

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการถอดรหัสของยีน *nifHDK*  
ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

NUCLEOTIDE SEQUENCING AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF  
*nifHDK* GENES IN THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM  
*ANABAENA SIAMENSIS*

ชุตินา ภาพสิงห์  
CHUTIMA PAPSING

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการถอดรหัสของยีน *nifHDK*  
ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis*

NUCLEOTIDE SEQUENCING AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF  
*nifHDK* GENES IN THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM  
*ANABAENA SIAMENSIS*

ชุตินา ภาพสิงห์  
CHUTIMA PAPSING

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2550

NUCLEOTIDE SEQUENCING AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF  
*nifHDK* GENES IN THE NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIUM  
*ANABAENA SIAMENSIS*

CHUTIMA PAPSING

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

**COPYRIGHT 2007**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการถอดรหัสของยีน <i>nifHDK</i> ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i>
นักศึกษา	นางสาวชุตินา ภาพสิงห์
รหัสประจำตัว	46063421
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์

### บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรียจัดอยู่ในกลุ่มโปรคาริโอต ที่สามารถผลิตออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง ภายใต้สภาวะการขาดแหล่งไนโตรเจน ไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ เอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน โดยเร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย จัดเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคไนโตรจีเนสรีดักทีสซึ่งถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* และเอนไซม์ไคไนโตรจีเนสที่ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีนและศึกษาคุณลักษณะของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีน *nifD* และ *hupL* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ *A. siamensis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย แยกได้จากนาข้าวในประเทศไทยและมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง ในงานวิจัยนี้ เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหารสูตร BG11 เก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ นำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* มาเพิ่มปริมาณยีน *nifHDK* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์อนุรักษ์ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive หรือ pGEM-T Easy จากนั้น ทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการสร้างสีด้วย X-gal และ IPTG ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน จากการทดลองพบว่า *A. siamensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ขนาด 888, 1,500 และ 1,536 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีน *nifH* ถอดและแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 295 ตัวที่มีขนาด 32.2 กิโลดาลตัน ยีน *nifD* ถอดและแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 499 ตัวที่มีขนาด 55.8 กิโลดาลตัน และยีน *nifK* ถอดและแปลรหัสได้

กรดอะมิโนจำนวน 511 ตัวที่มีขนาด 56.9 กิโลดาลตัน โดยลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่ได้มีความคล้ายคลึงกันสูงกับโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของไซยาโนแบคทีเรียเส้นสายที่ตรึงไนโตรเจนอื่นๆ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* ของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า *A. siamensis* มีระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และ *hupL* ในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) ภายใต้สภาวะการชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์และสารละลายโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ รวมถึงการชักนำภายใต้สภาวะปราศจากอากาศด้วยก๊าซอาร์กอน

<b>Thesis</b>	Nucleotide Sequencing and Transcriptional Analysis of <i>nifHDK</i> genes in the Nitrogen-Fixing Cyanobacterium <i>Anabaena siamensis</i>
<b>Student</b>	Miss Chutima Papsing
<b>Student ID</b>	46063421
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Biotechnology
<b>Year</b>	2007
<b>Thesis Advisor</b>	Assist. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

### ABSTRACT

Cyanobacteria comprise a diverse group of photosynthetic prokaryotes with oxygen-evolving photosynthesis similar to that of higher plants. In a depletion of nitrogen source, some species of cyanobacteria are capable of fixing atmospheric nitrogen. Nitrogen fixation is catalyzed by the enzyme nitrogenase complex. It catalyzes the reduction of atmospheric nitrogen to ammonia and is a metalloenzyme composed of two proteins: dinitrogenase reductase encoded by *nifH* and dinitrogenase encoded by *nifD* and *nifK*. This study aims to clone and characterize *nifHDK* genes of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* and study gene expression of *nifD* and *hupL* under different cultivation and induction conditions. *A. siamensis* is a filamentous cyanobacterium isolated from the rice paddle field in Thailand and shows the high capability of nitrogen fixation. In this study, *A. siamensis* was cultivated in BG11 medium and genomic DNA was isolated. The *nifHDK* genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the conserved primers using genomic DNA of *A. siamensis* as a template. The PCR products were ligated to plasmid pDrive or pGEM-T Easy and the recombinant plasmids were transformed into the competent cells *E. coli* DH5 $\alpha$ . Transformants were selected on the ampicillin containing LB agar and from the color reaction with X-gal and IPTG. Plasmid DNAs were isolated and sequenced. Their amino acid sequences were compared to other amino acid sequences reported in GenBank. It was found that *A. siamensis nifH*, *nifD* and *nifK* contained 888, 1,500 and 1,536 bp, respectively. The predicted gene products for *nifH*, *nifD* and *nifK* consisted of 295 amino acids with a molecular mass of 32.2 kDa, 499 amino acids with a molecular mass of 55.8 kDa and 511 amino acids with a molecular mass of 56.9 kDa, respectively. Their deduced amino acid sequences showed higher than 83% similarity for NifHDK compared to those of the

filamentous heterocystous cyanobacteria. In addition, transcriptional analysis of *A. siamensis nifD* and *hupL* was studied by RT-PCR. It was shown that higher transcription level of *nifD* and *hupL* was found in *A. siamensis* grown in BG11<sub>0</sub> medium. Higher transcription level of *nifD* and *hupL* was also found when induced with 25 and 8  $\mu\text{M}$  of iron and molybdenum solution, respectively including anaerobic adaptation by argon.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์ ในการให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา รวมทั้งการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ. รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาใช้เวลาตรวจสอบและให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวก และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนครอบครัว ที่ให้ความรักและกำลังใจ รวมถึงการสนับสนุนทางด้านการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ชุตินา ภาพสิงห์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญรูป.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การตรึงไนโตรเจน.....	5
2.2 เอนไซม์ในโตรจีเนส.....	6
2.3 ยีนในโตรจีเนส.....	9
2.4 ไชยาโนแบคทีเรีย.....	11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	21
3.2 สารเคมี.....	21
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	21
3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ.....	21
3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม.....	22
3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	22
3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์.....	22

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมี ผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด .....	22
3.2.7 ชุดทดสอบ (kit).....	23
3.3 อุปกรณ์ .....	23
3.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย.....	24
3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> .....	24
3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>E. coli</i> .....	24
3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในโครโมโซมใน <i>A. siamensis</i> .....	24
3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. siamensis</i> .....	24
3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส .....	25
3.5.3 การออกแบบไพรเมอร์ .....	25
3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน .....	26
3.5.5 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....	27
3.5.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (Ligation) .....	27
3.5.7 การเตรียม Competent cell.....	28
3.5.8 การทรานสฟอร์มเมชัน.....	28
3.5.9 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม .....	28
3.5.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis) .....	29
3.5.11 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	29
3.5.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	29
3.6 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนในโครโมโซมด้วยเทคนิค RT-PCR.....	30
3.6.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> ภายใต้สภาวะการชักนำ แบบต่างๆ .....	30
3.6.2 การสกัด total RNA ของ <i>A. siamensis</i> .....	31
3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA .....	32
3.6.4 การย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI.....	32

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.6.5 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	33
3.6.6 การสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA <i>nifD</i> และยีน <i>hupL</i> ด้วย เอนไซม์ Reverse Transcriptase .....	34
3.6.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ยีน <i>nifD</i> และยีน <i>hupL</i> ด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	34
3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools...	35
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	36
4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสไนไซยาโนแบคทีเรียครึ่ง ไนโตรเจน <i>A. siamensis</i> .....	36
4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> .....	36
4.1.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนไนโตรจีเนส .....	38
4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส .....	44
4.1.4 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ .....	47
4.1.5 ผลการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ pDrive หรือ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ .....	48
4.1.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยค่า่าง (Alkali lysis) .....	49
4.1.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	49
4.1.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 .....	51
4.1.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>nifUHDK</i> ของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> .....	52
4.1.10 ผลการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน NifHDK ของ <i>A. siamensis</i> .....	60
4.2 ผลการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิค RT-PCR .....	66

## สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่มี และขาดแหล่งไนโตรเจน.....	66
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการ เพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยเหล็กปริมาณต่างๆ .....	76
4.2.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการ เพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ.....	85
4.2.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการ เพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซ .....	94
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง .....	104
5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตรึง ไนโตรเจน <i>A. siamensis</i> .....	104
5.2 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิค RT-PCR.....	105
บรรณานุกรม .....	106
ภาคผนวก ก .....	114
ภาคผนวก ข .....	117
ประวัติผู้เขียน.....	118

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 องค์ประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>nifU-H</i> , <i>nifH-D</i> , <i>nifD-K</i> และ <i>nifK</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	26
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>nifU-H</i> , <i>nifH-D</i> , <i>nifD-K</i> และ <i>nifK</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	27
3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	33
3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	33
3.5 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ยีน <i>nifD</i> และยีน <i>hupL</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	35
3.6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ยีน <i>nifD</i> และยีน <i>hupL</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาหลูกโซ่พอลิเมอเรส .....	35
4.1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifHDK</i> ในไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> .....	45
4.2 ขนาดของยีน <i>nifHDK</i> ของไซยาโนแบคทีเรีย <i>A. siamensis</i> และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น .....	58
4.3 ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifHDK</i> ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น .....	59
4.4 ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifHDK ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น.....	60
4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifH ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น .....	63
4.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifD ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น .....	64
4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifK ของ <i>A. siamensis</i> กับไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น .....	65

## สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8	
ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA (RT-reaction) และปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนของ cDNA ด้วยเทคนิค	
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR).....	67

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส .....	7
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับเอนไซม์อะพเทคไฮโดรจีเนส .....	8
2.3 โครงสร้างของ <i>nifregulon</i> ใน <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	12
2.4 ลักษณะเส้นสายของ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 ที่เจริญในสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจน (+N) และไม่มีแหล่งไนโตรเจน (-N) .....	14
2.5 รูปร่างของ <i>A. siamensis</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 3,500 เท่า .....	16
3.1 แผนภาพแสดงการออกแบบเวกเตอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>nifU</i> , <i>nifH</i> , <i>nifD</i> และ <i>nifK</i> .....	26
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. siamensis</i> จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ .....	37
4.2 แผนภาพแสดงการจัดเรียงลำดับของยีน <i>nifU</i> , <i>nifH</i> , <i>nifD</i> และ <i>nifK</i> และตำแหน่งของไพรมอร์จากการออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>nifHDK</i> .....	38
4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifU</i> ของ <i>Anabaena azollae</i> , <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 และ <i>Anabaena variabilis</i> .....	40
4.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifH</i> ของ <i>Anabaena azollae</i> , <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 และ <i>Anabaena variabilis</i> .....	41
4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifD</i> ของ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. PCC 7108, <i>Anabaena variabilis</i> และ <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 .....	42
4.6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>nifK</i> ของ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. และ <i>Anabaena variabilis</i> .....	43
4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของเวกเตอร์ U2-H2 (ก) H1-D4 (ข) D1-K1 (ค) และ K4-K6 (ง) เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>A. siamensis</i> เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ .....	46
4.8 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ .....	48
4.9 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 จากการสกัดด้วยต่าง .....	50
4.10 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	51
4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>nifU</i> บางส่วนและยีน <i>nifHDK</i> ของ <i>A. siamensis</i> .....	53

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ <i>A. siamensis</i> จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน.....69
4.13	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน.....70
4.14	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน .....72
4.15	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน .....73
4.16	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ .....75
4.17	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ .....76
4.18	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ <i>A. siamensis</i> จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ .....78
4.19	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ .....80
4.20	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ .....81
4.21	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ .....82
4.22	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลาย เหล็กปริมาณต่างๆ .....84
4.23	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลาย เหล็กปริมาณต่างๆ .....85
4.24	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ <i>A. siamensis</i> จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ .....87

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.25	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ .....88
4.26	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ ที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ.....90
4.27	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ ที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ.....91
4.28	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม ปริมาณต่างๆ .....93
4.29	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม ปริมาณต่างๆ .....94
4.30	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ <i>A. siamensis</i> จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ.....96
4.31	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ สภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ .....97
4.32	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ ที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ.....99
4.33	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ ที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ.....100
4.34	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>nifD</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ.....102
4.35	ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hupL</i> เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ.....103

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ด้วยเหตุที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม การพัฒนากระบวนการผลิตและการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ปุ๋ยจัดเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่ช่วยให้พืชได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอ และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดิน ส่งผลให้ผลผลิตทางการเกษตรมีปริมาณมากขึ้น ในปัจจุบัน รัฐบาลสนับสนุนและส่งเสริมให้เกษตรกรนำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี เนื่องจากปุ๋ยชีวภาพเป็นปุ๋ยที่ได้มาจากธรรมชาติ สามารถนำไปใช้เพิ่มผลผลิตทางการเกษตรโดยไม่ทำให้มีสารเคมีตกค้าง จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในทางเกษตรกรรม ได้มีการนำไซยาโนแบคทีเรียมาใช้เป็นวัตถุคิบเพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพ และเป็นแหล่งอาหารให้แก่พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นิยมใช้ปุ๋ยชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียในการเพาะปลูกข้าว เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำหรือที่ชื้นแฉะ และมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ โดยเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปสารประกอบแอมโมเนียด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส แอมโมเนียที่ผลิตขึ้นนี้จะเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ เมื่อไซยาโนแบคทีเรียตายลงยังเป็นแหล่งแร่ธาตุให้แก่ดิน ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น

เอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ (nitrogenase complex) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส (dinitrogenase reductase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* และเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส (dinitrogenase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* มีรายงานการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena cylindrica* (Smith and Evans. 1970 ; 1971) *Anabaena flos-aquae* (Bone. 1971a ; 1971b) *Anabaena* sp. L-31 (Thomas and David. 1972) *Anabaena inaequalis* (Stratton et. al. 1979 ; Stratton and Corke. 1979) *Mastigocladus laminosus* (Miyamoto et. al. 1979) *Anabaena variabilis* Kutz (Hawkesford et. al. 1981) *Plectonema boryanum* (Hawkesford et. al. 1982) *Anabaena* sp. PCC 7120 (Privalle and Burris. 1983) และศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจีเนสใน *A. cylindrica* (Hallenbeck et. al. 1979) ต่อมาได้มีรายงานวิจัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสใน *Anabaena* sp. PCC 7120

(Mevarech et. al. 1980 ; Lammers and Haselkorn. 1983) *Anabaena* sp. L-31 (Murphy et. al. 1993) *Nostoc* sp. PCC 6720 (Beesley et. al. 1994) *Synechococcus* sp. RF-1 (Chen et. al. 1996) *A. variabilis* (Thiel et. al. 1997) และ *Trichodesmium* sp. IMS101 (Dominic et. al. 1998) นอกจากนี้ ได้มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนสในระดับ mRNA ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. variabilis* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน (Helber et. al. 1988a) และภายใต้สภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรท กลูตามีนและกลูตามेट (Helber et. al. 1988b) ศึกษาการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนสใน *A. variabilis* ATCC 29413 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (Wealand et. al. 1989) และใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ (Golden et. al. 1991)

ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้สนใจศึกษายีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินนาของประเทศไทย สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูงและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่มีแสงจำกัด นอกจากนี้ ได้มีรายงานการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ขนาดใหญ่เพื่อใช้ผลิตปุ๋ยสำหรับการเพาะปลูกข้าว (Boussiba. 1993) การศึกษายีนไนโตรจีเนสใน *A. siamensis* เริ่มต้นจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ไนโตรจีเนสรีดักเทส (*nifH*) และยีน *nifDK* ไนโตรจีเนส (*nifDK*) เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน การทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้จะนำไปสู่การศึกษาและเปลี่ยนแปลงยีนในอนาคต เพื่อใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่นให้สามารถตรึงไนโตรเจนในปริมาณที่สูงขึ้น นอกจากนี้ ยังสนใจที่จะศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ โดยระดับการถอดรหัสของยีนจะเป็นตัวกำหนดกิจกรรมของเอนไซม์ นั่นคือ หากมีการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสในระดับสูง กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสก็สูงขึ้นด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และปัจจัยที่มีผลต่อระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนส จึงเป็นแนวทางเริ่มต้นในการพัฒนาไซยาโนแบคทีเรียให้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้มากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* และวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และ *hupL* ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ภายใต้สภาวะการ

เพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ เพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย และชักนำยีนไนโตรจีเนสให้ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสในปริมาณสูง

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในสูตรอาหาร BG11 เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยง นำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน *nifHDK* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน *nifHDK* ที่ได้ทำการออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์อื่น จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive หรือ pGEM-T Easy ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ X-gal และ IPTG นำทรานสฟอร์มแมนท์มาเพาะเลี้ยงและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมและแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน นอกจากนี้ ยังศึกษาอัตราการถอดรหัสของยีน *nifD* ยีน *hupL* และยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ ได้แก่ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน สภาวะการชักนำด้วยธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนและอาร์กอน โดยเริ่มจากการสกัด total RNA นำ total RNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยาสร้างสาย cDNA ของยีน *nifD* ยีน *hupL* และยีน 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase เพิ่มปริมาณยีน *nifD* ยีน *hupL* และยีน 16S rDNA จากสาย cDNA ที่ได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเปรียบเทียบระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* กับระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงและเจริญเติบโตได้ดีในนาข้าวประเทศไทย เพื่อนำไปใช้เป็นองค์ความรู้ใหม่และให้ผู้อื่นสนใจนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้อ้างอิงต่อไป นอก

จากนี้ ยังทำให้ทราบสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการชักนำเพื่อให้ไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจากอากาศมากขึ้น ผลที่ได้จะเป็นแนวทางเริ่มต้นในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียเพื่อให้ตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณสูง สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การตรึงไนโตรเจน

ในบรรยากาศของโลก ก๊าซไนโตรเจนจัดเป็นก๊าซที่มีปริมาณมากที่สุด โดยทั่วไปก๊าซไนโตรเจนจะอยู่ในรูปที่ไม่ทำปฏิกิริยา เนื่องจากไนโตรเจน 2 อะตอมเชื่อมต่อกันด้วยพันธะสาม จึงทำให้โมเลกุลมีความเสถียรมาก ต้องใช้พลังงานสูงถึง 946 กิโลจูลต่อโมลในการแยกไนโตรเจนอะตอมออกจากกัน (Dixon and Wheeler. 1986) สิ่งมีชีวิตบนโลกทั้งพืชและสัตว์จึงไม่สามารถใช้ไนโตรเจนจากบรรยากาศโดยตรงได้ ดังนั้น พืช สัตว์และจุลินทรีย์ต่างจำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนในรูปที่ถูกตรึง การตรึงไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศสามารถเกิดขึ้นได้ในปริมาณเล็กน้อยจากการเกิดฟ้าแลบ-ฟ้าผ่า คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด ในขณะที่การตรึงไนโตรเจน 85 เปอร์เซ็นต์บนโลกเกิดจากจุลินทรีย์จำพวกโปรคาริโอตประเภทต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา แอคติโนมัยซิสต์ รวมถึงไซยาโนแบคทีเรีย การตรึงไนโตรเจนจากจุลินทรีย์เหล่านี้จัดเป็นการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (biological nitrogen fixation) เนื่องจากมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนีย กลไกการเกิดปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถเขียนได้ดังสมการที่ 1



ตัวอย่างของแบคทีเรียประเภทต่างๆ ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ได้แก่ แบคทีเรียที่เจริญในสถานะที่ไม่มีอากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อย เช่น *Azotobacter* sp. และ *Beijerinckia* sp. แบคทีเรียที่เจริญในสถานะที่ไม่มีอากาศ *Clostridium pasteurianum* และแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง เช่น *Chromatium* sp., *Rhodospirillum* sp. และ *Rhodobacter* sp. รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียหลายกลุ่มที่พบว่ามีความสามารถตรึงไนโตรเจน ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายสร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Anabaena* sp. และ *Nostoc* sp. ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Trichodesmium* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Plectonema* sp. ไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Gloeothece* sp. และ *Synechococcus* sp. เป็นต้น

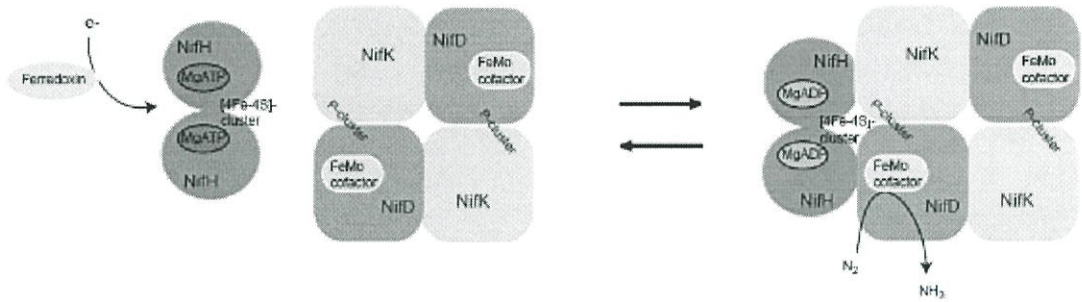
จากคุณสมบัติของจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ทำให้มีการนำเอาจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ในต่างประเทศมีการนำปุ๋ยชีวภาพมาใช้เพื่อปรับปรุงดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา และออสเตรเลียมีการใช้ไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว ในประเทศอินเดียมีการทดลอง

ใช้ *Azotobacter chroococcum* กับพืชหลายชนิด เช่น ข้าวเจ้า มะเขือเทศ กะหล่ำปลี ส่วนในประเทศไทย ได้มีการนำปุ๋ยชีวภาพมาใช้กับพืชเศรษฐกิจโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับข้าว นอกจากนี้ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ยังได้คิดค้นการผลิตปุ๋ยชีวภาพทางการค้าจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีชื่อว่า “อัลจินัว” ซึ่งประกอบด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหลายชนิด ได้แก่ *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Hapalosiphon* sp., *Nostoc* sp., *Scytonema* sp. และ *Tolypothrix* sp. ไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้ล้วนแต่ใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนสในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศและได้ผลผลิตเป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่พืชต่อไป

## 2.2 เอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนส (EC 1.18.6.1) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ จัดเป็นเอนไซม์คอมเพลกซ์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด เอนไซม์ชนิดที่ 1 คือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบ (Fe-protein) ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อยที่มีขนาดเท่ากัน ( $\gamma_2$  homodimer) มีขนาดประมาณ 60 ถึง 70 กิโลดาลตัน โดยหน่วยย่อยทั้งสองจะเข้าจับกับ 4Fe-4S cluster 1 ชุด นอกจากนี้ ในแต่ละหน่วยย่อยยังจับกับ Mg-ATP 1 บริเวณ (รูปที่ 2.1) เอนไซม์ชนิดที่ 2 คือ เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ (MoFe-protein) จึงสามารถเรียกชื่อเอนไซม์ชนิดนี้อีกชื่อหนึ่งว่าโมลิบดีนัมไดไนโตรจีเนส ประกอบด้วยโปรตีน 4 หน่วยย่อยที่แตกต่างกัน แบ่งเป็น  $\alpha$  2 หน่วยย่อย และ  $\beta$  2 หน่วยย่อย ( $\alpha_2\beta_2$  heterotetramer) มีขนาดประมาณ 220 ถึง 250 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสแต่ละหน่วยย่อยจะมี P-cluster และศูนย์กลางโคแฟกเตอร์ FeMoco (7FeMo9S) โดย P-cluster หรือศูนย์กลาง 8Fe-7S ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นช่องทางขนส่งอิเล็กตรอนที่มาจาก 4Fe-4S cluster ของ Fe-protein และส่งต่ออิเล็กตรอนให้กับศูนย์กลาง FeMoco ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดิวซ์ไนโตรเจนขึ้นภายในศูนย์กลางของโคแฟกเตอร์ FeMoco (รูปที่ 2.1) (Triplett, 2000)

เอนไซม์ไนโตรจีเนสที่พบในไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 เอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส (Molybdenum nitrogenase) ชนิดที่ 2 เอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนส (Vanadium nitrogenase) และชนิดที่ 3 เอนไซม์เหล็กไนโตรจีเนส (Iron nitrogenase) เอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนสและเหล็กไนโตรจีเนสจัดเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสทางเลือก (alternative nitrogenase) โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสทางเลือกนี้จะไม่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อมีโมลิบดีนัมที่เพียงพอแต่จะช่วยส่งเสริมกลไกการตรึงไนโตรเจน

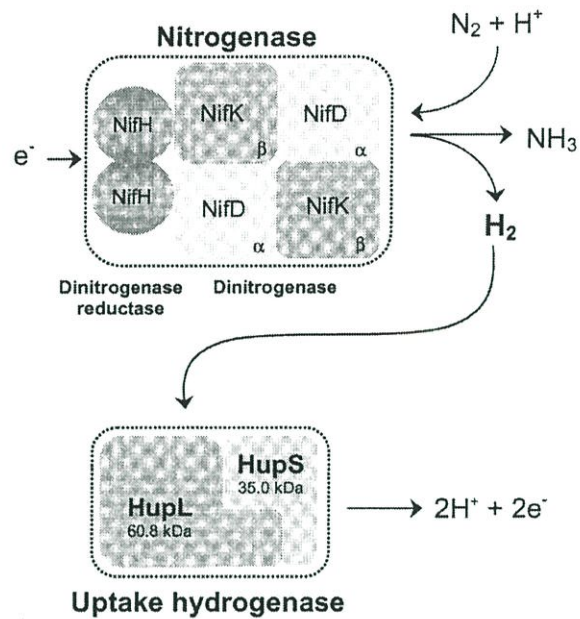


รูปที่ 2.1 องค์ประกอบและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ที่มา : Lindberg, 2003

อย่างต่อเนื่องในสภาวะที่มีโมลิบดีนัมจำกัด เมื่อนำเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส เอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนส และเอนไซม์เหล็กไนโตรจีเนส มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียพบว่า เอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์สูงกว่าเอนไซม์ไนโตรจีเนสชนิดอื่น รองลงมาคือเอนไซม์วานาเดียมไนโตรจีเนส และเอนไซม์ที่จริงไนโตรเจนได้น้อยที่สุดคือเหล็กไนโตรจีเนส (Joerger and Bishop, 1988 ; Miller and Eady, 1988)

ปฏิกิริยารีดิวซ์ไนโตรเจนไปเป็นสารประกอบแอมโมเนียของเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นแรก Fe-protein 2 หน่วยย่อยของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสจะถูกรีดิวซ์โดยตัวให้อิเล็กตรอนเฟอร์รีดอกซินหรือฟลาวอดอกซิน Fe-protein ในสภาพรีดิวซ์จะเคลื่อนที่ไปจับกับ FeMo-protein ของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปคอมเพลกซ์ ต่อมา Mg-ATP ทั้งสองของ Fe-protein จะสลายพลังงานจาก ATP เพื่อนำพลังงานที่ได้ไปใช้ในการขนส่งอิเล็กตรอนให้แก่ FeMo-protein โดยผ่านทาง P-cluster (8Fe-7S) จากนั้น Fe-protein ที่จับกับ FeMo-protein ในรูปคอมเพลกซ์เกิดการแยกออกและมีการปลดปล่อย ADP ออกมา ทำให้ Fe-protein เป็นอิสระและสามารถถูกรีดิวซ์ได้อีกครั้ง (Rees and Howard, 2000) ขั้นตอนที่ 2 FeMo-protein จะทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียตรงบริเวณศูนย์กลาง FeMoco (Bryant, 1994 ; Masepohl et. al. 1997) ปฏิกิริยาของกระบวนการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นซ้ำๆ กัน 8 รอบ จนกระทั่งได้อิเล็กตรอนเพียงพอในการส่งต่ออิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลของไนโตรเจน และเกิดผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย พร้อมกับการรีดิวซ์โปรตอนไปเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน โดยปฏิกิริยานี้จะใช้พลังงานอย่างน้อย 16 ATP ดังแสดงในสมการที่ 1 ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน จะเข้าสู่กระบวนการออกซิเดชันของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนโดยเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส (รูปที่ 2.2)



**รูปที่ 2.2** ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไนโตรจีเนสกับเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส  
ที่มา : Tamagnini et. al. 2002

นอกจากนี้ เอนไซม์ไนโตรจีเนสยังสามารถรีดิวซ์สารประกอบอื่นๆ ได้ เช่น อะเซทิลีน ไฮโดรเจนเอไซด์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ หรือ ไนตรัสออกไซด์ เป็นต้น จากคุณสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่สามารถรีดิวซ์อะเซทิลีน ( $C_2H_2$ ) ไปเป็นเอทิลีน ( $C_2H_4$ ) จึงทำให้ในปัจจุบันสามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสทางอ้อมด้วยวิธีวัดการรีดิวซ์ก๊าซอะเซทิลีน (Acetylene reduction assay) มีรายงานการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *A. cylindrica* (Smith and Evans. 1970 ; 1971) *A. flos-aquae* (Bone. 1971a ; 1971b) *Anabaena* sp. L-31 (Thomas and David. 1972) *A. inaequalis* (Stratton et. al. 1979 ; Stratton and Corke. 1979) *M. laminosus* (Miyamoto et. al. 1979) *A. variabilis* Kutz (Hawkesford et. al. 1981) *P. boryanum* (Hawkesford et. al. 1982) *Anabaena* sp. PCC 7120 (Privalle and Burris. 1983)

การตรึงไนโตรเจนของไซยาโนแบคทีเรียจะถูกจำกัดโดยออกซิเจนที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส นอกจากนี้ การตรึงไนโตรเจนจะลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน เช่น ไนเตรท แอมโมเนีย และ กรดอะมิโน ฯลฯ โดยปกติแอมโมเนียที่ผลิตขึ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะไม่กีดกันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่หากมีแอมโมเนียมากเกินไป แอมโมเนียจะไปกีดกันการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการสูญเสียพลังงาน ATP โดยไม่สร้างผลิตภัณฑ์ขึ้นในสถานะที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอ ในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกควบคุมโดยแอมโมเนีย เรียกแอมโมเนียนี้เป็น “ตัวปิด (switch-off)” แอมโมเนียที่มีมากเกินไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโควาเลนต์

ของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส เมื่อมีแอมโมเนียในปริมาณน้อย เอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสจะกลับมาทำงานอีกครั้ง และผลิตแอมโมเนียอย่างรวดเร็ว

## 2.3 ยีนไนโตรจีเนส

เอนไซม์ไนโตรจีเนสคอมเพลกซ์ ประกอบด้วยเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* (*nif* มาจาก nitrogen fixation) และเอนไซม์ไดไนโตรจีเนส 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อย  $\alpha$  และ  $\beta$  ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK* ตามลำดับ ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. variabilis* ATCC 29413 มียีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนส 2 ชุด คือ *nif1* และ *nif2* โดยการแสดงออกของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากยีน *nif1* สามารถพบเฉพาะในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ส่วนการแสดงออกของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากยีน *nif2* สามารถพบได้ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์เฮเทอโรซิสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (Schrautemeier et. al. 1995 ; Thiel et. al. 1995 ; 1997) นอกจากนี้เอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสแล้ว ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์วานเดียมไนโตรจีเนสใน *A. variabilis* ATCC 29413 (Kentemich et al. 1988) และพบว่าเอนไซม์วานเดียมไนโตรจีเนสสามารถรีงไนโตรเจนและรีดิวซ์อะเซทิลีนในสภาวะที่มีโมลิบดีนัมจำกัด โดยเอนไซม์นี้ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *vnfDGK* (Thiel. 1993) นอกจากนี้ ยังพบการแสดงออกของเอนไซม์เหล็กไนโตรจีเนสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *anf* ใน *A. variabilis* ATCC 29413 อีกด้วย (Kentemich et. al. 1991 ; Stacey et. al 1992) สำหรับไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 ไม่พบยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์วานเดียมไนโตรจีเนส (Thiel. 1993) ในแบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* พบยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนส เอนไซม์วานเดียมไนโตรจีเนสและเอนไซม์เหล็กไนโตรจีเนส (Premakumar et. al. 1992 ; Walmsley et. al. 1994)

ในปี ค.ศ. 1980 Mevarech และคณะได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทสจำนวน 900 คู่เบสและเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ของแบคทีเรีย *C. pasteurianum* และแบคทีเรีย *A. vinelandii* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนซิสเทอีนที่น่าจะเป็นกรดอะมิโนอนุรักษ์ตรงกัน 5 ตำแหน่งทางด้านปลาย N (N-terminal) ต่อมา ได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* และ *nifK* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสหน่วยย่อย  $\alpha$  และ  $\beta$  ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ายีน *nifD* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,443 คู่เบส แปลเป็น

