้วยเซลล์ที่เป็นทรงกระบอกซึ่งมีเมือกเหนียวใส ไม่มีสีหุ้มอยู่ ในเซลล์จะประกอบด้วย กรานูลาร์ที่มีไทลาคอยด์ผิวขรุขระกระจายอยู่โดยทั่ว เซลล์เฮเทอร์โรซิสต์มักอยู่ระหว่างเซลล์ซึ่งมีรูปร่างหลากหลายทั้งแบบทรงกลมเหมือนกับส่วนของทรัยโคม ไปจนถึงรูปทรงกระบอกเหมือนแขนงที่แตกออกมา บางชนิดเท่านั้นที่จะมีอะคินีตโดยจะอยู่บริเวณทรัยโคม ลักษณะของ *Fischerella* sp. แสดงดังรูปที่ 2.9



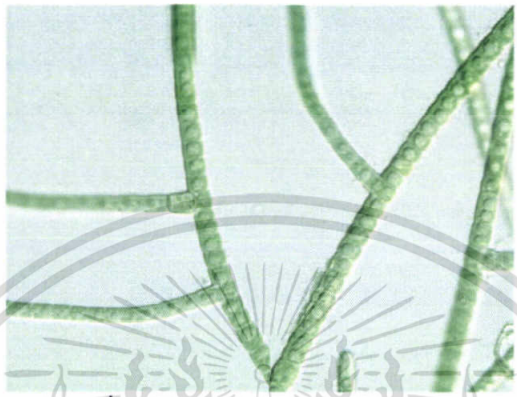
รูปที่ 2.9 ลักษณะ *Fischerella* sp.

2.5.3.2 *Hapalosiphon delicatulus*

จัดอยู่ใน Order Stigonematales เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกระบอกสั้นมาเรียงต่อกันเป็นเส้นสายที่แตกแขนงได้หลายแบบ และหลายทิศทาง มีทั้งแขนงแท้และแขนงเทียมซึ่งจะมี

72594
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีทหุ้มอยู่ เซลล์จะเรียงต่อกันเพียงชั้นเดียวและแตกแขนงอย่างต่อเนื่อง แขนงที่แตกออกจะเกิดในแนวตั้งฉากกับสายเซลล์หลัก สร้างเฮเทอโรซิสต์อยู่ภายในสายเซลล์หลักและแขนง อาจมีตุ่ม (polar notch) ถึง 3 อัน ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ ลักษณะของ *Hapalosiphon delicatulus* แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ลักษณะ *Hapalosiphon* sp.

2.6 ลักษณะสำคัญของสาหร่ายสีเขียว

สาหร่ายสีเขียวจัดอยู่ใน Division Chlorophyta ซึ่งเป็นสาหร่ายกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีสีเขียวเหมือนหญ้า พบทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย น้ำเค็ม บนดิน ต้นไม้ และสิ่งยึดเกาะต่างๆ มีขนาดตั้งแต่เล็กมากประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดี่ยวมองด้วยหาเปล่าไม่เห็น ไปจนถึงขนาดใหญ่เห็นเป็นทัลลัส

สาหร่ายสีเขียวมีลักษณะทั่วไปที่สำคัญ 7 ประการคือ

1. รงควัตถุสังเคราะห์แสงอยู่ในคลอโรพลาสต์ มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับที่พบในพืชชั้นสูง ทั่วไป คือ มีคลอโรฟิลล์-เอ คลอโรฟิลล์-บี แคโรทีน และแซนโทฟิลล์ คลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียวมีลักษณะต่างๆ กัน เช่น รูปถ้วย (cup-shaped) แฉกรูปดาว (stellate) และเป็นแถบข้างเซลล์ (parietal) ซึ่งจำนวนของคลอโรพลาสต์อาจมีเพียงหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งก็ได้
2. มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส
3. การสืบพันธุ์มีทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศ
4. ผนังเซลล์ โดยทั่วไปมี 2 ชั้น ผนังชั้นในเป็นพวกเซลลูโลส ส่วนผนังชั้นนอกเป็นพวกเพกติน สาหร่ายสีเขียวบางสกุลนั้นบริเวณภายนอกอาจมีสารพวกไคติน (chitin) หินปูน หรือซิลิกา (silica) หุ้มอีกชิ้นหนึ่งซึ่งทำให้แข็ง เวลาจับจะรู้สึกสาก หรือกระด้างมือ บางสกุลสามารถผลิตเมือกออกมาหุ้มผนังเซลล์ได้ เวลาจับจึงรู้สึกลื่นมือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหารสะสม สาหร่ายสีเขียวส่วนใหญ่จะสะสมอาหารไว้ที่ไพรีนอยด์ ในรูปของแป้งแต่บางชนิดที่ไม่มีไพรีนอยด์จะสะสมอาหารไว้ในรูปของน้ำมัน (oil)

6. สาหร่ายสีเขียวพวกที่มีการเคลื่อนที่ได้ มักพบว่ามีอายสปอต (eye spot)

7. รูปร่างของสาหร่ายสีเขียวมีหลายแบบด้วยกัน มีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นกลุ่มเซลล์ เป็นเส้นสาย เป็นหลอดหรือท่อ และเป็นทัลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchymatous cell)

2.7 อนุกรมวิธานของสาหร่ายสีเขียว (ลัดดา, 2542)

นักแบคทีเรียวิทยาได้จัดจำแนกสาหร่ายสีเขียว โดยใช้หลักของ International Code of Nomenclature of Bacteria ดังนี้

Kingdom : Plantae

Division : Chlorophyta

Class : Chlorophyceae

ตัวอย่างของสาหร่ายสีเขียวที่สามารผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ เช่น *Ankistrodesmus* sp., *Chlorella* sp. และ *Scenedesmus* sp.

2.7.1 *Ankistrodesmus* sp.

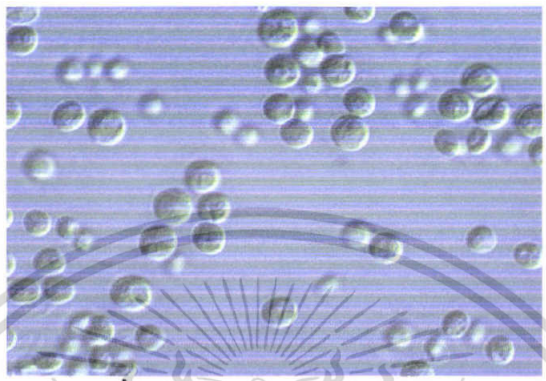
จัดอยู่ใน Order Sphaeropleales เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่มอย่างหลวมๆ มีจำนวนเซลล์ในกลุ่มไม่แน่นอน เซลล์มีลักษณะยาว ปลายสองข้างเรียวแหลม เซลล์อาจจะตรง โค้งงอ หรืออาจบิดเกลียวได้ ผนังเซลล์บาง คลอโรพลาสต์เป็นแถบข้างเซลล์ บางครั้งพบไพรีนอยด์ (pyrenoid) สามารถพบได้ทั้งในดินและในน้ำ ลักษณะของ *Ankistrodesmus* sp. แสดงดังรูปที่ 2.11

รูปที่ 2.11 ลักษณะของ *Ankistrodesmus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 *Chlorella* sp.

จัดอยู่ใน Order Chlorococcales เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวที่มีขนาดเล็ก รูปร่างกลมหรือรี คลอโรพลาสต์เป็นรูปรูปถ้วยหรือเป็นแถบอยู่ข้างเซลล์ ไม่พบไพรีนอยด์ ผนังเซลล์บาง พบในน้ำจืดและน้ำเค็ม อยู่อย่างอิสระ บางชนิดอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น โปรโตซัว ฟองน้ำ ไฮดรา เป็นต้น ลักษณะของ *Chlorella* sp. แสดงดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ลักษณะของ *Chlorella* sp.

2.7.3 *Scenedesmus* sp.

จัดอยู่ใน Order Chlorococcales และ Family Scenedesmacaca เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ซีโนเบียม โดยเอาผนังด้านยาวของเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นแถว แต่ละกลุ่มจะมีจำนวนเซลล์เป็นทวีคูณของ 2 เซลล์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปไข่ รูปกระสวย โค้งงอ เป็นต้น ผังเซลล์มีทั้งลักษณะเรียบหรือขรุขระ บางชนิดเซลล์ที่อยู่ริมสุดอาจมีหนามยื่นยาวออกมา บางชนิดเป็นหนามสั้นๆ คลอโรพลาสต์เป็นแถบตามความยาวของเซลล์ มีไพรีนอยด์ 1 เม็ด และมีนิวเคลียสเพียง 1 อัน ลักษณะของ *Scenedesmus* sp. แสดงดังรูปที่ 2.13

รูปที่ 2.13 ลักษณะ *Scenedesmus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogenase : acceptor oxidoreductase, EC 1.12.1.2, 1.12.2.1 และ 1.18.99) เป็นเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนจากปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนและสลายไฮโดรเจนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรเจน ปฏิกิริยาที่ผันกลับของเอนไซม์แสดงดังสมการ 2.2

$$H_2 \xrightleftharpoons{\text{Hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad (2.2)$$

Stephenson และ Stickland (1931) บัญญัติศัพท์ hydrogenase ขึ้นเป็นครั้งแรกหลังการค้นพบไฮโดรเจนในแบคทีเรียที่ใช้เมธิลีนบลู (Methylene blue) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เอนไซม์นี้พบกระจายทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งส่วนใหญ่จะไวต่อออกซิเจนและใช้นิกเกิลในการเร่งปฏิกิริยา ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้ตามปัจจัยในการพิจารณา ดังนี้

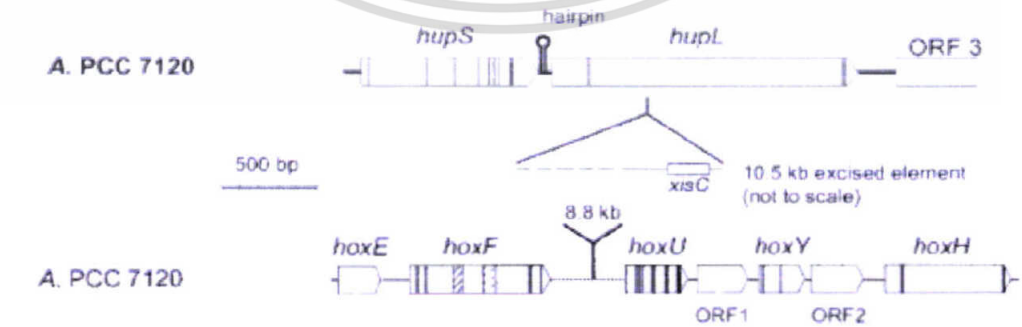
2.8.1 การจัดจำแนกเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามทิศทางของการเกิดปฏิกิริยา

