2. วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

สาหร่ายที่ใช้ในการทดลองเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่แยกได้จากตัวอย่างที่ 13 ในตารางที่ 3.1 ธารน้ำไหลจากบ่อรักษะวาริน จ. ระนอง ณ บริเวณที่เก็บ ซึ่งมีอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

สำลี

ผ้าก็อซ

กระดาษฟอยล์

Thermometer (แบบแท่งแก้ว)

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	PG5002-S	Mettler
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-S	Mettler
Centrifuge	5804R	Eppendorf
Centrifuge	HARRIER 18/80	Sanyo
Digital Dry Bath	D1200	Labnet International
Illuminated Shaker	-	Sanyo
Magnetic Stirrer	MS101	Gem
pH meter	240	Corning
Power Supply	AE-8130	ATTO
Salinity meter	HI 98203	HANNA
Slab gel electrophoresis Apparatus	AE-6400	ATTO
Spectrophotometer	8453	Hewlet Packard
Vortex mixer	K-550-GE	Scientific Industries

สารเคมี

Primary antibody เตรียมโดยฉีดกระต่ายด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากข้าวโพด (ประทุม ฤทธิสุนทร. 2547)

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Lab-scan
Acrylamide	Sigma
Ammonium dihydrogen orthophosphate	BDH
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Merck
BCIP/NBT solution (5-bromo-4-chloro-3-indoly phosphate/nitro blue tetrazolium)	Sigma
Bisacrylamide (N, N'-methylene diacrylamide)	Fluka
Boric acid	Hopkins&Williams
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Calcium chloride	Merck
3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS)	USB
Citric acid	Riedel-de Hean
Cobalt (II) chloride	Ajax chemicals
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
Copper sulphate	Ajax chemicals
Deoxycholate Sodium salt	Fluka
3,3'-Diaminobenzidine	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Folin-Ciocalteu's-phenol reagent	Merck
Glycerol	Sigma
Hydrochloric acid	Merck

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Iron (II) sulphate	Merck
Glycine	Fluka
Liquid Nitrogen	TIG
Magnesium chloride	Ajax Chemicals
Magnesium sulphate	Fluka
Manganese (II) chloride	Ajax Chemicals
β-Mercaptoethanol	Merck
N-(1-naphyl) ethylenediamine dihydrochloride	Sigma
Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)	Sigma
Octyl β -D-glucopyranoside	Sigma
([Octyl phenoxy] polyethoxyethanol)	USB
Phenylmethylsulfonylfluride (PMSF)	BDH
Potassium cyanide	Riedel-de Haen
Potassium nitrate	Carlo Erba
Potassium sodium tartrate	Fluka
Salicylic acid	BDH
Goat anti-rabbit (Secondary antibody)	Sigma
Sodium azide	Sigma
Sodium chloride	Lab-scan
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Riedel-de Haen
Sodium hydroxide	BDH
Sodium molybdate	Merck
Sodium nitrate	Ajax Finechem
Sodium nitrite	Ajax Finechem
Sodium thiocyanate	Sigma
Sulfanilamide	Sigma
Sulfuric acid	Merck
N,N,N',N'-tetramethylenediamine	Fluka

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)	Sigma
Triton X-100	Merck
Tween-20	APS
Zinc acetate	BDH
Zinc sulphate	Hopkins&Williams

2. วิธีการทดลอง

2.1 สถานที่เก็บตัวอย่างสาหร่าย

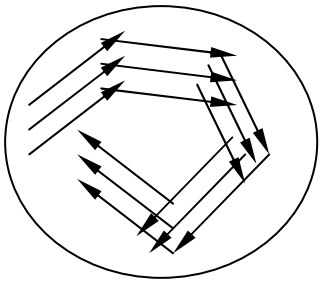
สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษาเก็บจากบ่อน้ำร้อนรักษะวาริน บ่อพ่อ บ่อแม่ บ่อไข่ลวก บ่อบำบัด และ ลำธารใหญ่ ใน จ.ระนอง