กรดอะมิโนได้ 480 ตัว และมีกรดอะมิโนซีสเทอีนอนุรักษ์ 5 ตัว (Lammers and Haselkorn. 1983) ยีน *nifK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,539 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 512 ตัว และมีกรดอะมิโนซีสเทอีนอนุรักษ์ 3 ตัว (Mazur and Chui. 1982) ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสชุดที่ 1 (*nifI*) ของ *A. variabilis* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifI* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifI* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ (Brusca et. al. 1989) ต่อมา Thiel และคณะ (1997) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสชุดที่ 2 (*nif2*) ใน *A. variabilis* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH2*, *nifD2* และ *nifK2* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ชุดที่ 1 ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 79, 80 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ใน *Anabaena* sp. L-31 โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ใน *Anabaena* sp. L-31 มีความเหมือนและความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 91 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Murphy et. al. 1993)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. PCC 6720 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *nifU*, *nifD* และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *nifH* ของ *Nostoc* sp. PCC 6720 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU*, *nifH* และ *nifD* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena* sp. L-31 สูง แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *nifU* และ *nifH* จะมีสองบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ ที่เหมือนกันและมีการเรียงตัวแบบสั้น (short tandem repetitive repeat sequences; STRRs) ซึ่งแตกต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบใน *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena* sp. L-31 (Beesley et. al. 1994) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Synechococcus* sp. RF-1 พบว่ายีน *nifH* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 891 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 296 ตัว ยีน *nifD* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,431 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 476 ตัว และยีน *nifK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,539 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 512 ตัว และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ามีความเหมือนถึง 76.7, 77.3 และ 69.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Chen et. al. 1996)

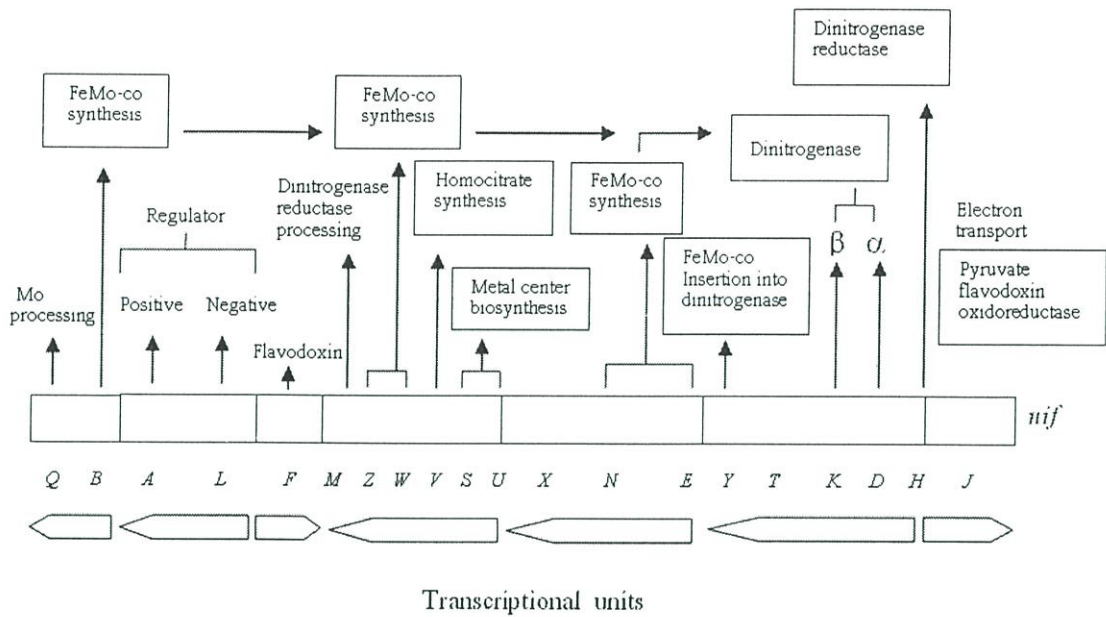
ในปัจจุบัน นักวิจัยได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งจีโนมในไซยาโนแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายสร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (*Nostoc punctiforme* ATCC 29133) ไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Spirulina platensis* และไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus* WH8102, *Gloeobacter* sp. PCC 7421 และ *Microcystis aeruginosa* เป็นต้น การทราบลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งจีโนมในสิ่งมีชีวิต ทำให้ทราบว่ามิไซยาโนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มียีนไนโตรจีเนสมากกว่า 1 ชุด เช่น มิไซยาโนแบคทีเรีย *N. punctiforme* PCC 73102 มียีน *nifH* ถึง 3 ชุด (Thiel and Pratte, 2001 ; [http://www.jgi.doe.gov/JGI\\_microbial/html/nostoc/nostoc\\_homepage.html](http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/nostoc/nostoc_homepage.html)) จนกระทั่งถึงปัจจุบัน มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในมิไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เช่น มิไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Trichodesmium* sp. IMS101 (Dominic et. al. 1998) มิไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว *Cyanothece* sp. PCC 51142 (Colón-López et. al. 1999) มิไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายสร้างเฮเทอโรซิสต์ *Calothrix desertica*, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6718 (Henson et. al. 2002) และ *Tolypothrix* sp. PCC 7101 (Steward et. al. 2004) มิไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ *Oscillatoria sancta* PCC 7515 และ *Symploca atlantica* PCC 8002 (Steward et. al. 2004)

ในแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ยีนใดไนโตรจีเนสรีดักเทส (*nifH*) และยีนใดไนโตรจีเนส (*nifDK*) จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ร่วมกับ accessory gene ต่างๆ ที่ทำหน้าที่ช่วยในการตรึงไนโตรเจน กลุ่มของยีนนี้รวมเรียกว่า *nif* regulon (รูปที่ 2.3) ดีเอ็นเอของ *nif* regulon ใน *K. pneumoniae* มีขนาดประมาณ 24 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน 20 ชนิด ที่จัดเรียงตัวใน transcriptional unit ต่างๆ โดยโคแฟกเตอร์ FeMoco จะถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยผ่านยีนหลายๆ ยีนซึ่งประกอบด้วยยีน *nifN*, *nifV*, *nifZ*, *nifW*, *nifE* และ *nifB* รวมถึง *nifQ* ซึ่งจะควบคุมเฉพาะกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของโมลิบดีนัมเท่านั้น (รูปที่ 2.3) โปรตีน NifA เป็นโปรตีนควบคุมในเชิงบวก (positive regulatory protein) ที่ช่วยกระตุ้นการถอดรหัสของยีน *nif* อื่นๆ แต่จะถูกกดคั้นโดยโปรตีน NifL จะเห็นได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีการควบคุมอย่างเป็นระบบที่แน่นอนและมีการร่วมกันควบคุมการทำงานจากยีนทั้งหมด

## 2.4 มิไซยาโนแบคทีเรีย

มิไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทโพรคาริโอต (prokaryote) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียคือ มิไซยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์แสงและมีการปลดปล่อยออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสง มิไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุคลอโรฟิลล์ เอ และ แคโรทีนอยด์ เมื่อพิจารณาถึงรูปร่างของมิไซยาโนแบคทีเรียพบว่ามีรูปร่างหลายแบบ เช่น มีรูปร่างเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) มิไซยาโนแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ทั้งน้ำจืด น้ำทะเล น้ำพุร้อน อาจอยู่แบบอิสระหรืออยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ *nif* regulon ใน *Klebsiella pneumoniae*

ที่มา : Madigan et. al. 1997

ไซยาโนแบคทีเรียมีลักษณะที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรียมีรงควัตถุที่ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ แครโรทีนอยด์ประเภทแคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน ( $\beta$ -carotene) ประเภทแซนโทฟิลล์ ได้แก่ มิกโซแซนทิน (myxoxanthin) มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) ซีอาแซนทิน (zeaxanthin) และไฟโคบิลินซึ่งมีอยู่ 4 ชนิดในไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ ซีไฟโคไซยานิน (c-phycoyanin) ซีอัลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycoyanin) ไฟโคอีรีทรไซยานิน (phycoerythrocyanin) และซีไฟโคอีรีทริน (c-phycoerythrin)

2. ผนังเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นในประกอบด้วยสารประเภทเซลลูโลส ชั้นกลางเป็นสารพวกเพคติน ส่วนชั้นนอกค่อนข้างหนาและฉีกขาดได้ง่าย ประกอบด้วยสารประเภทเจลาตินหรือเมือก (ยูวดี. 2546)

3. ไซโตพลาสซึมของไซยาโนแบคทีเรียจะอยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างใน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนในคือส่วนที่ไม่มีรงควัตถุเรียกว่า เซนโทรพลาสซึม (centroplasm) เป็นส่วนที่มีสารพันธุกรรม พบอยู่ในใจกลางเซลล์ ส่วนบริเวณรอบนอกเป็นบริเวณที่มีรงควัตถุอยู่เรียกว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm)

4. แวกคิวโอลของไซยาโนแบคทีเรียจะมีขนาดเล็กกว่าสาหร่ายชนิดอื่นๆ ในบางชนิด พบก๊าซแวกคิวโอล (gas vacuole) หรือซูโดแวกคิวโอล (pseudovacule) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ

กระจายทั่วไป ก๊าซที่บรรจุอยู่ในก๊าซแวกคิวโกลโดยส่วนใหญ่คือก๊าซไนโตรเจนหรือสารประกอบไนโตรเจนและมีก๊าซออกซิเจนเพียงเล็กน้อย

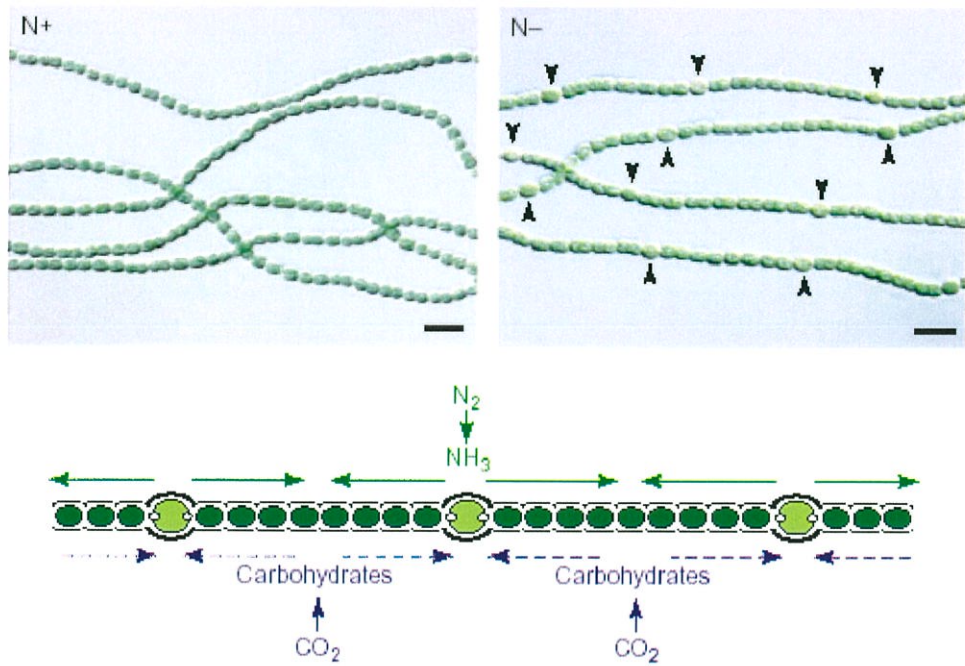
5. ไชยาโนแบคทีเรียทุกชนิดทั้งเซลล์ปกติและเซลล์สืบพันธุ์ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) ไชยาโนแบคทีเรียชนิดที่เคลื่อนที่ได้จะมีการเคลื่อนที่แบบเลื่อนไหล (gliding movement) (ลัดดา. 2542)

6. สารที่เก็บสะสม (reserve substance) ของไชยาโนแบคทีเรียเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่เรียกว่า แป้งไชยาโนไฟเซียน (cyanophycean starch) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนกับไกลโคเจน (glycogen) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ของแป้งที่พบในพืชชั้นสูง (Carr and Whitton. 1973 ; Lewin. 1962) โดยแป้งไชยาโนไฟเซียนมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไป เรียกว่า ไชยาโนไฟซินกรานูล (cyanophycin granule)

7. ไชยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด

7.1 เซลล์ปกติ (vegetative cell) คือเซลล์ทั่วไป ประกอบด้วยผนังเซลล์ ภายในเป็นที่อยู่ของโปรโตพลาสซึมและนิวเคลียสที่ไม่มีผนังหุ้ม มีรงควัตถุชนิดต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์แสงและตรึงคาร์บอนไดออกไซด์

7.2 เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (heterocyst cell) เป็นเซลล์พิเศษที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน เซลล์เฮเทอโรซิสต์พบในไชยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายบางชนิดเท่านั้น โดยเซลล์ปกติสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ได้เมื่ออยู่ในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน อันได้แก่แอมโมเนีย ไนเตรท หรือยูเรีย เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 2.4) เซลล์เฮเทอโรซิสต์มีผนังเซลล์ที่หนาประกอบด้วยชั้นของพอลิแซคคาไรด์และไกลโคลิปิด โดยผนังเซลล์ที่หนาจะช่วยลดการแพร่ของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันอนุมูลอิสระไนโตรจีนจากออกซิเจน (Murry and Wolk. 1989 ; Walsby. 1985 ; Bryant. 1994) และภายในเซลล์ยังมีอัตราการหายใจที่สูง เพื่อรักษาระดับออกซิเจนภายในเซลล์ให้มีระดับต่ำเพียงพอที่จะยอมให้มีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ แม้ว่าเฮเทอโรซิสต์เป็นเซลล์ที่มีการสังเคราะห์แสง แต่ขาดระบบแสงที่ 2 (Photosystem II) ดังนั้นจึงไม่เกิดออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงภายในเซลล์ (Tel-Or et al. 1997) ภายหลังการตรึงไนโตรเจนจะมีการขนส่งสารประกอบต่างๆ เช่น กลูตามีนหรือกรดอะมิโนจากเซลล์เฮเทอโรซิสต์ไปยังเซลล์ปกติ ส่วนเซลล์ปกติจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากการสังเคราะห์แสงแล้วขนส่งคาร์โบไฮเดรตเข้าสู่เซลล์เฮเทอโรซิสต์ (รูปที่ 2.4) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและนำไปรีดิวซ์สารต่างๆ ภายในเซลล์ เซลล์เฮเทอโรซิสต์จะมีลักษณะใส มีสีเหลืองจางๆ เนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์เอ



**รูปที่ 2.4** ลักษณะเส้นสายของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ที่เจริญในสถานะที่มีแหล่งไนโตรเจน (N+) และไม่มีแหล่งไนโตรเจน (N-) หัวลูกศรชี้ตรงตำแหน่งของเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ด้านล่างแสดงแผนภาพทิศทางการขนส่งสารประกอบระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์เฮเทอโรซิสต์  
ที่มา : Golden and Yoon. 2003

ตำแหน่งการเกิดเฮเทอโรซิสต์พบว่ามี 2 แบบ คือ แบบแรก อินเทอร์คาลารีเฮเทอโรซิสต์ (intercalary heterocyst) เป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดระหว่างเซลล์ปกติภายในเส้นสาย พบใน *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. บางสายพันธุ์ แบบที่สอง เทอร์มินัลเฮเทอโรซิสต์ (terminal heterocyst) เป็นเฮเทอโรซิสต์ที่เกิดตรงปลายข้างใดข้างหนึ่งของเส้นสายหรือทั้งสองข้าง แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ชนิดแรก เบซัลเฮเทอโรซิสต์ (basal heterocyst) พบในเส้นสายของเซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากันตลอดทั้งสาย ส่วนมากมักเกิดติดกับเซลล์ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด พบในไซยาโนแบคทีเรีย *Calothrix* sp. ชนิดที่สอง เพดิเซลเลตเฮเทอโรซิสต์ (pedicellate heterocyst) เกิดที่ปลายของแขนงสั้นๆ ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพียง 1-3 เซลล์ และชนิดที่สาม แลทเทอร์อัลเฮเทอโรซิสต์ (lateral heterocyst) เกิดข้างๆ เส้นสาย โดยแนบติดกับเซลล์ในเส้นสายนั้นๆ สามารถพบเพดิเซลเลตเฮเทอโรซิสต์และแลทเทอร์อัลเฮเทอโรซิสต์ได้ในไซยาโนแบคทีเรีย *Nostochopsis* sp. นอกจากนี้ ยังพบว่าโดยปกติเฮเทอโรซิสต์มักเกิดเดี่ยวๆ ในแต่ละจุด แต่ในบางชนิดจะเกิดติดกันเป็นคู่ และในแต่ละสายอาจเกิดเฮเทอโรซิสต์ได้เพียง 1 เซลล์หรือมากกว่า 1 เซลล์ (ยูวดี. 2546)

7.3 เซลล์อะคิเน็ต (akinetete cell) หรือสปอร์ เป็นเซลล์พิเศษที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ปกติเพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ และมักจะพบในสาหร่ายที่มีการสร้างเฮเทอโรซิสต์ ใน

ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด อะคินีตอาจอยู่ติดกับเซลล์เฮเทอโรซิสต์ อะคินีตเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ ภายในเซลล์มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปโกลโคเจนในปริมาณมากและยังเก็บสะสมไนโตรเจนในรูปของไซยาโนไฟซิน (cyanophycin) อีกด้วย (Bryant, 1994)

ในวิทยานิพนธ์นี้ จะทำการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เนื่องจาก *A. siamensis* เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ดี แยกได้จากนาข้าวของประเทศไทย ตามหลักอนุกรมวิธานของ Desikachary (1959) พบว่า *A. siamensis* จัดอยู่ใน

Division Cyanophyta

Class Cyanophyceae

Order Nostocales

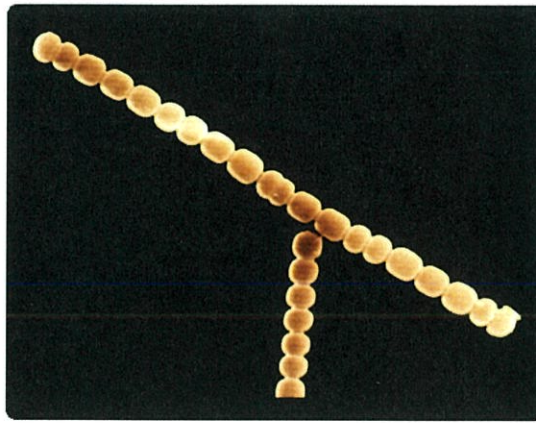
Family Nostocaceae

Genus *Anabaena*

Specie *Anabaena siamensis*

เซลล์ของ *A. siamensis* มีรูปร่างเป็นรูปถังเบียร์ กลม หรือสี่เหลี่ยมจัตุรัสทรงกระบอก ขนาดสม่ำเสมอ เรียงต่อกันเป็นเส้นสายคล้ายลูกบิด (รูปที่ 2.5) และมีเซลล์พิเศษที่เรียกว่าเฮเทอโรซิสต์ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน โดยมีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ตำแหน่งของการเกิดเฮเทอโรซิสต์อยู่บริเวณตอนปลายด้านหัวท้ายของเซลล์

ไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง โดยจะตรึงไนโตรเจนให้อยู่ในรูปแอมโมเนีย แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์บางชนิดในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ให้เป็นไนไตรท์และไนเตรท จากนั้นพืชจะดูดซึมไนไตรท์ ไนเตรท และแอมโมเนียเข้ามาเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่พืชใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อไซยาโนแบคทีเรียเจริญเต็มที่และตายไปจะให้อินทรีย์วัตถุแก่ดินทำให้โครงสร้างของดินดีขึ้น ส่งผลให้การเพาะปลูกพืชหลังการทำได้ผลผลิตดี



รูปที่ 2.5 รูปร่างของ *A. siamensis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 3,500 เท่า

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mevarech และคณะ (1980) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน หลังจากนั้นจึงนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH* ของเชื้อแบคทีเรีย *C. pasteurianum* และ *Azotobacter vinelandii* พบว่ากรดอะมิโนของยีน *nifH* ทั้งสามสายพันธุ์มีบริเวณที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนที่ตรงกัน 5 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ทางด้านปลายอะมิโนอิสระของสายเปปไทด์ และกรดอะมิโนซิสเทอีนทั้ง 5 ตัวจัดเป็นกรดอะมิโนอนุรักษ์

Mazur และ Chui (1982) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ายีน *nifK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,539 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 512 ตัว เป็นโปรตีนที่มีขนาด 57,583 ดาลตัน และมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ 3 ตัวจากจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีนที่พบทั้งหมด 6 ตัว นอกจากนี้ ยังพบว่าลำดับเบสบริเวณรอบกรดอะมิโนซิสเทอีนของ *Anabaena* sp. PCC 7120 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบริเวณรอบกรดอะมิโนซิสเทอีนของเอนไซม์ไคโนโตรจีเนสใน *A. vinelandii* ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

Lammers และ Haselkorn (1983) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ายีน *nifD* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,443 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 480 ตัว เป็นโปรตีนที่มีขนาด 54,283 ดาลตัน และมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ 5 ตัวจากจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีนที่พบทั้งหมด 8 ตัว กรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ทั้งห้าตัวของ

*Anabaena* sp. PCC 7120 จะมีตำแหน่งที่สัมพันธ์กับกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ 5 ตัวของเอนไซม์ ไคโนโตรจีเนสหน่วยย่อย  $\alpha$  ของแบคทีเรีย *A. vinelandii*, *C. pasteurianum* และ *K. pneumoniae*

Kallas และคณะ (1983) ศึกษา ยีน *nif* ในไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ตรึงไนโตรเจน *Gloeothece* sp. PCC 6909 และไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย *Calothrix* sp. PCC 7601 ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมได้จากยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่ารูปแบบการจัดเรียงตัวของยีน *nif* ของ *Gloeothece* sp. PCC 6909 และ *Calothrix* sp. PCC 7601 มีความคล้ายคลึงกับยีน *nif* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 เนื่องจากตัวติดตามที่เตรียมจากยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 สามารถจับกับดีเอ็นเอของ *Gloeothece* sp. PCC 6909 และ *Calothrix* sp. PCC 7601 ได้ และใน *Gloeothece* sp. PCC 6909 มีรูปแบบการจัดเรียงตัวของยีน *nifHDK* ที่ติดกัน ส่วนการจัดเรียงตัวของยีน *nifHDK* ใน *Calothrix* sp. PCC 7601 มีรูปแบบการจัดเรียงตัวที่ซับซ้อนกว่า *Gloeothece* sp. PCC 6909 เมื่อไฮบริไดซ์กับตัวติดตามยีน *nifH* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 จะปรากฏแถบที่จำเพาะมากกว่า 1 แถบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *Calothrix* sp. PCC 7601 อาจมียีน *nifH* มากกว่า 1 ชุดในจีโนม

Helber และคณะ (1988a) ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *nifH* และ *nifD* ใน *A. variabilis* ATCC 29413 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ จากนั้นย้ายเชื้อมาเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนภายใต้การชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนเป็นเวลา 20 นาที จากการทดลองสามารถตรวจพบ mRNA ของยีนไนโตรจีเนส เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดไนโตรเจนเป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง และภายหลังการตรวจพบ mRNA ประมาณ 1 ชั่วโมง จะสามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงนี้ ไซยาโนแบคทีเรียจะไม่สร้างเซลล์เฮเทอโรซิสต์และโปรเฮเทอโรซิสต์ แต่เซลล์จะมีขนาดเล็กและเปลี่ยนสี นอกจากนี้ เมื่อให้ก๊าซออกซิเจนกับไซยาโนแบคทีเรียที่ชักนำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ระดับ mRNA ของยีนไนโตรจีเนสจะลดลงอย่างรวดเร็ว ต่อมา Helber และคณะ (1988b) ศึกษาสารประกอบไนโตรเจนที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *nifH* และ *nifD* พบว่าเมื่อเติมแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (20 ไมโครโมลาร์) ลงในอาหาร แอมโมเนียมจะป้องกันไม่ให้เกิดการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนส ซึ่งตรงข้ามกับการเติมไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นสูงลงในอาหาร จะส่งผลให้ยีนไนโตรจีเนสมีการแสดงออกได้เล็กน้อย ส่วนการเติมกรดอะมิโนกลูตามีนและกลูตาเมตในอาหารไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *nif* เมื่อเปรียบเทียบกับแสดงออกของยีนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากการเติมกรดอะมิโน ในขณะที่การเติมเมทไทโอนีนซัลฟอกซิมินลงไปในอาหารที่มีแอมโมเนียมจะมีผลทำให้แอมโมเนียมไม่สามารถกดดันการแสดงออกของยีน *nif* ได้

Wealand และคณะ (1989) ศึกษาการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนสในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนในไซยาโนแบคทีเรีย *A. variabilis* ATCC 29413 ด้วยเทคนิค DNA-RNA hybridization และวัดระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากการรีดิวิซ์ก๊าซอะเซทิลีน พบว่าสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและระดับ mRNA ของยีนไนโตรจีเนสในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 8.5 ชั่วโมง โดยระดับ mRNA ของยีนไนโตรจีเนสจะเพิ่มขึ้นเป็นเวลา 5 ถึง 6 ชั่วโมง จากนั้นระดับ mRNA ของยีนไนโตรจีเนสจะลดลง

Golden และคณะ (1991) ศึกษาการควบคุมการถอดรหัสโอเปอรอน *nifHDK* และการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอในช่วงที่เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 ด้วยวิธี Southern blot hybridization และวิธี Northern blot hybridization พบว่าในช่วงที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เฮเทอโรซิสต์ ซีนดีเอ็นเอขนาด 11 กิโลเบสจะถูกตัดออกจากยีน *nifD* โดยยีน *xisA* ที่อยู่บนซีนดีเอ็นเอขนาด 11 กิโลเบส การถอดรหัสและการจัดเรียงตัวใหม่ของโอเปอรอน *nifHDK* จะเกิดขึ้นในช่วงท้ายของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเฮเทอโรซิสต์ (ภายหลังการชักนำในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง) ในสายพันธุ์กลาย DW12-2.2 ที่ไม่สามารถตัดซีนดีเอ็นเอขนาด 11 กิโลเบสออกจากยีน *nifD* ทำให้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน พบการถอดรหัสของยีน *nifH* และ *nifD* บนโครโมโซมที่ไม่มีการจัดเรียงตัวใหม่ แต่ไม่พบการถอดรหัสของยีน *nifK* ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *nifK* ขึ้นอยู่กับโปรโมเตอร์ของยีน *nifH* และการตัดซีนดีเอ็นเอขนาด 11 กิโลเบสจากโอเปอรอน ในสายพันธุ์กลาย LW1 ที่ไม่มีโปรโมเตอร์ของยีน *nifH* สามารถสร้างเฮเทอโรซิสต์ได้แต่ไม่เจริญบนอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน จะไม่พบการถอดรหัสของยีน *nifD*

Thiel และคณะ (1995) ศึกษา ยีน *nif* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. variabilis* ด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ตัวติดตามที่เตรียมได้จากยีน *nifB* และ *nifD* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่าใน *A. variabilis* มีกลุ่มยีน *nif2* ชุด คือ ยีน *nif1* และยีน *nif2* ที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยยีน *nif2* ไม่มีชิ้นส่วนขนาด 11 กิโลเบสแทรกภายในยีน *nifD* และไม่มียีน *fdxN* ที่แทรกอยู่ระหว่าง *nifB2* และ *nifS2* ส่วนยีน *nifE* และ *nifN* จะรวมกันเป็น 1 Open Reading Frame (ORF) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มยีน *nif* ที่มากกว่า 3,000 คู่เบส พบว่าใน *A. variabilis* กลุ่มยีน *nif1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับกลุ่มยีน *nif2* ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มยีน *nif1* ใน *A. variabilis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับกลุ่มยีน *nif* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Thiel และคณะ (1997) ศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์โมลิบดีนัมไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. variabilis* สายพันธุ์กลาย *nif1* และ สายพันธุ์กลาย *nif2* ด้วย

วิธีการรีดิวซ์ก๊าซอะซิทีลีน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่  
มีออกซิเจน (ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซอาร์กอน) พบว่าภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อสายพันธุ์ปกติ  
และเชื้อสายพันธุ์กลาย *nif2* สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในชั่วโมงที่ 12-14  
ของการชักนำ ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลาย *nif1* จะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสตลอดการ  
ชักนำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อสายพันธุ์ปกติและเชื้อสายพันธุ์กลาย *nif1* สามารถตรวจพบ  
กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในชั่วโมงที่ 2-4 ของการชักนำ ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลาย *nif2* จะ  
ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในชั่วโมงที่ 11 ของการชักนำ เนื่องจากเริ่มมีการสร้าง  
เฮเทอโรซิสต์ ทั้ง 2 สภาวะเชื้อสายพันธุ์ปกติจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่สูงกว่าเชื้อ  
สายพันธุ์กลาย *nif1* และ *nif2*

Chen และคณะ (1996) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ที่มีขนาด 5 กิโลเบสของ  
ไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. RF-1 พบว่า *Synechococcus* sp. RF-1 มีลำดับกรดอะมิโน  
ของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 76.7,  
77.3 และ 69.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสด้วยวิธี Primer  
extension ทำให้ทราบว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสจะอยู่หน้าจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของยีน *nifH*  
247 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาด 405 คู่เบสที่อยู่หน้าบริเวณจุดเริ่มต้นของการแปล  
รหัสของยีน *nifH* มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ใน *Anabaena* sp. PCC 7120

Dominic และคณะ (1998) ศึกษา ยีน *nifUHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่สร้างเฮเทอโร-  
ซิสต์ *Trichodesmium* sp. IMS101 พบว่า *Trichodesmium* sp. IMS101 มีลำดับกรดอะมิโนของยีน  
*nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* sp. PCC 7120 ถึง 79, 66 และ  
68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษากการถอดรหัสพบว่าจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสจะอยู่หน้า  
จุดเริ่มต้นการแปลรหัสของยีน *nifH* 212 คู่เบส สำหรับการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค  
Northern hybridization ใน *Trichodesmium* sp. IMS101 จะพบการถอดรหัสของยีน *nifH*, *nifHD*  
และ *nifHDK* นอกจากนี้ ในเตรทที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และออกซิเจนที่ความเข้มข้น 40  
เปอร์เซ็นต์ ไม่กกดั้นการถอดรหัสของยีน *nifHDK* ซึ่งจะตรงกันข้ามกับแอมโมเนียและยูเรียที่ยับยั้ง  
การถอดรหัสของยีน *nifHDK*

Huang และคณะ (1999) ศึกษาการจัดเรียงตัวและการแสดงออกของยีน *nif* ในไซยาโน  
แบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ตรึงไนโตรเจน *Synechococcus* sp. RF-1 พบว่ายีน *nif* และยีนที่เกี่ยวข้องมี  
การจัดเรียงเป็นกลุ่มที่ติดต่อกัน มีขนาดประมาณ 18 กิโลเบส และมี 7 โอเปอรอน โดย 2  
โอเปอรอนที่ตั้งอยู่หน้าจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของโอเปอรอนยีน *nifH-nifD-nifK* มีการเรียงลำดับ

ดั่งนี้ *nifP*, *nifB-fdxN-nifS-nifU* และ 4 โอปอเรอนที่ตั้งอยู่ถัดจากจุดสิ้นสุดการแปลรหัสของยีน *nifK* มีการจัดเรียงตัวดั่งนี้ *nifE-nifN*, *nifX-orf*, *nifW-hesA-hesB*, '*fdx*'

## บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 ไชยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
- 3.1.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$  *lacU169* ( $\phi$  80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)

### 3.2 สารเคมี

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11
- 3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11<sub>0</sub>
- 3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11<sub>0</sub> ที่มีเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์
- 3.2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani medium)
- 3.2.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

#### 3.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

- 3.2.2.1 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA พีเอช 7.5 (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)
- 3.2.2.2 เม็ดแก้ว (Glass bead)
- 3.2.2.3 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.4 โซเดียมลอริลซัลโฟเนต (SLS) 10 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.5 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE saturated phenol)
- 3.2.2.6 ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (25:24:1)  
(Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.7 คลอโรฟอร์ม-ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (24:1) (Chloroform : Isoamylalcohol)
- 3.2.2.8 ไลโซไซม์ (Lysozyme)
- 3.2.2.9 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.2.2.10 ลิเทียมคลอไรด์ 5 โมลาร์
- 3.2.2.11 Break buffer (บัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 100 มิลลิโมลาร์ ที่มี