2.8.1.1 unidirectional หรือ uptake hydrogenase

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup* (*hup* มาจาก hydrogen uptake) ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน คือ ยีน *hupL* และยีน *hupS*

2.8.1.2 bidirectional หรือ reversible hydrogenase

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ได้จากการถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hox* (*hox* มาจาก hydrogen oxidation) ซึ่งประกอบด้วยยีนหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย เช่นแผนที่ยีน *hup* และยีน *hox* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 แผนที่ยีน *hup* และยีน *hox* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tamagnini และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 การจัดจำแนกเอนไซม์ไฮโดรจีเนสตามองค์ประกอบของโลหะที่ศูนย์กลางเร่งปฏิกิริยา

2.8.2.1 NiFe–hydrogenase ประกอบด้วยนิกเกิล และกลุ่มเหล็กและซัลเฟอร์ (Fe-S cluster) ที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.8.2.2 Fe-hydrogenase ประกอบด้วยกลุ่มเหล็กที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.8.2.3 Metal-free hydrogenase ซึ่งไม่พบโลหะใดที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์

2.9 เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า membrane-bound hydrogenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบในไซโตพลาสมิคเมมเบรน (cytoplasmic membrane) หรือไทลาคอยด์เมมเบรน (thylakiod membrane) ของเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ดังสมการ 2.3

$$H_2 \xrightarrow{\text{uptake hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad (2.3)$$

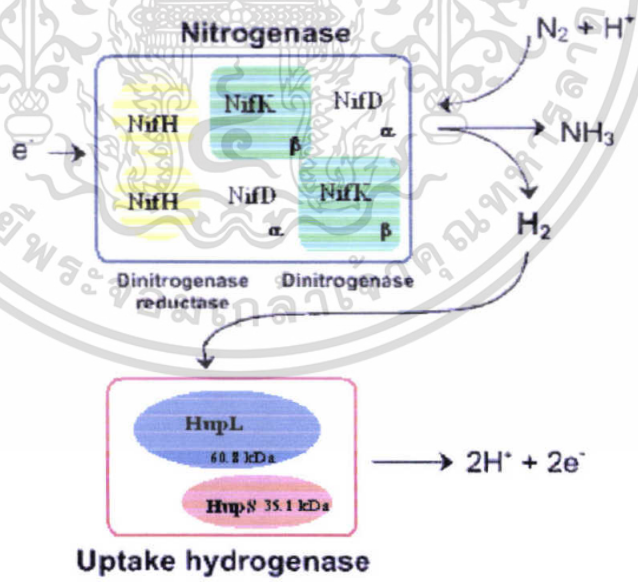
เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้รับความสนใจศึกษาในแบคทีเรียหลายชนิดได้แก่ *Azotobacter* sp. , *Rhizobium* sp. เป็นต้น โดยพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความไวต่อออกซิเจน นอกจากมีการค้นพบในแบคทีเรียแล้ว สามารถพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ทุกชนิด (Houchins, 1984) รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียวที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* sp. PCC 6301 (*Anacystis nidulans*)

เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสมีหน้าที่หลักในการสลายไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์จากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสายและสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้ จึงได้รับความสนใจนำมาศึกษาเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส โดยสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทั้งในเฮเทอโรซิสต์ และในเซลล์ปกติ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความถี่ในการเกิดเฮเทอโรซิสต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าปัจจัยภายนอกได้แก่ แสง นิกเกิล ไฮโดรเจน และสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลต่อปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจน (Oxelfelt และคณะ, 1995) โดยมีการศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศปกติกับสภาวะอากาศที่มีการเติมไฮโดรเจน 4 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีไฮโดรเจนในอากาศจะมีสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่าเชื้อที่เลี้ยงภายใต้สภาวะอากาศปกติ ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena variabilis* ATCC 29413 และได้มีการศึกษาพบว่าการเติมไฮโดรเจนและสารอินทรีย์คาร์บอนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายไฮโดรเจนภายในเซลล์ปกติที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ และจากงานวิจัยที่ศึกษาผลของนิกเกิลต่อการสลายไฮโดรเจนใน *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F พบว่าการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงไปในอาหาร ซึ่งนอกเหนือจาก *Anabaena* สายพันธุ์ CA และ 1F แล้วยังมีรายงานอื่นที่ยืนยันว่าไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ อีกหลายสายพันธุ์ที่กิจกรรมของการสลายไฮโดรเจนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของนิกเกิลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

ในไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสจัดเป็นไดเมอริคเอนไซม์ (dimeric enzyme) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีน 2 หน่วยที่มีขนาดต่างกันมาทำงานร่วมกัน (รูปที่ 2.15) โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) หรือ HupL มีขนาดประมาณ 60.8 กิโลดาลตันและถอดรหัสมาจากยีน *hupL* ส่วนโปรตีนหน่วยย่อยเล็ก (small subunit) หรือ HupS มีขนาดประมาณ 35 กิโลดาลตัน และถอดรหัสมาจากยีน *hupS* (รูปที่ 2.15) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดของอัพเทคไฮโดรจีเนสในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เป็นไซยาโนแบคทีเรียด้วยกัน พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง (similarity) กันมากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.4) แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส หน่วยย่อยใหญ่ของไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 73102 กับแบคทีเรีย *Desulfovibrio gigas* พบว่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน HupL จะลดลงเหลือ 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น



รูปที่ 2.15 แบบจำลองโครงสร้างของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสและไนโตรจีเนส (Tamagnini และคณะ, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *hupSL* ของไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด (*Nostoc* sp. PCC 73102, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena* sp. PCC 7120) (Tamagnini และคณะ, 2002)

Strain	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

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

2.10 เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

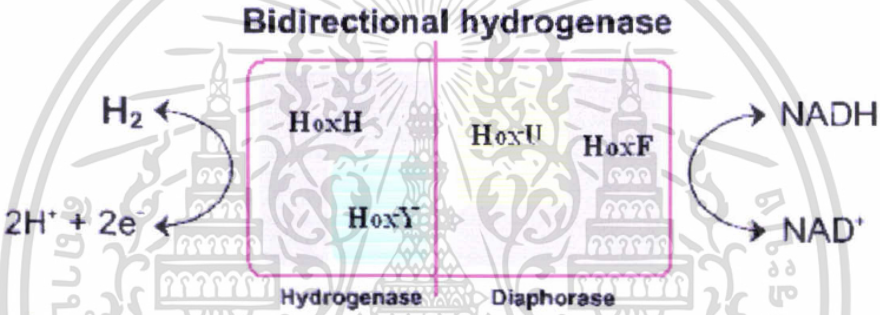
เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอนไปเป็นโมเลกุลไฮโดรเจน ดังสมการ 2.4

$$H_2 \xrightleftharpoons{\text{reversible hydrogenase}} 2H^+ + 2e^- \qquad (2.4)$$

รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่พบทั้งในไซยาโนแบคทีเรีย ที่ตรึงไนโตรเจนและไม่ตรึงไนโตรเจน โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว เช่น *Synechocystis* sp. และ *Synechococcus* sp. ไซยาโนแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น *Spirullina maxima* รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียที่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เมื่อศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเทียบกับเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส พบว่า เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสมีความไวต่อออกซิเจน และคาร์บอนมอนอกไซด์มากกว่า เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส แต่ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส กิจกรรมของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย ที่สร้างเฮเทอโรซิสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสทำงานได้โดยอาศัยหน่วยย่อยของโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน (heterotetrameric enzyme) มารวมกัน โดยมีสองหน่วยย่อยรวมกันเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และมีอีกสองหน่วยย่อยที่เหลือรวมเรียกว่า ไดอะฟอเรส (diaphorase) (รูปที่ 2.16) หน่วยย่อยของไฮโดรจีเนส δ และ β ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxY* และ *hoxH* ตามลำดับ ส่วนหน่วยย่อยของไดอะฟอเรส α และ γ ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hoxF* และ *hoxU* โดยทั้งสองส่วนทำหน้าที่ช่วยในการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง NAD^+ หรือ NADH



รูปที่ 2.16 แบบจำลองโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส (Tamagnini และคณะ, 2002)

2.11 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานวิทยาศาสตร์หลายสาขา ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่คิดค้นโดย Kary Mullis แห่งบริษัทซีตัส (Cetus Cooperation) สหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1983 ต่อมา Randall Saike และ Henry Erlich ได้นำเทคนิคนี้มาใช้และรายงานครั้งแรกในวารสาร Science ในปี ค.ศ. 1985 หลังจากนั้นได้มีผู้สนใจนำเทคนิคนี้มาใช้มากขึ้นจนสามารถพัฒนาเทคนิคทำให้เป็นวิธีการที่ใช้เป็นเครื่องอัตโนมัติได้ (thermal cycle)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการหรือต้นแบบ ซึ่งปรากฏอยู่ในจีโนม (genome) โดยใช้วิธีการในหลอดทดลองซึ่งเป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติที่เกิดขึ้นเมื่อจะมีการแบ่งตัวของเซลล์ ต่างกันที่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR นี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถกำหนดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้และสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ

2.11.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในเทคนิค PCR

2.11.1.1 ดีเอ็นเอแม่แบบ (target DNA)

เป็นดีเอ็นเอสายคู่และจะต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง

2.11.1.2 ไพรเมอร์

เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ส่วนใหญ่นิยมขนาด 20 ถึง 30 เบส และมีลำดับเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.11.1.3 ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส

ในเทคนิค PCR จะใช้ *Taq* DNA polymerase ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้แยกได้จากเชื้อ *Thermus aquaticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง

2.11.1.4 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP)

ประกอบด้วยดีออกซีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (dATP), ดีออกซีกวาโนซีนไตรฟอสเฟต (dGTP), ดีออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟต (dCTP), และดีออกซีไทมิดีนไตรฟอสเฟต (dTTP)

2.11.1.5 บัฟเฟอร์

ประกอบด้วยโพรแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) Tris-HCL เจลาติน (Gelatin)

2.11.1.6 เกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ (Salt-$MgCl_2$)

เป็นตัวควบคุมการเกิด primer-annealing และการเกิดปฏิกิริยาโดยรวม

2.11.2 ขั้นตอนการทำ PCR

เทคนิค PCR เป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิตมีหลักการที่สำคัญอยู่ 3 ขั้นตอนดังรูปที่ 2.17

2.11.2.1 การทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (denaturation)

เป็นการแยกดีเอ็นเอเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนที่จับกันอยู่ระหว่างเบสแต่ละคู่ นิยมใช้อุณหภูมิ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 60 วินาที

2.11.2.2 การกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติของดีเอ็นเอ (annealing หรือ renaturation)

จะมีการเติมไพรเมอร์นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ 2 สายลงไปในปฏิกิริยาไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแต่ละสายตามกฎการจับคู่ของเบส ความยาวของไพรเมอร์ประมาณ 20