2.2 วิธีเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทั้งสีเขียว (green algae) และสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae/cyanobacteria) และสาหร่ายชนิดอื่น ๆ ที่ลอยในน้ำโดยใช้ตาข่ายตาถี่ตักสาหร่ายขึ้นจากแหล่งน้ำ ส่วนสาหร่ายที่เกาะอยู่ตามผิวดินใต้ท้องน้ำใช้ปากคีบคีบสาหร่าย (Stevenson, 1996) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างน้ำประมาณ 250 มิลลิลิตร ไว้ในขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างทั้งจากบ่อน้ำร้อนและธารน้ำที่ไหลจากบ่อน้ำร้อนรักษะวาริน บ่อพ่อ บ่อแม่ บ่อไข่ลวก บ่อบำบัด และ ลำธารใหญ่ ใน จ.ระนอง บันทึกสภาพแวดล้อมบริเวณที่เก็บตัวอย่างทั้ง สี กลิ่น อุณหภูมิ สภาพความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม (salinity)ของแหล่งน้ำ

2.3 การแยกสาหร่ายให้เป็นสาหร่ายชนิดเดียว

นำตัวอย่างสาหร่ายบางส่วนมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปลอดเชื้อสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 23.8 มิลลิโมลาร์ (2 กรัมต่อลิตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเติบโตของสาหร่าย และนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ประมาณ 1 สัปดาห์ สังเกตว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว นำตัวอย่างดังกล่าวมาแยกชนิดสาหร่ายให้เป็นชนิดเดียวด้วย วิธีการ streak plate โดยนำตัวอย่างสาหร่ายบางส่วนมาขีดด้วย loop ที่ปลอดเชื้อบนอาหารแข็งซึ่งเป็นสูตรเดียวกันกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงวิธีการขีดตัวอย่างสาหร่ายบนอาหารแข็ง

หลังจากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสงประมาณ 120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งมีอุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจดูโคโลนีของสาหร่ายที่ขึ้นบนอาหารแข็ง และนำโคโลนีที่อยู่เดี่ยวที่ไม่มีราหรือแบคทีเรีย ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสาหร่ายชนิดเดียวมาขีดบนอาหารแข็งอีกครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างสาหร่ายบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น และนำตัวอย่างบางส่วนมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจดูว่าเป็นสาหร่ายชนิดเดียวหรือไม่ เมื่อได้สาหร่ายชนิดเดียวแล้ว นำตัวอย่างดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้ loop ที่ปลอดเชื้อเขี่ยสาหร่ายที่เป็นโคโลนีเดียวลงในอาหารสูตรเดิม ประมาณ 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 35 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และเอียงหลอดทดลองประมาณ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้โคโลนีของสาหร่ายกระจายไปทั่วอาหารเพาะเลี้ยงไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวหลังจากนั้นเพิ่มปริมาณอาหาร เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สาหร่ายและนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ในการจำแนกชนิดสาหร่ายใช้หนังสือ Cyanoprokaryota ของ Komarak

2.4 การวิเคราะห์ไนเตรตและไนไตรต์ในน้ำจากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่เก็บสาหร่าย

2.4.1 วิเคราะห์ปริมาณไนเตรต

นำตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตด้วยวิธีประยุกต์ของ Cataldo และคณะ (1975) โดยไนเตรตในน้ำ 1 มิลลิลิตร จะทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน conc H_2SO_4 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้ง

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที หลังจากนั้นปรับให้เป็นด่างด้วย 4 นอร์มอล NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายเย็นลง จะได้สารละลายสีเหลืองที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และใช้ KNO_3 เตรียมสารละลายไนเตรตมาตรฐาน

2.4.2 วิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์

นำตัวอย่างน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาเติม 1% (w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที ไนไตรต์จะทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าวได้เป็นสารละลายสีชมพู ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร และใช้ $NaNO_2$ เตรียมสารละลายไนไตรต์มาตรฐาน

2.5 การหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่แยกได้แบบ *in vivo*

นำตัวอย่างสาหร่ายที่เติบโตในอาหารเหลวเต็มที่มาศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vivo* ซึ่งใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Harley (1993) นำตัวอย่างสาหร่ายมาหมุนเหวี่ยงที่ 3,000xg นาน 10 นาที เทอาหารเก่าทิ้ง ล้างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิม นาน 10 นาที ทิ้งน้ำที่ล้างและละลายเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีกครั้งผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งตัวอย่างสาหร่ายปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร ผสมบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่มี KNO_3 30 มิลลิโมลาร์และ propanol 5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร หยุดปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ คือ 10, 20 และ 30 นาที ด้วยการเติม 0.1 โมลาร์ zinc acetate 500 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นโดยการเติม 1% (w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร และทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้ KNO_2 เป็นสารละลายไนไตรต์มาตรฐาน ส่วนตะกอนนำมาหาปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยเติม 5% deoxycholate 0.4 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน

จากนั้นเติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสารละลายคอปเปอร์ทาร์เทรต (1% $CuSO_4$ และ 2% Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.6 การหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่แยกได้แบบ *in vitro*

2.6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำตัวอย่างสาหร่ายมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000Xg นาน 10 นาที นำตะกอนสาหร่ายมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิมอีก 2 ครั้ง เพื่อล้างอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายออกจากเซลล์สาหร่าย หลังจากนั้น นำตะกอนสาหร่ายที่ได้มาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว จนเซลล์สาหร่ายแตกละเอียด เติมบัฟเฟอร์สกัดที่มี MOPS 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5, EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ บดผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที เก็บส่วนตะกอนสาหร่ายนำมาละลายในบัฟเฟอร์สกัดอีกครั้งได้เป็นสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาหากิจกรรมแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993)

2.6.2 การหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993)

หากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยผสมสารต่าง ๆ ดังนี้

0.1	โมลาร์	KNO_3	ปริมาตร	100	ไมโครลิตร
0.1	โมลาร์	Tris-HCl (pH 7)	ปริมาตร	100	ไมโครลิตร
1	มิลลิโมลาร์	NADH	ปริมาตร	50	ไมโครลิตร
		น้ำกลั่น	ปริมาตร	50	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหยุดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่เวลาต่าง ๆ ด้วยการเติม 1% (w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 250

ไมโครลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 250 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ KNO_2 เพื่อหาอัตราการเพิ่มขึ้นของไนไตรต์ต่อเวลา

2.6.3 การหาปริมาณโปรตีนตามวิธีประยุกต์ของ Lowry และคณะ (1951)

นำสารสกัดหยาบมาหาปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยละลายโปรตีนจากสารสกัดหยาบด้วย 5% deoxycholate 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 2% Na_2CO_3 ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสารละลายคอปเปอร์ทาร์เทรต (1% $CuSO_4$ และ 2% Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.7 การเพาะเลี้ยงและการวัดการเติบโตของสาหร่าย

นำสาหร่ายมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 10 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอนเซลล์สาหร่าย เพื่อล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 10 นาที ล้างเซลล์สาหร่าย 2-3 ครั้ง เพื่อล้างอาหารเดิมออกให้หมด เก็บตะกอนเซลล์สาหร่ายและละลายตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ทดลอง หลังจากนั้นวัดการเติบโตของสาหร่ายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยละลายตะกอนเซลล์สาหร่ายในอาหารเพาะเลี้ยงให้อ่านค่าจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 560 นาโนเมตร เท่ากับ 0.06 วัดการเติบโตของสาหร่ายทุกวันโดยเทียบกับอาหารที่ไม่มีสาหร่าย

2.8 การวิเคราะห์การเติบโตของสาหร่าย

2.8.1 ศึกษาความเข้มข้นไนเตรตที่สาหร่าย *S. minervae* สามารถเติบโตได้ดีที่สุด

เนื่องจากสาหร่าย *S. minervae* มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสดีที่สุด จึงนำสาหร่ายดังกล่าวมาทดลองต่อไป โดยเริ่มจากการหาความเข้มข้นไนเตรตที่เหมาะสมในการเติบโตของสาหร่าย นำสาหร่าย *S. minervae* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 23 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตต่าง ๆ กัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 ให้ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตสูงกว่าสูตรอาหาร BG-11 ปกติ 17 มิลลิโมลาร์(1.5 กรัมต่อลิตร), 35 มิลลิโมลาร์ (3.0 กรัมต่อลิตร) และ 53 มิลลิโมลาร์ (4.5 กรัมต่อลิตร)

ชุดที่ 2 ให้ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตต่ำกว่าสูตรอาหาร BG-11 ปกติ ได้แก่ 0 มิลลิโมลาร์, 5.9 มิลลิโมลาร์ (0.5 กรัมต่อลิตร), 11.7 มิลลิโมลาร์ (1 กรัมต่อลิตร) และ 17 มิลลิโมลาร์ (1.5 กรัมต่อลิตร)

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงไปวางบนเครื่องเขย่าให้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วัดการเติบโตของสาหร่ายทุก ๆ วัน ตามข้อ 2.7