TritonX-100 0.47 เปอร์เซ็นต์, SDS 0.38 เปอร์เซ็นต์ และ SLS 0.38 เปอร์เซ็นต์)

3.2.2.12 เอทานอล (Ethanol) 99 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.13 เอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.14 ไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Diethylpyrocarbonate)

### 3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

3.2.3.1 คีอ็อกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

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

3.2.3.3 เอนไซม์ *Taq* คีเอ็นเอพอลิเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Promega, USA)

3.2.3.4 DNaseI (Promega, USA)

3.2.3.5 Ribonuclease inhibitor (Fermentas, USA)

3.2.3.6 Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega, USA)

3.2.3.7 อะกาโรส (Agarose) (BioWhittaker Molecular Application, USA)

3.2.3.8 เจลสตาร์ (Gelstar) (BioWhittaker Molecular Application, USA)

3.2.3.9 บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, Boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

3.2.3.10 สีย้อมคีเอ็นเอ (Tracking dye) (ซูโครสหรือกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโม-ฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, บัฟเฟอร์ Tris-Boric-EDTA 1 เท่า)

### 3.2.4 คีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.4.1 ฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ( $\lambda$ /*HindIII*) (Invitrogen, USA)

3.2.4.2 100 bp Ladder (Promega, USA)

### 3.2.5 เคมีภัณฑ์สำหรับต่อผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์

3.2.5.1 เอนไซม์ T4 คีเอ็นเอไลเกส (Promega, USA)

### 3.2.6 เคมีภัณฑ์สำหรับถ่ายโอนยีน (Transformation) และตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของพลาสมิด

3.2.6.1 สารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก)

3.2.6.2 สารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก)

3.2.6.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)

3.2.6.4 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside) (Promega, USA)

3.2.6.5 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) (Promega, USA)

3.2.6.6 ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin)

### 3.2.7 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.7.1 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany)

3.2.7.2 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pDrive (Qiagen, Germany)

3.2.7.3 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้เวกเตอร์ pGEM-T-Easy (Promega, USA)

## 3.3 อุปกรณ์

3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Hirayama Manufacturing Corporation HV-50, Japan)

3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) (Hermle Z383K, Germany)

3.3.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (International Scientific Supply HS123, Thailand)

3.3.4 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gellenkamp T490188, UK)

3.3.5 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (Scientific Promotion Binder, Thailand)

3.3.6 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Inc Genies2, USA)

3.3.7 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermoblock) (Biosan TDB-120, Thailand)

3.3.8 ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) (Data Laboratory 1375FX, Thailand)

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

3.3.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Cyberscan 2000, Singapore)

3.3.11 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Ultra-low temperature freezer) Sanyo, Japan)

3.3.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1601, Japan)

3.3.13 คิวเวต (Semimicro rectangular 10 mm) (Hellma, USA)

3.3.14 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) (Perkin Elmer DNA thermal cycler 480, USA)

3.3.15 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (Power supply) (EC570-90 E-C Apparatus Corporation, USA)

3.3.16 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech GNA 100, Sweden)

3.3.17 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene MD1 1019, Japan)

3.3.18 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.19 เครื่องแก้ว (Glasswares)

### 3.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

#### 3.4.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

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

#### 3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli*

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  1 โคโลนีในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในกรณีคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสติกด้านทานยาปฏิชีวนะ เดิมแอมพิซิลินให้มีความเข้มข้น สุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหาร

### 3.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสใน *A. siamensis*

#### 3.5.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของ *A. siamensis*

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็งตามวิธีในข้อ 3.4.1 เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเขี่ยเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE ที่ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เดิมเม็ดแก้วประมาณ 100-200 ไมโครลิตร โซเดียมโคเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร โซเดียมลอริลซาร์โคซิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และ สารละลายฟีนอลที่อิมัตด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเซลล์ vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 30 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วย ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ สกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 1 เท่าของปริมาตร หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอน ดีเอ็นเอโดยเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติม เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา

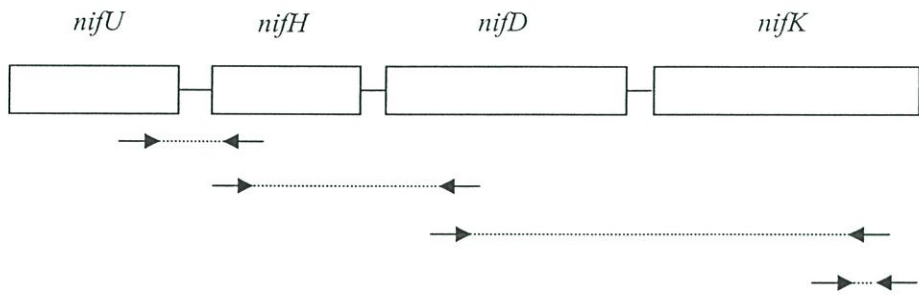
เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำจีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาวิเคราะห์ปริมาณบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยช่องอะกาโรส 0.16 กรัม เดิมบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนกระทั่งอะกาโรสละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เดิม Gelstar ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วเทลงในถาดที่มีแผ่นรองเจล และหิวเสียบ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที คิงหิวออก นำแผ่นรองเจลมาวางใน chamber ที่มีบัฟเฟอร์ TBE 1 เท่า จากนั้นนำจีโนมดีเอ็นเอมาผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ แล้วหยอดลงในช่องเจล (well) โดยใช้ฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* หรือ 100 bp Ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์อยู่ที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

### 3.5.3 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Metal center biosynthesis ยีน *nifH* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสรีดักเทส ยีน *nifD* และ *nifK* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไดไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน (GenBank) มาทำการเปรียบเทียบ (multiple alignment) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* และยีน *nifH* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena azollae*, *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Anabaena variabilis* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7108, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica* PCC 7122 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp., *Anabaena variabilis* จากนั้นทำการเลือกบริเวณที่คาดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์มาใช้สร้างไพรเมอร์ 4 คู่ เพื่อให้ได้บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อกันครบทั้ง 3 ยีน (*nifHDK*) (รูปที่ 3.1) คำนวณค่า Tm (melting temperature) และความเป็นไปได้ในการเข้าจับกันของไพรเมอร์ นำไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifU*, *nifH*, *nifD* และ *nifK* (ลูกศรแสดงบริเวณของไพรเมอร์)

#### 3.5.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifU-H*, *nifH-D*, *nifD-K* และ *nifK* โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่แบบ องค์กรประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์กรประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifU-H*, *nifH-D*, *nifD-K* และ *nifK* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA Thermal Cycler) ซึ่งตั้งโปรแกรมให้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifU-H*, *nifH-D*, *nifD-K* และ *nifK*  
ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	45-55°C	30-60 วินาที
	Extension	72°C	1-2 นาที
	} 30 รอบ		
3	Final Extension	72°C	10 นาที

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามข้อ 3.5.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

### 3.5.5 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังการวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วจึงทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักริบบอนที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด ปิดฝาสารละลายดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน Collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรใน Spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งย้าย Spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.2

### 3.5.6 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์ (Ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.5.5 มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pDrive (ภาคผนวก ข) หรือเวกเตอร์ pGEM-T Easy (ภาคผนวก ข) โดยใช้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10 : 1 ปฏิบัติการเชื่อม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่าที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต พลาสมิด pDrive หรือ pGEM-T Easy 50 นาโน

กรัม ผลิตภัณฑ์ PCR และนำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

### 3.5.7 การเตรียม Competent cell

เปิดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.2 ในอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1 : 250 (0.4 มิลลิลิตร) ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร SOB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ประมาณ 3-4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าระหว่าง 0.2-0.4 จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก) 1/3 ของปริมาตร SOB จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก) 1/25 ของปริมาตร SOB แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หรือใช้ทำทรานสฟอร์มเมชันทันที

### 3.5.8 การทรานสฟอร์มเมชัน

เปิด competent cell 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย ligation ที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 3.5.6 ผสมให้เข้ากัน วางไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และวางบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่บ่มมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

### 3.5.9 การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานสฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG โดยโคโลนีสีขาวมีพลาสมิดลูกผสมของพลาสมิด pDrive หรือ pGEM-T Easy ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR แทรกอยู่ เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินจึงทำให้โคโลนีเป็นสีขาว

### 3.5.10 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ด่าง (Alkali lysis)

นำโคลนที่ได้จากข้อ 3.5.9 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำเซลล์มากระจายในสารละลาย Solution I (ซูโครส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl พีเอช 8.0 25 มิลลิโมลาร์ และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิเตท (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Solution II (โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มัล) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา ตั้งหลอดทิ้งไว้บนน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Solution III (โพแทสเซียมอะซิเตท 5 โมลาร์ 60 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติก 11.5 มิลลิลิตร และน้ำ 28.5 มิลลิลิตร) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง ตั้งหลอดทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งและละลายในบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า (Tris-EDTA พีเอช 8.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

### 3.5.11 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.5.10 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR โดยปฏิบัติการของการตัด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 เท่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 15 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะเป็ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ต้องการด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.2

### 3.5.12 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดลูกผสมโดย BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>R</sup> 3700 DNA Analyzer

### 3.6 การศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนในไตรจีโนมด้วยเทคนิค RT-PCR

#### 3.6.1 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ภายใต้สภาวะการชักนำแบบต่างๆ

##### 3.6.1.1 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11 ตามวิธีในข้อ 3.4.1 เมื่อเซลล์เจริญ ทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างเซลล์โดยกระจายเซลล์ในอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ลงในอาหาร BG11 ที่มีเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ อาหาร BG11 และอาหาร BG11<sub>0</sub> ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.05 นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

##### 3.6.1.2 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยธาตุเหล็กความเข้มข้นต่างๆ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างเซลล์โดยกระจายเซลล์ในอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากเหล็ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากเหล็ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ลงในอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากเหล็ก) โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.05 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายเหล็กให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

##### 3.6.1.3 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยโพลีดีนิมความเข้มข้นต่างๆ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศา

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 10 นาที ทั้งส่วนใส ล้างเซลล์โดยกระจายเซลล์ในอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากโมลิบดีนัม) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทั้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากโมลิบดีนัม) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารละลายเซลล์ลงในอาหาร BG11<sub>0</sub> (ที่ปราศจากโมลิบดีนัม) โดยให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรประมาณ 0.05 นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเติมสารละลายโมลิบดีนัมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

#### 3.6.1.4 การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซ

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.4.1 เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเซลล์เจริญ จึงทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์จำนวน 3 หลอด นำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทั้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทั้งหมดไปชักนำด้วยก๊าซต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยหลอดที่ 1, 2 และ 3 ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอนและอากาศ ตามลำดับ ต่อมานำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทั้งส่วนใส กระจายเซลล์ด้วยอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่เตรียมใหม่ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์เพื่อนำไปสกัด total RNA ต่อไป

#### 3.6.2 การสกัด total RNA ของ *A. siamensis*

นำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำต่างๆ มาเติมเม็ดแก้วลงในหลอดประมาณ 500 ไมโครลิตร Break buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซอเมทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไป vortex 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที สลับกับแช่น้ำแข็ง 3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ สกัดด้วยสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซอเมทิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วนใสด้านบนที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอและ total RNA โดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ พีเอช 5.2 ในปริมาณ 0.1 เท่าของปริมาตร และเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล 70

เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เดิมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการตกตะกอน total RNA ด้วยสารละลายลิเทียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอน total RNA ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตากตะกอน total RNA ให้แห้งและละลาย total RNA ในน้ำที่มีไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (DEPC) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ต่อไป

### 3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA

นำสารละลาย total RNA ที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.6.2 มาวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ โดยเจือจางสารละลาย total RNA ลงในคิวเวตควอดซ์แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณ total RNA จากสูตร

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

สำหรับการหาความบริสุทธิ์ของสารละลาย total RNA สามารถได้จากอัตราส่วนระหว่าง  $A_{260}/A_{280}$  โดยสารละลาย total RNA ที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ประมาณ 1.8-2.0 ถ้าได้ค่าอัตราส่วนต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน (Sambrook et. al. 1989)

### 3.6.4 การย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมาจากการสกัด total RNA ด้วยเอนไซม์ DNaseI

ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย total RNA อาจทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR อาจเป็นผลจากการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน ไม่ใช่เป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอที่ผ่านการเปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอ (cDNA) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในสารละลาย total RNA ให้หมดก่อน โดยนำ total RNA ที่ได้มาย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ปฏิกิริยาของการย่อย 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย total RNA 10 ไมโครกรัม บัฟเฟอร์ 1 เท่า เอนไซม์ DNaseI 20 ยูนิต RNaseIn 1 ยูนิต และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำที่มีไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอไปตรวจสอบการมีดีเอ็นเอเหลืออยู่ในขั้นตอนต่อไป

### 3.6.5 การทดสอบการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน โดยนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI จากข้อ 3.6.4 มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เนื่องจากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ในปริมาณมาก ดังนั้น การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ในสารละลายจึงไวต่อการตรวจสอบแม้จะมีดีเอ็นเอในปริมาณน้อยก็ตาม องค์ประกอบและสภาวะที่ใช้สำหรับการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.3 และตารางที่ 3.4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ต่อไป

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl <sub>2</sub> ) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Ana16 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ AnaR 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอ	1 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	58°C	30 วินาที
	Extension	72°C	30 วินาที
3	Final Extension	72°C	10 นาที

### 3.6.6 การสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA, *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ Reverse Transcriptase

นำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนจากข้อ 3.6.4 มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* โดยผสม total RNA 5-10 ไมโครกรัม เข้ากับ RT-primer ได้แก่ ไพรมเมอร์ AnaR ไพรมเมอร์ D2 และไพรมเมอร์ Uhyd6 ปริมาณ 0.45 พิโคโมล ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเขย่าบนน้ำแข็งทันที จากนั้นแบ่งสารละลายออกเป็น 2 หลอดในปริมาณที่เท่ากัน นำทั้งสองหลอดมาเติมบัฟเฟอร์ Reverse Transcriptase 1 เท่า RNaseIn 0.4 ยูนิต และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหลอดที่ 1 นำมาเติมเอนไซม์ Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่ 2 ใช้เป็นหลอดควบคุม โดยเติมน้ำที่มี DEPC 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำหลอดสารละลายทั้งสองหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที และหยุดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลาย 1 ไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ของยีนที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

### 3.6.7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* โดยใช้สาย cDNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาในข้อ 3.6.6 เป็นแม่แบบ องค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแสดงดังตารางที่ 3.5 และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) ซึ่งตั้งโปรแกรมให้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดยจะใช้อุณหภูมิ Annealing เฉพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ที่ 58 องศาเซลเซียส และใช้เวลาของช่วงอุณหภูมิ Annealing เฉพาะในการเพิ่มปริมาณยีน *hupL* ที่ 60 วินาที และเวลาของช่วงอุณหภูมิ Extension เฉพาะในการเพิ่มปริมาณยีน *nifD* และ *hupL* ที่ 60 วินาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.5.2 ต่อไป

ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl <sub>2</sub> ) 25 มิลลิโมลาร์	3 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 ไมโครโมลาร์	2.5 ไมโครลิตร
cDNA	1 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาณสุทธิ	50 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3.6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที
2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	58°C	30 วินาที
	Extension	72°C	30 วินาที
	} 35 รอบ		
3	Final Extension	72°C	10 นาที

### 3.6.8 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วยโปรแกรม Gene Tools

นำรูปอะกาโรสเจลที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอที่แน่นอน สำหรับการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* จะนำปริมาณดีเอ็นเอของยีนทั้งสองที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรมดังกล่าว มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณดีเอ็นเอของยีนทั้งสองกับปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA เพื่อใช้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *nifD* และยีน *hupL* ซึ่งถูกชักนำด้วยสภาวะที่แตกต่างกัน

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการถอดรหัสของยีนไนโตรจีนเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *A. siamensis* เริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในสูตรอาหาร BG11 เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยง นำเซลล์ที่ได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณยีน *nifU-H*, *nifH-D*, *nifD-K* และ *nifK* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน *nifU*, *nifH*, *nifD* และ *nifK* ที่ได้ทำการออกแบบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์อื่น จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive หรือพลาสมิด pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมแล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลิตภัณฑ์ PCR มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีนแต่ละคู่มาต่อกันเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* มาเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน นอกจากนี้ ยังศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA, ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) ในสภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำต่างๆ ได้แก่ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน สภาวะการชักนำด้วยสารละลายเหล็กและโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ สภาวะการชักนำด้วยอากาศ, ก๊าซไนโตรเจนและก๊าซอาร์กอน โดยทำการสกัด total RNA นำ total RNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยาสร้างสาย cDNA จากสาย 16S rRNA, สาย *nifD* mRNA และสาย *hupL* mRNA ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA, ยีน *nifD* และยีน *hupL* จากสาย cDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเปรียบเทียบกับระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* กับระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA เพื่อบ่งชี้สภาวะที่ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียชนิดนี้มีระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* ในปริมาณสูง

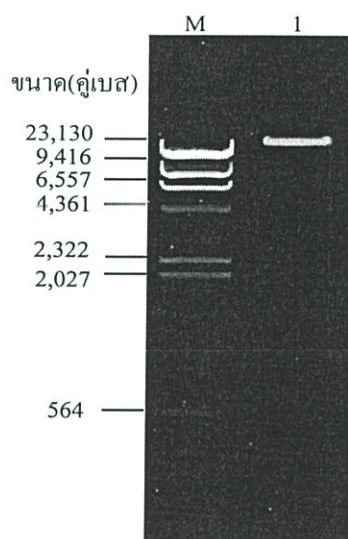
#### 4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีนเนสในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน

##### *A. siamensis*

##### 4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* บนอาหารแข็ง BG11 เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ทำการเก็บเซลล์มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีการในข้อ 3.5.1 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อ

เซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตพบว่าปรากฏแถบ จีโนมิกดีเอ็นเอ 1 แถบที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ *Hind*III ที่มีขนาด 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 4.1) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของจีโนมิกดีเอ็นเอ กับปริมาณของดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* มีปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์

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

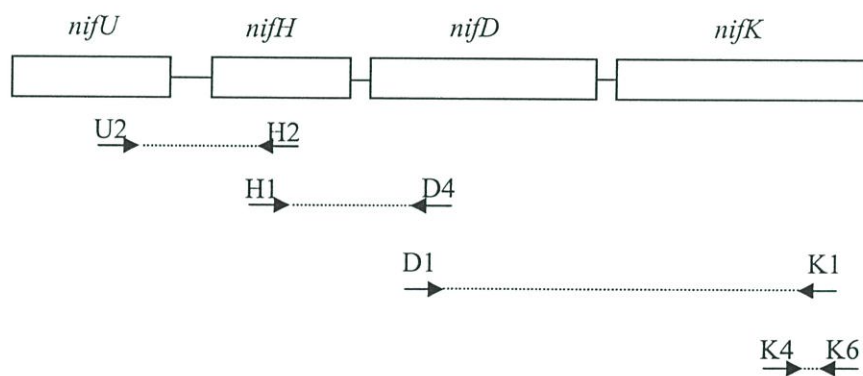
1 จีโนมิกดีเอ็นเอของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีคุณภาพดี เนื่องจากปรากฏแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากเพียง 1 แถบ ไม่มีรอยบันของจีโนมิกดีเอ็นเอที่เกิดจากการถูกย่อยและไม่ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอที่มีขนาดเล็กด้านล่างของเลนใต้แถบของจีโนมิก ดีเอ็นเอ อีกทั้งยังได้จีโนมิกดีเอ็นเอที่มีปริมาณสูง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสกัด จีโนมิก ดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มตามวิธีของ Tamagnini และคณะ (1997) เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ได้ มีรายงานพบว่าการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์มนี้ สามารถนำมาใช้สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ ต่างๆ ได้แก่ *A. variabilis*, *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *Nostoc* sp. PCC 73102 (Tamagnini et. al. 1997) และ *Gloeotheca* sp. ATCC 27152 (Oliveira et. al. 2004) จากนั้น จึงนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่

สกัดได้ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

#### 4.1.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ของยีนไนโตรจีเนส

ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ของยีนไนโตรจีเนสก่อน การออกแบบไพรเมอร์ทำได้โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU*, *nifH*, *nifD* และ *nifK* จากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานไว้แล้วในธนาคารยีนมาทำการเปรียบเทียบและคัดเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากที่สุด ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมีทั้งหมด 4 คู่ คือ คู่ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 (รูปที่ 4.2) โดยเมื่อนำไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ซ้อนกันและทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องกันของยีน *nifHDK*



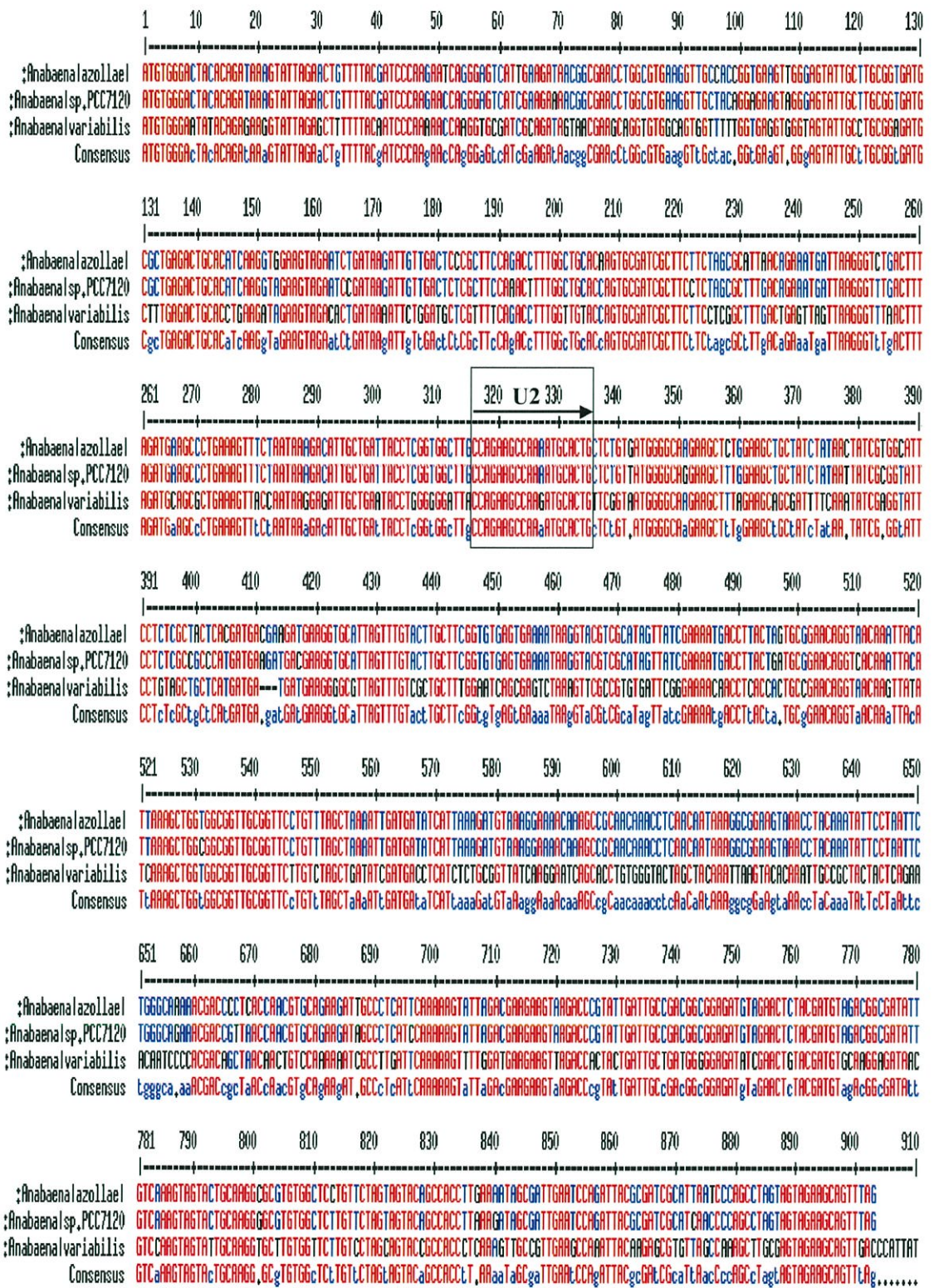
**รูปที่ 4.2** แผนภาพแสดงการจัดเรียงลำดับของยีน *nifU*, *nifH*, *nifD* และ *nifK* และตำแหน่งของไพรเมอร์จากการออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *nifHDK* โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีทั้งหมด 4 คู่ (ลูกศร) คือ คู่ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 เส้นประแสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น

ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ U2-H2 ทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ U2 และ H2 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* และ *nifH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. azollae*, *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *A. variabilis* ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 316 ถึง 335 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-CCAGAAGCCAA (A/G)ATGCACTG-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า U2 (รูปที่ 4.3) สำหรับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ-

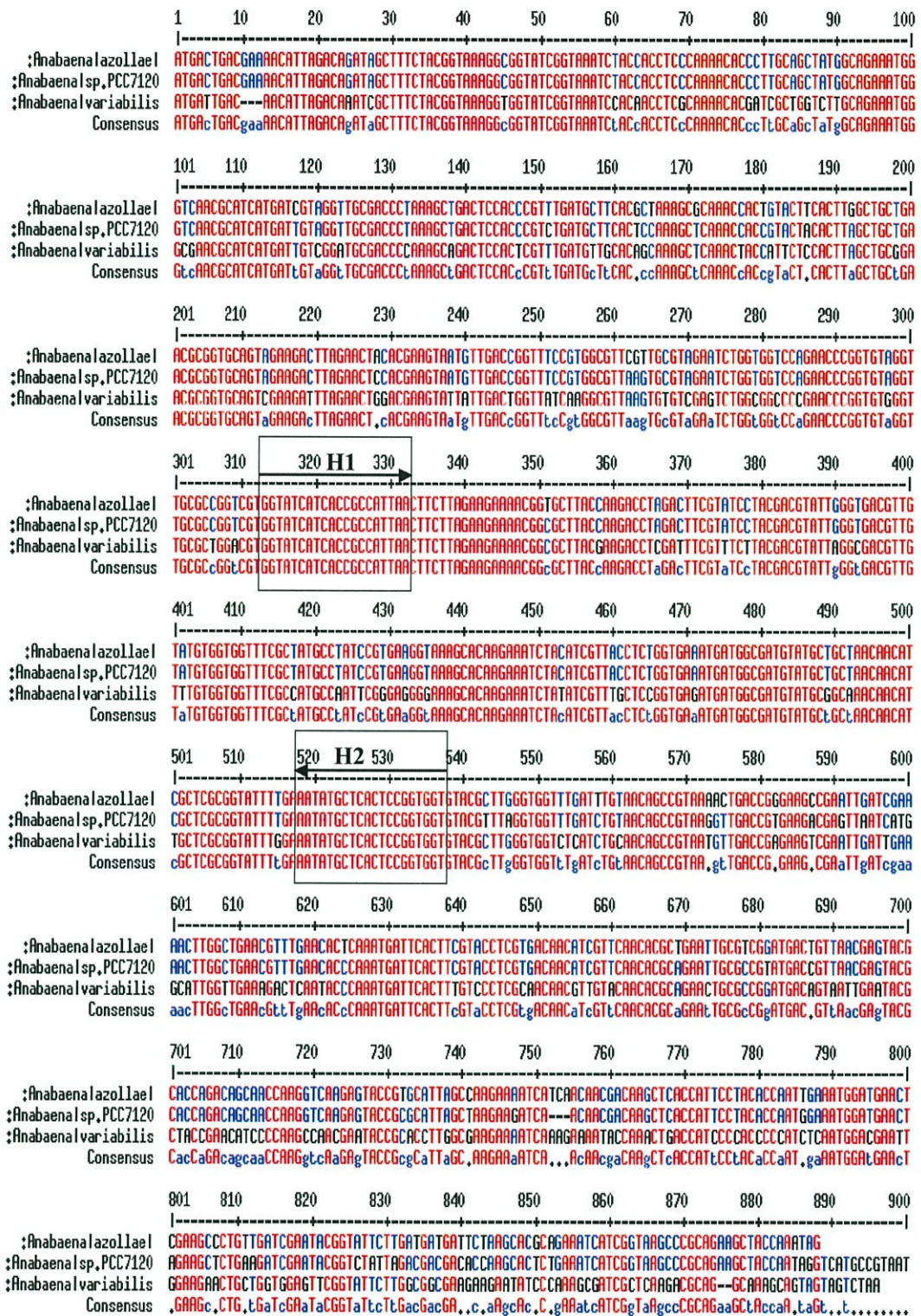
โหนดของยีน *nifH* จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 537 ถึง 518 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACCACCGGAGTGAGCA TATT-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า H2 (รูปที่ 4.4) เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ U2-H2 ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,350 คู่เบส

ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ H1-D4 ทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ H1 จากการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. azollae*, *Anabaena* sp. PCC 7120 และ *A. variabilis* และทำการออกแบบไพรเมอร์ D4 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ที่ได้จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ D1-K1 จากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ที่ได้ จากผลการทดลองในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* จะ ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' อยู่ในบริเวณตำแหน่ง ที่ 313 ถึง 332 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GGTATCATCACCGCCATTAA-3' ตั้งชื่อ ไพรเมอร์ว่า H1 (รูปที่ 4.4) สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ D4 เมื่อนำไพรเมอร์ D4 ที่ออกแบบไว้ มาเปรียบเทียบกับตำแหน่งกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ จะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 645 ถึง 626 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-AGCTTTGTGCGAATTG AGGGA-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า D4 (รูปที่ 4.5) เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ H1-D4 ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,324 คู่เบส

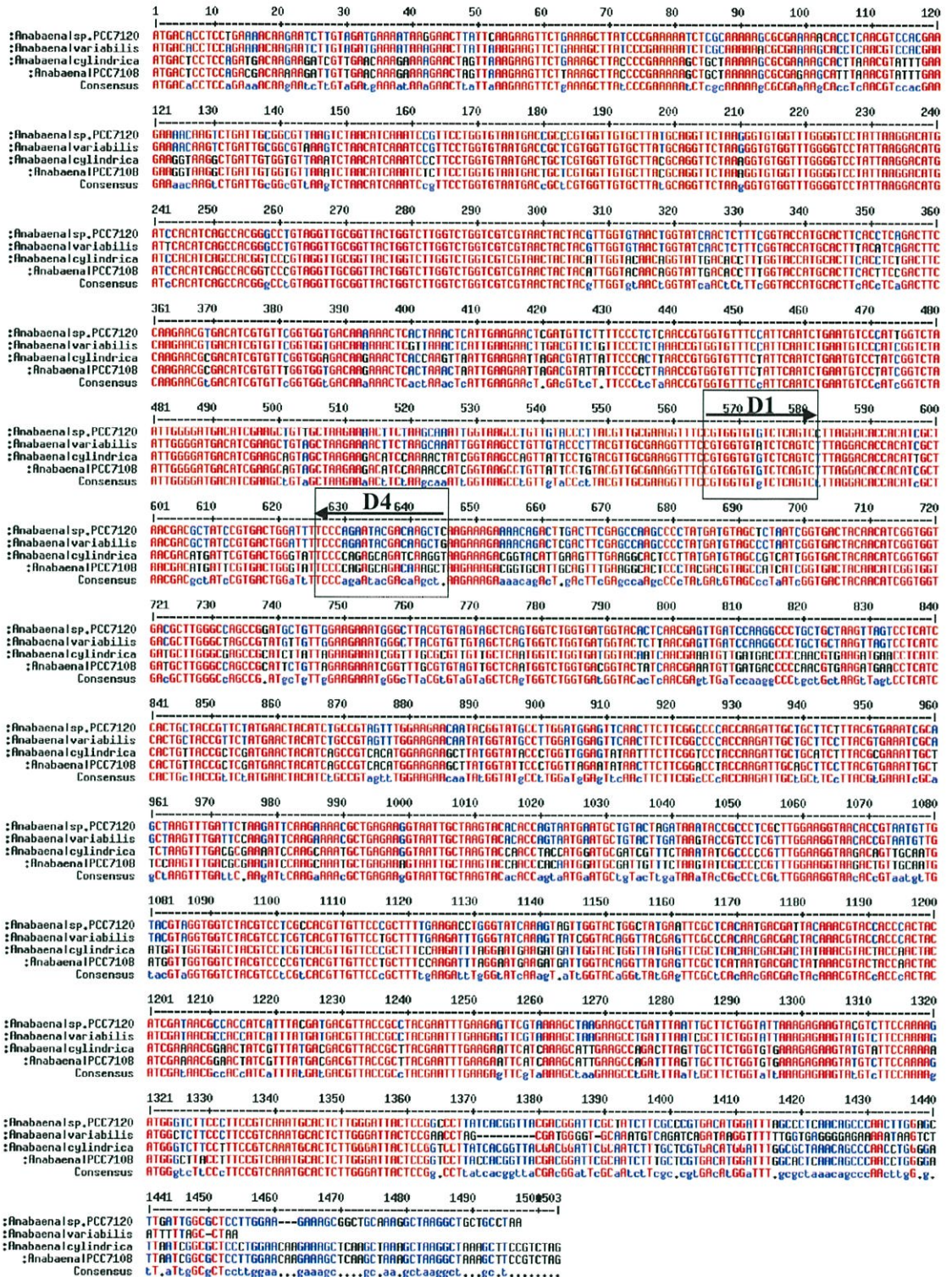
ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ D1-K1 ทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ D1 จากการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7108, *A. cylindrica* PCC 7122 และ *A. variabilis* และออกแบบไพรเมอร์ K1 จากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. และ *A. variabilis* จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* จะได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 565 ถึง 581 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-CGTGGTGT(G/A)TCTCAGTC-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า D1 (รูปที่ 4.5) สำหรับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' อยู่ในบริเวณตำแหน่งที่ 1,337 ถึง 1,318 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TTACCGTAGGAGTTACC-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า K1 (รูปที่ 4.6) เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ D1-K1 ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูโซฟอลิเมอเรสจะ ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 2,309 คู่เบส