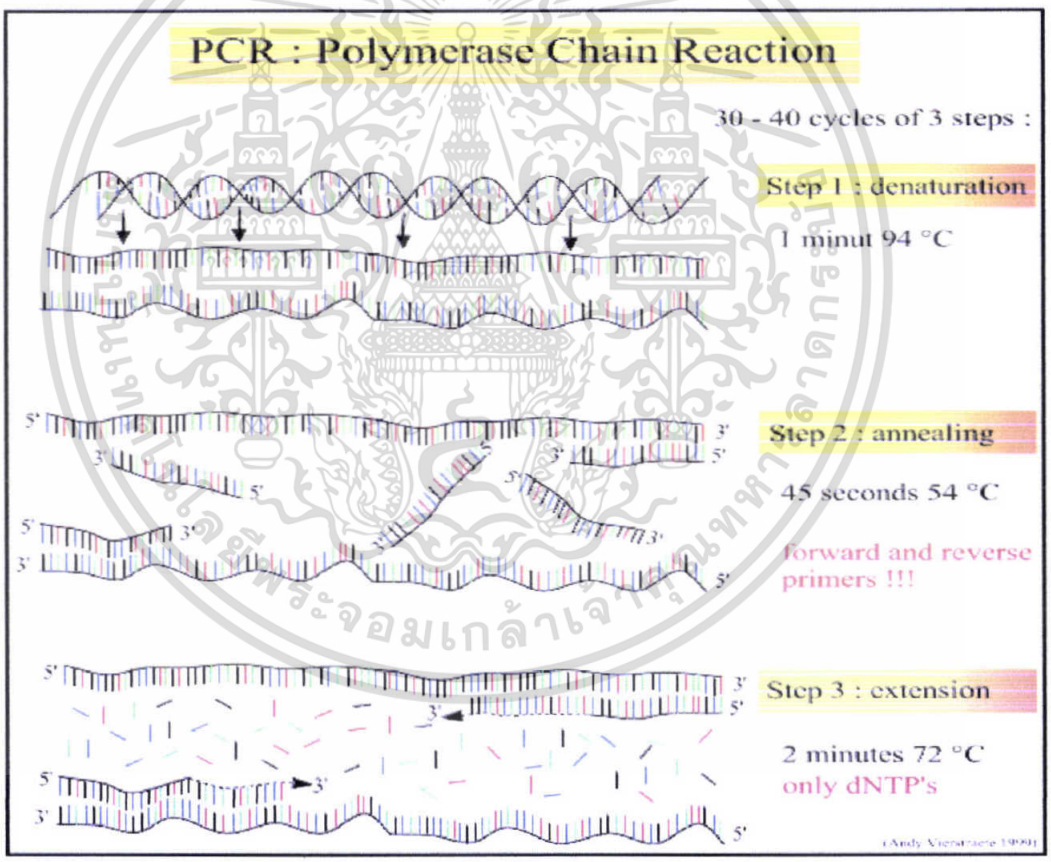
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึง 40 นิวคลีโอไทด์ และมีลำดับเบสที่เป็นคู่จำเพาะทั้งทางด้าน 5' (ด้านซ้าย) หรือ 3' (ด้านขวา) กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน อุณหภูมิที่นิยมใช้คือ ช่วง 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 60 วินาที

2.11.2.3 การสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension)

จะทำการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5'ไป 3' โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวแต่ละสายเป็นแม่แบบ นิยมทำที่อุณหภูมิ 70 ถึง 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ถึง 2 นาที

จะเห็นได้ว่าในแต่ละรอบของ PCR ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังกล่าว ทุกๆ รอบจะมีการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจเป็นสองเท่า ซึ่งถ้าทำ 30 รอบ จะมีการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจถึงพันล้านเท่าทำให้ได้ปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ ในระดับโมเลกุลต่อไป



รูปที่ 2.17 ขั้นตอนของ Polymerase Chain Reaction

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.3 ประโยชน์ของเทคนิค PCR

2.11.3.1 ใช้ในงานวิจัย (research application) อาทิเช่น DNA sequencing, Molecular cloning, Dnase I Footprinting, Genome mapping, Evolutionary analysis

2.11.3.2 ใช้ในงานทางการแพทย์และนิติเวชวิทยา (diagnostic and forensic application) ใช้ในการชันสูตรโรค และพิสูจน์หลักฐานในการดำเนินคดี

2.11.4 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR ขั้นพื้นฐาน

2.11.4.1 วิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

วิธีนี้เป็นวิธีการดูผลผลิตภัณฑ์ PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากผ่านกระบวนการเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้ววิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทราบขนาดแน่นอนและได้ผลิตภัณฑ์ PCR เพียงชนิดเดียวหรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้อะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.11.4.2 วิธีนิวคลีอิคแอซิดไฮบริไดเซชัน

คือวิธีการตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการในกรณีที่การดูผลจากเจลไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีการนี้ต้องใช้ตัวติดตามที่มีเบสคู่สมกับผลิตภัณฑ์ PCR และจะจับเบสคู่สมกันในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอ็นเอก็ได้ แต่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารปลอดรังสีซึ่งมีการตรวจหาตัวติดตามนั้นอีกครั้งหนึ่ง

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tamagnini และคณะ (1997) ตรวจสอบการมียีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* sp. PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม Av1 และ Av3 ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena variabillis* ATCC 29413 สำหรับศึกษายีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยเล็กและหน่วยย่อยใหญ่ ตามลำดับ และตรวจสอบการมียีนอัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Nostoc* sp. PCC 73102 ด้วยวิธี Southern hybridization กับตัวติดตาม *hup2* ที่เตรียมจากผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่า *Nostoc* sp. PCC 73102 มียีนอัพเทคไฮโดรจีเนสแต่ไม่มีรีเวอร์สซิ-เบิลไฮโดรจีเนส ต่อมาในปี ค. ศ. 2000 Tamagnini และคณะ ศึกษาความหลากหลายของไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยเลือกศึกษาในส่วนที่เป็นยีน *hup*, *hox* และ *xisC* (*xisC* เป็นบริเวณที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในยีน *hupL)* พบว่าสามารถพบเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดที่ตรึงไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

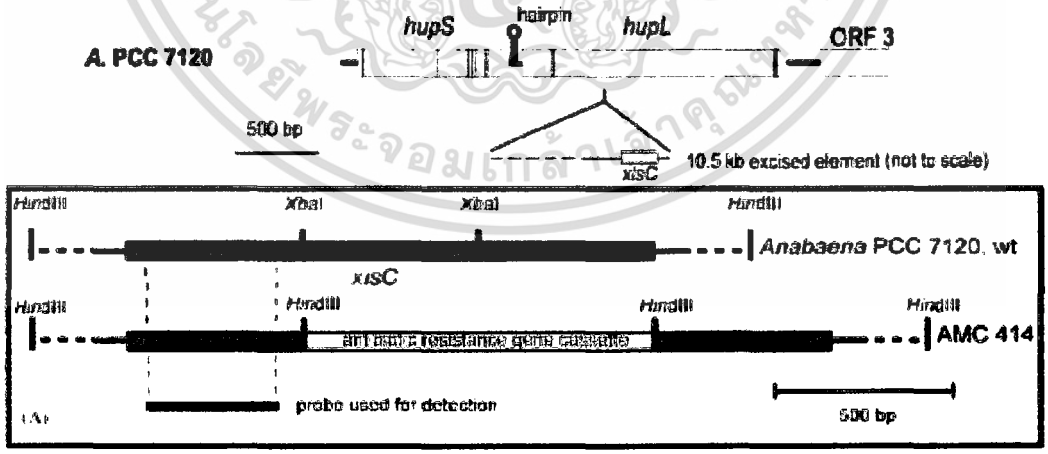
ได้ ส่วนเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสและยีน *xisC* พบเฉพาะในไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้น

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

Tamagnini และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (mutant AVM13) โดยเกิดจากการขาดหายไป (deletion) ของบริเวณปลายยีน *hupL* ทำให้ยีน *hupL* ไม่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสได้ โครงสร้างของยีน *hupL* ใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (รูปที่ 2.18)

รูปที่ 2.18 โครงสร้างของยีน *hupL* ใน *Anabaena variabilis* ATCC 29413

Lindblad และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทางชีวภาพใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ชนิดที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมและที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (mutant AMC 414) โดยการทำให้กลายพันธุ์แสดงได้ (รูปที่ 2.19)



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของยีน *hupSL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 สายพันธุ์ปกติ (wild type) และสายพันธุ์กลาย (mutant AMC 414)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปจะเห็นได้ว่า โครงสร้างของยีน *hupL* จะมีบริเวณยีน *xisC* อยู่ ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ มีหน้าที่ช่วยทำให้ยีน *hupL* และ *hupS* ที่อยู่ห่างไกลกันอยู่ใกล้กันมากขึ้นและสามารถทำงานร่วมกันได้ดีขึ้นในการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส การทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นเกิดจากการตัด *xisC* ออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังรูปและใส่ยีนต้านยาปฏิชีวนะเข้าไปแทนที่ทำให้ยีน *hupL* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ไม่สามารถทำงานได้และไม่มีการถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ

3.1.1 ไซยาโนแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์

3.1.1.1 *Anabaena siamensis*

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.1.2 *Fiscerella muscicola*

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.1.3 *Hapalosiphon delicatulus*

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.1.4 *Nostoc carneum*

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.1.5 *Synechococcus* sp. PCC 7942

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.1.6 *Synechocystis* sp. PCC 6803

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 สาหร่ายสีเขียว 3 สายพันธุ์

3.1.2.1 *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.2.2 *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

3.1.2.3 *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ (วว.)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 อาหาร BG 11 (ภาคผนวก ก)

3.2.1.2 อาหาร LB (ภาคผนวก ข)

3.2.2 ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.2.2.1 แอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2.2 กานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.2.3 สเปกติโนมัยซิน (spectinomycin) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

3.2.3.1 เม็ดแก้ว (Glass bead) (Sigma , USA)

3.2.3.2 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (ภาคผนวก ค)

3.2.3.3 โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.3.4 โซเดียมลอริลซาร์โคซีน (sodium lauroyl sarcosine) 10 เปอร์เซ็นต์

3.2.3.5 ฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (TE saturated phenol)

3.2.3.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1 โดยปริมาตร)
(phenol : chlorofrom : isoamylalcohol)

3.2.3.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 โดยปริมาตร)
(chlorofrom : isoamylalcohol)

3.2.3.8 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) 3 โมลาร์

3.2.3.9 เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (99% ethanol)

3.2.3.10 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol)

3.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.4.1 dNTPs (deoxyribonucleotidetriphosphate) (Promega, USA)

3.2.4.2 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Promega, USA)

3.2.4.3 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Promega, USA)

