ภาคผนวก

1. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

1.1 ศึกษาผลของก๊าซออกซิเจนต่ออัตราการเจริญเติบโต

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 35 °C ทั้งที่มีการเขย่าฟลาสก์และวางฟลาสก์ไว้เฉย ๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	
	เขย่า	ไม่เขย่า
0	0.297±0.024[a]	0.297±0.020[a]
1	0.370±0.004[a]	0.416±0.008[a]
2	0.708±0.029[a]	0.723±0.048[b]
3	0.831±0.071[a]	1.028±0.032[b]
4	1.370±0.232[a]	1.794±0.032[b]
5	1.751±0.092[a]	2.138±0.048[b]
6	2.313±0.100[a]	2.400±0.165[a]
7	2.466±0.065[a]	2.600±0.145[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารที่ลดลง เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 35 °C ทั้งที่มีการเขย่าฟลาสก์และวางฟลาสก์ไว้เฉย ๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	
	เขย่า	ไม่เขย่า
0	18.895±0.711[a]	18.895±0.711[a]
1	16.942±0.116[a]	16.328±0.261[a]
2	16.540±1.072[a]	16.010±0.810[b]
3	16.548±0.143[a]	16.378±1.489[a]
4	14.212±0.680[a]	16.080±0.741[a]
5	11.266±1.956[a]	12.042±0.395[a]
6	11.364±1.398[a]	11.396±0.460[a]
7	7.897±2.500[a]	7.582±1.050[a]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารที่เพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 35 °C ทั้งที่มีการเขย่าฟลาสก์และวางฟลาสก์ไว้เฉย ๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย	
	เขย่า	ไม่เขย่า
0	0	0
1	0.007±0.0012[a]	0.0068±0.0020[a]
2	0.009±0.0004[a]	0.009±0.0004[a]
3	0.014±0.0009[a]	0.014±0.0017[a]
4	0.014±0.0019[a]	0.018±0.0020[b]
5	0.013±0.0024[a]	0.016±0.0020[b]
6	0.016±0.0001[a]	0.028±0.0018[b]
7	0.028±0.0030[a]	0.028±0.0050[a]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโต

1.2.1 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารที่เหมาะสม

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกันคือ 0, 6.25 และ 12.5 g/l

วันที่เพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ([NaCl]) (g/l)		
	0	6.25	12.5
0	0.209±0.007[a]	0.204±0.002[a]	0.208±0.001[a]
2	0.179±0.006[a]	0.182±0.0004[a]	0.185±0.002[a]
4	0.235±0.007[a]	0.328±0.005[b]	0.276±0.006[c]
6	0.549±0.016[a]	0.731±0.009[b]	0.649±0.031[c]
8	0.919±0.006[a]	1.410±0.015[b]	1.125±0.024[c]
10	1.476±0.022[a]	1.708±0.022[b]	1.341±0.019[c]
12	1.359±0.047[a]	1.464±0.060[b]	1.211±0.012[c]
14	1.224±0.011[a]	1.251±0.018[b]	0.997±0.012[c]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.2.1 ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารที่เหมาะสม

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่างกันคือ 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตในอาหาร ($[NO_3]$) (mM)			
	4.4	8.8	17.6	35.2
0	0.207±0.000[a]	0.214±0.000[a]	0.209±0.000[a]	0.214±0.000[a]
2	0.167±0.029[a]	0.160±0.014[a]	0.157±0.014[a]	0.163±0.000[a]
4	0.377±0.029[a]	0.394±0.033[b]	0.241±0.021[c]	0.316±0.078[c]
6	0.561±0.065[a]	0.401±0.044[b]	0.586±0.092[a]	0.971±0.160[c]
8	0.466±0.098[a]	0.411±0.032[b]	0.815±0.460[c]	1.618±0.112[d]
10	1.193±0.128[a]	0.909±0.239[b]	1.381±0.172[c]	1.840±0.076[d]
12	1.328±0.076[a]	1.069±0.109[b]	1.298±0.009[a]	1.754±0.116[c]
14	1.203±0.036[a]	1.078±0.076[b]	1.416±0.103[c]	1.512±0.136[d]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.3 ศึกษาสภาวะที่ส่งผลให้เอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. ทำงานได้สูงสุด

1.3.1 ศึกษาผลของความเค็มในอาหารที่มีต่อแอคติวิตีเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 6.25 และ 12.5 g/l