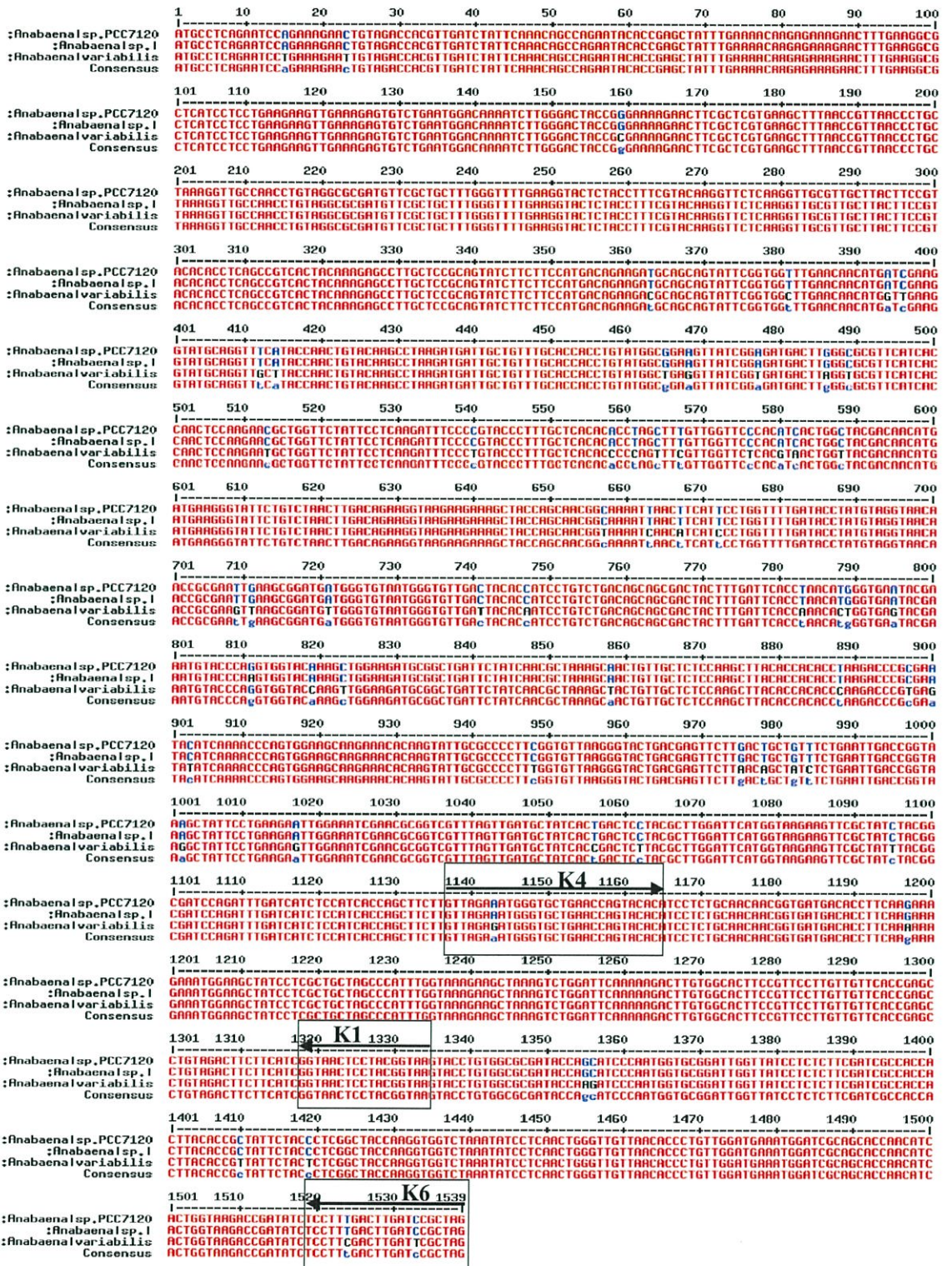
รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ของ *Anabaena azollae*, *Anabaena sp. PCC 7120* และ *Anabaena variabilis* อักษรสีแดง สีนํ้าเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่เลือกในการออกแบบไพรเมอร์ U2



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* ของ *Anabaena azollae*, *Anabaena sp.* PCC 7120 และ *Anabaena variabilis* อักษรสีแดง สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่เลือกในการออกแบบไพรเมอร์ H1 และไพรเมอร์ H2



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ของ *Anabaena sp. PCC 7120*, *Anabaena sp. PCC 7108*, *Anabaena variabilis* และ *Anabaena cylindrica* PCC 7122 อักษรสีแดง สีนํ้าเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่เลือกในการออกแบบไพรเมอร์ D1 และไพรเมอร์ D4



รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ของ *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. และ *Anabaena variabilis* อักษรสีแดง สีนํ้าเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่เลือกในการออกแบบไพรเมอร์ K1, ไพรเมอร์ K4 และไพรเมอร์ K6

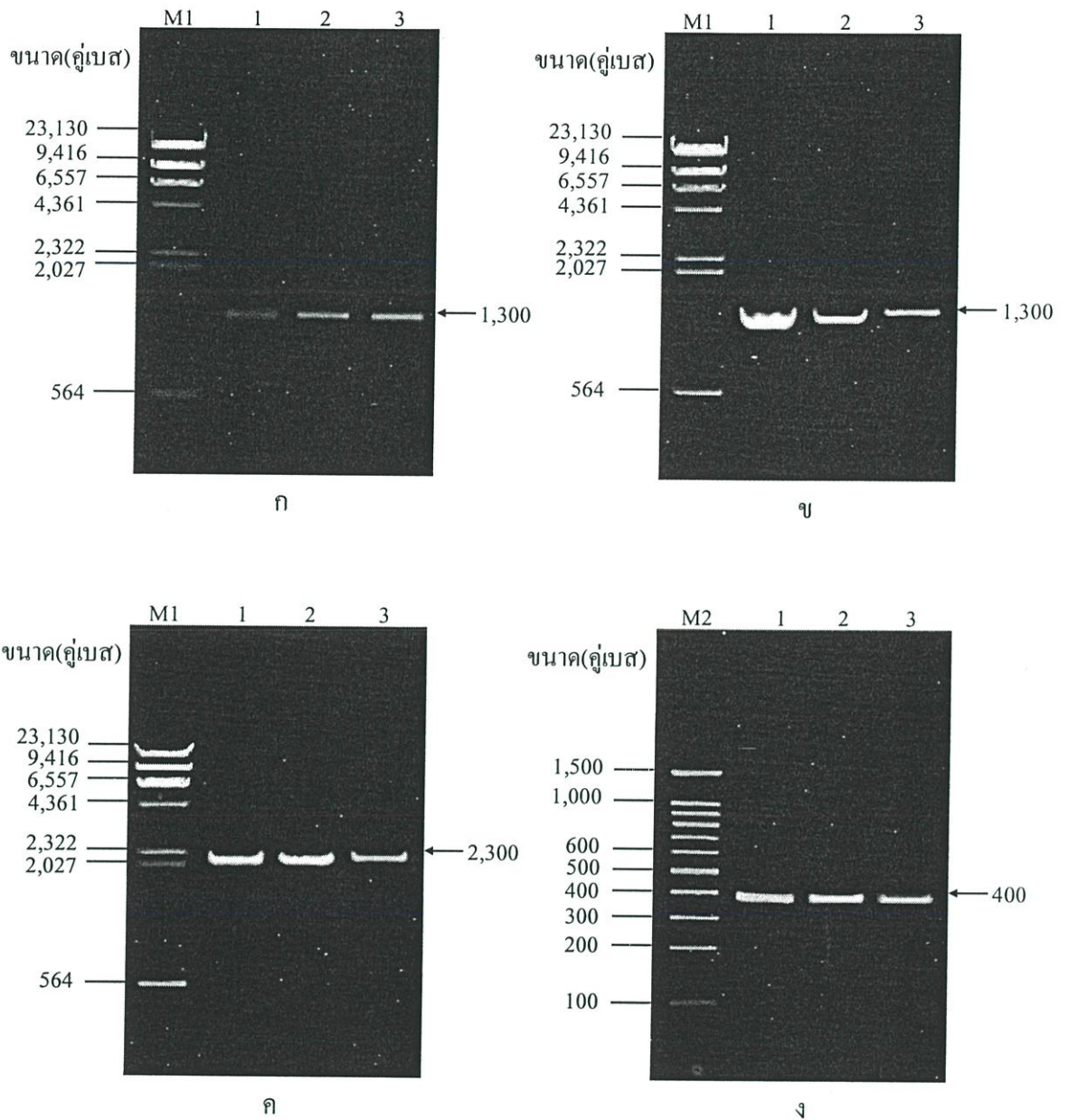
ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์ K4-K6 ทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ K4 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ของผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ D1-K1 ที่ได้จากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* และออกแบบไพรเมอร์ K6 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ในไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. และ *A. variabilis* ในการออกแบบไพรเมอร์ K4 เมื่อนำไพรเมอร์ K4 ที่ได้ออกแบบไว้มาเปรียบเทียบกับตำแหน่งภายในรูปที่ 4.6 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงต้นที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 5' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 1,137 ถึง 1,164 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-GTTAGAAGTAGGTGCTGAACCTGTACAC-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า K4 สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ K6 จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงท้ายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' อยู่ในช่วงตำแหน่งที่ 1,519 ถึง 1,539 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-CTA(T/G)CG(A/G)ATCAAGTC(G/A)(T/A)AGGA-3' ตั้งชื่อไพรเมอร์ว่า K6 (รูปที่ 4.6) เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ K4-K6 ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 403 คู่เบส ข้อมูลคู่ไพรเมอร์ทั้งหมดสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้น นำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ทั้ง 4 คู่ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

#### 4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิการจับตัว (annealing temperature) ที่ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอุณหภูมิในการจับตัวที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ทั้ง 4 คู่ จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ 3 คู่ คือคู่ U2-H2, H1-D4 และ D1-K1 ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของคู่ไพรเมอร์ K4-K6 ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนไนโตรจีเนสเมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ 1 แถบในทุกๆ อุณหภูมิของการจับตัว โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ U2-H2 และ H1-D4 (รูปที่ 4.7 ก และ ข) ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2,300 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ D1-K1 (รูปที่ 4.7 ค) และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ K4-K6 (รูปที่ 4.7 ง)

ตารางที่ 4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

คู่ไพรเมอร์	ยีน	สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (คู่เบส)
U2-H2	U2	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>A. azollae</i> และ <i>A. variabilis</i>	CCAGAAAGCCAA(A/G)ATGCACTG	1,350
	H2	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>A. azollae</i> และ <i>A. variabilis</i>	ACCACCGGAGTGAGCATATT	
H1-D4	H1	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>A. azollae</i> และ <i>A. variabilis</i>	GGTATCATCACCCGCATTAA	1,324
	D4	<i>A. siamensis</i>	AGCTTTGTGGAATTGAGGGA	
D1-K1	D1	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. PCC 7108 <i>A. cylindrica</i> PCC 7122 และ <i>A. variabilis</i>	CGTGGTGT(G/A)TCTCAGTC	2,309
	K1	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. และ <i>A. variabilis</i>	TTACCGTAGGAGTTACC	
K4-K6	K4	<i>A. siamensis</i>	GTTAGAAAGTAGGTGCTGAACCTGT ACAC	403
	K6	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. และ <i>A. variabilis</i>	CTA(T/G)CG(A/G)ATCAAGTC(G/A)(T/A) AGGA	



รูปที่ 4.7 ผลิตรัณฑ์ PCR ของคูโฟเรเมอร์ U2-H2 (ก) H1-D4 (ข) D1-K1 (ค) และ K4-K6 (ง) เมื่อใช้ จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

M1 ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

M2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตรัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 45 องศาเซลเซียส

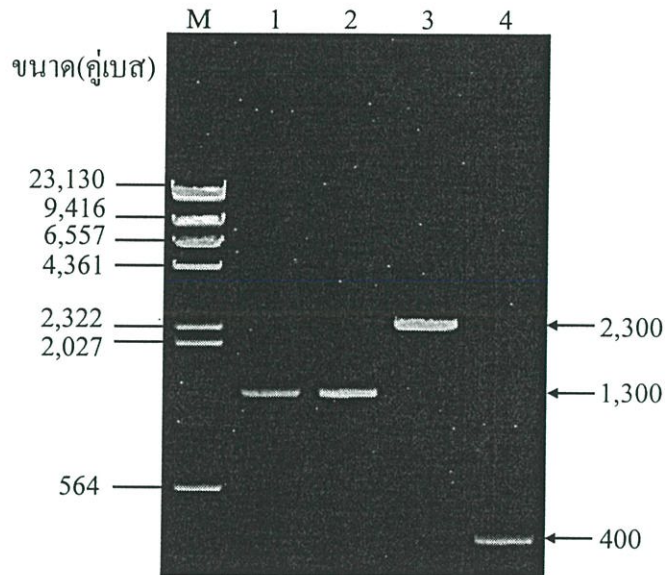
2 ผลิตรัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 50 องศาเซลเซียส

3 ผลิตรัณฑ์ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลอง พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่สามารถใช้เพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนในโตรจีนเนสได้ เนื่องจากปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ในทุกๆ อุณหภูมิของการจับตัว แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบไว้ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะสูง โดยปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับค่า  $T_m$  (melting temperature; อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์  $T_m$  ของไพรเมอร์ทั้งหมดมีค่าระหว่าง 61 ถึง 68 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้อุณหภูมิของการจับตัวที่ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifUHDK* จากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ ดังที่ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 4.1 มาทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* สายพันธุ์ต่างๆ อยู่ในจีนัสเดียวกับ *A. siamensis* จึงทำให้ได้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ที่มีความจำเพาะสูงมาก หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

#### 4.1.4 ผลการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ที่มีขนาดประมาณ 1,300, 1,300, 2,300 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ จากข้อ 4.1.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany) เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอหรือแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะออกจากแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 อย่างละ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ช่องที่ 1) 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ช่องที่ 2) 2,300 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ช่องที่ 3) และ 400 คู่เบส (รูปที่ 4.8 ช่องที่ 4) ตามลำดับ โดยขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (รูปที่ 4.7) เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 มีปริมาณ 100, 150, 250 และ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ในการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าวเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดสิ่งปนเปื้อนไปรบกวนปฏิกิริยาการเชื่อมในหัวข้อต่อไป



รูปที่ 4.8 ผลิตรหัส PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
- 1 ผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2
- 2 ผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ H1-D4
- 3 ผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ D1-K1
- 4 ผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ K4-K6

#### 4.1.5 ผลการเชื่อมต่อผลิตรหัส PCR เข้ากับเวกเตอร์ pDrive หรือ pGEM-T Easy และทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$

จากการนำชิ้นส่วนผลิตรหัส PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ที่มีขนาดประมาณ 1,300, 1,300, 2,300 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pDrive พบว่าผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2 และ D1-K1 สามารถเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive ส่วนผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ H1-D4 และ K4-K6 ไม่สามารถเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pDrive ได้ จึงนำผลิตรหัส PCR ของคู่ไพรเมอร์ H1-D4 และ K4-K6 ไปเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy การเชื่อมต่อผลิตรหัส PCR เข้ากับเวกเตอร์ทั้งสองอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วนปริมาณผลิตรหัส PCR ต่อเวกเตอร์เท่ากับ 10 : 1 จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-Gal และ IPTG จากผลการทดลองได้คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีผลิตรหัส PCR ของ

ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่อย่างละ 1 โคลนีนมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

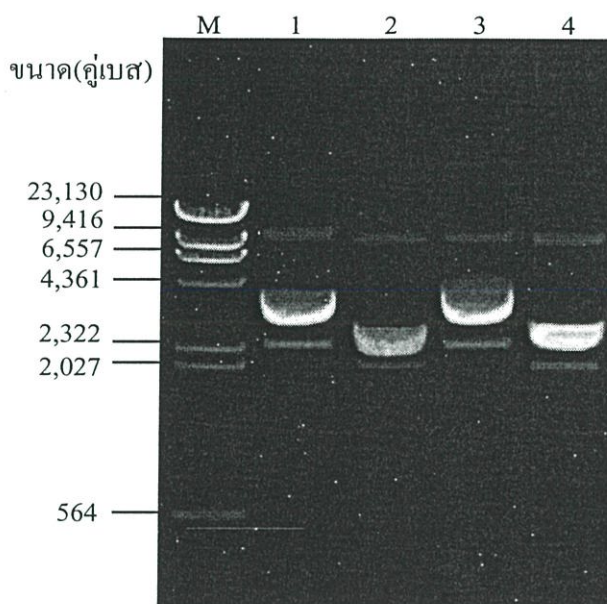
#### 4.1.6 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง (Alkali lysis)

จากการนำโคลนีสีขาวที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยด่าง จากนั้นตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ตามลำดับดังนี้ pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังรูปที่ 4.9 และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าพลาสมิด pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 มีปริมาณ 250, 200, 250 และ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ต่อไป

#### 4.1.7 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 จากข้อที่ 4.1.6 มาตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ตามลำดับ โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และวิเคราะห์ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิด pCA1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส และ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.10 ช่องที่ 2) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,800 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบสและแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,300 คู่เบสเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไป เนื่องจากในเวกเตอร์ pDrive มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ 2 บริเวณที่ด้านหน้าและด้านหลังผลิตภัณฑ์ PCR และอยู่ภายในบริเวณ multicloning site เมื่อตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้ชิ้นส่วนของเวกเตอร์ pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2 (1,350 คู่เบส) จึงสรุปได้ว่าพลาสมิด pCA1.4 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2

จากการนำพลาสมิด pCB12.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบสและ 1,300 คู่เบส (รูปที่ 4.10 ช่องที่ 4) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,000 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pGEM-T Easy เนื่องจากในเวกเตอร์ pGEM-T Easy มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* อยู่ภายในบริเวณ multicloning site เช่นเดียวกับ

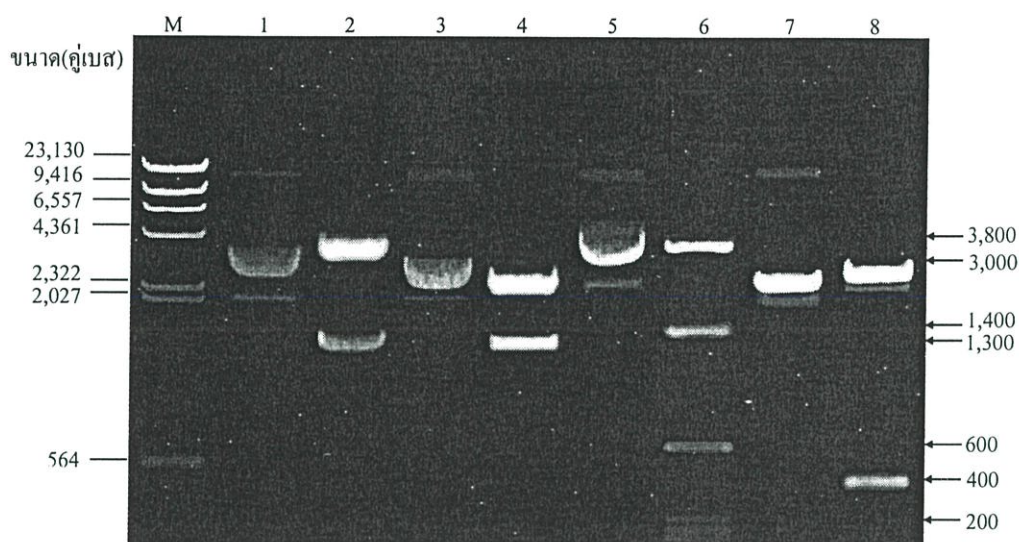


**รูปที่ 4.9** พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 จากการสกัดด้วยต่าง M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

- 1 พลาสมิด pCA1.4
- 2 พลาสมิด pCB12.4
- 3 พลาสมิด pCP7.5
- 4 พลาสมิด pCK1.7

เวกเตอร์ pDrive ดังนั้น เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จะได้แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของเวกเตอร์ pGEM-T Easy คือ 3,015 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,300 คู่เบสเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไปโดยมีขนาด ใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของคูไพรเมอร์ H1-D4 (1,324 คู่เบส) จึงสรุปได้ว่าพลาสมิด pCB12.4 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของคูไพรเมอร์ H1-D4

จากการนำพลาสมิด pCP7.5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ 4 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,800, 1,400, 600 และ 200 คู่เบส (รูปที่ 4.10 ช่องที่ 6) แถบ ดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนสุดขนาด 3,800 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pDrive ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,400, 600 และ 200 คู่เบสเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของคูไพรเมอร์ D1-K1 ที่เชื่อมเข้าไป เมื่อนำขนาดของแถบดีเอ็นเอทั้ง 3 แถบมารวมกันจะได้ขนาด 2,200 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของคูไพรเมอร์ D1-K1 (2,309 คู่เบส) จึงสรุปได้ว่า พลาสมิด pCP7.5 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของคูไพรเมอร์ D1-K1 และใน ผลิตภัณฑ์ PCR มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI



รูปที่ 4.10 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- |   |  |
|---|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i> |
| 1 | พลาสมิด pCA1.4   |
| 2 | พลาสมิด pCA1.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>                         |
| 3 | พลาสมิด pCB12.4  |
| 4 | พลาสมิด pCB12.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>                        |
| 5 | พลาสมิด pCP7.5   |
| 6 | พลาสมิด pCP7.5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>                         |
| 7 | พลาสมิด pCK1.7   |
| 8 | พลาสมิด pCK1.7 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>                         |

จากการนำพลาสมิด pCK1.7 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และ 400 คู่เบส (รูปที่ 4.10 ช่องที่ 8) โดยแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 3,000 คู่เบสเป็นแถบของเวกเตอร์ pGEM-T Easy ที่ปราศจากผลิตภัณฑ์ PCR และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400 คู่เบสเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่เชื่อมเข้าไปเนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ K4-K6 (403 คู่เบส) จึงสรุปได้ว่าพลาสมิด pCK1.7 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ K4-K6

#### 4.1.8 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 ที่ผ่านการตรวจสอบการมีผลิตภัณฑ์ PCR ของคู่ไพรเมอร์ U2-H2, H1-D4, D1-K1 และ K4-K6 ตามลำดับ มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Reaction และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABI

PRISM<sup>R</sup> 3700 DNA Analyzer พบว่าพลาสมิด pCA1.4 มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifU-H* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ขนาด 1,354 คู่เบส พลาสมิด pCB12.4 มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifH-D* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ขนาด 1,378 คู่เบส พลาสมิด pCP7.5 มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD-K* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ขนาด 2,519 คู่เบส และพลาสมิด pCK1.7 มีผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ขนาด 400 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดของพลาสมิด pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 มาทำการเชื่อมต่อกันให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ถึง *nifK* ของ *A. siamensis* ที่มีขนาด 5,140 คู่เบส (รูปที่ 4.11) และได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไว้ในธนาคารยีนโดยมี accession number DQ176436 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ Metal center biosynthesis ของยีน *nifU*, เอนไซม์ไคโนโตรจีนเนสรีดักเทสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifH* และเอนไซม์ไคโนโตรจีนเนสที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *nifD* และ *nifK*

#### 4.1.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifUHDK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ถึง *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* เพียงบางส่วน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifU* ที่ได้มีขนาด 588 คู่เบส (ตำแหน่งที่ 1-588 รูปที่ 4.11) ซึ่งถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 195 ตัว ยีน *nifH* ของ *A. siamensis* มีขนาด 888 คู่เบส (ตำแหน่งที่ 818-1,705 รูปที่ 4.11) โดยถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 295 ตัวและเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปคำนวณมวลโมเลกุลพบว่าโปรตีน NifH มีขนาด 32.2 กิโลดาลตัน (<http://proteomics.mcw.edu/promost/index.jsp>) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนไคโนโตรจีนเนสรีดักเทส (Fe-protein) ที่รายงานไว้คือประมาณ 32-40 กิโลดาลตัน (Berman-Frank et. al. 2003) ยีน *nifD* ของ *A. siamensis* มีขนาด 1,500 คู่เบส (ตำแหน่ง 1,860-3,359 รูปที่ 4.11) โดยถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 499 ตัวและจากการคำนวณ โปรตีน NifD มีขนาด 55.8 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนไคโนโตรจีนเนสชนิดหน่วยย่อย  $\alpha$  (MoFe-protein  $\alpha$  subunit) ที่รายงานไว้คือประมาณ 54-56 กิโลดาลตัน (Hallenbeck et. al. 1979) และยีน *nifK* ของ *A. siamensis* มีขนาด 1,536 คู่เบส (ตำแหน่ง 3,605-5,140 รูปที่ 4.11) โดยถอดและแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 511 ตัว จากการคำนวณ โปรตีน NifK มีขนาด 56.9 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีนไคโนโตรจีนเนส ชนิดหน่วยย่อย  $\beta$  (MoFe-protein  $\beta$  subunit) ที่รายงานไว้คือประมาณ 57 กิโลดาลตัน (Mazur and Chui. 1982)

1	CCAGAAGCCA P E A K	AAATGCACTG M H C	TTCTGTAATG S V M	GGACAAGAAG G Q E A	CTCTAGAAGC L E A	50
51	TGCTATCCAT A I H	AATTACAGAG N Y R G	GCATTCCCTCG I P R	CGTTGCCAC V A H	GATGACGATG D D D D	100
101	ATGAAGGCAC E G T	TTTAGTTTGC L V C	ACCTGCTTTG T C F G	GTATTAGCGA I S E	AAACAAAATT N K I	150
151	CGCCGTGTGG R R V V	TATTAGAAAA L E N	TGATCTAATC D L I	AGTGCGGAGC S A E Q	AGGTAACAAA V T N	200
201	TTATGTGAAA Y V K	GCTGGTGGCG A G G G	GATGCGGTTT C G S	CTGTTTAGCG C L A	AAGATTGATG K I D D	250
251	ATATAATAAG I I S	TGAAGTAAAG E V K	CAAGAATCCG Q E S A	CCAAACAAAA K Q N	TCTCAACATC L N I	300
301	AATGGCGCGA N G A K	AAGCTAAAAC A K T	AGAAATTTCC E I S	AGTGTAGGGC S V G Q	AACAAAAACC Q K P	350
351	ATTAECTAAT L T N	GTTTCAGAAAA V Q K I	TAGCCCTAAT A L I	TCAAAAAGTT Q K V	CTTGATGAAG L D E E	400
401	AAGTTAGACT V R L	AGTTTTAATC V L I	GCTGATGGTG A D G G	GAGATGTTGA D V E	ACTCTACGAT L Y D	450
451	ATAGAAGGCG I E G D	ATAAGGTAAA K V K	AGTAAAATC V K L	CAAGGTGCTT Q G A C	GTGGTTCATG G S C	500
501	TTCTAGCAGC S S S	ACCGCGACCT T A T L	TAAAAATAGC K I A	GATTGAAGCC I E A	AGATTACGCG R L R D	550
551	ATCGCATCAG R I S	CAAAGACATC K D I	ATTGTCTGAAG I V E A	CAGTGTAGCA V *	ATTGAAAATT	600
601	CAGGTTTAGC	AGTGCTAAAC	CCCTAAACCT	ACAAACCAGA	AATCCTGACA	650
651	ACCCAATAAA	CACTATGCTC	TCAACACTAA	CTCTATTTTT	GGTAGAGCGT	700
701	TCGCCACCAT	AAAACCGCGA	CGTTCTATAC	ACGCTCACTG	CCGTAGATAC	750
751	ATAGGCGTGA	GAAGCAACGA	AAAACAGACC	CACTAAATCA	ACCAACTAAT	800
801	ACTAGGAAAC	ACGAACAATG M	AGCGACGAAA S D E R	GAATTAGACA I R Q	GATAGCTTTC I A F	850
851	TACGGCAAGG Y G K G	GCGGTATCGG G I G	TAAATCTACA K S T	ACCTCTCAA T S Q N	ACACCCTGGC T L A	900
901	AGCTATGGCT A M A	GAAATGGGTC E M G Q	AACGCATTCT R I L	GATCGTAGGT I V G	TGCGACCCTA C D P K	950
951	AAGCTGACTC A D S	CACCCGTTTG T R L	ATGTTGCACT M L H S	CCAAGGCTCA K A Q	AACCACAGTA T T V	1000
1001	TTACTTGG L H L A	CTGCTGAAAG A E R	AGGTGCTGTA G A V	GAAGACCTCG E D L E	AACTCGAAGA L E E	1050
1051	AGTAATGCTC V M L	ACCGTTTCC T G F R	GTGGTGTTAA G V K	GTGCGTAGAA C V E	TCTGGTGGTC S G G P	1100
1101	CAGAACCCGG E P G	TGTAGGTTGT V G C	GCAGGTCGTG A G R G	GTATTATCAC I I T	CGCTATTAAC A I N	1150
1151	TTCTTAGAAG F L E E	AAAACGGTGC N G A	TTACACAGAC Y T D	TTAGATTTTCG L D F V	TATCTTAGGA S Y D	1200