3.2.4.4 อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.4.5 เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.4.6 บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) (ภาคผนวก ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.7 สีผสมดีเอ็นเอ (tracking Dye) (ภาคผนวก ค)

3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy

3.2.5.1 เอนไซม์ T4 ดีเอนเอไลเกส (T4 DNA ligase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)

3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด

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 ฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII (λ/*Hin*dIII) (Invitrogen, USA)

3.2.8 ชุดทดสอบ (Kit)

3.2.8.1 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA)

3.2.8.2 ชุดแยกดีเอ็นเอจากเจล (Qiagen, 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientific Promotion , Sartorius BP2215, Thailand)

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

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

3.3.10 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) (Amersham Pharmacia Biotech EPS301, Sweden)

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

3.3.12 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel documentation) (Syngene , MD1 1019, Japan)

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

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

3.3.15 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.16 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ (Glasswaers)

3.3.17 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope) (Olympus CH30, Japan)

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1. การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BG 11 (Rippka และคณะ, 1979) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลานาน 7 ถึง 10 วัน (รูปที่ 3.1)

รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Eschericia 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 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในกรณีของการคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สามารถคัดเลือกเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

3.4.3 การแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในอาหารเหลวมักมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียเกิดขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์ ก่อนที่จะนำเซลล์ไปศึกษาในระดับโมเลกุล ซึ่งวิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มีดังนี้

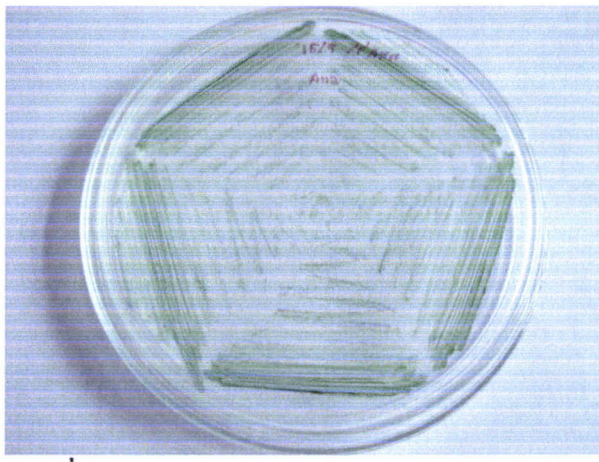
1) เทคนิคการปั่นให้ตกตะกอน (washing by centrifugation technique)

การแยกแบคทีเรียออกจากสาหร่ายสามารถทำได้โดยการปั่นให้ตกตะกอนและล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้หลอดปั่นความจุ 15 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างสาหร่ายลงในหลอดปั่น ทำการปั่นตัวอย่างสาหร่ายที่ความเร็วประมาณ 2,000 รอบต่อนาที นาน 45 – 90 วินาที รินส่วนใสออกให้หมด แล้วทำการล้างตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง ทำอย่างนี้จนครบ 12 ครั้ง จากนั้นรินส่วนใสออกให้หมดโดยไม่ทำให้ตะกอนขุ่น ใช้ไมโครปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสาหร่ายในหลอดปั่นหยดลงในอาหารแข็ง และใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาลาก (streak) เชื้อ เมื่อเลี้ยงสาหร่ายจนครบ 1 สัปดาห์ ควรตรวจดูสาหร่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ปราศจากการปนเปื้อนไปเพาะเลี้ยงต่อไป (ลัดดา, 2542)

2) เทคนิค streak plate (streak plate technique)

การเตรียมเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไปลนไฟ ทิ้งไว้สักพักให้เย็น แล้วนำลวดเขี่ยเชื้อไปเขี่ยเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวมาลากบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง BG 11 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้แสงที่ความเข้ม 1,000 ลักซ์ นาน 18 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน 5 ถึง 7 วัน จะสังเกตพบเซลล์ที่เจริญขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วจึงนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว BG 11 ดังรูปที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 *Anabaena siamensis* บนอาหารแข็ง BG 11

3.4.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์โดยนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ 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 นำส่วนใสด้านบนที่มีดีเอ็นเออยู่มาสกัดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร ตามด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4.4 มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งอะกาโรส 0.2 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เติมเจลสตาร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10,000 ส่วนอะกาโรส แล้วจึงเทใส่ถาด จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงในช่อง (well) ของแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นและใช้ฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hup*L) และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hox*H) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ 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) โดยมีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสและรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94 50 72	30 วินาที 1 นาที 2 นาที } 30 รอบ
3	72	10 นาที
4	20	∞

3.4.7 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จนกระทั่งแถบของดีเอ็นเอแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ทำการตัดเจลบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากแผ่นเจลและนำเจลที่ตัดได้ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริสุทธิ์โดยชุดแยกดีเอ็นเอจากเจลแบบสำเร็จรูป (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 Collecion tube แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมบัฟ-เฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

3.4.8 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T Easy

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนอัพเทคไฮโดร-จีเนสหน่วยย่อยใหญ่ และยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ที่มีขนาดตรงตามต้องการผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) (ภาคผนวก ง) ใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เป็น 10 : 1 ปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation) 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า เอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต ผลิตภัณฑ์ PCR และเวคเตอร์ pGEM-T Easy 50 นาโนกรัม ผสมให้เข้ากัน และนำหลอดที่มีส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.4.9 การเตรียม competent cell *Eschericia coli* DH5α สำหรับทรานสฟอร์มเมชัน

นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 1 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ (แคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์และ Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วเติมบัฟเฟอร์แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 86 เปอร์เซ็นต์ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บ competent cell ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10 การทรานสฟอร์มเมชัน

นำเซลล์ที่เตรียมไว้หรือที่เตรียมในขณะนั้นมาตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง ปิเปตเซลล์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีส่วนผสมที่เตรียมไว้สำหรับ ligation ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.4.8 นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ย้ายไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90วินาที ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นย้ายไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง นำเซลล์ที่บ่มไว้มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์มต่อไป

3.4.11 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์

คัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนส จากคุณสมบัติการต้านทานปฏิชีวนะแอมพิซิลินและทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาว ซึ่งเกิดจากพลาสมิดสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลกโตซิเดส (β-galactosidase) ในการเปลี่ยน X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตู้เพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ที่เจริญได้มาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง

3.4.12 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)

นำเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.4.10 มาเพาะเลี้ยงจนเจริญเติบโตและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายใน Solution I ที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม Solution II ที่ประกอบด้วยโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาและวางบนน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม Solution III ที่ประกอบด้วยโพเทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร กลาเซียอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 วินาที และวางบนน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนในที่อยู่ด้านบนใส่หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรที่ได้และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตากให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.4.13 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.4.12 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยปฏิกิริยาของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 10 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 10 ยูนิต และน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

3.4.14 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสจาก BigDye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาชนิดของยีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเซลล์ไปสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟเรซิส และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ จากนั้นคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในธนาคารยีนไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.1 ผลการศึกษายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.1.1 ผลการทำไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวให้บริสุทธิ์

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวในอาหารเหลว เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ นำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวชนิดอื่น แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนแบคทีเรีย ดังนั้นจึงนำเซลล์ไปย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ที่ย้อมมีการติดสีทั้งสีแดงของซาฟรานิน (safranin) และสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แสดงว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย จึงต้องนำเชื้อไปผ่านการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการเก็บเซลล์ที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนไปปั่นให้เซลล์ตกตะกอนและล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 5-6 ครั้ง จากนั้นนำเชื้อไปลากบนอาหารแข็ง BG 11 ที่มีการผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในที่มีแสง พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่ยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว ดังนั้นจึงนำเชื้อไปลากบนอาหารแข็ง BG 11 ที่มียาปฏิชีวนะเป็นกานามัยซิน (kanamycin) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร พบว่าไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวสามารถเจริญได้และมีความบริสุทธิ์ขึ้น จากนั้นนำเซลล์ที่ปราศจากการปนเปื้อนไปลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและปราศจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 4.1 จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อด้วยการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์

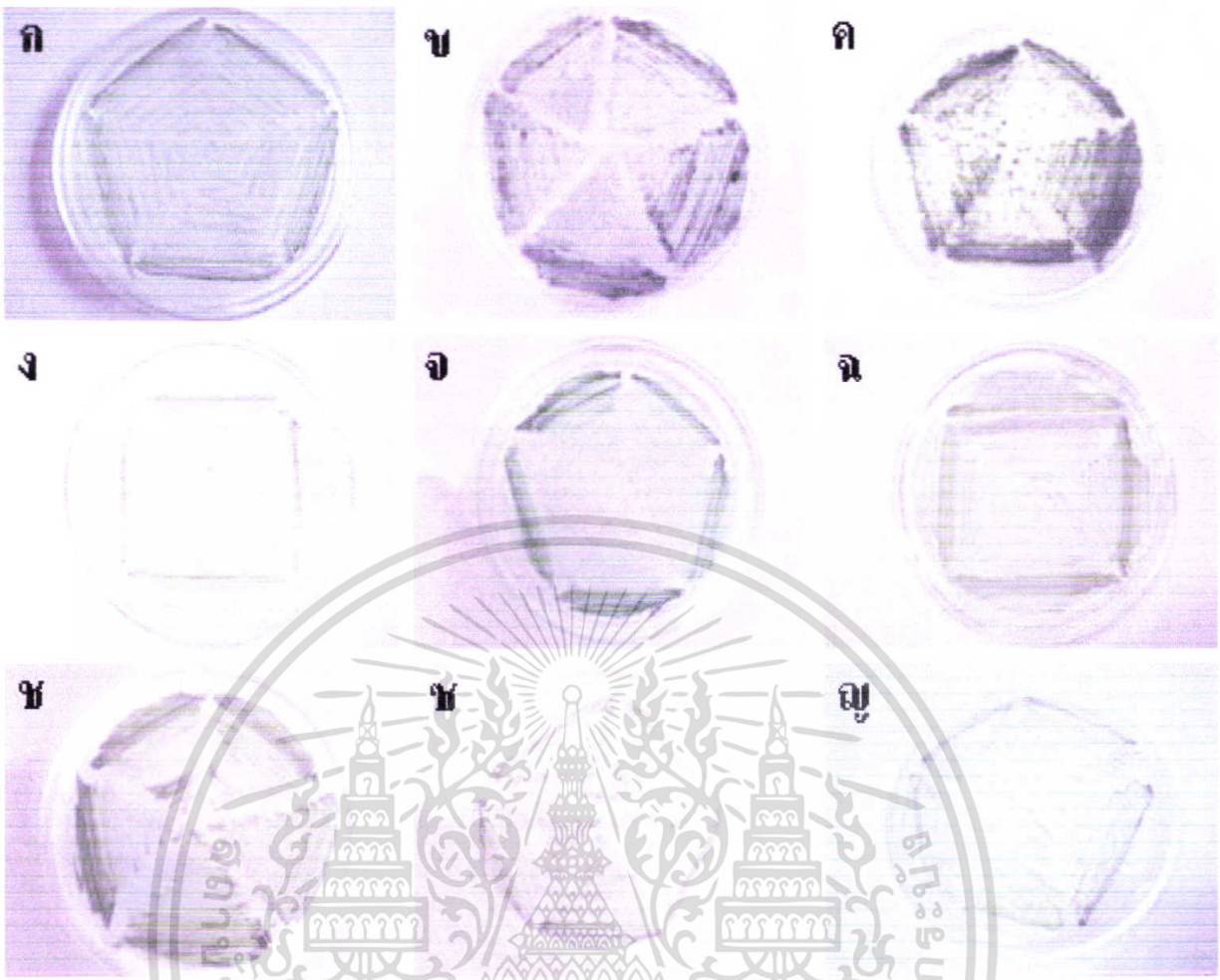
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anabaena siamensis มีลักษณะเป็นเส้นสาย บางเซลล์มีรูปร่างแบบถังเบียร์เรียงต่อกัน (รูปที่ 4.2 ก) *Fischerella muscicola* มีลักษณะเป็นเส้นสายและมีการแตกกิ่ง (รูปที่ 4.2 ข) *Hapalosiphon delicatulus* มีลักษณะเป็นเซลล์กระบอกสั้นเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และมีการแตกแขนง (รูปที่ 4.3 ค) *Nostoc carneum* มีรูปร่างกลม รูปทรงกระบอกเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย (รูปที่ 4.2 ง) *Synechococcus* sp.PCC 7942 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นรูปแท่ง แยกออกจากกัน (รูปที่ 4.2 จ) *Synechocystis* sp. PCC 6803 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม แยกออกจากกัน (รูปที่ 4.2 ฉ) และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris var vulgaris* TISTR 8261 มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม หรือรี (รูปที่ 4.2 ช) *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557 มีลักษณะยาว ปลายสองข้างเรียวแหลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มอย่างหลวมๆ (รูปที่ 4.2 ซ) และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 มีลักษณะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีรูปร่างรี (รูปที่ 4.2 ฌ)