2.8.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธี *in vitro*

จากการศึกษาเพื่อหาช่วงที่สาหร่ายสามารถผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในอาหารสูตรปกติ (โซเดียมไนเตรต 17 มิลลิโมลาร์) พบว่าตลอดทุกช่วงในการเติบโตของสาหร่ายไม่พบกิจกรรมเอนไซม์เลย จึงลดความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารเหลือเพียง 500 ไมโครโมลาร์ วัดการเติบโตของสาหร่ายทุก ๆ วัน ตามข้อ 2.7 ศึกษาการดูดซับไนเตรตโดยวัดความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงตามข้อ 2.4.1 การปล่อยไนไตรต์โดยวัดความเข้มข้นไนไตรต์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเพาะเลี้ยงตามข้อ 2.4.2 หลังจากนั้นนำสาหร่ายมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย โดยเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ นำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro* ทุกวัน และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีประยุกต์ของ Lowry และคณะ (1951) ตามข้อ 2.6.1, 2.6.2 และ 2.6.3 ตามลำดับ

2.8.3 ศึกษาการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* ในอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรตน้อย ๆ ตั้งแต่ 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์

เนื่องจากการสังเคราะห์เอนไซม์ในสาหร่ายจะพบในช่วงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงและในช่วงที่ไนเตรตในอาหารเริ่มหมดลง จึงทำการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่สาหร่ายเติบโตได้มากที่สุด และช่วงที่ไนเตรตในอาหารเหลือน้อย โดยนำตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรต 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการเติบโตของสาหร่ายตามข้อ 2.7

2.9 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโต การดูดซับไนเตรตและการผลิตไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae*

นำสาหร่าย *S. minervae* ในฟลาสก์ใส่อาหารดัดแปลงสูตร BG-11 ซึ่งมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 23 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นนำสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันดังนี้ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้คงที่ ศึกษาการเติบโตของสาหร่ายตามข้อ 2.7

วิเคราะห์การดูดซับไนเตรตและการผลิตไนไตรต์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังข้างต้น โดยเก็บน้ำตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงสาหร่าย ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หลังจากหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000xg นาน 10 นาที นำน้ำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ ตามข้อ 2.4.1 และ 2.4.2

2.10 ศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำ-เงิน *S. minervae*

นำสาหร่าย *S. minervae* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 23 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และให้ความเข้มแสงต่าง ๆ ดังนี้ 120, 137, 152 และ 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และวัดการเติบโตของสาหร่ายตามข้อ 2.7

2.11 ศึกษาการดูดซับไนเตรตในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเขย่าและไม่เขย่า

เพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. minervae* ในอาหารดัดแปลงสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไบคาร์บอเนต 23 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ เขย่าให้เข้ากันและปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ตอนเริ่มต้นให้มีค่าประมาณ 0.06 หลังจากนั้นแบ่งสาหร่ายออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1. เพาะเลี้ยงสาหร่ายบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

กลุ่มที่ 2. เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยวางสาหร่ายไว้เฉย ๆ

ทั้ง 2 กลุ่ม เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มแสง 120 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากเขย่าขวดให้สาหร่ายเข้ากับอาหารเก็บตัวอย่างอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดและนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 10 นาที นำสารละลายมาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ ตามข้อ 2.4.1 และ 2.4.2

2.12 ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายในรอบวัน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารดัดแปลงสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ และไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร นาน 14 วัน สังเกตสาหร่ายเริ่มเปลี่ยนสี นำสาหร่ายดังกล่าวมาทำการทดลองโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ให้แสงสว่างตลอดเวลา เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro*

กลุ่มที่ 2 เก็บสาหร่ายไว้ในที่มืดตลอดเวลา เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro*

นำสาหร่ายมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบตามข้อ 2.6.1 หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) เช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.2 เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของทั้ง 2 กลุ่มในรอบวัน

2.13 ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

2.13.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 23 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร นาน 14 วัน มาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบตามวิธี 2.6.1 หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) เช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30 - 55 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ

2.13.2 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) เช่นเดียวกับข้อ 2.6.2 โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิกำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส และที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 3 - 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังนี้

ในช่วง pH 3-6 ใช้ 0.1 โมลาร์ acetate buffer

ในช่วง pH 7-9 ใช้ 0.1 โมลาร์ Tris buffer

และที่ pH 10 และ 11 ใช้ 0.1 โมลาร์ carbonate buffer

2.13.3 ศึกษาผลของ NADH, NADPH และ Methyl viologen ต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาศึกษาการให้อิเล็กตรอนของ NADH, NADPH และ Methyl viologen โดยนำสารสกัดหยาบมาหากิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ซึ่งส่วนผสมของสารต่าง ๆ ดังนี้