*nifU**nifH*

1201	CGTATTAGGT V L G	GACGTTGTGT D V V C	GCGGTGGTTT G G F	CGCTATGCCT A M P	ATCCGTGAAG I R E G	1250	<i>nifH</i>
1251	GTAAGGCTCA K A Q	AGAAATCTAC E I Y	ATCGTTACCT I V T S	CCGGTGAAT G E M	GATGGCGATG M A M	1300	
1301	TACGCTGCTA Y A A N	ACAACATCGC N I A	TCGTGGTATT R G I	TTGAAATATG L K Y A	CTCACTCCGG H S G	1350	
1351	TGGTGTACGT G V R	TTAGGTGGTT L G G L	TGATCTGTAA I C N	CAGCCGTAAA S R K	GTTGACCGTG V D R E	1400	
1401	AAGACGAGTT D E L	AATCATGAAC I M N	TTGGCTGAAC L A E R	GTTTGAACAC L N T	CCAAATGATT Q M I	1450	
1451	CACTTCGTAC H F V P	CTCGCGACAA R D N	CATCGTTCAA I V Q	CACGCAGAAT H A E L	TGCGTCGTAT R R M	1500	
1501	GACCGTTAAC T V N	GAGTACGCTC E Y A P	CCGACAGCAA D S N	CCAATCTAAC Q S N	GAATACCGCG E Y R A	1550	
1551	CATTAGCGAA L A K	GAAAATCATC K I I	AACAACGACA N N D K	AGCTCACCAT L T I	TCCTACTCCA P T P	1600	
1601	ATGGAAATGG M E M D	ATGAATTGGA E L E	AGCTCTGTTG A L L	ATCGAATACG I E Y G	GTCTATTAGA L L D	1650	
1651	CGATGACACC D D T	AAGCACGCAG K H A E	AAATCATCGG I I G	TAAGCCCGCA K P A	TCTGCTAGTA S A S K	1700	
1701	AGTAGAATTT *	AATCTACATG	GGAAAAGGAA	AAAGGACAAG	GAACACTCCA	1750	
1751	CATCATTCT	ACCTTTGACC	TTTTACCCCC	TCCCTTCCCC	ACAAATTCCC	1800	
1801	AGGGGGACAA	GAATAAGTCC	CCTCTTCCCA	GAACCAGCAA	TTCCAGACAG	1850	
1851	AGGCAAAAA M	TGACACCTCC T P P	AGATAAAGAT D K D	AAAAACCTGA K N L I	TTGAAGAACG E E R	1900	
1901	CAAACAGCTA K Q L	GTAAAGAAG V K E V	TTCTCGAAGC L E A	TTATCCTGAA Y P E	AAATCTCGCA K S R K	1950	
1951	AAAAACGCGA K R E	GAAGCACCTC K H L	AACGTACACG N V H E	AGGAAGGCAA E G K	GACCGATTGC T D C	2000	
2001	GGCGTTAAGT G V K S	CTAACATCAA N I K	ATCCGTTCT S V P	GGTGTAAATGA G V M T	CCGCTCGTGG A R G	2050	
2051	TTGTGCTTAC C A Y	GCAGGTTCTA A G S K	AAGGTGTGGT G V V	TTGGGGTCT W G P	ATTAAGGACA I K D M	2100	
2101	TGATCCACAT I H I	CAGCCACGGT S H G	CCCGTAGGTT P V G C	GCGGTTACTG G Y W	GTCTTGGTCT S W S	2150	<i>nifD</i>
2151	GGTCGTCGTA G R R N	ACTACTACGT Y Y V	AGGTACCACC G T T	GGTGTAGATT G V D S	CCTTCGGTAC F G T	2200	
2201	CATGCACTTC M H F	ACCTCCGACT T S D F	TCCAAGAACG Q E R	CGACATCGTA D I V	TTCGGTGGTG F G G D	2250	
2251	ACAAAAA K K L	TACCAAATC T K L	ATCGAAGAAA I E E I	TCGAAGTTTT E V L	ATCCCTCTC F P L	2300	
2301	AACCGTGGTA N R G I	TTTCTATTCA S I Q	ATCTGAATGT S E C	CCTATCGGTC P I G L	TAATCGGGGA I G D	2350	
2351	TGACATCGAA D I E	GCTGTAGCTA A V A K	AGAAAGCATC K A S	TAAGACCACT K T T	GGTAAGCCAG G K P V	2400	

2401	TTGTACCCCT V P L	GC GTTGCGAA R C E	GGTTTCCGTG G F R G	GTGTGTCTCA V S Q	GTCCTTGGGT S L G	2450
2451	CACCACATTG H H I A	CTAACGACGC N D A	TATCCGTGAC I R D	TGGATTTTCC W I F P	CTCAATTCGA Q F D	2500
2501	CAAAGCTAAG K A K	AAAGACAACA K D N K	AACTCACCAT L T I	TGAACCCGGC E P G	CCCTACGATG P Y D V	2550
2551	TAGCCTTAAT A L I	CGGTGACTAT G D Y	AACATCGGTG N I G G	GTGACGCATG D A W	GGCTAGCCGT A S R	2600
2601	ATGCTCTTAG M L L E	AAGAAATGGG E M G	CTTACGTGTT L R V	GTTGCTCAAT V A Q W	GGTCTGGTGA S G D	2650
2651	CGGTACTTTA G T L	AACGAATTAA N E L I	TTCAAGGACC Q G P	TGCTGCTAAA A A K	TTAATTCTGA L I L I	2700
2701	TCCA CTGCTA H C Y	CCGTTCCATG R S M	AACTACATTT N Y I C	GTCGTTCTTT R S L	GGAAGAATCT E E S	2750
2751	TACGGCTTGC Y G L P	CTTGGATGGA W M E	GTTCAACTTC F N F	TTTGGTCCTA F G P T	CCAAGATTGC K I A	2800
2801	TGAATCTCTC E S L	CGTGAAATTG R E I A	CTGCCCGCTT A R F	CGACGACAAG D D K	ATCAAAGCAA I K A N	2850
2851	ACGCAGAGAA A E K	AGTAATCGCC V I A	AAGTACACTC K Y T P	CAGTAATGAA V M N	CAAGGTA CTT K V L	2900
2901	GAGAAGTATC E K Y R	GTCCTCGCGT P R V	TGAAGGTAAC E G N	ACCGTAATGT T V M L	TGTACGTAGG Y V G	2950
2951	TGGTCTACGT G L R	CCTCGTCACG P R H V	TTGTTCTCTG V P A	TTTCGCTGAC F A D	TTGGGTATCA L G I T	3000
3001	CAGTATTGGG V L G	TACAGGTTAC T G Y	<b>GAATT</b> CGCTC E F A H	ACAACGACGA N D D	CTATAAACGT Y K R	3050
3051	ACTACCCACT T T H Y	ACATTGACAA I D N	CGCTACCGTT A T V	ATTTACGACG I Y D D	ACGTA ACTGC V T A	3100
3101	TTACGAATTT Y E F	<b>GAAGAATTCA</b> E E F T	CCAAGCAACT K Q L	TAAGCCTGAC K P D	TTGATTGCTT L I A S	3150
3151	CAGGTATTA G I K	GGAAAAATAC E K Y	GTCTTCCAAA V F Q K	AGATGGGCTT M G L	ACCCTTCCGT P F R	3200
3201	CAAATGCACT Q M H S	CCTGGGATTA W D Y	CTCCGGTCCT S G P	TATCACGGAT Y H G Y	ACGACGGATT D G F	3250
3251	TGCTATCTTC A I F	GCTCGCGACA A R D M	TGGATTTAGC D L A	TCTCAACAGC L N S	CCAACCTGGG P T W G	3300
3301	GATTAATCGG L I G	CGCTCCCTGG A P W	AAAAAGACTG K K T A	CTGCTAAGAG A K S	CAAGGCTAAA K A K	3350
3351	GTTGCTTAAAT V A <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">*</span>	TAGCATTTCGC	TTCATCTCAT	GGGAAAACCT	GGGGTAGAAG	3400
3401	CCCCAGGAAC	AAAGGGAAGA	ATGATGAATG	TTGAATGGTG	CGATGAATAG	3450
3451	GGTTTTTCATT	CATTATTCAT	CATTCATCGC	TCGTCACTCC	CTCAGCCGAA	3500
3501	GACAACCCCC	AGGTTTTCAC	TAAGGCGGGG	TAAACCCCGC	CCCTACCCAA	3550
3551	ACCACCTCTT	CATTCGCCAC	ATCAA ACTAA	ACAAGTAACA	GAGAGTAACG	3600

*nifD*

3601	AGAAATGCCA M P	CAGAATCCAG Q N P E	AGAGAATTGT R I V	AGACCACGTT D H V	GATCTATTCA D L F K	3650
3651	AACAGCCAGA Q P E	GTACAAACAA Y K Q	CTGTTTGAAA L F E N	ACAAGAGAAA K R K	AGAATTTGAA E F E	3700
3701	GGCGCACACA G A H S	GCGCTGAAGA A E E	GGTTGAGCGG V E R	GTAGCTGAAT V A E W	GGACAAAATC T K S	3750
3751	CTGGGAATAC W E Y	CGGGAAAAGA R E K N	ACTTCGCTCG F A R	TGAAGCTTTA E A L	ACCGTTAACC T V N P	3800
3801	CTGCTAAAGG A K G	TTGTCAACCT C Q P	CTGGGCGCAA L G A M	TGTTTGCTGC F A A	TCTAGGTTTT L G F	3850
3851	GAAGGTACTC E G T L	TACCTTTCGT P F V	TCAAGTTTCT Q G S	CAAGTTTGGC Q G C V	TAGCTTACTT A Y F	3900
3901	CCGTACCCAC R T H	CTCAGCCGTC L S R H	ACTATAAAGA Y K F	GCCTTGCTCT P C S	GCTGTTTCTT A V S S	3950
3951	CTTCCATGAC S M T	TGAAGACGCA E D A	GCCGTGTTTCG A V F G	GTGGTTTGAA G L N	CAACATGATT N M I	4000
4001	GAAGGCTTGC E G L Q	AAGTTTCTTA V S Y	TCAACTGTAC Q L Y	AAGCCCAAGA K P K M	TGATTGCTGT I A V	4050
4051	TTGCACCACC C T T	TGTATGGCAG C M A E	AAGTTATCGG V I G	TGATGACTTA D D L	GGTGCATTCA G A F I	4100
4101	TCACCAACGC T N A	TAAGAACGCT K N A	GGTTCGTTTC G S V P	CTCAAGATTT Q D L	ACCCGTACCT P V P	4150
4151	TTCGCTCATA F A H T	CTCCTAGCTT P S F	CGTTGGTTCT V G S	CACACCACTG H T T G	GCTATGACAA Y D N	4200
4201	CATGATGAAG M M K	GGTATTCTGT G I L S	CTAACTTGAC N L T	AGAAGGTAAG E G K	AAGGGCAAAG K G K A	4250
4251	CTAACGGTAA N G K	GGTAACTTT V N F	ATTCCTGGTT I P G F	TTGATACCTA D T Y	TGTTGGTAAC V G N	4300
4301	AACCGCGAAT N R E L	TAAAGAGAAT K R I	CTTAGGCTTG L G L	ATGGGTATTG M G I D	ACTACCCAT Y T I	4350
4351	CCTGTCTGAT L S D	ACCAAGTATT T S D Y	ACTTCGATTC F D S	ACCTAACAAAT P N N	GGTGAATACG G E Y E	4400
4401	AAATGTATCC M Y P	CGGTGGAACC G G T	AAGCTAGCTG K L A D	ATGCGGCTGA A A D	TTCTATCAAC S I N	4450
4451	GCCAAAGCTA A K A T	CTGTTACATT V T L	GCAAGCTTAC Q A Y	ACCACTGCTA T T A K	AGACTCGTGA T R E	4500
4501	ATATATCGCT Y I A	AAGTCTTGGA K S W K	AGCAAGAAGT Q E V	TAAGTTCTA K V L	CGTCCCTTGG R P F G	4550
4551	GTGTTAAGGG V K G	TACAGATGAA T D E	TTCTTGATGG F L M A	CGTTGTCAGA L S E	ATTAAGTGGT L T G	4600
4601	AAGGCAATTC K A I P	CTGAAGAGTT E E L	AGAAATCGAA E I E	CGTGGTCGTT R G R L	TGGTTGACGC V D A	4650
4651	TATCACTGAC I T D	TCTTACGCTT S Y A W	GGTTACATGG L H G	TAAGAAGTTC K K F	GCTATCTACG A I Y G	4700
4701	GCGATCCTGA D P D	CTTAATCATC L I I	TCTGTTACCA S V T S	GCTTCTTGTT F L L	AGAAGTAGGT E V G	4750

nijK

4751	GCTGAACCTG A E P V	TACACATCCT H I L	CTGCAACAAC C N N	GGTGATGGAG G D G E	AATCAAGCA F K Q	4800
4801	AGAATTGCAA E L Q	GCTATCCTAG A I L D	ATGCTAGCCC A S P	CTTCGGTAAG F G K	GAAGCTACCA E A T I	4850
4851	TTTGGTTAGG W L G	TAAAGACTTG K D L	TGGCACTTCC W H F R	GCTCCTTGTT S L L	GTTCACTGAG F T E	4900
4901	CCTGTTGACT P V D F	TCTTCGTTGG F V G	TAACTCCTAC N S Y	GGTAAGTACC G K Y L	TGTGGCGCGA W R D	4950
4951	TACCAAGATT T K I	CCTATGGTTC P M V R	GCATCGGTTA I G Y	TCCTCTGTTT P L F	GACCGTCACC D R H H	5000
5001	ACTTACACCG L H R	CTACGCTACA Y A T	TTGGGTTACC L G Y Q	AAGGCGGTAT G G I	CAACTTGTTA N L L	5050
5051	ACTTGGGTTG T W V V	TTAACACCCT N T I	GTTGGATGAA L D E	ATCGATCGCA I D R N	ATACCAATAT T N I	5100
5101	CACTGGTAAG T G K	ACCGATATCT T D I S	CCTTTGACTT F D L	GATTCGTTAA I R		5140

**รูปที่ 4.11** ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifU* บางส่วนและยีน *nifHDK* ของ *A. siamensis* กรอบสี่เหลี่ยมสีดำแสดงรหัสเริ่มต้นและรหัสสุดท้ายของการแปลรหัส กรอบสี่เหลี่ยมสีแดงแสดงบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน วงกลมสีแดงคือกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ ตัวอักษรสีแดงคือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เมื่อนำขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ของ *A. siamensis* ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ธนาคารยีน พบว่าขนาดของยีน *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* มีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *nifK* ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีขนาดที่แตกต่างกันเพียง 3 คู่เบส (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ขนาดของยีน *nifH* ของ *A. siamensis* ก็มีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดของยีน *nifH* ในไซยาโนแบคทีเรียอื่นเช่นกัน ยกเว้นขนาดของยีน *nifH* ใน *Cyanotheca* sp. ATCC 51142 และ *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 ที่มีขนาดต่ำกว่าและสูงกว่ายีน *nifH* ใน *A. siamensis* ถึง 15 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนขนาดของยีน *nifD* ใน *A. siamensis* มีความแตกต่างกับขนาดของยีน *nifD* ในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยพบว่ามีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งอาจมาจากลักษณะโครงสร้างของยีนหรือการจัดเรียงตัวของยีน *nifD* ระหว่างไซยาโนแบคทีเรียมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ ระยะห่างระหว่างยีน *nifH* ถึง *nifD* และ *nifD* ถึง *nifK* มีความแตกต่างกันตามชนิดของไซยาโนแบคทีเรียอีกด้วย โดยความแตกต่างกันของขนาดยีน *nifD* และระยะห่างระหว่างยีน *nifH* ถึง *nifD* และ *nifD* ถึง *nifK* สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกหรือแบ่งกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้อีกด้วย

ตารางที่ 4.2 ขนาดของยีน *nifHDK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* และไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ไซยาโนแบคทีเรีย	GenBank Accession no.	ขนาดของยีน (คู่เบส)				
		<i>nifH</i>	ระยะห่าง ระหว่างยีน <i>nifH-D</i>	<i>nifD</i>	ระยะห่าง ระหว่างยีน <i>nifD-K</i>	<i>nifK</i>
<i>A. siamensis</i>	DQ176436	888	154	1,500	245	1,536
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	BA000019	888	134	1,494	201	1,539
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413 ( <i>nifHDK1</i> )	CP000117	888	140	1,443	201	1,539
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413 ( <i>nifHDK2</i> )	U49859	891	88	1,476	72	1,539
<i>Fisherella</i> sp. UTEX 1931	U49514	888	137	1,491	153	1,539
<i>Synechococcus</i> sp.	U22146	891	232	1,431	177	1,536
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	AY728386	873	156	1,443	182	1,536
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS 101	AF016484	891	188	1,458	224	1,539
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	DQ078751	903	126	1,455	229	1,536

จากการวิเคราะห์บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ของ *A. siamensis* มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ถึง 4 บริเวณ โดยบริเวณที่ 1 และ 2 พบว่าอยู่บนบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifD* ที่ตำแหน่ง 3,021 ถึง 3,026 และ 3,114 ถึง 3,119 ตามลำดับ สำหรับบริเวณที่ 3 และ 4 พบว่าอยู่บนบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifK* ที่ตำแหน่ง 4,568 ถึง 4,573 และ 4,790 ถึง 4,795 ตามลำดับ (ตัวอักษรสีแดง รูปที่ 4.11) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการตัดพลาสติก pCP7.5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ในข้อที่ 4.1.7

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้ของยีน *nifHDK* ของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของ *A. siamensis* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มากกว่า 68 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) โดยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงสูงกับกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสาย สร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่น *Nostoc* sp. PCC 7120, *A. variabilis* ATCC 29413 และ *Fisherella* sp. UTEX 1931 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่มากกว่า 83 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของ *A. siamensis* จะมีความคล้ายคลึงกับไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp., *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 และ *Trichodesmium* sp. IMS 101 ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่า เนื่องมาจากความแตกต่างในระดับจีโนมและสปีชีส์ ซึ่งรวมถึงความแตกต่างของลักษณะพื้นฐาน รูปร่างและโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.3 ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifHDK* ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เปอร์เซ็นต์)		
	<i>nifH</i>	<i>nifD</i>	<i>nifK</i>
<i>Anabaena siamensis</i>	100	100	100
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	92	84	85
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	89	80	85
<i>Fisherella</i> sp. UTEX 1931	85	83	85
<i>Synechococcus</i> sp.	73	75	72
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	74	75	72
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	72	75	71
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS 101	74	73	71

ตารางที่ 4.4 ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifHDK ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ไซยาโนแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงของกรดอะมิโน (เปอร์เซ็นต์)		
	NifH	NifD	NifK
<i>Anabaena siamensis</i>	100	100	100
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	96	89	89
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	94	84	89
<i>Fisherella</i> sp. UTEX 1931	95	87	87
<i>Synechococcus</i> sp.	75	79	71
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	75	76	71
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	74	77	72
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS 101	80	72	69

#### 4.1.10 ผลการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน NifHDK ของ *Anabaena siamensis*

จากการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน NifHDK ของ *A. siamensis* โดยนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของ *A. siamensis* ไปค้นหาบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ (motif) (<http://www.ebi.ac.uk>) แล้วนำบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ในไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifH มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G และ D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P (รูปที่ 4.11) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์พบว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรูปแบบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 และ 2 ของโปรตีน NifH คือ E-x-G-G-P-x(2)-[GA]-x-G-C-[AG]-G และ D-x-L-G-D-V-V-C-GG-F-[AGSP]-x-P ตามลำดับและกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ที่พบจำนวน 2 ตัวจากจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีนที่พบทั้งหมด 5 ตัว อยู่ตำแหน่งที่ 1,118-1,120 และ 1,220-1,222 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.11) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ทั้ง 2 บริเวณใน NifH ของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของ NifH ในไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันทั้งหมด (ตารางที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ทั้ง 2 บริเวณของโปรตีน NifH มีความคล้ายคลึงสูงในสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นไซยาโนแบคทีเรียหรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โปรตีน NifH จัดเป็นโปรตีนที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบและสองหน่วยย่อยของโปรตีน NifH มีบริเวณของ 4Fe-4S cluster ที่สามารถจับกับเหล็กจำนวน 1 ชุด ในการทำงานของเอนไซม์ไดโนโตร-

จีนสรีดักเทศ เหล็กจะจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีนอนูรัลซึ่งมีหมู่ซัลเฟอร์ (S) ทำให้ได้ 4Fe-4S แล้วทำให้เกิดการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังโคแฟกเตอร์ FeMoCo ต่อไป

จากการวิเคราะห์บริเวณอนูรัลของโปรตีน NifD ของ *A. siamensis* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifD ของ *A. siamensis* มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนูรัล 2 บริเวณอยู่ทางด้านปลาย N คือ I-S-H-G-P-V-G-C และ S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V (รูปที่ 4.11) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนูรัลพบว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรูปแบบลำดับกรดอะมิโนอนูรัลบริเวณที่ 1 และ 2 ของโปรตีน NifD (ตารางที่ 4.6) และมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอนูรัลจำนวน 2 ตัวจากจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีนที่พบทั้งหมด 7 ตัว อยู่ตำแหน่งที่ 2,130-2,132 และ 2,328-2,330 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.11) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนูรัลทั้ง 2 บริเวณของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนอนูรัลของไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าลำดับกรดอะมิโนอนูรัลบริเวณที่ 1 ของ *A. siamensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนอนูรัลของไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น แบคทีเรีย *K. pneumoniae* จะมีลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งที่ต่างจากแบคทีเรีย *A. vinelandii* และไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยมีกรดอะมิโนอะลานีน (A) แทนกรดอะมิโนวาเลอีน (V) จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนูรัลบริเวณที่ 2 พบว่าลำดับกรดอะมิโนอนูรัลของ *A. siamensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนอนูรัลของ *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc commune*, *Cyanothece* sp. ATCC 51142 และ *Plectonema boryanum* และพบว่ามีเพียง *Trichodesmium* sp. IMS101 เท่านั้นที่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยพบกรดอะมิโนวาเลอีน (V) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (I) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนวาเลอีนที่พบในโปรตีน NifD เป็นกรดอะมิโนที่จำเพาะเฉพาะใน *Trichodesmium* sp. IMS101 เนื่องจาก *P. boryanum* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเส้นสายไม่สร้างเฮเทอโรซิสต์ เช่นเดียวกับ *Trichodesmium* sp. IMS101 แต่กลับพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตาม ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifD ของไซยาโนแบคทีเรียยังคงมีความคล้ายคลึงกันสูง สำหรับแบคทีเรีย *A. vinelandii* และ *K. pneumoniae* พบว่าลำดับกรดอะมิโนอนูรัลทั้ง 2 บริเวณมีกรดอะมิโนที่ต่างกันถึง 3 ตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifD ระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียจะมีความคล้ายคลึงที่ต่ำกว่ากลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย โปรตีน NifD จัดเป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วย  $\alpha$  2 หน่วยย่อย โดยโปรตีน NifD มี FeMoco (7Mo9FeS) ที่ทำหน้าที่ในการรีดิวซ์ไนโตรเจน และ P-cluster ทำหน้าที่เป็นช่องทางการขนส่งอิเล็กตรอนที่มาจาก 4Fe-4S cluster ดังนั้น กรดอะมิโนซิสเทอีนอนูรัลทั้งสองบริเวณนี้ทำหน้าที่จับกับ Fe-S cluster ซึ่งจะทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อทำหน้าที่รีดิวซ์ไนโตรเจนร่วมกับ NifK

จากการวิเคราะห์บริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน NifK ของ *A. siamensis* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NifK มีบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ F-V-Q-G-S-Q-G-C และ T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-A-F (รูปที่ 4.11) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรูปแบบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 และ 2 ของโปรตีน NifK คือ [LIVMFYH]-[LIVMFST]-H-[AG]-[AGSP]-[LIVMNQA]-[AG]-C และ [STANQ]-[ET]-C-x(5)-G-D-[DN]-[LIVMT]-x-[STAGR]-[LIVMFYST] ตามลำดับ และกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ที่พบจำนวน 2 ตัว จากจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีนที่พบทั้งหมด 6 ตัว

อยู่ตำแหน่งที่ 3,887-3,889 และ 4,061-4,063 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 4.11) เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ทั้ง 2 บริเวณใน NifK ของ *A. siamensis* กับลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของ NifK ในไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ พบว่าในรูปแบบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 ในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันและมีกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งที่ต่างจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยพบกรดอะมิโนกลูตามีน (Q) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนฮิสทีดีน (H) (ตารางที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนกลูตามีนที่พบในโปรตีน NifK จะเป็นกรดอะมิโนที่จำเพาะเฉพาะในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* นอกจากนี้ ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของแบคทีเรียจะมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย โดยพบกรดอะมิโนไทโรซีน (Y) แทนที่จะเป็นกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (F) ในตำแหน่งแรกของลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ ซึ่งอาจส่งผลให้กลไกการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสมีความแตกต่างกับการทำงานของเอนไซม์ไนไซยาโนแบคทีเรีย จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ในบริเวณที่ 2 พบว่าลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของ *A. siamensis* มีความเหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของ *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 และ *Cyanothece* sp. ATCC 51142 และแตกต่างกับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของ *Trichodesmium* sp. IMS 101, *Synechococcus* sp. PCC8801, *Azotobacter vinelandii* และ *K. pneumoniae* 1 ตำแหน่ง โดยใน *Trichodesmium* sp. IMS101 และ *Synechococcus* sp. PCC 8801 พบกรดอะมิโนเซอรีน (S) แทนกรดอะมิโนอะลานีน (A) ในขณะที่แบคทีเรีย *A. vinelandii* และ *K. pneumoniae* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งที่แตกต่างกันและยังแตกต่างกับกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีกด้วย โปรตีน NifK เป็นโปรตีนที่มีทั้งธาตุเหล็กและโมลิบดีนัมเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วย  $\beta$  2 หน่วยย่อย โดยโปรตีน NifK จะมี FeMo-co (7FeMo9S), P-cluster และกรดอะมิโนอนุรักษ์ซิสเทอีนโดยทำงานร่วมกับโปรตีน NifD ในการรีดิวซ์ก๊าซไนโตรเจนไปเป็นผลิตภัณฑ์แอมโมเนีย

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับการดอจะมีโนนุรักษ์ของ โปรตีน NifH ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ลำดับการดอจะมีโนนุรักษ์บริเวณที่ 1	ลำดับการดอจะมีโนนุรักษ์บริเวณที่ 2	ข้อมูลอ้างอิง
<i>Anabaena siamensis</i>	E-x-G-G-P-x(2)-[GA]-x-G-C-[AG]-G	D-x-L-G-D-V-V-C-GG-F-[AGSP]-x-P	This study
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Mevarech et. al. 1980)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Thiel et. al. 1995)
<i>Nostoc commune</i>	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Angeloni and Potts. 1994)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Colón-López et. al. 1999)
<i>Plectonema boryanum</i>	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Ben-Porath and Zehr. 1994)
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS101	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Dominic et. al. 1998)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Jacobson et. al. 1989)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E-S-G-G-P-E-P-G-V-G-C-A-G	D-V-L-G-D-V-V-C-G-G-F-A-M-P	(Hausinger and Howard. 1980)

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NiMD ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียและแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 [LIVMFYH]-[LIVMFST]-H-[AG]- [AGSP]-[LIVMNQA]-[AG]-C	ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 2 [STANQ]-[ET]-C-x(5)-G-D-[DN]- [LIVMT]-x-[STAGR]-[LIVMFYST]	ข้อมูลอ้างอิง
<i>Anabaena siamensis</i>	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	This study
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Lammers and Haselkorn. 1983)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Brusca et al. 1989)
<i>Nostoc commune</i>	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Angeloni and Potts. 1994)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Colón-López et. al. 1999)
<i>Plectonema boryanum</i>	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Fujita et. al. 1991)
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS101	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-V-G-L-I-G-D-D-I-E-A-V	(Dominic et. al. 1998)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	I-S-H-G-P-V-G-C	S-E-C-P-I-G-L-I-G-D-D-I-E-S-V	(Jacobson et. al. 1989)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I-S-H-G-P-A-G-C	S-E-C-P-V-G-L-I-G-D-D-I-S-A-V	(Ioannidis and Buck. 1987)

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifK ของ *A. siamensis* กับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 1 [LIVMFYH]-[LIVMFST]-H-[AG]- [AGSP]-[LIVMNQA]-[AG]-C	ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณที่ 2 [STANQ]-[ET]-C-x(5)-G-D-[DN]- [LIVMT]-x-[STAGR]-[LIVMFYST]	ข้อมูลอ้างอิง
<i>Anabaena siamensis</i>	F-V-Q-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-A-F	This study
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	F-V-Q-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-A-F	(Mazur and Chui. 1982)
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	F-V-Q-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-A-F	(Copeland et. al. Unpublished)
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	F-V-H-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-A-F	(Colón-López et. al. 1999)
<i>Trichodesmium</i> sp. IMS101	F-V-H-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-S-F	(Dominic et. al. 1998)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 8801 /RF-1	F-V-H-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-G-S-F	(Chen et. al. 1996)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Y-V-H-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-N-A-F	(Jacobson et. al. 1989)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Y-V-H-G-S-Q-G-C	T-T-C-M-A-E-V-I-G-D-D-L-Q-A-F	(Steinbauer et. al. 1988)

## 4.2 ผลการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิค RT-PCR

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนส (*nifD*) ของ *A. siamensis* ทำได้โดยศึกษาระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน การชักนำด้วยเหล็กและโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ และการชักนำด้วยก๊าซชนิดต่างๆ นอกจากนี้ ยังศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนอ็อปเทคไฮโดรจีเนสหน่วยย่อยใหญ่ (*hupL*) จากสภาวะการเพาะเลี้ยงและการชักนำดังที่ได้กล่าวมา เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* เนื่องจากปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะมีการผลิตไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ และการสลายไฮโดรเจนจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์อ็อปเทคไฮโดรจีเนส

### 4.2.1 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในสูตรอาหารต่างๆ ได้แก่ อาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl 5 มิลลิโมลาร์) อาหารเหลว BG11 (มีไนเตรท (NO<sub>3</sub>) 17.6 มิลลิโมลาร์) และอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) เป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน ทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2 วิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ ตามวิธีในข้อ 3.6.3 พบว่า total RNA ที่สกัดได้ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ อาหารเหลว BG11 และอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน มีปริมาณอาร์เอ็นเอ 5.3, 5.6 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีค่าอัตราส่วนของ A260/A280 เท่ากับ 1.9, 2.0 และ 2.0 ตามลำดับ แสดงว่า total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะมีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณต่ำ เนื่องจากค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8 และ 2.0 ซึ่งจัดเป็นค่าที่เหมาะสมของอาร์เอ็นเอที่ควรได้จากการสกัด (Sambrook et. al. 1989) จากนั้น นำ total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 สภาวะไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

#### 4.2.1.1 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนใน total RNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูโซ่พอลิเมอเรส

นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ดังวิธีการในข้อ 3.6.4 จากนั้นนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI มาตรวจสอบดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR (ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงไว้ในตารางที่ 4.8) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา

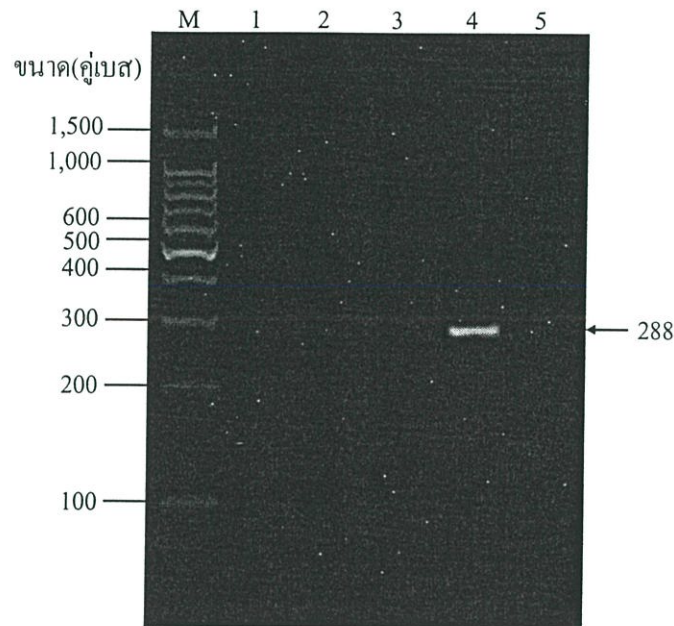
ตารางที่ 4.8 โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาสุกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA (RT-reaction) และปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณของ cDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาสุกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR)

คู่ไพรเมอร์	ยีน	ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (คู่เบส)
PCR				
Ana16	16S rDNA	<i>A. variabilis</i> ATCC 29413, <i>Anabaena</i> sp. PCC 9109	accctgaccggaaccga	288
AnaR		<i>A. cylindrica</i> UTEX629 และ <i>A. sphaerica</i> UUTEXB 1616	ccgccgttctccggggct	
RT-reaction				
AnaR	16S rDNA	<i>A. variabilis</i> ATCC 29413, <i>Anabaena</i> sp. PCC 9109	ccgccgttctccggggct	
D2	<i>nifD</i>	<i>A. cylindrica</i> UTEX629 และ <i>A. sphaerica</i> UUTEXB 1616	ccgatgttga(a/g)tcacc	
Uhyd6	<i>hupL</i>	<i>A. cylindrica</i> PCC 7122 และ <i>A. variabilis</i> <i>A. siamensis</i>	ggggtcataatgctgcccaag	
RT-PCR				
Ana16	16S rDNA	<i>A. variabilis</i> ATCC 29413, <i>Anabaena</i> sp. PCC 9109	accctgaccggaaccga	288
AnaR		<i>A. cylindrica</i> UTEX629 และ <i>A. sphaerica</i> UUTEXB 1616	ccgccgttctccggggct	
D1	<i>nifD</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, <i>Anabaena</i> sp. PCC 7108	cg(g/t)gggtgctcagtc	152
D2		<i>A. cylindrica</i> PCC 7122 และ <i>A. variabilis</i>	ccgatgttga(a/g)tcacc	
Uhyd5	<i>hupL</i>	<i>A. siamensis</i>	attggcggatgggttggat	390
Uhyd11		<i>A. siamensis</i>	accacctgcgactaatg	

ลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ได้ควรมีขนาด 288 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้จะใช้จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 และนำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนสารละลาย total RNA เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมแบบ positive และ negative ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ที่สกัดจากทุกสภาวะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.12 ช่องที่ 1, 2 และ 3) แต่จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส เฉพาะในตัวอย่างที่ใช้จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.12 ช่องที่ 4) จากผลการทดลองแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่มีดีเอ็นเอเหลืออยู่ จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ แต่หากปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจำเป็นต้องทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอีกครั้งหรือจนกว่าจะทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนจนหมด นำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนจากทุกสภาวะไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ในขั้นตอนต่อไป

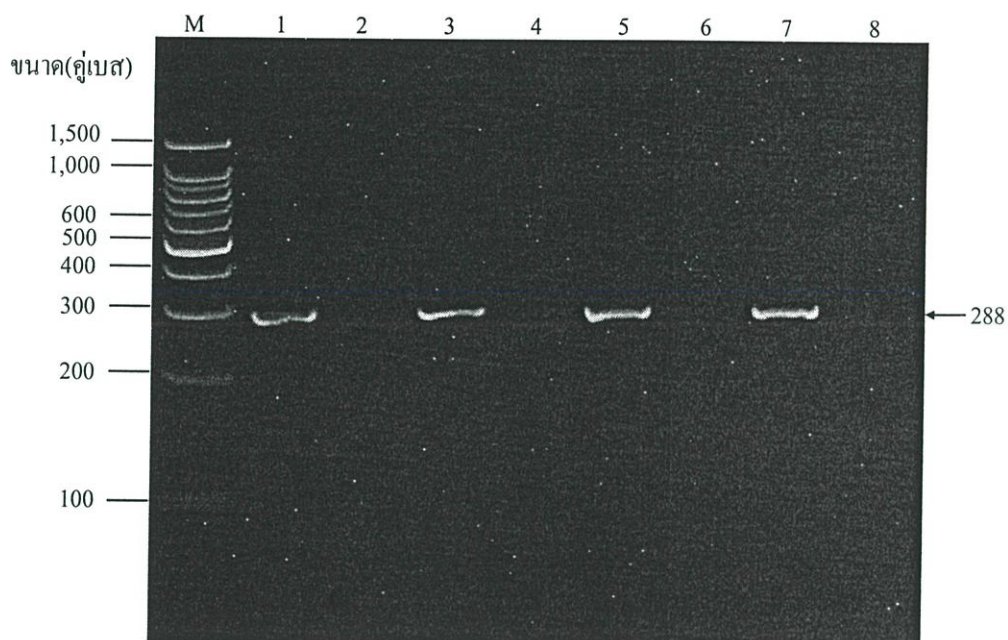
#### 4.2.1.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

จากการนำ total RNA มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase โดยใช้ RT-primer AnaR, D2 และ Uhyd6 ในการทำปฏิกิริยาดังวิธีการในข้อ 3.6.6 จากนั้นนำสารละลาย 1 ไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังวิธีการในข้อ 3.6.7 โดยการเพิ่มผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ใช้คู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR, D1-D2 และ Uhyd5-Uhyd11 ตามลำดับ (ข้อมูลไพรเมอร์แสดงไว้ในตารางที่ 4.8) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ของยีน 16S rDNA มาวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส ที่เหมือนกัน เมื่อใช้ total RNA ของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากทุกสภาวะ (รูปที่ 4.13 ช่องที่ 1, 3 และ 5) ซึ่งแต่ละแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ ยังปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้จีโนมิคดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอ



**รูปที่ 4.12** ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ *A. siamensis* จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

- M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl
- 2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร BG11
- 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร BG11<sub>0</sub>
- 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกคีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อนำน้ำกลั่นเป็นคีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)



**รูปที่ 4.13** ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl

3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11

5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>

7 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกคีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)

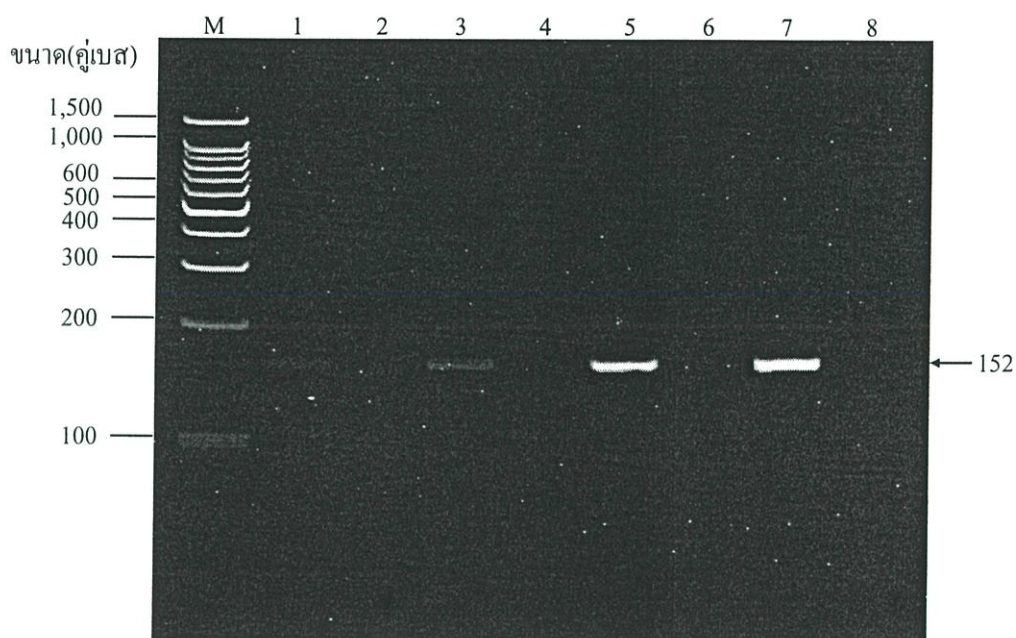
8 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นคีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl, BG11 และ BG11<sub>0</sub> ตามลำดับ

ต้นแบบ (positive control) (รูปที่ 4.13 ช่องที่ 7) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่มีการสร้างสาย cDNA ส่งผลให้ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.13 ช่องที่ 2, 4 และ 6) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน หากหลอดควบคุมปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงว่าสารละลาย total RNA ที่นำมาใช้ยังคงมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเออยู่ และไม่สามารถนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณของ cDNA แต่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณจีโนมดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 152 คู่เบสที่เหมือนกัน เมื่อใช้ total RNA ของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากทุกสภาวะ (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 1, 3 และ 5) ซึ่งแต่ละแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> มีปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 5) รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มีไนเตรท (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 3) และผลิตภัณฑ์ RT-PCR ยีน *nifD* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 1) นอกจากนี้ ยังพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 7) และไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้ cDNA ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสร้างสายที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (รูปที่ 4.14 ช่องที่ 2, 4 และ 6) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 390 คู่เบสที่เหมือนกัน เมื่อใช้ total RNA ของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากทุกสภาวะ (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 1, 3 และ 5) ซึ่งแต่ละแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> มีปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 5) รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มีไนเตรท (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 3) และผลิตภัณฑ์ RT-PCR ยีน *hupL* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 1) นอกจากนี้ ยังพบแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอ



รูปที่ 4.14 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl

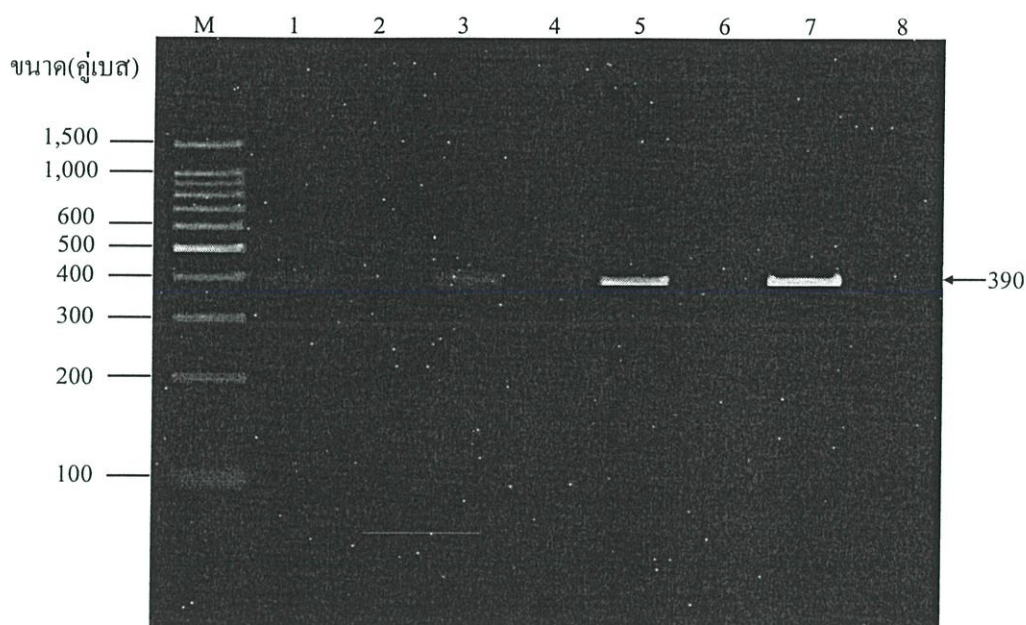
3 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11

5 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>

7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis*  
(Positive control)

8 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl, BG11 และ BG11<sub>0</sub> ตามลำดับ



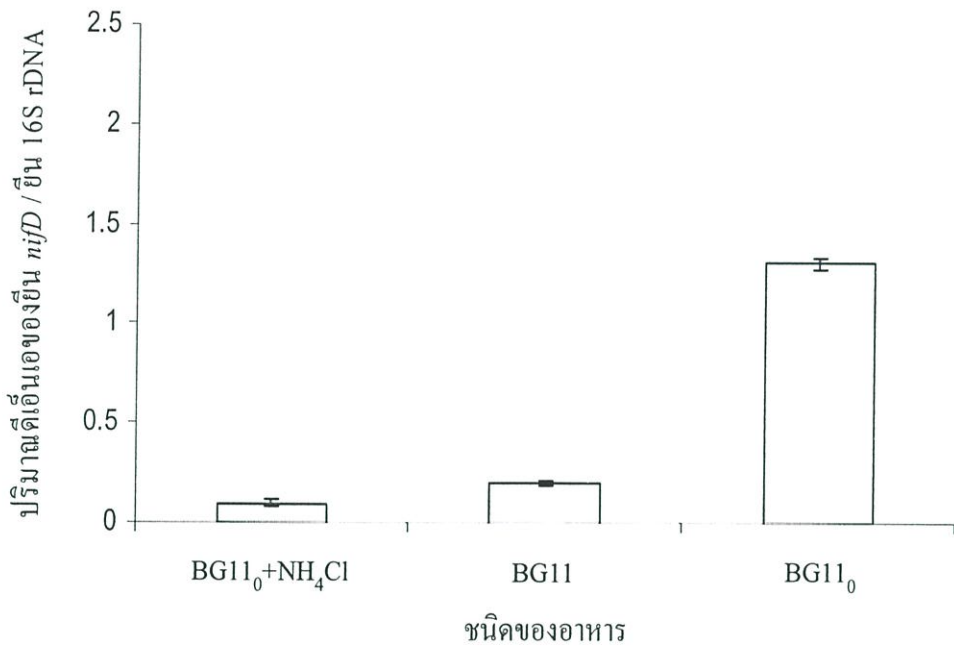
รูปที่ 4.15 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจน

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>
- 7 ผลิตรหัส PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 8 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl, BG11 และ BG11<sub>0</sub> ตามลำดับ

*A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 7) และไม่พบแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้ cDNA ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสร้างสายที่ไม่มีเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (รูปที่ 4.15 ช่องที่ 2, 4 และ 6) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสถานะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน จากนั้น จึงนำผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ที่สกัดจาก *A. siamensis* ในทุกสถานะ (รูปที่ 4.13, 4.14 และ 4.15) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป

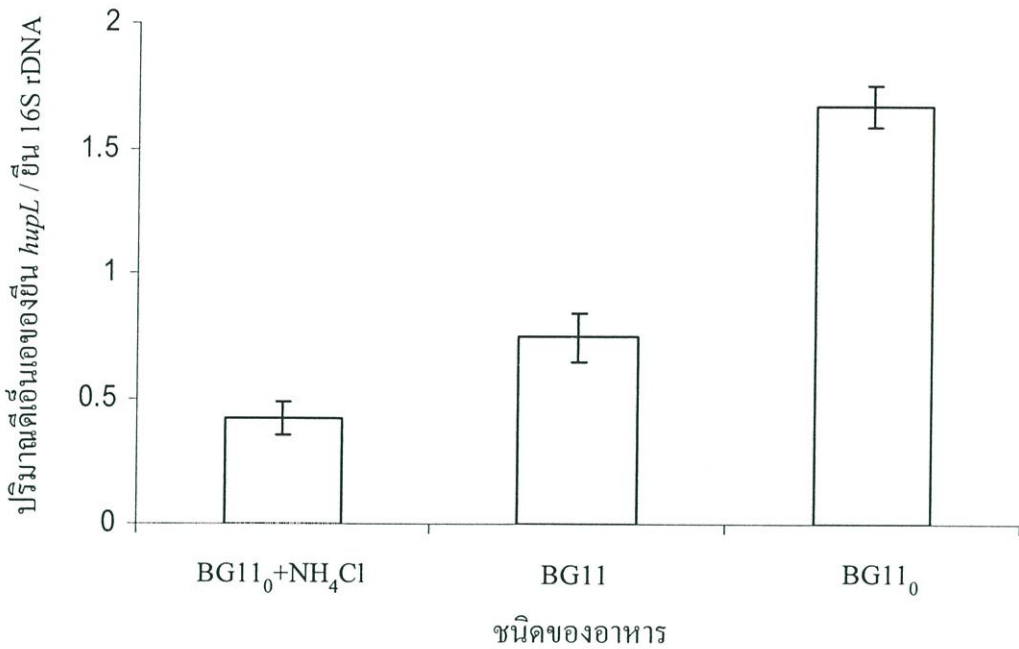
#### 4.2.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสถานะที่มีและขาดแหล่งไนโตรเจนด้วยโปรแกรม Gene Tools

ในการวิเคราะห์ปริมาณระดับการถอดรหัสของยีนหรือ mRNA สามารถทำได้โดยนำ mRNA ของยีนนั้นมาสร้างสาย cDNA แล้วเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส อย่างไรก็ตาม ปริมาณการถอดรหัสนั้นขึ้นกับการสกัดในแต่ละตัวอย่าง จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ หากต้องการเปรียบเทียบระดับการถอดรหัสหรือ mRNA ของยีนแต่ละชนิด จำเป็นต้องเปรียบเทียบระดับการถอดรหัสของยีนนั้นกับระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA ซึ่งจะพบว่าในแต่ละตัวอย่างของสิ่งมีชีวิต ยีน 16S rDNA จะมีการแสดงออกที่เท่ากัน จากการนำรูปที่ 4.13 และ 4.14 ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ใน *A. siamensis* ที่เลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> มีค่าสูงสุด โดยมีระดับการถอดรหัสมากกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร BG11 และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.16) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณของไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* โดยในสถานะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) *A. siamensis* จะมีการตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเพิ่มมากขึ้น โดยการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นภายในเซลล์เฮเทอโรซิสต์ด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทำให้มีการถอดรหัสของยีน *nifD* มากขึ้น สำหรับสถานะการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11 ที่มีไนเตรท และอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่เติมแอมโมเนียม (BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl) ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารนั้น *A. siamensis* จะมีการถอดรหัสของยีน *nifD* ได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากในสถานะอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจะไม่มีการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ทำให้ไม่จำเป็นต้องมีการผลิตเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากยีน *nifD* ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Helber และคณะ (1988b) ที่พบว่า ไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นสูงและแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่ำจะมีผลให้ยีนไนโตรจีเนสมีการแสดงออกได้เพียงเล็กน้อยและป้องกันไม่ให้เกิดการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนส



**รูปที่ 4.16** ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* โดยนำรูปที่ 4.15 มาวิเคราะห์ ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools และเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hupL* ต่อปริมาณ ดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> มีปริมาณการถอดรหัส ของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA สูงสุด รองลงมาคือเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร BG11 และเซลล์ที่ เลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดและ ปริมาณของไนโตรเจนมีผลต่อการถอดรหัสของยีน *hupL* โดยในสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ ปราศจากแหล่งไนโตรเจน (BG11<sub>0</sub>) *A. siamensis* มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* สูงสุด ซึ่งผล การทดลองสอดคล้องกับผลการถอดรหัสของยีน *nifD* สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก แหล่งไนโตรเจนเป็นสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจนจากอากาศด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ทำให้มีการ กระตุ้นการถอดรหัสของยีน *nifD* ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ ในกระบวนการตรึงไนโตรเจน จะมีการผลิตไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ เมื่อมีโมเลกุลของไฮโดรเจนอยู่ในปริมาณสูงจึง มีความจำเป็นที่จะต้องมีการรีดิวซ์โมเลกุลของไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนเพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อ เซลล์ ดังนั้นจึงมีการกระตุ้นให้การทำงานของเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสที่ถอดและแปลรหัสมา จากยีน *hupL* ด้วยเหตุนี้ จึงพบว่า *A. siamensis* มีระดับการถอดรหัสของยีน *hupL* ที่สูง ผลการ ทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Axelsson และคณะ (1999) และ Happe และคณะ (2000) ที่



รูปที่ 4.17 ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ

ศึกษาการถอดรหัสของยีน *hupL* ใน *Nostoc muscorum* และ *A. variabilis* ATCC 29413 โดยพบว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงให้เซลล์มีการตรึงไนโตรเจนจะมีการชักนำให้มีการถอดรหัสของยีน *hupL* สูงขึ้น จากผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ภายใต้การเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub>+NH<sub>4</sub>Cl อาหาร BG11 และอาหาร BG11<sub>0</sub> สรุปได้ว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> *A. siamensis* มีการชักนำให้มีการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* สูงสุด ในการทดลองต่อไปจะทำการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหาร BG11<sub>0</sub> และแปรผันปริมาณเหล็กต่อไป

#### 4.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยเหล็กปริมาณต่างๆ

จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายเหล็กให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์เพาะเลี้ยงต่อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณอาร์เอ็นเอ 0.4, 0.5, 0.3, 0.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีค่าอัตราส่วนของ

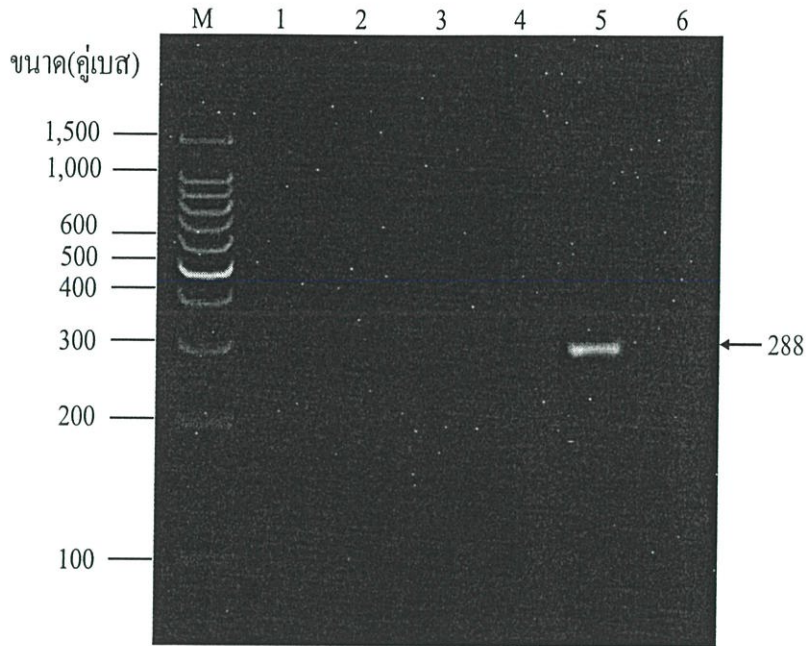
A260/A280 เท่ากับ 2.0, 1.8, 1.8 และ 1.9 ตามลำดับ แสดงว่า total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 4 สภาวะมีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณต่ำ เนื่องจากค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8 และ 2.0 ซึ่งจัดเป็นค่าที่เหมาะสมของอาร์เอ็นเอที่ควรได้จากการสกัด จากนั้น นำ total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 4 สภาวะไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

#### 4.2.2.1 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนใน total RNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DnaseI และนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI มาตรวจสอบดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA จากคูโพรเมอร์ Ana16-AnaR (ตารางที่ 4.8) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ได้ควรมีขนาด 288 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนสารละลาย total RNA เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมแบบ positive และ negative ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ที่สกัดจากทุกสภาวะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.18 ช่องที่ 1, 2, 3 และ 4) แต่จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส เฉพาะในตัวอย่างที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) (รูปที่ 4.18 ช่องที่ 5) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่มีดีเอ็นเอเหลืออยู่ จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ จากนั้น นำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนจากทุกสภาวะไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.2.2.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วยเหล็กปริมาณต่างๆ

จากการนำ total RNA มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase โดยใช้ RT-primer AnaR, D2 และ Uhyd6 จากนั้นนำสารละลาย 1 ไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเพิ่มผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ใช้คูโพรเมอร์ Ana16-AnaR, D1-D2 และ Uhyd5-Uhyd11 ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์



**รูปที่ 4.18** ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ *A. siamensis* จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ

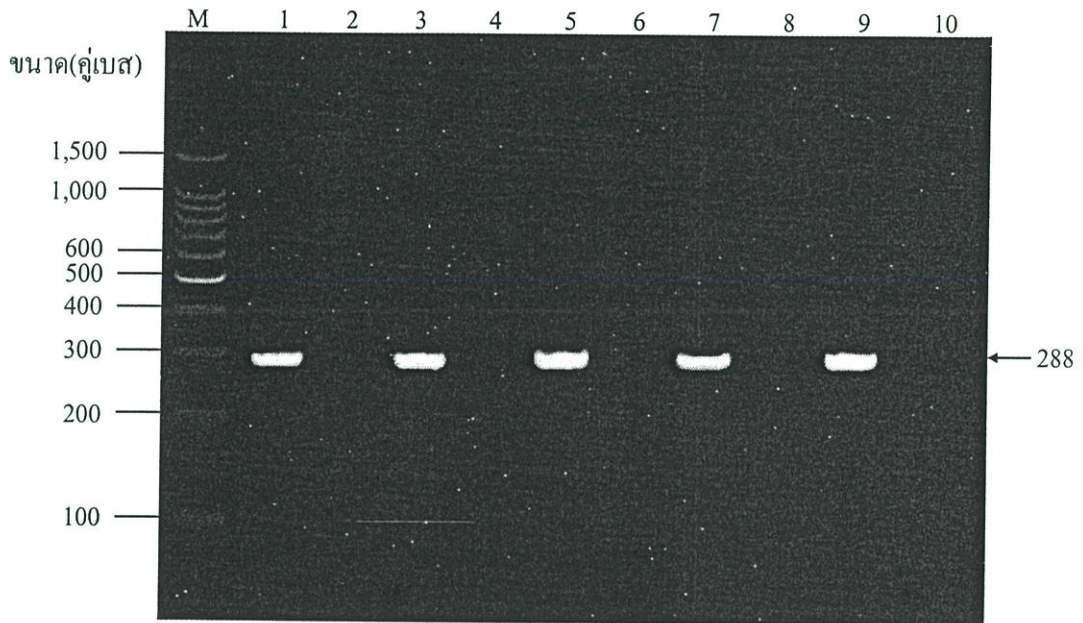
M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

- 1 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10 ไมโครโมลาร์
- 2 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 50 ไมโครโมลาร์
- 4 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 100 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 6 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

RT-PCR ที่ได้ของทั้งสามยีนมาวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบสที่เหมือนกัน ซึ่งแต่ละแถบมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.19 ช่องที่ 1, 3, 5 และ 7) ส่วนช่องที่ 9 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) (รูปที่ 4.19) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิบัติการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.19 ช่องที่ 2, 4, 6 และ 8) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 152 คู่เบสเมื่อใช้ total RNA จากทุกสภาวะและผ่านการทำปฏิบัติการสร้างสาย cDNA ซึ่งแต่ละแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.20 ช่องที่ 1, 3, 5 และ 7) และปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) (รูปที่ 4.20 ช่องที่ 9) แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เมื่อใช้ total RNA ที่ผ่านปฏิบัติการสร้างสาย cDNA โดยไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (รูปที่ 4.20 ช่องที่ 2, 4, 6 และ 8) แสดงให้เห็นว่า total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 390 คู่เบสเมื่อใช้ total RNA จากทุกสภาวะและผ่านการทำปฏิบัติการสร้างสาย cDNA (รูปที่ 4.21 ช่องที่ 1, 3, 5 และ 7) โดยแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กทุกความเข้มข้นมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.21 ช่องที่ 3, 5 และ 7) เมื่อเทียบปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* จากรูปที่ 4.21 ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์มีปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่า total RNA ที่สกัดได้จากสภาวะอื่นๆ เพียงเล็กน้อย ส่วนช่องที่ 9 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมิกดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control) (รูปที่ 4.21) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิบัติการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.21 ช่องที่ 2, 4, 6 และ 8) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน จากนั้น นำผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์



**รูปที่ 4.19** ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10 ไมโครโมลาร์

3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์

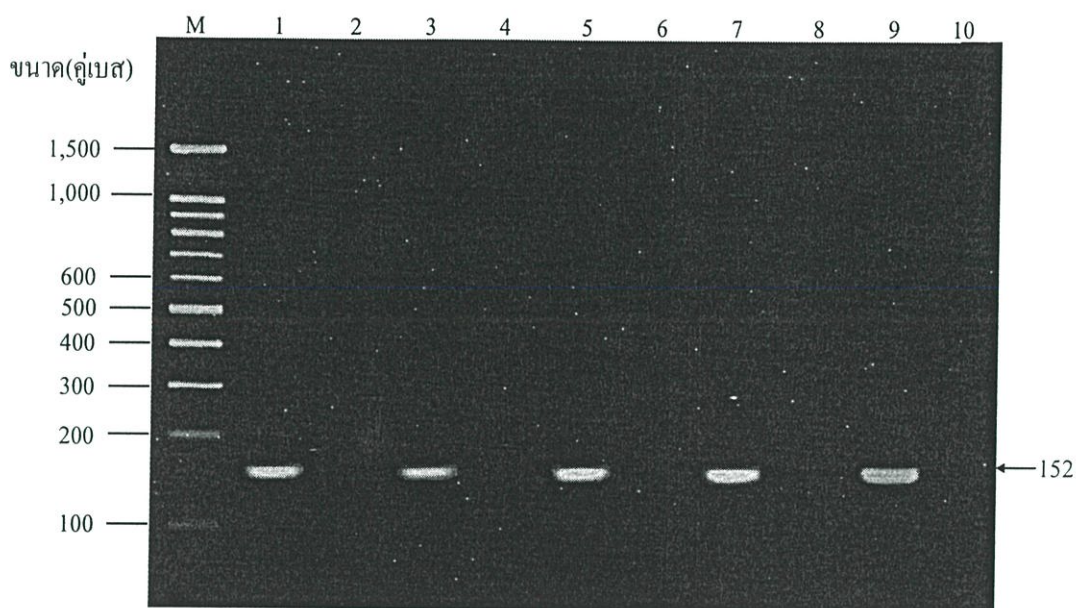
5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 50 ไมโครโมลาร์

7 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 100 ไมโครโมลาร์

9 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกคีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)

10 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นคีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6,8 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ



**รูปที่ 4.20** ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10 ไมโครโมลาร์

3 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์

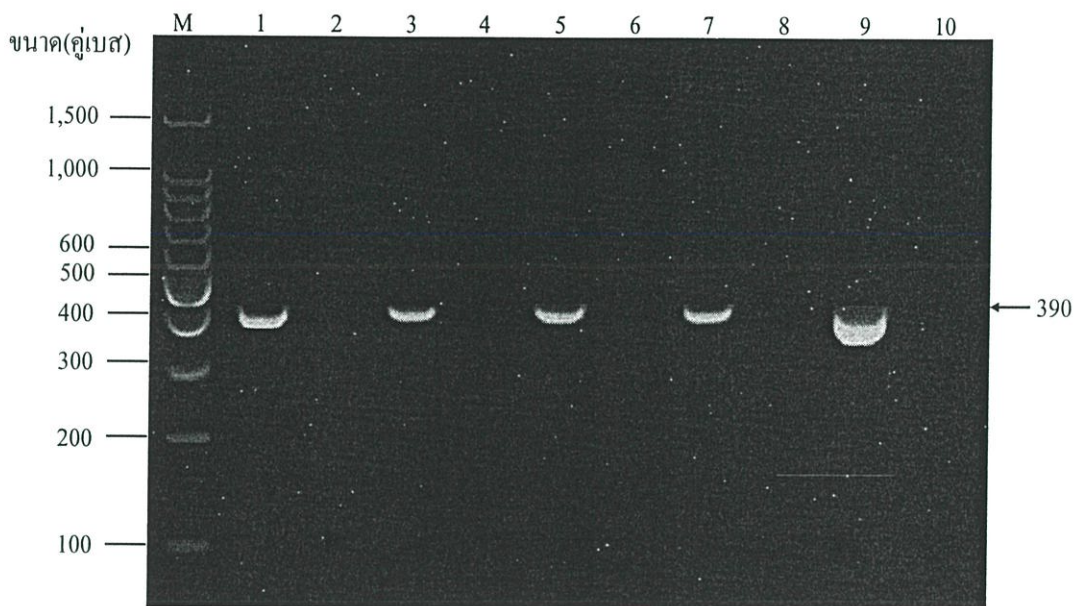
5 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 50 ไมโครโมลาร์

7 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 100 ไมโครโมลาร์

9 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)

10 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6,8 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ



**รูปที่ 4.21** ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ

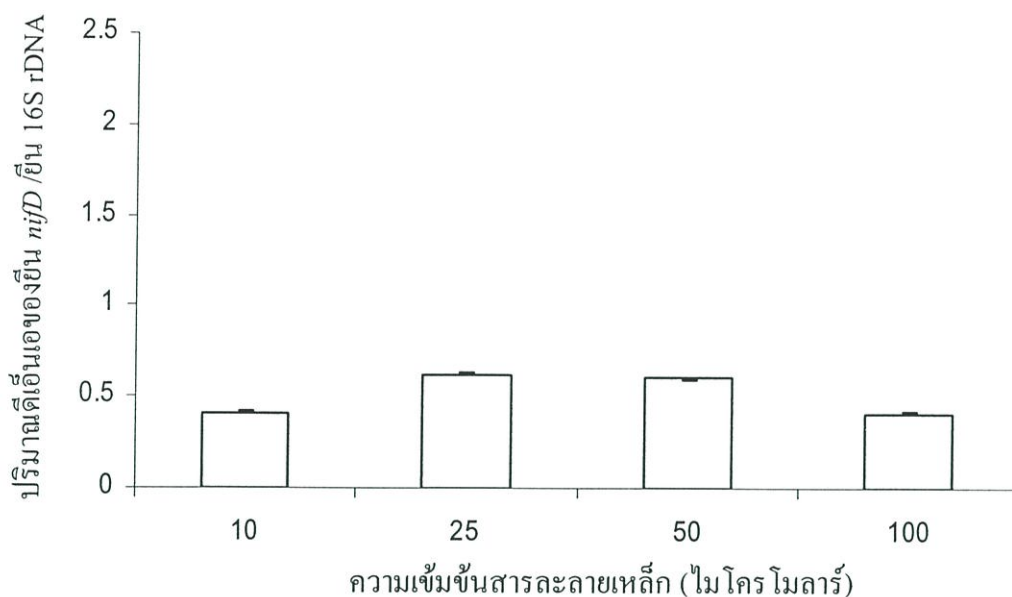
- M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 50 ไมโครโมลาร์
- 7 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 100 ไมโครโมลาร์
- 9 ผลิตรหัส PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมคีเอ็นเอของ *A. siamensis*  
(Positive control)
- 10 ผลิตรหัส PCR เมื่อนำน้ำกลั่นเป็นคีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6,8 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 10, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ (รูปที่ 4.19, 4.20 และ 4.21) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป

#### 4.2.2.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ ด้วยโปรแกรม Gene Tools

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA และ *nifD* (รูปที่ 4.19 และ 4.20) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดและใกล้เคียงกับปริมาณดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครโมลาร์มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด (รูปที่ 4.22) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายเหล็กในช่วงความเข้มข้น 10 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ มีผลต่อปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* โดยในสภาวะที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้นต่ำหรือสูงไปทำให้ *A. siamensis* มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ต่ำ ในอาหารที่มีความเข้มข้นเหล็กต่ำ *A. siamensis* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลง เนื่องจากเอนไซม์ต้องใช้เหล็กเป็นโคแฟกเตอร์ของปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน เหล็กจึงมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ มีรายงานว่าเหล็กมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียอีกด้วย (Paerl et. al. 1994 ; Falkowski. 1997 ; Berman-Frank et. al. 2001) ส่วนความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมต่อการถอดรหัสของยีน *nifD* คือ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ โดยให้ปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Saxena และคณะ (2006) ที่ศึกษาการชักนำด้วยเหล็กใน *Anabaena* sp. PCC 7120 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก 50 ไมโครโมลาร์ จะช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญ ความถี่ในการสร้างเฮเทอโรซิสต์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในการทดลองต่อไปได้เลือกความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารละลายเหล็กในอาหาร BG11 และมีปริมาณต่ำกว่า 50 ไมโครโมลาร์

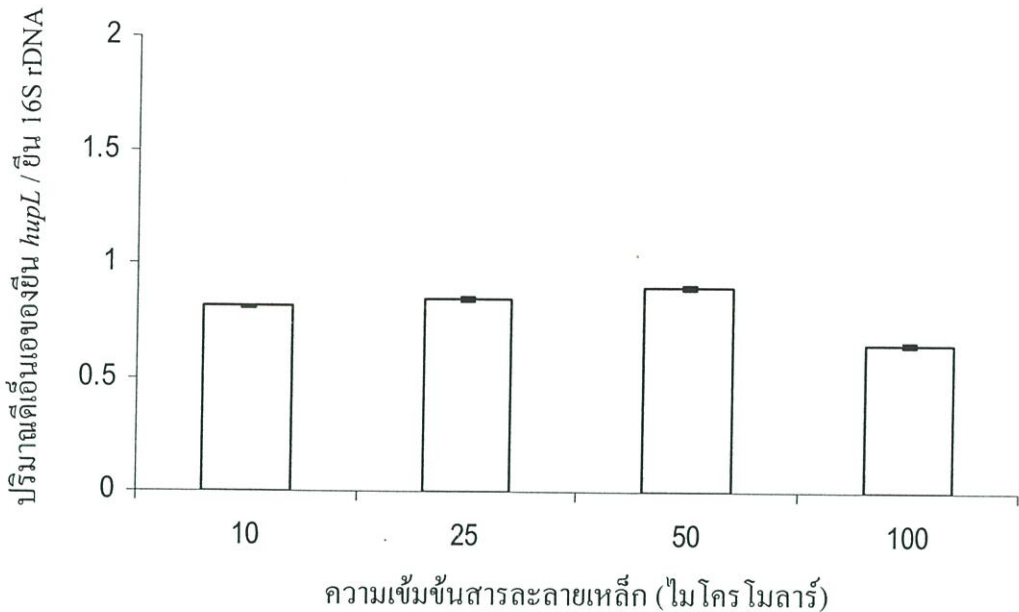
จากการวิเคราะห์ปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* โดยนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* (รูปที่ 4.21) มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA สูงสุด ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณการถอดรหัสของเซลล์



รูปที่ 4.22 ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ

ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และ 10 ไมโครโมลาร์ ส่วน *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ต่ำสุด (รูปที่ 4.23) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเหล็ก 10, 25 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้มีการถอดรหัสของยีน *hupL* ในปริมาณสูง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการถอดรหัสของยีน *nifD* นอกจากนี้เหล็กจะเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไนโตรจิเนสแล้ว ยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์อัปเทคไฮโดรจิเนสซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* อีกด้วย

จากผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กปริมาณต่างๆ สรุปได้ว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ *A. siamensis* มีการชักนำให้มีการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* ในปริมาณสูง ในการทดลองต่อไปจะทำการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหาร BG11<sub>0</sub> ชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์และชักนำด้วยการแปรผันโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ ต่อไป



**รูปที่ 4.23** ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยสารละลายเกลือปริมาณต่างๆ

#### 4.2.3 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ

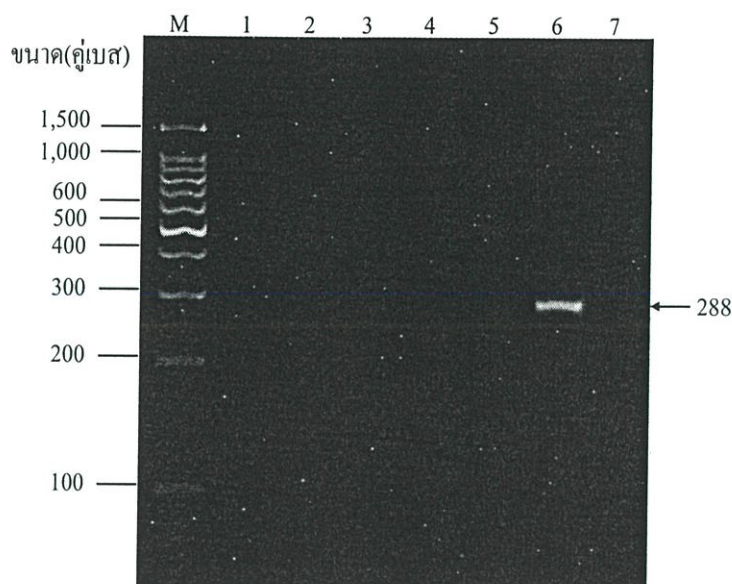
จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายโมลิบดีนัมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์เพาะเลี้ยงต่อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์มีปริมาณอาร์เอ็นเอ 2.8, 3.5, 3.2, 3.2 และ 3.8 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีค่าอัตราส่วนของ A260/A280 เท่ากับ 2.0 แสดงว่า total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 5 สภาวะมีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณต่ำ เนื่องจากค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8 และ 2.0 จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 5 สภาวะไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

#### 4.2.3.1 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนใน total RNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการนำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI และนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI มาตรวจสอบดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ได้ควรมีขนาด 288 คู่เบส ในการทำปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนสารละลาย total RNA เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมแบบ positive และ negative ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ที่สกัดจากทุกสภาวะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.24 ช่องที่ 1, 2, 3, 4 และ 5) แต่จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบสเฉพาะในตัวอย่างที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Positive control) (รูปที่ 4.24 ช่องที่ 6) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่มีดีเอ็นเอเหลืออยู่ จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ จากนั้น นำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนจากทุกสภาวะไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.2.3.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วยโมลิตินัมปริมาณต่างๆ

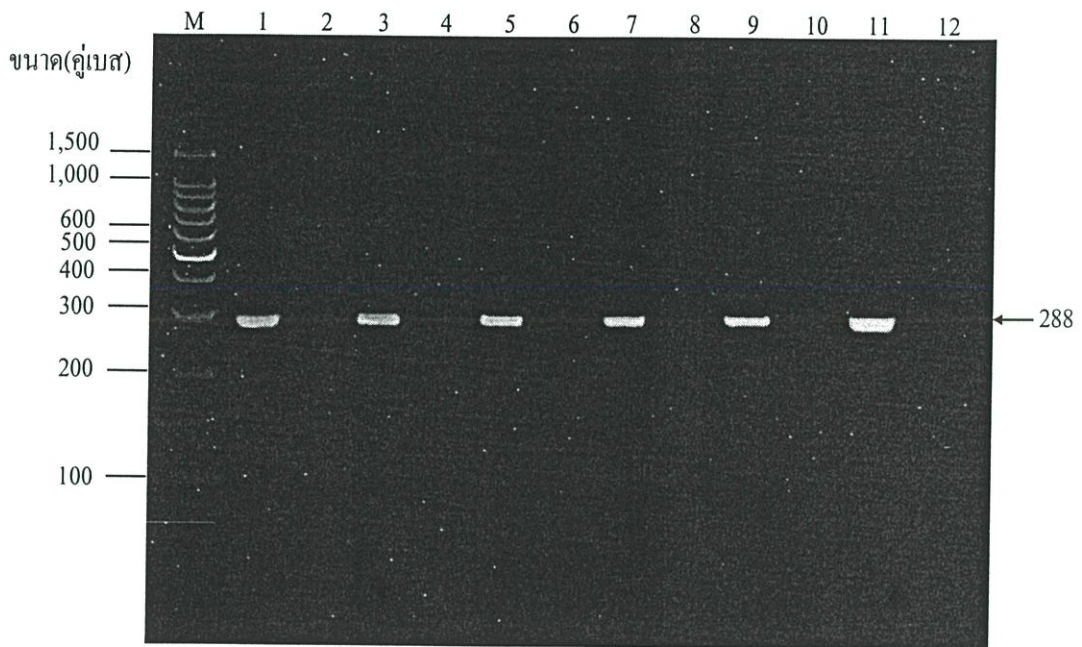
จากการนำ total RNA มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase โดยใช้ RT-primer AnaR, D2 และ Uhyd6 จากนั้น นำสารละลาย 1 ไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเพิ่มผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ใช้คู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR, D1-D2 และ Uhyd5-Uhyd11 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ของทั้งสามยีนมาวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส ซึ่งแต่ละแถบมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.25 ช่องที่ 1, 3, 5, 7 และ 9) ส่วนช่องที่ 11 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (positive



รูปที่ 4.24 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ *A. siamensis* จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

- 1 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8 ไมโครโมลาร์
- 2 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 1.6 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 3.2 ไมโครโมลาร์
- 4 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 8.0 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 16.0 ไมโครโมลาร์
- 6 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 7 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)



**รูปที่ 4.25** ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ

M คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8 ไมโครโมลาร์

3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 1.6 ไมโครโมลาร์

5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 3.2 ไมโครโมลาร์

7 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 8.0 ไมโครโมลาร์

9 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 16.0 ไมโครโมลาร์

11 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)

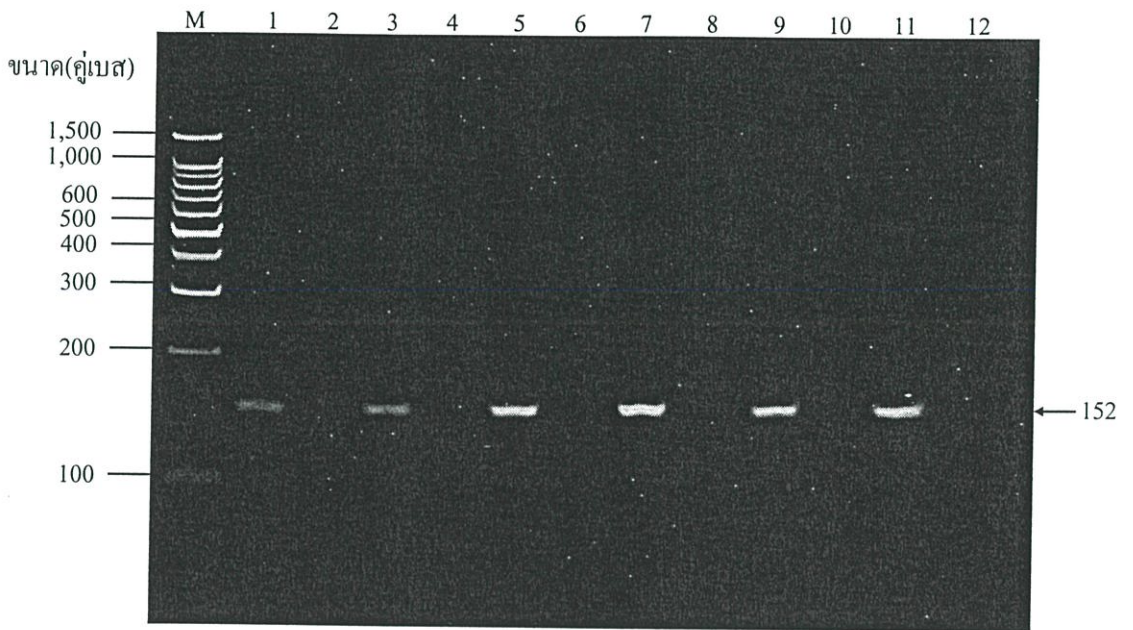
12 ผลิตรหัส PCR เมื่อนำน้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6,8,10 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

control) (รูปที่ 4.25) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิบัติการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.25 ช่องที่ 2, 4, 6, 8 และ 10) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสถานะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

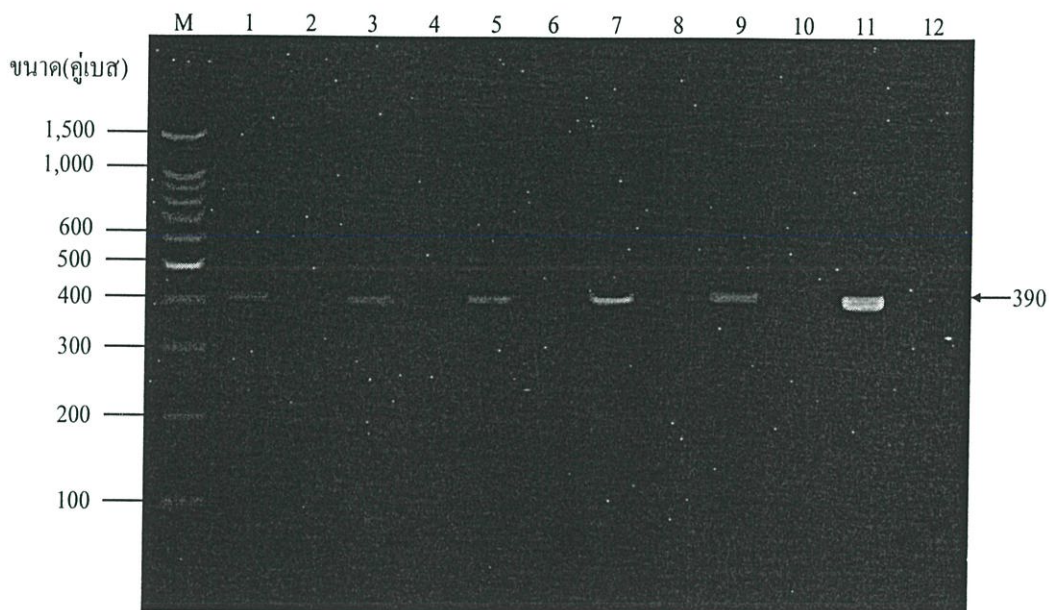
จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 152 คู่เบสเมื่อใช้ total RNA จากทุกสถานะและผ่านการทำปฏิบัติการสร้างสาย cDNA (รูปที่ 4.26 ช่องที่ 1, 3, 5, 7 และ 9) โดยแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่า total RNA ที่สกัดได้จากสถานะอื่นๆ (รูปที่ 4.26 ช่องที่ 5, 7 และ 9) ส่วนช่องที่ 11 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมิกดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control) (รูปที่ 4.26) สำหรับการทดลองควบคุมซึ่งปฏิบัติการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.26 ช่องที่ 2, 4, 6, 8 และ 10) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสถานะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 390 คู่เบสเมื่อใช้ total RNA จากทุกสถานะและผ่านการทำปฏิบัติการสร้างสาย cDNA (รูปที่ 4.27 ช่องที่ 1, 3, 5, 7 และ 9) โดยแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.8, 1.6, 3.2 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.27 ช่องที่ 1, 3, 5 และ 9) แต่แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า total RNA ที่สกัดได้จากสถานะอื่นๆ (รูปที่ 4.27 ช่องที่ 7) ส่วนช่องที่ 11 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมิกดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิบัติการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.27 ช่องที่ 2, 4, 6, 8 และ 10) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสถานะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน จากนั้น นำผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ (รูปที่ 4.25, 4.26 และ 4.27) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.26 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ

- M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 1.6 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 3.2 ไมโครโมลาร์
- 7 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 8.0 ไมโครโมลาร์
- 9 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 16.0 ไมโครโมลาร์
- 11 ผลิตรหัส PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมคีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 12 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นคีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6,8,10 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

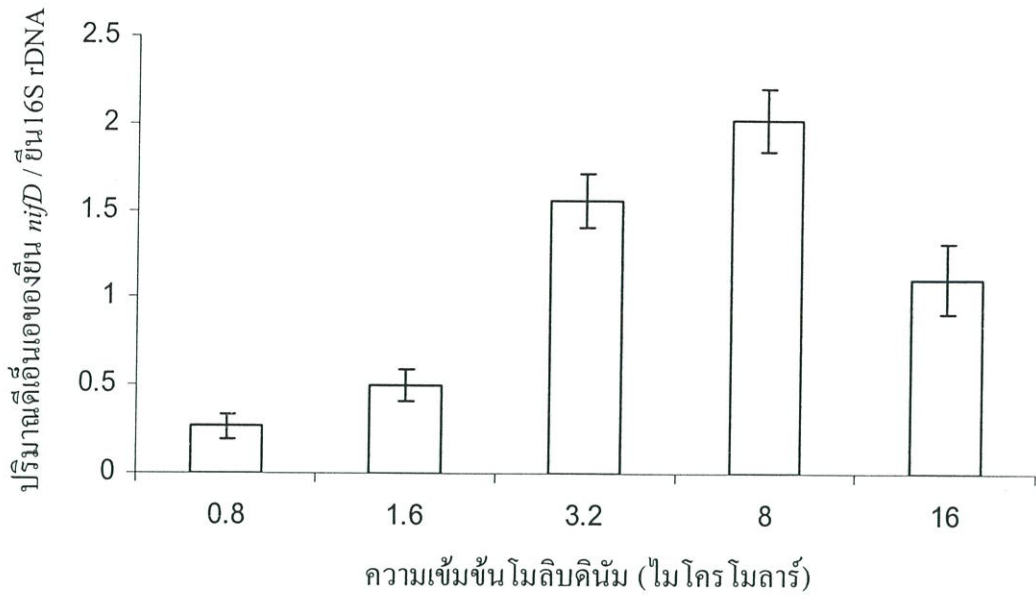


รูปที่ 4.27 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8 ไมโครโมลาร์
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 1.6 ไมโครโมลาร์
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 3.2 ไมโครโมลาร์
- 7 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 8.0 ไมโครโมลาร์
- 9 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 16.0 ไมโครโมลาร์
- 11 ผลิตรหัส PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 12 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6,8,10 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม 0.8, 1.6, 3.2, 8.0 และ 16.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

#### 4.2.3.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วย โมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ ด้วยโปรแกรม Gene Tools

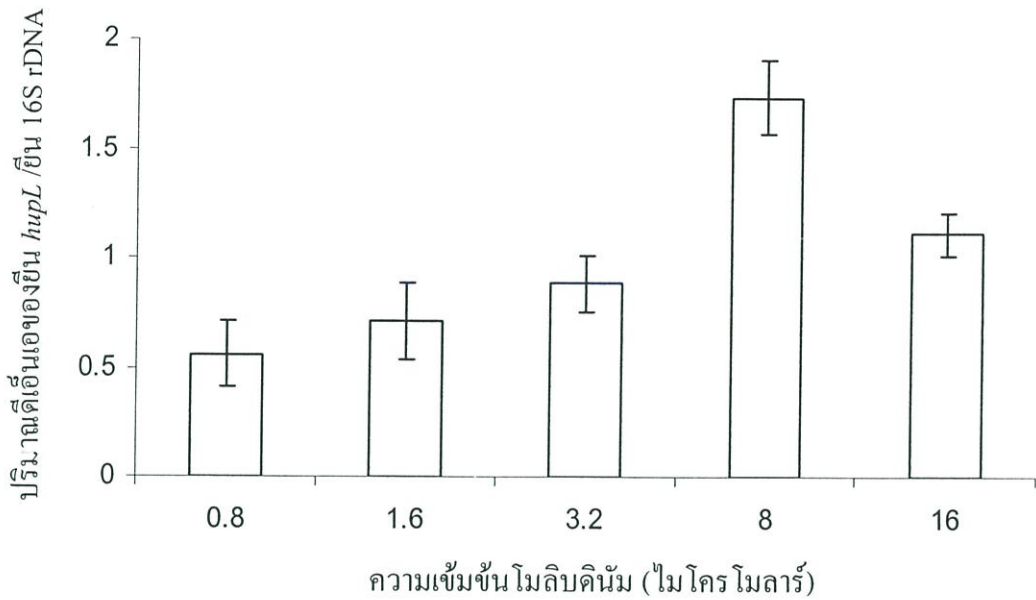
จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA และ *nifD* (รูปที่ 4.25 และ 4.26) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8.0 ไมโครโมลาร์มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด และในอาหารที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.8, 1.6, 3.2 และ 16.0 ไมโครโมลาร์มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำ (รูปที่ 4.28) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายโมลิบดีนัมในช่วงความเข้มข้น 0.8 ถึง 16.0 ไมโครโมลาร์มีผลต่อปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* โดยในสภาวะที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้นต่ำหรือสูงไปทำให้ *A. siamensis* มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ต่ำ ในอาหารที่มีโมลิบดีนัมความเข้มข้นต่ำ *A. siamensis* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจีเนสต้องใช้โมลิบดีนัมเป็นโคแฟกเตอร์ของปฏิกิริยา เมื่อมีปริมาณโมลิบดีนัมน้อยจึงส่งผลมีโคแฟกเตอร์จำกัด จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *K. pneumoniae*, *C. pasteurianum*, *A. vinelandii* และไซยาโนแบคทีเรีย *A. cylindrica* ภายใต้สภาวะที่ตรึงไนโตรเจนแต่ขาดโมลิบดีนัมจะมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลง (Brill et. al. 1974 ; Fay and Vasconcelos. 1974 ; Nagatani and Brill. 1974 ; Cardenas and Mortenson. 1975) ในอาหารที่มีโมลิบดีนัมความเข้มข้นสูง โมลิบดีนัมจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส Zahalak และคณะ (2004) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. variabilis* ATCC 29413 ในอาหารที่มีโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 10 ไมโครโมลาร์ และศึกษาอัตราการเจริญเติบโต พบว่า *A. variabilis* ATCC 29413 มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโมลิบดีนัม 10 ไมโครโมลาร์ ในการทดลองความเข้มข้นของโมลิบดีนัม 8.0 ไมโครโมลาร์เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการถอดรหัสของยีน *nifD* ใน *A. siamensis* ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Cardenas และ Mortenson (1975) ที่ศึกษาบทบาทของโมลิบดีนัมในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย *C. pasteurianum* ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เติมโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ พบว่าในอาหารที่เติมโมลิบดีนัมความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ *C. pasteurianum* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงสุด



**รูปที่ 4.28** ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัม ปริมาณต่างๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* โดยนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* (รูปที่ 4.27) มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8.0 ไมโครโมลาร์มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA สูงสุด (รูปที่ 4.29) และในอาหารที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 0.8, 1.6, 3.2 และ 16.0 ไมโครโมลาร์มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ต่ำ (รูปที่ 4.29) ผลการทดลองได้สอดคล้องกับผลการทดลองการถอดรหัสของยีน *nifD* อย่างไรก็ตาม โมลิบดีนัมไม่ได้ทำงานร่วมกับเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนส แต่เนื่องจากในสภาวะที่มีการชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8.0 ไมโครโมลาร์ ทำให้มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* สูง กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจึงสูงขึ้น มีการผลิตไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้มากขึ้น ทำให้มีสารตั้งต้นสำหรับการทำงานของเอนไซม์ฮัพเทคไฮโดรจีเนสสูงขึ้น จึงกระตุ้นให้มีการถอดรหัสของยีน *hupL*

จากผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมปริมาณต่างๆ สรุปได้ว่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่ชักนำด้วยโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8.0 ไมโครโมลาร์ *A. siamensis* มีการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* ในปริมาณสูง ในการ



**รูปที่ 4.29** ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยโมลิบดินัม ปริมาณต่างๆ

ทดลองต่อไป จึงได้ทำการเพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหาร BG11<sub>0</sub> และชักนำด้วยสารละลายเหล็ก 25 ไมโครโมลาร์ และ โมลิบดินัม 8.0 ไมโครโมลาร์ และแปรผันการชักนำด้วยก๊าซต่างๆ ต่อไป

#### 4.2.4 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

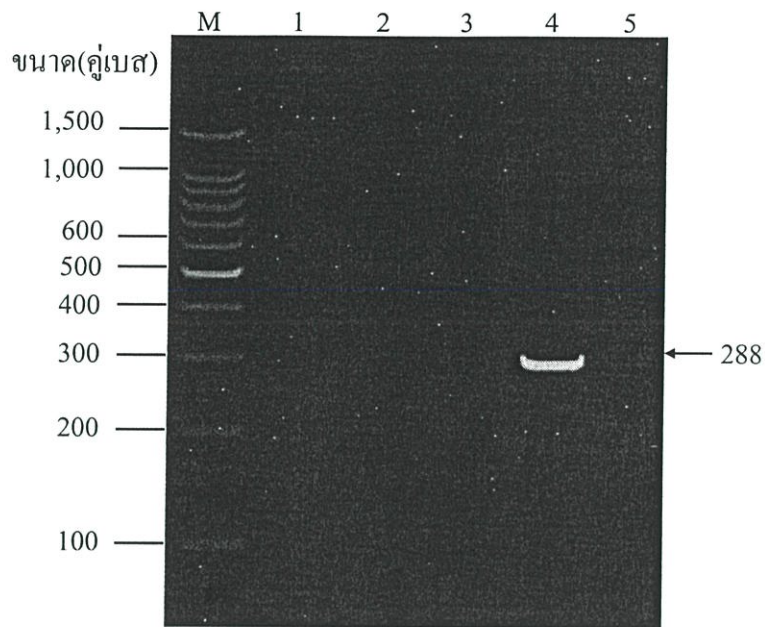
จากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นเติมสารละลายเหล็กและโมลิบดินัมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 25 และ 8.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอน และอากาศ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์มาสกัด total RNA วิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG11<sub>0</sub> ที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอน และอากาศ มีปริมาณอาร์เอ็นเอ 3.5, 1.6, 2.0, 3.3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และมีค่าอัตราส่วนของ A260/A280 เท่ากับ 2.0, 1.8, 1.8 และ 1.9 ตามลำดับ แสดงว่า total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 4 สภาวะมีความบริสุทธิ์และมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณต่ำ เนื่องจากค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8 และ 2.0 จากนั้น นำ total RNA ที่สกัดได้จากทั้ง 4 สภาวะไปทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI ต่อไป

#### 4.2.4.1 ผลการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนใน total RNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI จากนั้นนำสารละลาย total RNA ที่ผ่านปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNaseI มาตรวจสอบดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้จะใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่สกัดได้จากข้อ 4.1.1 และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนสารละลาย total RNA เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุมแบบ positive และ negative ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR บนอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ที่สกัดจากทุกสภาวะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.30 ช่องที่ 1, 2 และ 3) แต่จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส เฉพาะในตัวอย่างที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รูปที่ 4.30 ช่องที่ 4) จากผลการทดลองแสดงว่าปฏิกิริยาการย่อยดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่มีดีเอ็นเอเหลืออยู่ จากนั้นนำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนจากทุกสภาวะไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ในขั้นตอนต่อไป

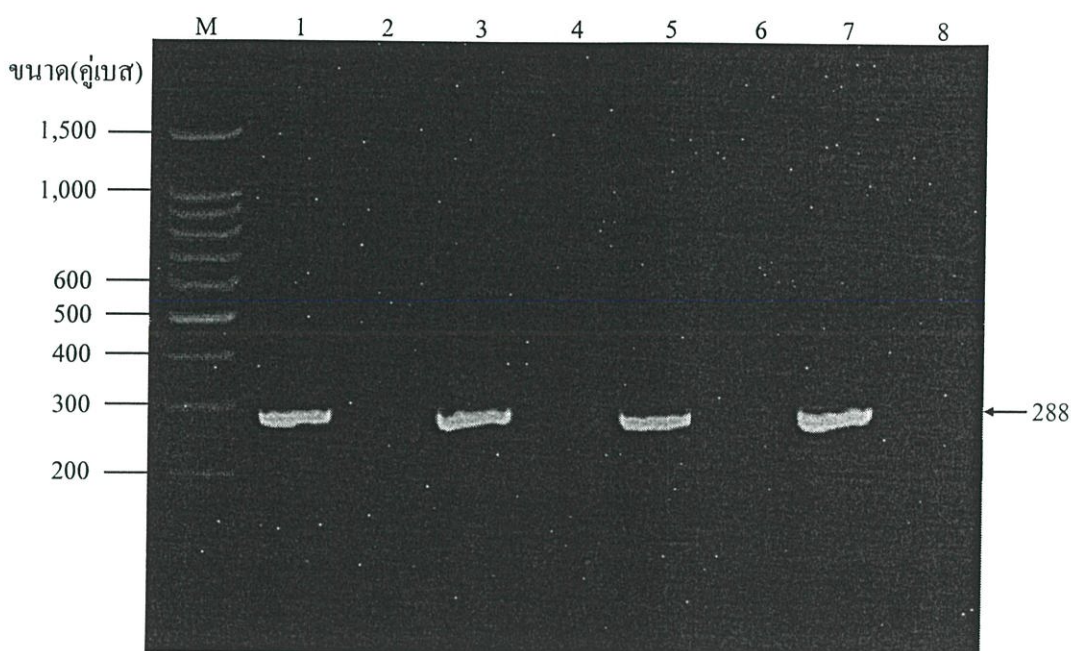
#### 4.2.4.2 ผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

จากการนำ total RNA มาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase โดยใช้ RT-primer AnaR, D2 และ Uhyd6 จากนั้น นำสารละลาย 1 ไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเพิ่มผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* ใช้คู่ไพรเมอร์ Ana16-AnaR, D1-D2 และ Uhyd5-Uhyd11 ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ของทั้งสามยีนมาวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 288 คู่เบส ซึ่งแต่ละแถบมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.31 ช่องที่ 1, 3 และ 5) ส่วนช่องที่ 7 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (positive control) (รูปที่ 4.31) สำหรับการทดลองควบคุมซึ่งปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์



รูปที่ 4.30 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA เมื่อใช้สารละลาย total RNA ของ *A. siamensis* จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 2 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 3 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของสารละลาย total RNA จากสภาวะการชักนำด้วยอากาศ
- 4 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 5 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)



**รูปที่ 4.31** ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน

3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน

5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยอากาศ

7 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของจีโนมิกดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control)

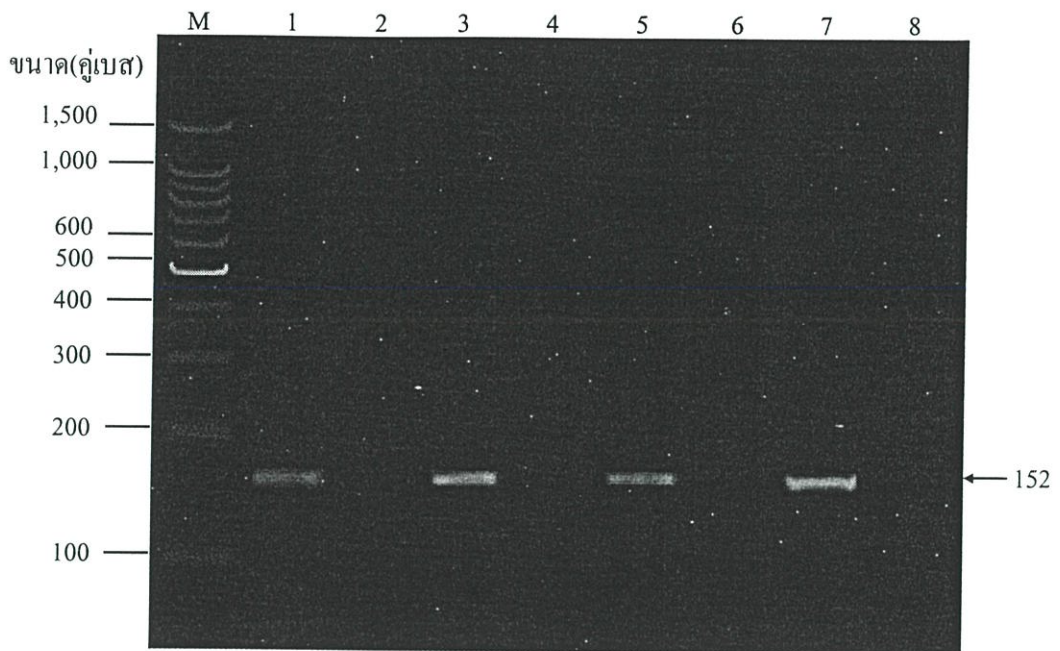
8 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)

2,4,6 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน 16S rDNA จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอน และอากาศตามลำดับ

M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.31 ช่องที่ 2, 4, 6 และ 8) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