4.1.2 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

หลังจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวบนอาหารแข็ง BG 11 เป็นเวลา 1–2 สัปดาห์ จึงนำเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้ว (glass bead) และสกัดด้วยฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE นำจีโนมิกที่สกัดได้มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 8 โวลท์ต่อเซนติเมตร นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต จากการเปรียบเทียบแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีระดับเดียวกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23,130 คู่เบส (รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ บนอาหารแข็ง BG 11

ก *Anabaena siamensis*

ข *Fischerella muscicola*

ค *Hapalosiphon delicatulus*

ง *Nostoc carneum*

จ *Synechococcus* sp. PCC 7942

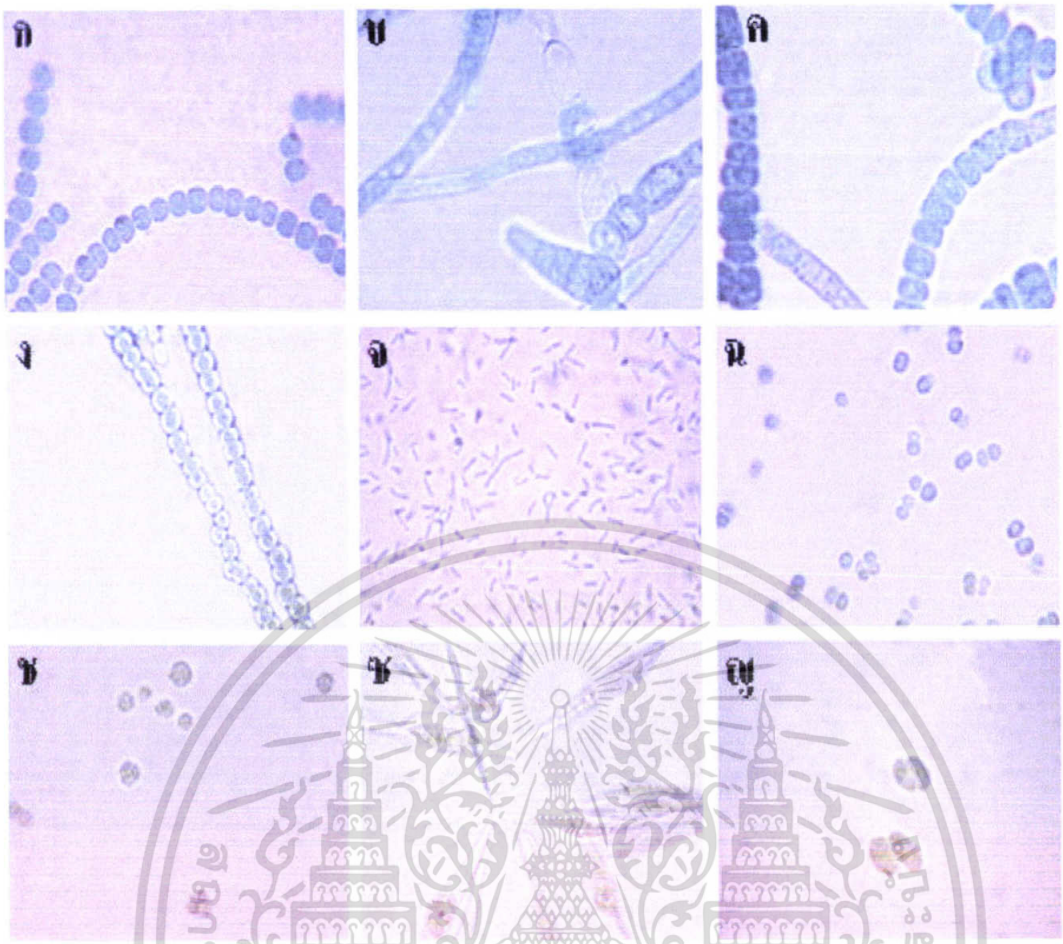
ฉ *Synechocystis* sp. PCC 6803

ช *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

ซ *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

ญ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างของไซยาโนแบคเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ก *Anabaena siamensis*

ข *Fischerella muscicola*

ค *Hapalosiphon delicatulus*

ง *Nostoc carneum*

จ *Synechococcus* sp. PCC 7942

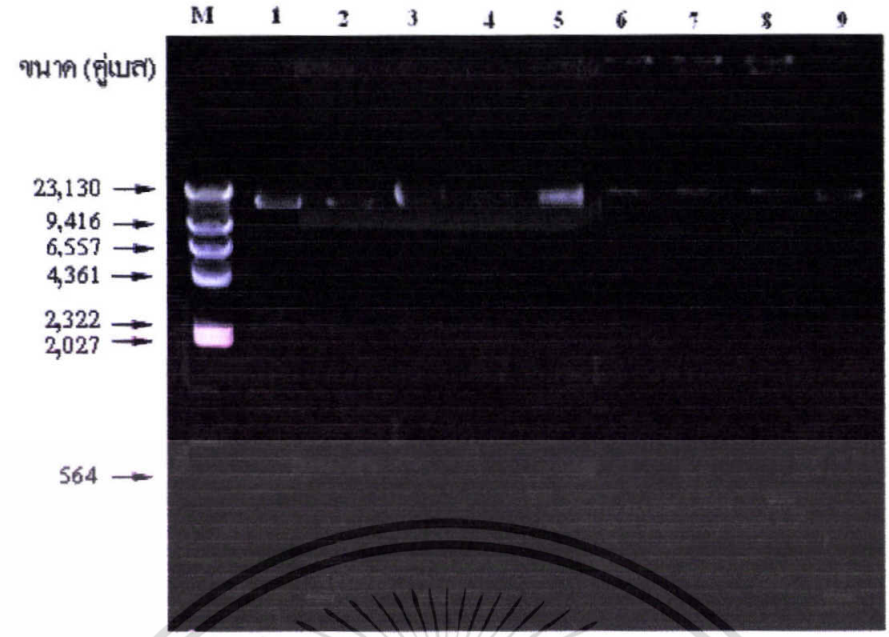
ฉ *Synechocystis* sp. PCC 6803

ช *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

ซ *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

ญ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์ จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Anabaena siamensis*

2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Fischerella muscicola*

3 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Hapalosiphon delicatulus*

4 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Nostoc carneum*

5 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Synechococcus* sp. PCC 7942

6 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Synechocystis* sp. PCC 6803

7 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

8 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

9 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส แสดงให้เห็นว่าวิธีการแตกเซลล์ด้วยเม็ดแก้วและสกัดต่อด้วยฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวได้ นอกจากนี้ จีโนมิกที่สกัดได้จากวิธีนี้ยังมีความบริสุทธิ์สูง เพราะปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวและดีเอ็นเอไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ DNase รวมถึงปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้จากวิธีนี้มีปริมาณพอสมควร ซึ่งปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้อาจขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่นำมาสกัด จากนั้นจึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

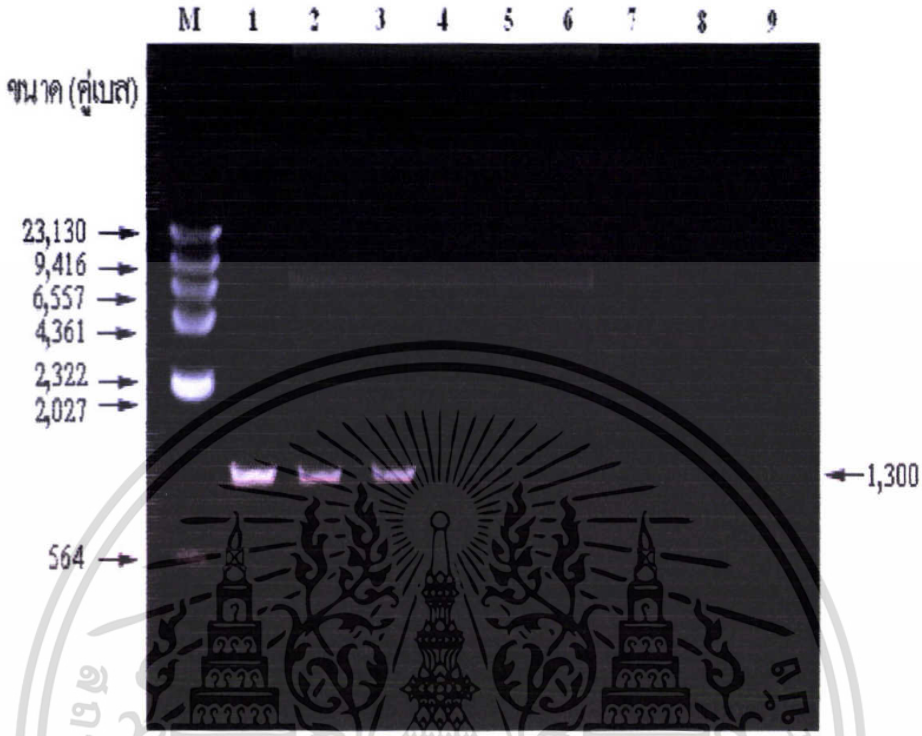
4.1.3 ผลการศึกษายีนอัพเทคไฮโดรจีเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากข้อ 4.1.2 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ-เมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 (ชมาภรณ์, 2545) และใช้อุณหภูมิในช่วงจับตัว (anncaling) ที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตร-โฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสที่ได้มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.4)

จากการศึกษาพบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,343 คู่เบส และไม่มีแถบดีเอ็นเอใดปนเปื้อนแสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะ ไซยาโนแบคทีเรียที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 คือ *Anabaena siamensis*, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* เพราะว่าทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์จึงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ และน่าจะมีการผลิตเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสจากยีนอัพเทคไฮโดร-จีเนสมาทำการสลายแอมโมเนียจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจน ส่วน *Nostoc carneum* มีความคาดหวังเช่นกันว่าน่าจะมียีนอัพเทคไฮโดรจีเนส เนื่องจากมีเซลล์เฮเทอโรซิสต์ แต่ปรากฏว่าไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส อาจเป็นผลมาจากจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อยเกินไปและสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม อาจเป็นไปได้ว่า *Nostoc carneum* สายพันธุ์นี้ไม่มียีนอัพเทคไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ยังไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 ในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 เพราะไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเซลล์เฮเทอโรซิสต์จึงไม่มีการตรึงไนโตรเจน ส่วนสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522, *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557 ไม่พบยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความจำเพาะต่อยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าสาหร่ายสีเขียวเพราะการออกแบบไพรเมอร์ได้นำข้อมูลมาจากไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้น



รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 ของเชื้อบริสุทธิ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Anabaena siamensis*

2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Fischerella muscicola*

3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Hapalosiphon delicatulus*

4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Nostoc carneum*

5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Synechococcus* sp. PCC 7942

6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Synechocystis* sp. PCC6803

7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

8 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลการศึกษายีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียว

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวที่ได้จากข้อ 4.1.2 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 (ชมาภรณ์, 2545) และใช้อุณหภูมิในช่วงจับตัว (annealing) ที่ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 4.5)

จากการศึกษาพบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,189 คู่เบส และไม่มีแถบใดปนเปื้อนแสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะ ไซยาโนแบคทีเรียที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 คือ *Anabaena siamensis*, *Synechococcus* sp. PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 ส่วนไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 คือ *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* การที่ *Fischerella muscicola* และ *Hapalosiphon delicatulus* ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสอาจเป็นผลมาจากไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่ม *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. และ *Anabaena variabilis* จึงมีความจำเพาะต่อยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของ *Anabaena siamensis*, *Synechococcus* sp. PCC 7942 และ *Synechocystis* sp. PCC 6803 มากกว่า *Fischerella muscicola* และ *Hapalosiphon delicatulus* อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่า *Fischerella muscicola* และ *Hapalosiphon delicatulus* ไม่มียีนรีเวอร์ส-ซิเบิลไฮโดรจีเนส ส่วน *Nostoc carneum* มีความคาดหวังว่าน่าจะมียีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนส แต่ปรากฏว่าไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส อาจเป็นผลมาจากจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อยเกินไปและสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261, *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522, *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557 เนื่องจากไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 มีความจำเพาะต่อยีนรีเวอร์สซิเบิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าสาหร่ายสีเขียวเพราะการออกแบบไพรเมอร์ได้นำข้อมูลมาจากไซยาโนแบคทีเรียเท่านั้น

รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd3–Rhyd1 ของเชื้อบริสุทธิ์

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Anabaena siamensis*

2 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Fischerella muscicola*

3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Hapalosiphon delicatulus*

4 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Nostoc carneum*

5 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Synechococcus* sp. PCC 7942

6 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Synechocystis* sp. PCC 6803

7 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261

8 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522

9 ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียในหลายสายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียในหลายสายพันธุ์

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของยีนไฮโดรจีเนส	Accession Number	เอกสารอ้างอิง
Anabaena siamensis	*hupL* and *hoxH* genes	AY152844	Phunpruch และคณะ, 2006
Nostoc punctiforme PCC 73102	*HypF* and *HypC* genes	AF325829	Hansel และคณะ, 2001
Synechococcus sp.	*hoxH* gene	X97797	Boison และคณะ, 1996
Synechocystis sp. PCC 6803	NAD(P)-reducing nickel hydrogenase	X97610	Appel.and Schulz, 1996

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่ายังไม่มีรายงานยีนไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Hapalosiphon delicatulus* ในธนาคารยีน ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงทำการศึกษาการโคลนยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Hapalosiphon delicatulus* และนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.2 ผลการโคลนยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Hapalosiphon delicatulus*

4.2.1 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 ที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส โดยใช้จีโนมิกของ *Hapalosiphon delicatulus* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extract Kit, Qiagen, Germany) ชุดแยกดีเอ็นเอดังกล่าวออกแบบมาสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 70 คู่เบสจนถึง 10 กิโลเบส จึงสามารถใช้แยกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการได้โดยอาศัยหลักที่ใช้ความร้อนและบัฟเฟอร์ในการละลายเจลที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ แล้วทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากบัฟเฟอร์โดยใช้ spin column ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR จะจับกับเมมเบรนของ spin column จากนั้นล้างผลิตภัณฑ์ PCR ที่อยู่บนเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ ทำให้สิ่งที่ปนเปื้อนที่ไม่ใช่ดีเอ็นเออถูกชะออกจากเมมเบรน ทำการชะผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเมมเบรน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลท์ต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่ามีแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 จำนวน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.6) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR พบว่ามีปริมาณ 67.6 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในการทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าว จึงเป็นการแยกเอาสิ่งปนเปื้อนจากขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสออกจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ เพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้ไปรบกวนปฏิกิริยาของการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวคเตอร์ในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่ใช้ไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

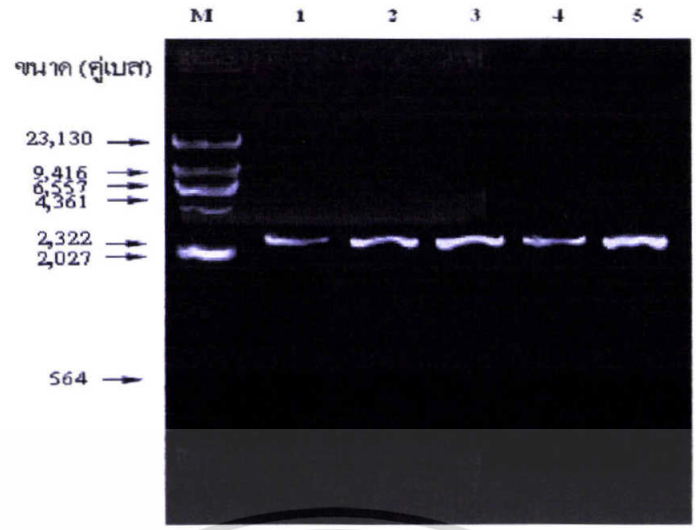
4.2.2 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T Easy และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ Uhyd3–Uhyd2 ขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy ตรงบริเวณปลาย T ซึ่งอยู่ตรงกลางของยีน *lacZ* ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยใช้อัตราส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวคเตอร์เท่ากับ 10:1 และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งเซลล์ให้อาศัยมีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มเมชัน (Transformation efficientcy) เท่ากับ $1.5x10^7$ CFU ต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG โคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสมจะมีสีขาวเนื่องจากสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงิน จากการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์ PCR มา 5 โคโลนี จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.2.3 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากทรานสฟอร์มแมนท์ด้วยด่าง

นำโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์และนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis) ตั้งชื่อพลาสมิดลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3–Uhyd2 ว่า pUha1.1, pUha1.2, pUha1.3, pUha1.4 และ pUha1.5 นำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (รูปที่ 4.7) จากแถบดีเอ็นเอที่เลือกมาทั้ง 5 โคโลนี พบว่ามีพลาสมิดดีเอ็นเอเหมือนกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกพลาสมิด pUha1.5เพื่อนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอ pUha ที่สกัดด้วยด่าง

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 pUha1.1 4 pUha1.4

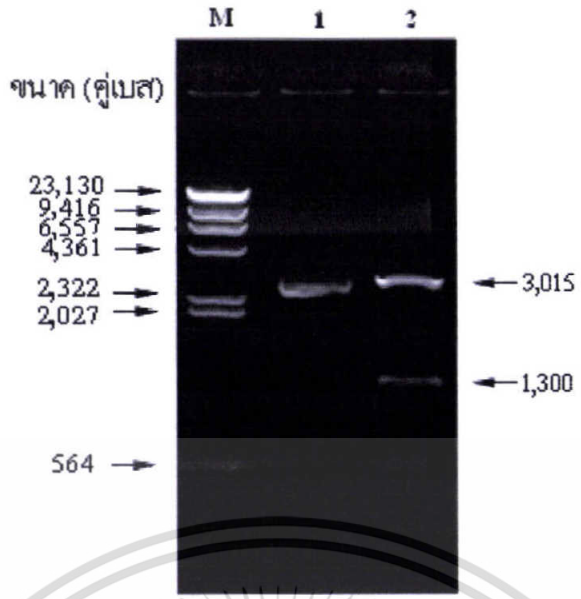
2 pUha1.2 5 pUha1.5

3 pUha1.3

4.2.4 ผลการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5 ที่สกัดได้จากข้อ 4.2.3 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pUha1.5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 3,015 และ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.8) แถบที่ปรากฏ 2 แถบนี้ แถบบนมีขนาด 3,015 คู่เบส จะเป็นแถบของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่ไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR เนื่องจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพราะใน pGEM-T Easy มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในบริเวณ multicloning site ซึ่งอยู่ก่อนหน้าปลาย T ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ก็จะได้เวคเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 3,015 คู่เบส และแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งอยู่ด้านล่างมีขนาด 1,300 คู่เบส ทำให้สามารถสรุปได้ว่าพลาสมิด pUha1.5 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่เกิดจากการนำเวคเตอร์ pGEM-T Easy เชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3-Uhyd2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5