$NaNO_3$	0.1 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCL pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
NADPH และ NADH	1 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ส่วนการใช้ Methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนตามวิธีของ Stewart (2001) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ สารผสมที่มีประกอบด้วย $Na_2S_2O_4$ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร, $NaHCO_3$ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ$NaNO_3$ 0.1 โมลาร์

สารผสม		ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCL pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Methyl viologen	1 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนตรตรีดักเทส		ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นหยุดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่เวลาต่าง ๆ ด้วยการเติม 1% (w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 250 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ KNO_2

2.13.4 ศึกษาตัวให้อิเล็กตรอน อื่น ๆ

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาหากิจกรรมเอนไซม์โดยเติมตัวให้อิเล็กตรอนที่น่าจะเป็นไปได้ ซึ่งได้แก่ bromophenol blue, succinic acid (disodium salt) และ Methyl viologen เตรียมสารต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ bromophenol blue 0.1เปอร์เซ็นต์ (w/v), succinic acid 25 มิลลิโมลาร์ และ Methyl viologen 25 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 นำมาหากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ในส่วนผสมของสารต่าง ๆ ดังนี้

$NaNO_3$	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCL pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารให้อิเล็กตรอนอื่น ๆ	25 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.13.5 ศึกษาสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบสาหร่าย *S. minrvae* มาทดสอบสารยับยั้งกิจกรรมไนเตรตรีดักเทส ซึ่งได้แก่ NaN_3, NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ โดยเตรียมสารทั้ง

4 ชนิดในความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งในการหากิจกรรมของเอนไซม์จะใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ดังนี้

ชุดควบคุม		
$NaNO_3$	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCl pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
และ น้ำกลั่น		ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
ชุดทดลอง		
$NaNO_3$	0.1 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCl pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
และ สารยับยั้ง	2.5 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาหากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.0 ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามข้อ 2.6.2

2.13.6 ศึกษาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* ไม่จำเป็นต้องใช้ NADH หรือ NADPH ในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์เกิดได้อัตราเท่ากันไม่ว่าจะเติม NADH หรือ NADPH หรือไม่เติม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงไม่เติม NADH หรือ NADPH นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่ออัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ โดยใช้ไนเตรตเข้มข้น 0, 1.52×10^{-3}, 6.09×10^{-3}, 2.43×10^{-2} M, 9.75×10^{-2} , 3.9×10^{-1}, 7.8×10^{-1}, 1.56 และ 3.12 มิลลิโมลาร์ หากิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.0 ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามข้อ 2.6.2

2.14 ศึกษาวิธีเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

2.14.1 ศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์โดยการเติม glycerol

ก. เติม glycerol ทันทีหลังจากการสกัดเอนไซม์

เตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารนาน 7 วัน ตามข้อ 2.6.1 นำสารสกัดหยาบมาแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่า ๆ กัน หลังจากนั้นเติม glycerol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน บ่มสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามข้อ 2.6.2 ทุกวัน

ข.เติม glycerol หลังจากบ่มสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

นำสารสกัดหยาบมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม glycerol ให้มีความเข้มข้น 0, 3, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเช่นเดิม และหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามข้อ 2.6.2

2.14.2 ศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส

แบ่งสารสกัดหยาบเอนไซม์ออกเป็น 4 ส่วน เก็บไว้ในหลอดพลาสติกหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามข้อ 2.6.2 ทุกวัน

2.15 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

นำสารสกัดหยาบมาแบ่งใสหลอดพลาสติดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างสารสกัดหยาบมาบ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ บ่มเป็นเวลานาน 30, 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาตั้งพักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 -15 นาที นำหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.0 ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามข้อ 2.6.2