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (g/l)		
	0	6.25	12.5
0	0	0	0
2	0	0	0
4	0	0.059±0.004[a]	0.075±0.006[a]
6	0.134±0.002[a]	0.158±0.003[b]	0.125±0.021[c]
8	0.265±0.007[a]	0.360±0.003[b]	0.263±0.008[a]
10	0.900±0.011[a]	0.705±0.008[b]	0.620±0.004[c]
12	0.710±0.012[a]	0.615±0.009[b]	0.560±0.004[c]
14	0.239±0.002[a]	0.246±0.002[a]	0.265±0.069[a]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.3.2 ศึกษาผลของไนเตรตในอาหารที่มีต่อแอคติวิตีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต (Mm)			
	4.4	8.8	17.6	35.2
0	0	0	0	0
2	0	0	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0.132 ± 0.000^{a}	0.278 ± 0.000^{b}
8	0.167 ± 0.012^{a}	0.127 ± 0.009^{b}	0.273 ± 0.000^{c}	0.372 ± 0.000^{d}
10	0.180 ± 0.014^{a}	0.203 ± 0.072^{b}	0.911 ± 0.046^{c}	0.588 ± 0.021^{d}
12	0.513 ± 0.024^{a}	0.704 ± 0.254^{b}	0.702 ± 0.035^{c}	0.524 ± 0.177^{a}
14	0.246 ± 0.044^{a}	0.304 ± 0.050^{b}	0.247 ± 0.017^{a}	0.260 ± 0.021^{a}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ (p<0.0

1.3.3 ศึกษาอายุของสาหร่ายที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ที่มีอายุต่างกัน

อายุ(วัน)	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
0	-
1	-
2	-
3	-
4	-
5	-
6	-
7	0.348 ± 0.024^{b}
8	0.518 ± 0.018^{c}
9	0.513 ± 0.000^{c}
10	1.771 ± 0.069^{g}
11	1.097 ± 0.000^{f}
12	0.840 ± 0.049^{e}
13	0.638 ± 0.096^{d}
14	0.285 ± 0.012^{a}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.3.4 ศึกษาผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 9 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 30±1 °C

เวลา (น.)	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
09.00	0.510 ± 0.070^{c}
12.00	0.553 ± 0.059^{c}
15.00	0.306 ± 0.039^{b}
18.00	0.132 ± 0.027^{a}
21.00	0.079 ± 0.004^{a}
24.00	0.908 ± 0.144^{d}
03.00	0.984 ± 0.153^{d}
06.00	1.525 ± 0.047^{e}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.3.5 ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 10 แอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อวิเคราะห์ที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ pH 3-6 (ใช้บัฟเฟอร์ Acetate), pH 7-9 (ใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl) และ pH 10-11 (ใช้บัฟเฟอร์ Carbonate)

pH	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
3	0.022 ± 0.000^{a}
4	0.197 ± 0.021^{b}
5	0.279 ± 0.009^{d}
6	0.566 ± 0.021^{f}
7	0.664 ± 0.000^{g}
8	0.708 ± 0.005^{h}
9	0.723 ± 0.003^{h}
10	0.524 ± 0.023^{e}
11	0.244 ± 0.008^{c}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.3.6 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 11 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน (30-65 °C)

อุณหภูมิ (°C)	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
30	0.483 ± 0.039^{a}
35	0.978 ± 0.028^{b}
40	1.004 ± 0.055^{b}
45	0.686 ± 0.079^{c}
50	0.227 ± 0.018^{d}
55	0.167 ± 0.012^{de}
60	0.147 ± 0.016^{e}
65	0.117 ± 0.020^{e}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.4 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

1.4.1 ศึกษาผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 12 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ชุดทดสอบ	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
Control	0.149±0.007[a]
FAD	0.155±0.008[b]
Molybdenum	0.160±0.005[ab]
FAD+Molybdenum (1:1)	0.172±0.007[c]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.4.2 ศึกษาผลของ Hydroquinone ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 13 ผลของ Hydroquinone ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ชุดทดสอบ	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
Control	0.716±0.018[a]
Hydroquinone	2.062±0.107[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.4.3 ศึกษาผลของ NADH และ NADPH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 14 ผลของ NADH และ NADPH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ชุดทดสอบ	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
Control	0.298±0.021[a]
β-NADH	0.286±0.000[ab]
β-NADPH	0.259±0.016[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.4.4 ศึกษาผลของ Methyl viologen ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 15 ผลของ Methyl viologen ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ชุดทดสอบ	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
Control	0.716±0.018[a]
Methyl viologen	1.018±0.034[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.4.5 ศึกษาผลของ Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Sodium thiocyanide (NaSCN), Arsenic trioxide (As_2O_3) และ Sodium azide (NaN_3) ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 16 ผลของ Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Sodium thiocyanide (NaSCN), Arsenic trioxide (As_2O_3) และ Sodium azide (NaN_3) ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