2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

4.2.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pUha1.5

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pUha1.5 ที่ผ่านการทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Uhyd3 และ Uhyd2 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Reactions และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI PISM^{R} 3700 DNA Analyzer โดยใช้ไพรเมอร์ที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ T7 ของเวคเตอร์ pGEM-T Easy ไพรเมอร์ T7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' ได้ผลดังโครมาโตแกรม (ภาคผนวก จ) ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pUha1.5 จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อกับปลาย T ของเวคเตอร์ทางด้านโปรโมเตอร์ T7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 906 คู่เบส (รูปที่ 4.9) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BLAST server พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cyanothece* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. และ *Gloeothece* sp. มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pUha1.5 ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน (รูปที่ 4.10) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. และ *Gloeothece* sp. มากกว่า 74 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.2 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากพลาสมิด pUha1.5 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของยีนไฮโดรจีเนส	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
Cyanothece sp. ATCC 51142	HupS (*hupS*) gene, *hupS-hupL* intergenic spacer and HupL (*hupL*) gene	90
Nostoc sp. PCC 7120	DNA	87
Nostoc sp. PCC 7422	*hupS*, *hupL* genes for uptake hydrogenase small subunit, uptake hydrogenase large subunit	84
Nostoc PCC73102	*hupS* homolog and *hupL* homolog genes	83
Lyngbya majuscula CCAP 1446/4	HupS (*hupS*) genes, HupL (*hupL*)	83
Anabaena variabilis ATCC 29413	chromosome	83
Anabaena sp.	[NiFe] uptake hydrogenase small subunit (*hupS*) and [NiFe] uptake hydrogenase large subunit (*hupL*) genes	81
Anabaena siamensis TISTR8012	uptake hydrogenase small subunit (*hupS*) and uptake hydrogenase large subunit (*hupL*) genes	81
Gloeothece sp. PCC 6909	uptake hydrogenase small subunit (*hupS*) gene *hupS-hupL* intergenic spacer and uptake hydrogenase large subunit (*hupL*) and uptake hydrogenase specific C-terminal endopeptidase (*hupW*) genes	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

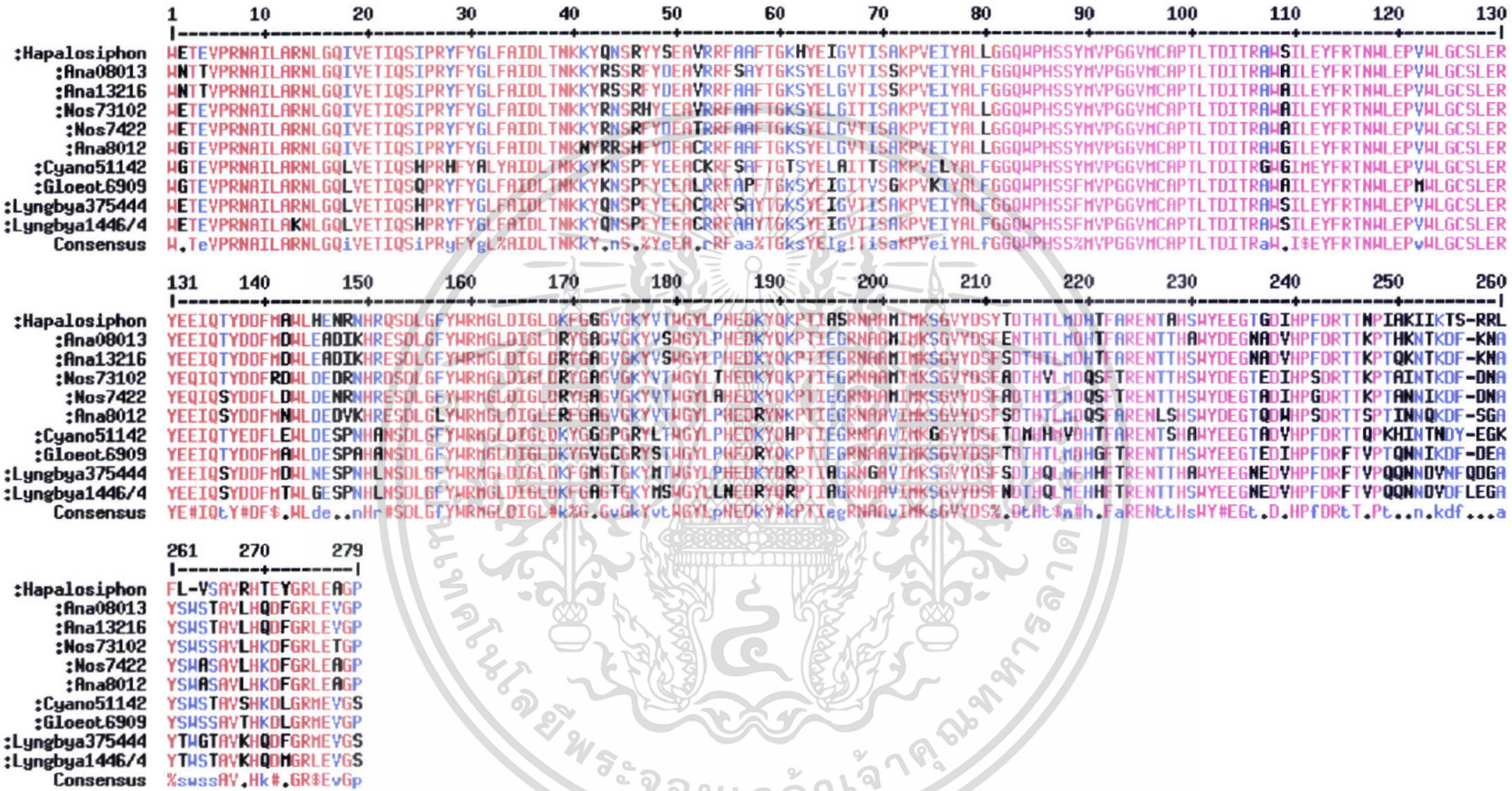
ตารางที่ 4.3 ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ *Hapalosiphon delicatlus* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCRในพลาสมิด pUha1.5 กับลำดับอะมิโนที่รายงานไว้ในธนาคารยีน

ไซยาโนแบคทีเรีย	ชนิดของกรดอะมิโน	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
Nostoc sp. PCC 7422	uptake hydrogenase large subunit	80
Anabaena variabilis ATCC 29413	[NiFe] uptake hydrogenase, large subunit	79
Nostoc punctiforme	*hup*L homolog	79
Nostoc punctiforme PCC 73102	Ni,Fe-hydrogenase I large subunit	79
Nostoc sp. PCC 7120	[NiFe] uptake hydrogenase large subunit	77
Anabaena sp.	[NiFe] uptake hydrogenase large subunit	77
Anabaena siamensis TISTR8012	uptake hydrogenase large subunit	77
Gloeothece sp. PCC 6909	uptake hydrogenase large subunit	75
Lyngbya sp. PCC 8106	Nickel-dependent hydrogenase	75
Lyngbya aestuarii	HupL	75
Lyngbya majuscula CCAP 1446/4	HupL	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pUha1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิด pUha1.5 กับลำดับอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษายีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

5.1.1 ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis*, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* มียีนอัพเทคไฮโดรจีเนส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 1,300 คู่เบส

5.1.2 ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Anabaena siamensis*, *Syncechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803 มียีนรีเวอร์สซิเบลไฮโดรจีเนส ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 1,200 คู่เบส

5.1.3 ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc carneum* และสาหร่ายสีเขียวสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris* TISTR 8261, *Ankistrodesmus falcatus* TISTR 8557และ *Scenedesmus obliquus* TISTR 8522 ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไฮโดรจีเนส

5.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon delicatulus*

5.2.1 พลาสมิดลูกผสม pUha1.5 เป็นพลาสมิดลูกผสมที่เกิดขึ้นระหว่างเวคเตอร์ pGEM-T Easy กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Hapalosiphon delicatulus*

5.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่สามารถอ่านได้มีขนาดทั้งหมด 906 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Cyanothece* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. และ *Gloeothece* sp. มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

5.2.3 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Hapalosiphon delicatulus* ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Nostoc* sp., *Anabaena* sp. และ *Gloeothece* sp. มากกว่า 74 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชมาภรณ์ ธงเพ็ง. (2545). ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรงาม ลิ้มตะกูล. (2541). ชีวเคมีของกรดนิวคลีอิก. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 37 น.

มนตรี จุฬาวัฒนทล. (2542). การสังเคราะห์แสงและการตรึงไนโตรเจน.ชีวเคมี. 511-523. มนตรี จุฬาวัฒนทล และประหยัด โกมารทัต.มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ

ลัดดา วงศ์รัตน์.(2542). แพลงก์ตอนพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 22 น.

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 (complexI) 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, CD., Buettner, JA., and Golden, JW. (1995). Programmed DNA rearrangement of a cyanobac-terial hupL gene in heterocystous. *Proc Natl Acad Sci USA*., 92: 791–795

Carrasco, CD., Garcia, JS., and Golden, JW. (1998). Programed DNA rearrangement of a hydrogenase gene during *Anabaena* heterocyst development. In: Zaborsky, OR., Benemann, JR., Matsunaga, T., and Miyake, J. San Pietro A (eds) BioHydrogen .Plenum Press, New York: pp 203–207

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

Graffron, R., and Rubin, A. (1942). A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*., 92: 9358–9362

Happe, T., Schutz, K., and Bohme, H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J Bacteriol*, 182: 1624–1631

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hansel A., Axelsson R., Lindberg P., Troshina OY., Wunschiers R., Lindblad P. (2001). Cloning and characterization of a *hyp* gene cluster in the filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain PCC 73102 FEMS Microbiol Lett 201: 59-64

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

Lindblad, P., Christensson, K., Lindberg, P., Fedorov, A., Pinto, F., and Tsygankov, A. (2002). Photoproduction of H2 by wildtype *Anabaena* PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant:from laboratory experiments to outdoor culture. *Int J 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

Phunpruch S, Baebprasert W, Thongpeng C. and Incharoensakdi A. (2006) nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Journal of Applied Phycology 18: 713-722.

Rippka R, Deruelles J,Waterbury JB, Herdman M, Stanier R (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1–61.