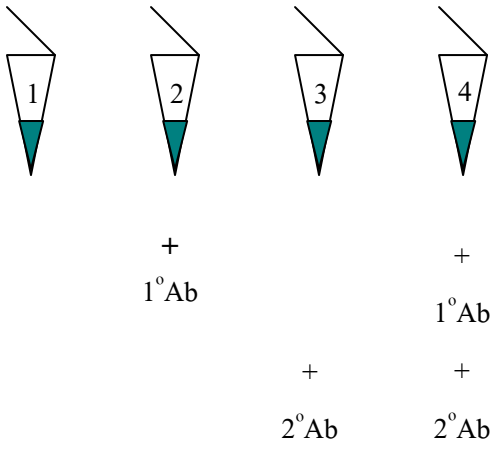
2.16 ศึกษาผลของดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดัก-เทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาแบ่งเป็น 6 กลุ่ม และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำตะกอนของสารสกัดหยาบมาเติมบัฟเฟอร์ที่มี MOPS 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5, EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์และ ดีเทอร์เจนต์ ต่าง ๆ ได้แก่ Triton X-100, Deoxycholate, Tween-20, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) และ Sodium dodecyl sulphate ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่านาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดหยาบดังกล่าวมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000Xg นาน 10 นาที เก็บส่วนตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์เดิม เพื่อละลายตะกอนแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg เช่นเดิม นาน 10 นาทีทำเช่นนี้ 2 – 4 ครั้ง เพื่อล้างดีเทอร์เจนต์ออกก่อนจะนำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามข้อ 2.6.2

2.17 ศึกษาการจับกับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลง

ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในสารสกัดหยาบด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลงตามวิธีของ Towbin และคณะ(1979) โดยนำสารสกัดหยาบสาหร่าย *S. minervae* 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอนและบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์ด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ที่มี 2.5% nonfat-milk ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย TBS ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที จากนั้นนำหลอดที่ 2 และ 4 มาบ่มด้วย 300 ไมโครลิตร แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส (primary antibody) ในอัตราส่วนแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส 200 ไมโครลิตรต่อ 10 มิลลิลิตร TTBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.05% tween 20, pH 7.5) ที่มี 1% nonfat-milk ส่วนหลอดที่ 1 และ 3 บ่มด้วย 300 ไมโครลิตร TTBSที่มี 1% nonfat-milk บ่มทั้ง 4 หลอด นาน 2 ชั่วโมง นำทั้ง 4 หลอดมาล้างด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

หลังจากนั้นนำหลอดที่ 3 และ 4 มาบ่มด้วย 300 ไมโครลิตรของแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (secondary antibody) ในอัตราส่วนแอนติบอดี IgG ของกระต่าย 100 ไมโครลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตร TTBS ที่มี 1% nonfat-milk ส่วนหลอดที่ 1 และ 2 บ่มด้วย 300ไมโครลิตร TTBS ที่มี nonfat-milk บ่มทั้ง 4 หลอดนาน 2 ชั่วโมง นำทั้ง 4 หลอดมาล้างด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที อีกครั้ง และล้างด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ย้อมด้วย substrate ของ alkaline phosphatase ดังแผนภาพรูปที่ 2.2 สังเกตการเกิดสีของ substrate



รูปที่ 2.2 แผนภาพการบ่มสารสกัดหยาบที่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase

2.18 ศึกษาความคงรูปของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสารสกัดหยาบหลังจากใช้ Triton X-100 และ SDS

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ Triton X-100 เป็น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่านาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดหยาบดังกล่าวมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000Xg นาน 10 นาที เก็บส่วนตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์ที่มี MOPS 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5, EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ ละลายตะกอนแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg เช่นเดิม นาน 10 นาทีทำเช่นนี้ 2 – 4 ครั้ง เพื่อล้างดีเทอร์เจนต์ออกก่อนจะนำมาหา

กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) หลังจากนั้นใช้สารสกัดหยาบที่ผ่าน Triton X-100 25 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทสบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วน SDS ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ SDS นำสารสกัดหยาบมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อล้างตะกอน 3-4 ครั้ง บ่มส่วนตะกอนด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ที่มี 2.5% non-fat milk ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย TBS ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที จากนั้นนำมาบ่มด้วย 300 ไมโครลิตร แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส(primary antibody) ในอัตราส่วนแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส 200 ไมโครลิตรต่อ 10 มิลลิลิตร TTBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.05% tween 20, pH 7.5) ที่มี 1% non-fat milk นาน 2 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้นนำตะกอนมาบ่มด้วย 300 ไมโครลิตร ของแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (secondary antibody) เช่นเดียวกันกับรูปที่ 2 ในการทดลองที่ 3.16 ในอัตราส่วนแอนติบอดี IgG ของกระต่าย 100 ไมโครลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตร TTBS ที่มี 1% non-fat milk นาน 2 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที อีกครั้ง และล้างด้วยTBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ย้อมด้วย substrate ของ alkaline phosphatase สังเกตการเกิดสีของ substrate