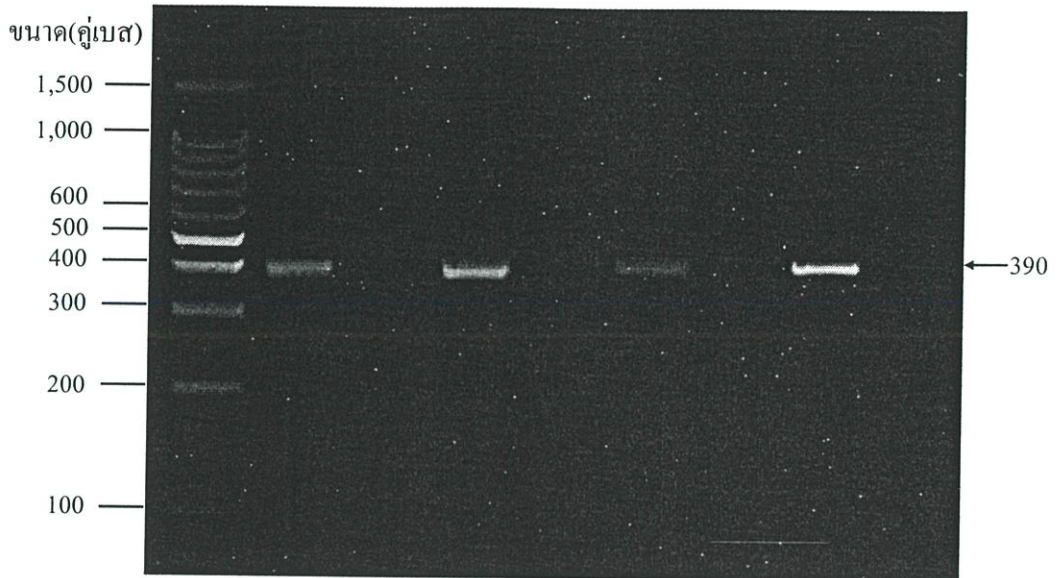
จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 152 คู่เบส เมื่อใช้ total RNA จากทุกสภาวะและผ่านการทำปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA (รูปที่ 4.32 ช่องที่ 1, 3 และ 5) โดยแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนมีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด (รูปที่ 4.32 ช่องที่ 3) และแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนและอากาศมีปริมาณดีเอ็นเอต่ำและมีปริมาณดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.32 ช่องที่ 1 และ 5) ส่วนช่องที่ 7 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control) (รูปที่ 4.32) สำหรับการทดลองควบคุม ซึ่งปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.32 ช่องที่ 2, 4 และ 6) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* มาวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เพียง 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 390 คู่เบส เมื่อใช้ total RNA จากทุกสภาวะและผ่านการทำปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA (รูปที่ 4.33 ช่องที่ 1, 3 และ 5) ซึ่งแต่ละแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยแถบของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนมีปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด (รูปที่ 4.33 ช่องที่ 3) รองลงมาคือแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน (รูปที่ 4.33 ช่องที่ 1) และแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยอากาศมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด (รูปที่ 4.33 ช่องที่ 5) ส่วนช่องที่ 7 เป็นแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมดีเอ็นเอ *A. siamensis* (Positive control) (รูปที่ 4.33) สำหรับการทดลองควบคุมซึ่งปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ทำให้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (รูปที่ 4.33 ช่องที่ 2, 4 และ 6) แสดงให้เห็นว่าหลอดควบคุมที่มี total RNA จากทุกสภาวะไม่มีดีเอ็นเอปนเปื้อน จากนั้น นำผลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ (รูปที่ 4.31, 4.32 และ 4.33) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools ต่อไป



รูปที่ 4.32 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยอากาศ
- 7 ผลิตรหัส PCR ของยีน *nifD* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 8 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *nifD* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอน และอากาศ ตามลำดับ



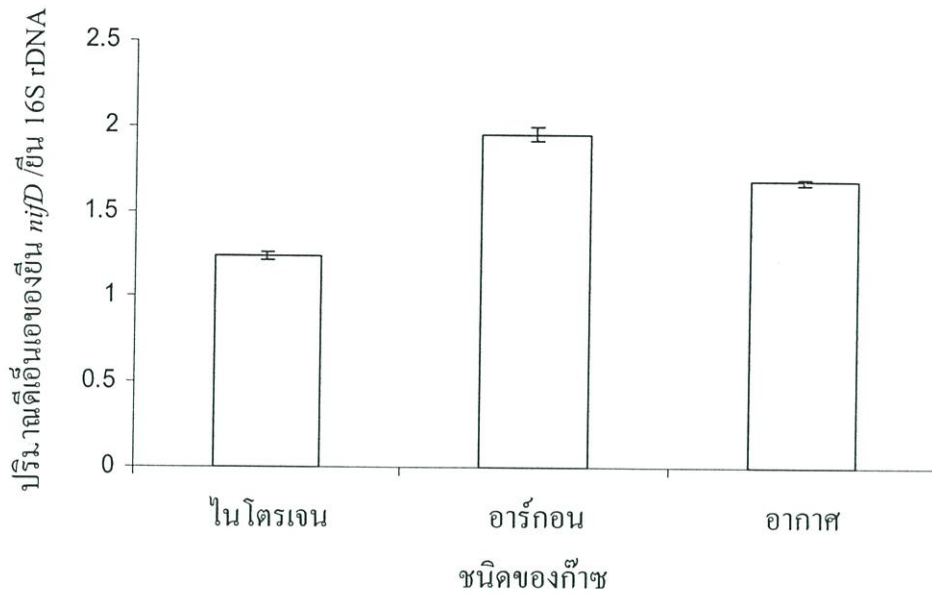
รูปที่ 4.33 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder
- 1 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน
- 3 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน
- 5 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จาก total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยอากาศ
- 7 ผลิตรหัส PCR ของยีน *hupL* ของจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. siamensis* (Positive control)
- 8 ผลิตรหัส PCR เมื่อใช้น้ำกลั่นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Negative control)
- 2,4,6 ผลิตรหัส RT-PCR ของยีน *hupL* จากปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA ที่ไม่เติมเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase ของ total RNA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ก๊าซอาร์กอน และอากาศ ตามลำดับ

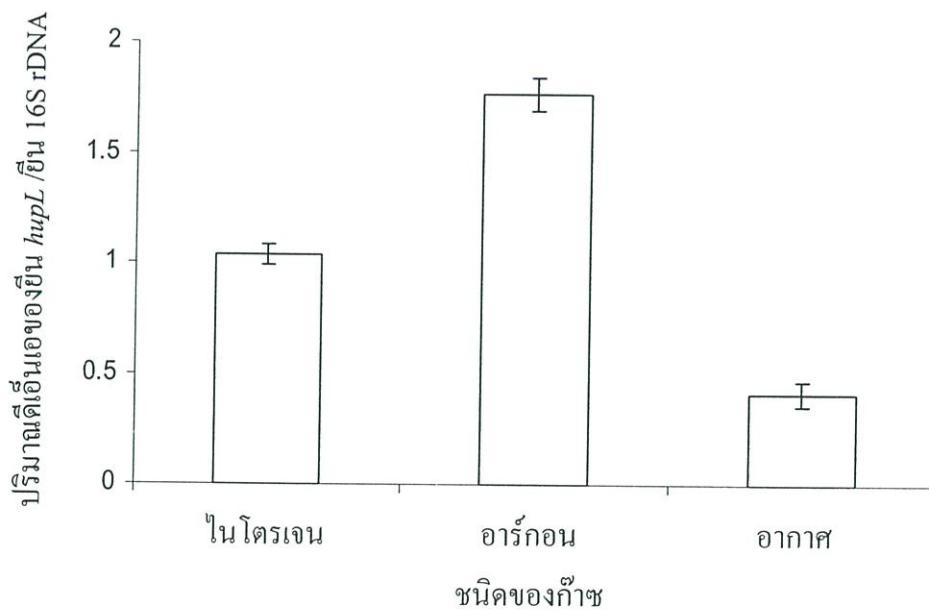
#### 4.2.4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA, *nifD* และ *hupL* จาก total RNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ ด้วยโปรแกรม Gene Tools

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA และ *nifD* (รูปที่ 4.31 และ 4.32) ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่าปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนมีปริมาณดีเอ็นเอเทียบกับยีน 16S rDNA สูงสุดและใกล้เคียงกับปริมาณดีเอ็นเอของ *A. siamensis* ที่ชักนำด้วยอากาศ ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนมีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด (รูปที่ 4.34) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนมีผลต่อปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* ในสภาวะที่มีการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน ก๊าซอาร์กอนจะเข้าไปแทนที่อากาศ ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากไม่มีออกซิเจนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในสภาวะการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน *A. siamensis* จะมีปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* ที่สูง ในขณะที่ปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนมีปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีไนโตรเจนที่มากเกินไปจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Weare และ Benemann (1974) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *Plectonema boryanum* ในสภาวะที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะลดลงภายหลังจากเซลล์ตรึงไนโตรเจน แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะไม่ลดลงภายใต้สภาวะการชักนำด้วยก๊าซอาร์กอน

จากการวิเคราะห์ปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* โดยนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* (รูปที่ 4.33) มาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่า *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนมีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA สูงสุด รองลงมาคือเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ชักนำด้วยอากาศมีปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ต่ำที่สุด (รูปที่ 4.35) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การชักนำด้วยก๊าซอาร์กอนจะมีผลต่อปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของยีน *nifD* ส่วนการชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ปริมาณการถอดรหัสของยีน *hupL* ถูกชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน ดังนั้น เมื่อนำเซลล์ *A. siamensis* มาชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจนถึงแม้จะมีปริมาณการถอดรหัสจากยีน *nifD* น้อยแต่ไม่ส่งผลต่อการถอดรหัสของยีน *hupL* จึงสามารถสรุปได้ว่า ก๊าซอาร์กอนมีผลต่อเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนสมากที่สุดแต่จะมีผลต่อเอนไซม์ไนโตรจีเนสมากกว่าเอนไซม์อัฟเทคไฮโดรจีเนส



รูปที่ 4.34 ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *nifD* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ



รูปที่ 4.35 ปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hupL* เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน 16S rDNA ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ

จากผลการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* เทียบกับยีน 16S rDNA ของ *A. siamensis* ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่ชักนำด้วยก๊าซต่างๆ สรุปได้ว่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> ภายใต้สภาวะการชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8.0 ไมโครโมลาร์ และก๊าซอาร์กอน จะชักนำให้ *A. siamensis* มีการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* ในปริมาณสูง

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 สรุปผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน *A. siamensis*

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไนโตรจีเนสของไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของ *A. siamensis* เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ U2-II2, III-D4, D1-K1 และ K4-K6 มีขนาดประมาณ 1,300, 1,300, 2,300 และ 400 คู่เบสตามลำดับ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะสูง และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pDrive หรือ pGEM-T Easy แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์มาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิด pCA1.4, pCB12.4, pCP7.5 และ pCK1.7 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีผลิตภัณฑ์ PCR จากการนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า *A. siamensis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *nifH* 888 คู่เบส ยีน *nifD* 1,500 คู่เบส และยีน *nifK* 1,536 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ถอดและแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 295, 499 และ 511 ตัว ที่มีขนาด 32.2, 55.8 และ 56.9 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนต่างๆ ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *nifH*, *nifD* และ *nifK* ของ *A. siamensis* มีความคล้ายคลึงสูงกับโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของไซยาโนแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนอื่นๆ มากกว่า 83 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาบริเวณลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ของโปรตีน NifH, NifD และ NifK ของ *A. siamensis* พบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ 2 บริเวณในทุกโปรตีน ซึ่งลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์จะมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ทำหน้าที่ช่วยในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

## 5.2 สรุปผลการศึกษาระดับการถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำ total RNA ที่สกัดได้ของ *A. siamensis* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะการชักนำต่างๆ มาวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอและความบริสุทธิ์ จากนั้นนำ total RNA ที่สกัดได้มาทำการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNaseI จากนั้นทำการทดสอบการย่อยดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำสารละลาย total RNA ที่ปราศจากดีเอ็นเอปนเปื้อนไปทำการสังเคราะห์สาย cDNA ของยีน 16S rDNA ยีน *nifD* และยีน *hupL* ด้วยเอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase และทำการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีนทั้งสามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสและเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder และนำรูปที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Tools พบว่า *A. siamensis* มีปริมาณการถอดรหัสของยีน *nifD* และยีน *hupL* สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BG11<sub>0</sub> ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน และภายใต้สภาวะการชักนำด้วยสารละลายเหล็กความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์และสารละลายโมลิบดีนัมความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ รวมถึงการชักนำภายใต้สภาวะปราศจากอากาศด้วยก๊าซอาร์กอน

## บรรณานุกรม

- ยูวดี พิรพรพิศาล. 2546. **สาหร่ายวิหยา**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.  
ถัดดา วงศ์รัตน์. 2542. **แพลงก์ตอนพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์.
- Angeloni, S. V. and Potts, M. 1994. "Analysis of the sequences within and flanking the  
cyanoglobin-encoding gene, *glnB*, of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584."  
**Gene**. 146 : 133-134.
- Axelsson, R., Oxelfelt, F. and Lindblad, P. 1999. "Transcriptional regulation of *Nostoc* uptake  
hydrogenase." **FEMS. Microbiol. Lett.** 170 : 77-81.
- Beesley, C. E., Smith, R. J., Temple, S. J. and Lea, P. J. 1994. "Cloning and nucleotide sequence  
of the gene encoding dinitrogenase reductase (*nifH*) from the cyanobacterium *Nostoc*  
6720." **Biochem. Biophys. Acta.** 1219(2) : 548-550.
- Ben-Porath, J., Zehr, J.P. 1994. "Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes."  
**Appl. Environ. Microbiol.** 60 : 880-887.
- Berman-Frank, I., Cullen, J. T., Shaked, Y., Sherrell, R. M. and Falkowski, P. G. 2001. "Iron  
availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*." **Limnol.**  
**Oceanogr.** 46(6) : 1249-1260.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. and Falkowski, P. 2003. "Nitrogen fixation and photosynthetic  
oxygen evolution in cyanobacteria." **Research in Microbiology.** 154 : 157-164.
- Bone, D. H. 1971a. "Nitrogenase activity and nitrogen assimilation in *Anabaena flos-aquae*  
growing in continuous culture." **Arch. Mikrobiol.** 80(3) : 234-241.
- Bone, D. H. 1971b. "Kinetic of synthesis of nitrogenase in batch and continuous culture of  
*Anabaena flos-aquae*." **Arch. Mikrobiol.** 80(3) : 242-251.
- Boussiba, S. 1993. "Production of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* in a  
closed tubular reactor for rice farming." **Microb. Releases.** 2 : 35-39.
- Brill, W. J., Steiner, A. L. and Shah, V. K. 1974. "Effect of molybdenum starvation and tungsten  
on the synthesis of nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae*." **J. Bacteriol.**  
118 : 986-989.

- Brusca, J. S., Hale, M. A., Carrasco, C. D. and Golden, J. W. 1989. "Excision of an 11-kilobase-pair DNA element from within the *nifD* gene in *Anabaena variabilis* heterocysts." **J. Bacteriol.** 171(8) : 427-431.
- Bryant, D. A., editor. 1994. **The molecular biology of cyanobacteria.** The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Cardenas, J. and Mortenson, L. E. 1975. "Role of molybdenum in dinitrogen fixation by *Clostridium pasteurianum*." **J. Bacteriol.** 123 : 978-984.
- Carr, N. G. and Whitton, B. A., editor. 1973. **In The Biology of Blue-green Algae.** Oxford : Blackwell.
- Chen, H.-M., Huang, T.-C. and Chine, C.-Y. 1996. "Nucleotide sequence of the *nifHDK* operon in the aerobic nitrogen-fixing unicellular *Synechococcus* sp. RF-1." **Bot. Bull. Acad. Sin.** 37 : 99-105.
- Colón-López, M. S., Tang, H.-Y., Tucker, D. L. and Sherman, L. A. 1999. "Analysis of the *nifHDK* operon and structure of the NifH protein from the unicellular, diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* strain sp. ATCC 51142." **Biochim. Biophys. Acta.** 1473 : 363-375.
- Desikachary, T. V. 1959. **Indian Council of Agriculture Research.** New Delhi.
- Dixon, R. O. D. and Wheeler, C. T. 1986. **Nitrogen Fixation in Plants.** New York : Chapman and Hall.
- Doe Joint Institute. 2001. ***nostoc punctiforme* PCC 73102.** [Online]. Available : [http://www.jgi.doe.gov/JGI\\_microbial/html/nostoc/nostoc\\_homepage.html](http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/nostoc/nostoc_homepage.html).
- Dominic, B., Chen, Y.-B. and Jonathan, P.-Z. 1998. "Cloning and transcriptional analysis of the *nifUHDK* gene of *Trichodesmium* sp. IMS101 reveals stable *nifD*, *nifDK* and *nifK* transcripts." **J. Microbiol.** 144 : 3359-3368.
- Falkowski, P. G. 1997. "Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean." **Nature.** 387 : 272-275.
- Fay, P. and Vasconcelos, L. D. 1974. "Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. II. The effect of molybdenum and vanadium." **Arch. Microbiol.** 99 : 221-230.
- Fujita, Y., Takahashi, Y., Shonai, F., Ogura, Y. and Matsubara, H. 1991. "Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the

- filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum*.” **Plant Cell Physiol.** 32 : 1093-1106.
- Golden, J. W., Whorff, L. L. and Wiest, D. R. 1991. “Independent regulation of *nifHDK* operon transcription and DNA rearrangement during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120.” **J. Bacteriol.** 173(22) : 7098-7105.
- Golden, J. W. and Yoon, H.-S. 2003. “Heterocyst development in *Anabaena*.” **Curr. Opin. Microbiol.** 6 : 557-563.
- Hallenbeck, P. C., Kostel, P. J. and Benemann, J.R. 1979. “Purification and properties of nitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*.” **Eur. J. Biochem.** 98(1) : 275-284.
- Happe, T., Schütz, K. and Böhme, H. 2000. “Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413.” **J. Bacteriol.** 182 : 1624-1631.
- Hausinger, R. P., Howard, J. B. 1980. “Comparison of the iron proteins from the nitrogen fixation complexes of *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum*, and *Klebsiella pneumoniae*.” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77 : 3826-3830.
- Hawkesford, M. J., Reed, R. H., Rowell, P. and Stewart, W. D. 1981. “Nitrogenase activity and membrane electrogenesis in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* Kutz.” **Eur. J. Biochem.** 115(3) : 519-523.
- Hawkesford, M. J., Reed, R. H., Rowell, P. and Stewart, W.D. 1982. “Nitrogenase activity and membrane electrogenesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*.” **Eur. J. Biochem.** 127(1) : 63-66.
- Helber, J. T., Johnson, T. R., Yarbrough, L. R. and Hirschberg, R. 1988a. “Regulation of nitrogenase gene expression in anaerobic cultures of *Anabaena variabilis*.” **J. Bacteriol.** 170(2) : 552-557.
- Helber, J. T., Johnson, T. R., Yarbrough, L. R. and Hirschberg, R. 1988b. “Effect of nitrogenous compounds on nitrogenase gene expression in anaerobic cultures of *Anabaena variabilis*.” **J. Bacteriol.** 170(2) : 558-563.
- Henson, B. J., Watson, L. E. and Barnum, S. R. 2002. “Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *NifD* sequences.” **Curr. Microbiol.** 45(3) : 161-164.

- Huang, T.-C., Lin, R.-F., Chu, M.-K. and Chen, H.-M. 1999. "Organization and expression of nitrogen fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1." **J. Microbiol.** 143 : 743-753.
- Ioannidis, I. and Buck, M. 1987. "Nucleotide sequence of the *Klebsiella pneumoniae nifD* gene and predicted amino acid sequence of the alpha-subunit of nitrogenase MoFe protein." **Biochem. J.** 247 : 287-291.
- Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J., Newton, W. E. and Dean, D. R. 1989. "Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*." **J. Bacteriol.** 171 : 1017-1027.
- Joerger, R. D. and Bishop, P. E. 1988. "Bacterial alternative nitrogen fixation systems." **Crit. Rev. Microbiol.** 16 : 1-14.
- Kallas, T., Rebiere, M.-C., Rippka, R. and Tandeau, N. 1983. "The structural *nif* genes of the cyanobacteria *Gloeotheca* sp. and *Calothrix* sp. share homology with those of *Anabaena* sp., but the *Gloeotheca* genes have a different arrangement." **J. Bacteriol.** 155 : 427-431.
- Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B. and Bothe, H. 1988. "Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in cyanobacterium *Anabaena variabilis*." **FEMS. Microbiol. Lett.** 51 : 19-24.
- Kentemich, T., Haverkamp, G. and Bothe, H. 1991. "The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*." **Z. Naturforsch.** 46 : 217-222.
- Lammers, P. J. and Haselkorn, R. 1983. "Sequence of the *nifD* gene coding for the  $\alpha$  subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80 : 4723 -4727.
- Lewin, R.A., editor. 1962. **Physiology and Biochemistry.** New York : Academic Press.
- Lindberg, P. 2003. "Cyanobacterial hydrogen metabolism-uptake hydrogenase and hydrogen production by nitrogenase in filamentous cyanobacteria." Ph.D. Thesis of Uppsala University.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 1997. **Brock Biology of Microorganisms.** New Jersey : Prentice-Hall Upper saddle River.
- Masepohl, B., Schoelisch, K., Goerlitz, K., Kutzki, C. and Böhme, H. 1997. "The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation." **Mol. Gen. Genet.** 253 : 770-776.

- Mazur, B. J. and Chui, C.-F. 1982. "Sequence of the gene coding for the  $\beta$ -subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 79 : 6782-6786.
- Mevarech, M., Rice, D. and Haselkorn, R. 1980. "Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77 : 6476-6480.
- Miller, R. W. and Eady, R. R. 1988. "Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. low temperature favours N<sub>2</sub> reduction by vanadium nitrogenase." **J. Biochem.** 256 : 429-432.
- Miyamoto, M., Hallenbeck, P. C. and Benemann, J. R. 1979. "Nitrogen fixation by thermophilic blue-green algae (cyanobacteria) : temperature characteristics and potential use in biophotolysis." **Appl. Environ. Microbiol.** 37(3) : 454-458.
- Murphy, S. T., Jackman, D. M. and Mulligan, M. E. 1993. "Cloning and nucleotide sequence of the gene for dinitrogenase reductase (*nifH*) from heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. L-31." **Biochem. Biophys. Acta.** 1171(3) : 337-340.
- Murry, M. A. and Wolk, C. P. 1989. "Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope." **Arch. Microbiol.** 151 : 469-474.
- Nagatani, H. H. and Brill, W. J. 1974. "Nitrogenase. V. The effect of Mo, W and V on the synthesis of nitrogenase components in *Azotobacter vinelandii*." **Biochim. Biophys. Acta.** 362 : 160-166.
- Oliveira, P., Leitão, E., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P. and Oxelfelt, F. 2004. "Characterization and transcriptional analysis of *hupSLW* in *Gloeotheca* sp. ATCC 27152: an uptake hydrogenase from a unicellular cyanobacterium." **J. Microbiol.** 150 : 3647-3655.
- Paerl, H. W., Prufert-Bebout, L.E. and Guo, C. 1994. "Iron-stimulated N<sub>2</sub> fixation and growth in natural and cultured populations of the planktonic marine cyanobacteria *Trichodesmium* spp." **Appl. Environ. Microbiol.** 60 : 1044-1047.
- Premakumar, R., Jacobson, M. R., Loveless, T. M. and Bishop, P. E. 1992. "Characterization of transcripts expressed from nitrogenase-3 structural genes of *Azotobacter vinelandii*." **J. Microbiol.** 38(9) : 929-936.

- Privalle, L. S. and Burris R. H. 1983. "Adenine nucleotide levels in and nitrogen fixation by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120." **J. Bacteriol.** 154(1) : 351-355.
- Rees, D. C. and Howard, J. B. 2000. "Nitrogenase : standing at the crossroads." **Curr. Opin. Chem. Biol.** 4 : 559-660.
- Rippka, R., Duruelles, J., Waterbury, B., Herdman, M. and Stanier, R. Y. 1979. "Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." **J. Gen. Microbiol.** 111 : 1-61.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** 2 nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saxena, R. X., Raqhuvanshi, R., Singh, S. and Bisen, P. S. 2006. "Iron induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120." **Indian J. Exp. Biol.** 44(10) : 849-851.
- Schrautemeier, B., Neveling, U. and Schmitz, S. 1995. "Distinct and differently regulated nitrogen-fixing system evolved for heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-characterization of the *nifH/2* gene clusters." **Mol. Microbiol.** 18 : 357-369.
- Smith, R. V. and Evans, M. C. 1970. "Soluble nitrogenase from vegetative cells of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*." **Nature.** 225(5239) : 1253-1254.
- Smith, R. V. and Evans, M. C. 1971. "Nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*." **J. Bacteriol.** 105(3) : 913-917.
- Stacey, G. Burris, R. H. and Evans, H. J., editors. 1992. **Biological nitrogen fixation.** New York : Chapman & Hall.
- Steinbauer, J., Wenzel, W. and Hess, D., 1988. "Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Klebsiella pneumoniae nifK* gene coding for the beta-subunit of nitrogenase MoFe protein. **Nucleic Acids Res.** 16 : 7199-7199.
- Steward, G. F., Jenkins, B. D., Ward, B. B. and Zehr, J. P. 2004. "Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity." **Appl. Environ. Microbiol.** 70(3) : 1455-1465.
- Stratton, G. W. and Corke, C. T. 1979. "The effect of nickel on the growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*." **Can. J. Microbiol.** 25(9) : 1094-1099.

- Stratton, G. W., Huber, A. L. and Corke, C. T. 1979. "Effect of mercuric ion on the growth, photosynthesis, and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*." **Appl. Environ. Microbiol.** 38(3) : 537-543.
- Tamagnini, P., Troshina, O., Oxelfelt, F., Salema, R. and Lindblad, P. 1997. "Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme." **Appl. Environ. Microbiol.** 63(5) : 1801-1807.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. 2002. "Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria." **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 66(1) : 1-20.
- Tel-Or, E., Luijk, L. W. and Packer, L. 1997. "An inducible hydrogenase in cyanobacteria enhances N<sub>2</sub> fixation." **FEBS Lett.** 78 : 49-52.
- Thiel, T. 1993. "Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*." **J. Bacteriol.** 175 : 6276-6286.
- Thiel, T., Lyons, E. M., Erker, J. C. and Ernst, A. 1995. "A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92 : 9358-9362.
- Thiel, T., Lyons, E. M. and Erker, J. C. 1997. "Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*." **J. Bacteriol.** 179(16) : 5222-5225.
- Thiel, T. and Pratte, B. 2001. "Effect on heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cell of cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413." **J. Bacteriol.** 183 : 280-286.
- Thomas, J. and David, K. A. 1972. "Site of nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena* sp. L-31." **Nat. New. Biol.** 238(85) : 219-221.
- Triplett, E. W., editor. 2000. **Prokaryotic nitrogen fixation : A model system for the analysis of a biological process.** Norfolk : Horizon Scientific Press.
- Walmsley, J., Toukdarian, A. and Kennedy, C. 1994. "The role of regulatory genes *nifA*, *vnfA*, *anfA*, *nfrX*, *utrC*, and *rpoN* in expression of genes encoding the three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*." **Arch. Microbiol.** 162(6) : 422-429.
- Walsby, A. E. 1985. "The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen." **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.** 226 : 345-336.

- Wealand, J. L., Myers, J. A. and Hirschberg, R. 1989. "Changes in gene expression during nitrogen starvation in *Anabaena variabilis* ATCC 29413." **J. Bacteriol.** 171(3) : 1309-1313.
- Weare, N. M. and Benemann, J. R. 1974. "Nitrogenase activity and photosynthesis in *Plectonema boryanum*." **J. Bacteriol.** 119(1) : 258-265.
- Zahalak, M., Pratte, B. Werth, J. K. and Thiel, T. 2004. "Molybdate transport and its effect on nitrogen utilization in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413." **Mol. Microbiol.** 51(2) : 357-369.

<http://proteomics.mcw.edu/promost/index.jsp>

<http://www.ebi.ac.uk>

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 (Rippka et al. 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) ไนเตรตเฮกซะไฮเดรต ( $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ )	0.17	มิลลิโมลาร์

ส่วนประกอบ BG11 100 เท่า

โซเดียมไนเตรต ( $NaNO_3$ )	1.76	โมลาร์
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ )	30.40	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	24.50	มิลลิโมลาร์
กรดซิตริก (Citric Acid)	3.12	มิลลิโมลาร์
ไดโซเดียมอีดีทีเอ ( $Na_2EDTA$ )	279	ไมโครโมลาร์
Trace metal mix 1000 เท่า	100	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

ส่วนประกอบ

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

สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง BG11 ทำได้โดยชั่งส่วนประกอบตามที่กำหนดและเติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11<sub>0</sub>

ส่วนประกอบแบบเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 โดย BG11 100 เท่าจะไม่เติมโซเดียมไนเตรด ( $\text{NaNO}_3$ ) ลงไปในอาหาร

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BG11 ที่มีเกลือแอมโมเนียมคลอไรด์

ส่วนประกอบแอมโมเนียมคลอไรด์ 100 เท่า

แอมโมเนียมคลอไรด์	500	มิลลิโมลาร์
HEPES	1000	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชเป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### ส่วนประกอบ

อาหาร BG11 <sub>0</sub> 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมคลอไรด์ 100 เท่า	10	มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (2 กรัม/100 มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (3.05 กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ( $\text{FeNH}_4$ Citrate) (0.60กรัม/100มิลลิลิตร)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร		

### อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

#### ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

### ส่วนประกอบ

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

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

## สารละลาย RF1

### ส่วนประกอบ

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

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter

## สารละลาย RF2

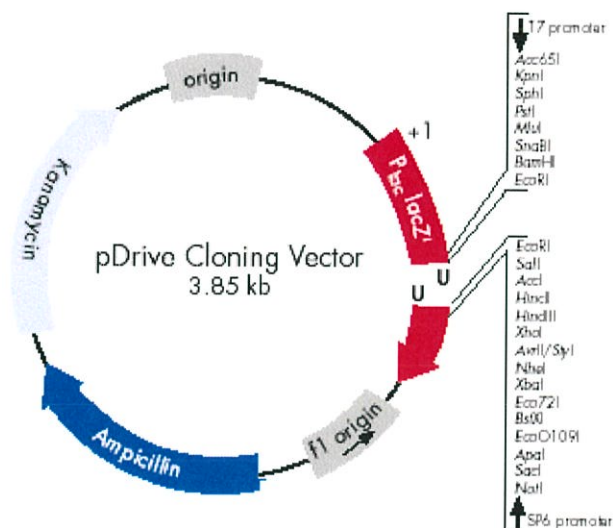
### ส่วนประกอบ

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

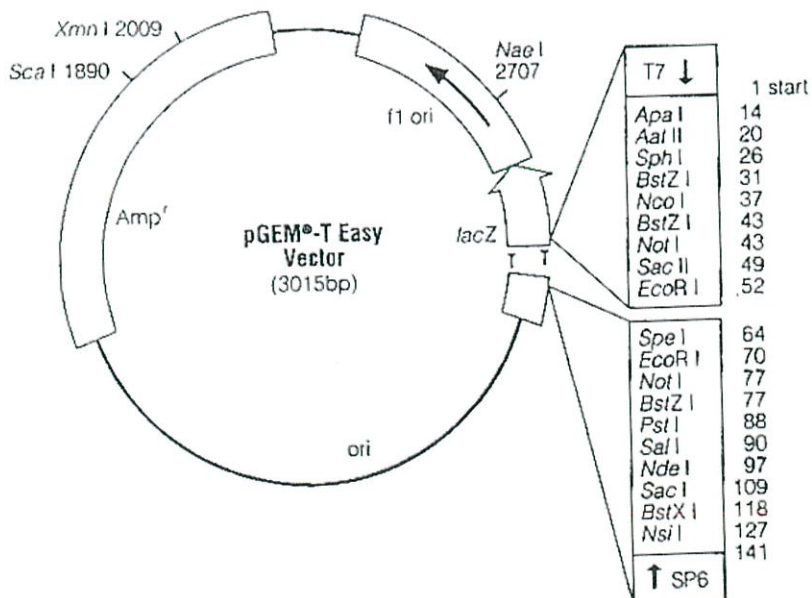
ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วย กรดอะซิติก แล้วกรองผ่าน filter

## ภาคผนวก ข

### แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)



### แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T-Easy



## ประวัติผู้เขียน

นางสาวชุติมา ภาพสิงห์ เกิดเมื่อวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2523 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 227 ถนนเพชรเจริญ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ในปี พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์บางพระ จังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำเร็จการศึกษาในปี 2550