Sambrook, J., Fritsch, EF., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

Schmitz. O., Boison, G., Hilscher, R., Hudeshagen, 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, A., and Stickland, R. (1931). The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration *Naturwissens- chaften*, 83: 525–535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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: 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., Wunschiers, R., and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66: 1–20

http://people.hofstra.edu/geotrans/eng/.../conc8en/energycontent.html

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

http://www.fao.org/.../w7241e0g.htm#chapter%205%20%20%20hydrogen%20production

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 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) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (3.05 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริคแอมโมเนียมซิเตรท ($FeNH_4 \cdot Citrate$) (0.60 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบอาหาร

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

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นปรับปริมาตร โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร สำหรับการเตรียมอาหารแข็งสูตร LB ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์ TBE 10 เท่า

ส่วนประกอบ

Tris	0.89 โมลาร์
กรดบอริก	0.89 โมลาร์
EDTA	25 มิลลิโมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายน้ำ ปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

บัฟเฟอร์ TE

ส่วนประกอบ

Tris-HCl	1 โมลาร์
EDTA	0.5 โมลาร์

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายและปรับพีเอชเป็น 8 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

Tracking dye

ส่วนประกอบ

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

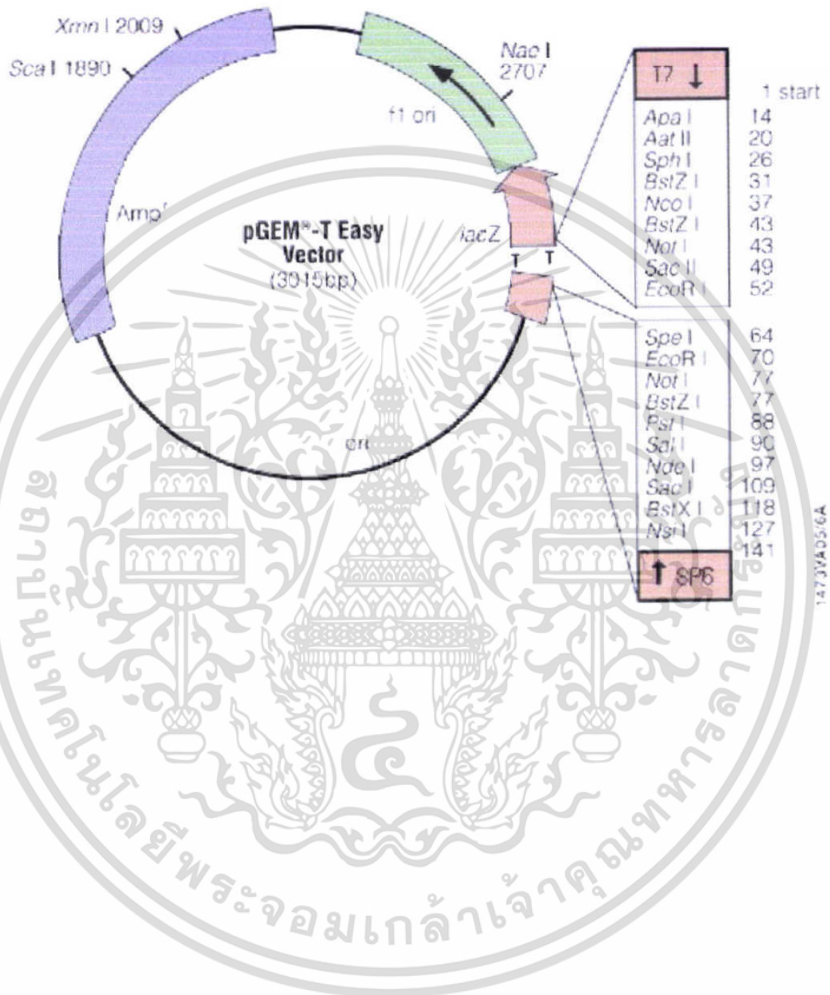
นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

เวคเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR

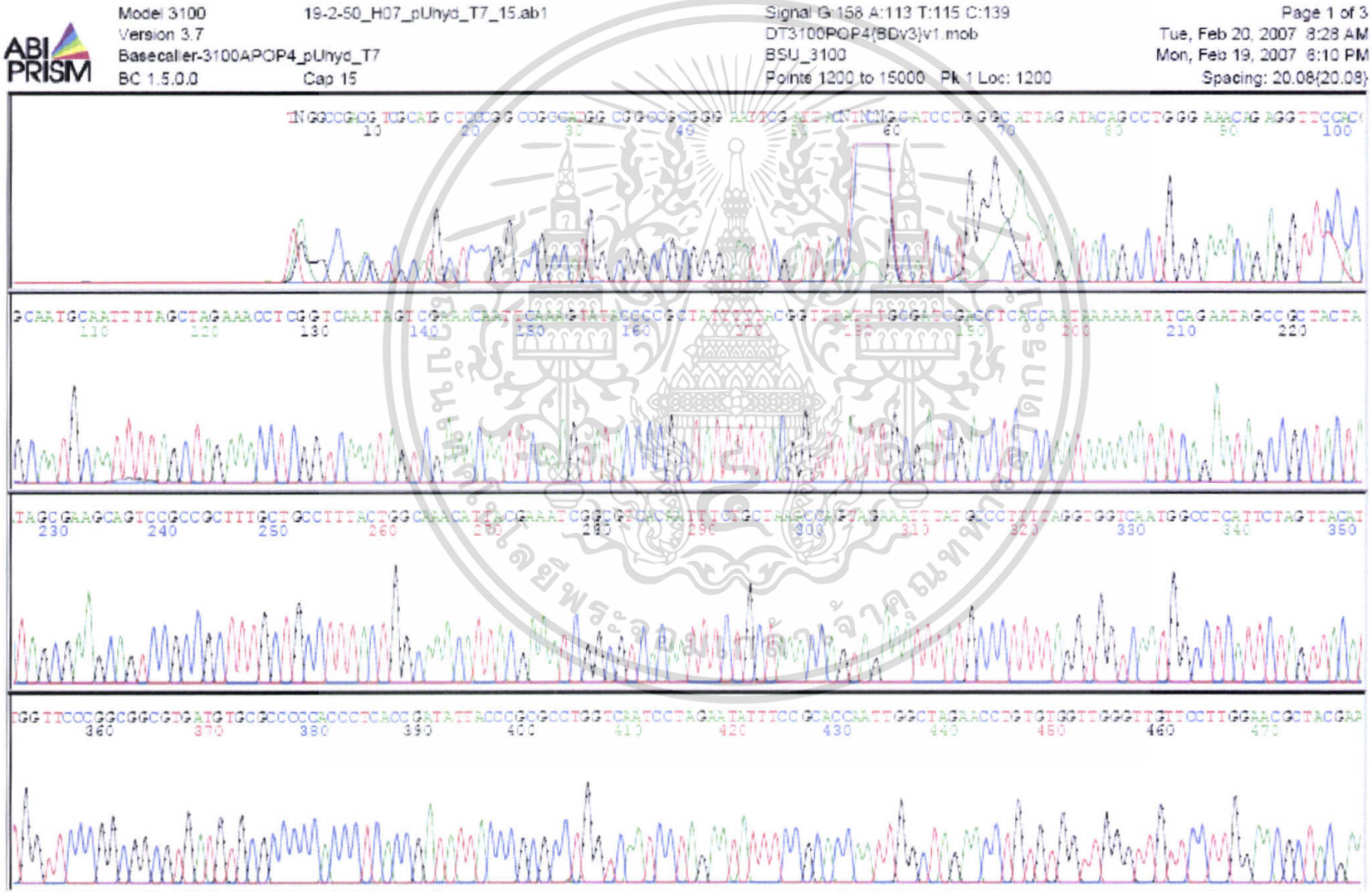
pGEM-T Easy

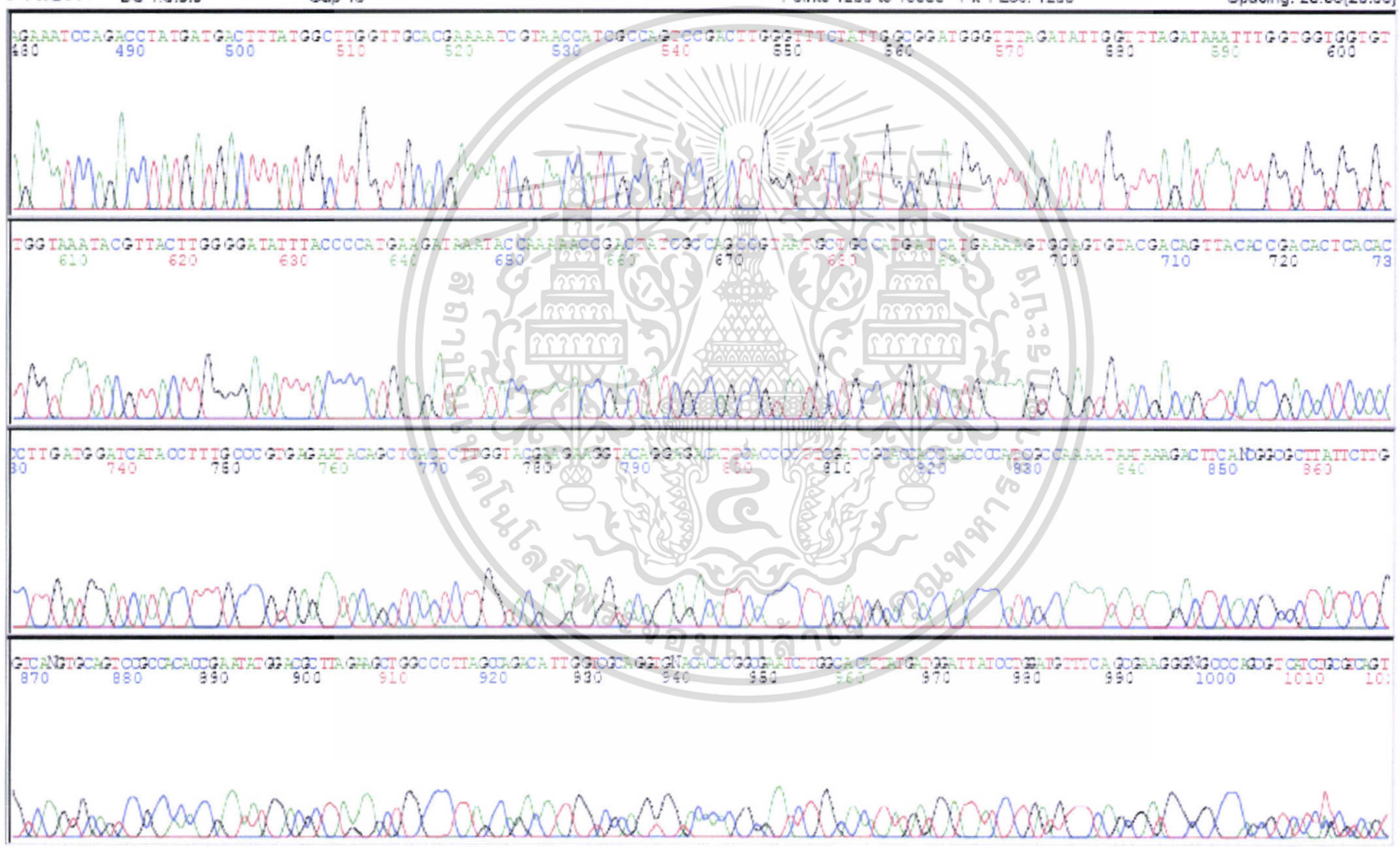


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสโดยใช้เวคเตอร์ pGEM-T Easy




ABI PRISM
Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP4_pUhyd_T7
BC 1.5.0.0
19-2-50_H07_pUhyd_T7_15.ab1
Cap 15
Signal G:158 A:113 T:115 C:139
DT3100POP4{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 1200 to 15000 Pk 1 Loc: 1200
Page 2 of 3
Tue, Feb 20, 2007 8:28 AM
Mon, Feb 19, 2007 6:10 PM
Spacing: 20.08{20.08}