สารทดสอบ	NR specific activity (nmole/min/mg protein)
Control	0.683±0.000[a]
Potassium ferricyanide	0.674±0.000[a]
Sodium thiocyanide	0.325±0.040[b]
Arsenic trioxide	0.208±0.012[c]
Sodium azide	0[d]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.4.8 ผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ตารางที่ 17 แอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อสกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตนต่าง ๆ และใส่สารให้อิเล็กตรอนลงในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

% Acetone	Electron donor			
	Control	FAD+molybdenum (1:1)	Hydroquinone	Methyl viologen
0	0.391 ± 0.063^{cd}	0.494 ± 0.119^{dc}	0.582 ± 0.135^{e}	1.171 ± 0.343^{f}
10	0.266 ± 0.119^{bc}	0.341 ± 0.210^{cd}	0.395 ± 0.235^{cd}	0.451 ± 0.059^{dc}
20	0.098 ± 0.012^{ab}	0.093 ± 0.009^{ab}	0.127 ± 0.041^{ab}	0.261 ± 0.066^{bc}
30	0.032 ± 0.017^{a}	0.017 ± 0.001^{a}	0.021 ± 0.017^{a}	0.052 ± 0.016^{ab}
40	0.019 ± 0.003^{a}	0.018 ± 0.008^{a}	0.019 ± 0.010^{a}	0.026 ± 0.009^{a}
Acetone	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$
Electron donor	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$
Acetone*Electron donor	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.05$

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนและแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$

1.5 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

1.5.1 ศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ (Heat stability)

ตารางที่ 18 แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 และMOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10% acetone เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -80, -20, 4, 0, อุณหภูมิห้อง (30), 40, 50, 60, 70 ºC นาน 1 ชั่วโมง ก่อนวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ºC)

อุณหภูมิห้อง (ºC)	NR specific activity (nmole/min/mg protein)	
	MOPS-NaOH pH 7.5	MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี 10%acetone
-80	0.556±0.116[a]	0.395±0.067[a]
-20	0.791±0.094[b]	0.718±0.152[b]
4	0.829±0.086[b]	0.779±0.220[c]
0	0.673±0.231[c]	0.410±0.176[d]
อุณหภูมิห้อง (30)	0.869±0.059[d]	0.797±0.177[c]
40	1.030±0.116[e]	0.976±0.306[e]
50	0.794±0.041[b]	0.769±0.201[c]
60	0.015±0.008[f]	0.009±0.002[f]
70	0	0

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.5.2 ศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 ºC ที่ระยะเวลาต่างกัน

ตารางที่ 19 แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 ºC ที่ระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	NR specific ac. (nmole/min/mg protein)
0	0.726 ± 0.017^{a}
30	1.230 ± 0.056^{b}
60	1.010 ± 0.063^{c}
90	0.901 ± 0.010^{d}
120	0.534 ± 0.003^{e}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

1.6 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

1.6.1 เก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 20 แอคติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 ºC เป็นระยะเวลา 7 วัน

วันที่เก็บตัวอย่างวิเคราะห์	4 ºC	-20 ºC	-80 ºC
0	0.314±0.115[a]	0.314±0.115[a]	0.314±0.115[a]
1	0.248±0.049[a]	0.351±0.027[b]	0.116±0.021[c]
2	0.333±0.040[a]	0.276±0.076[a]	0.097±0.011[b]
3	0.292±0.037[a]	0.222±0.050[a]	0.077±0.007[b]
4	0.196±0.040[a]	0.151±0.036[a]	0.055±0.013[b]
5	0.181±0.014[a]	0.129±0.025[b]	0.052±0.007[c]
6	0.179±0.053[a]	0.201±0.044[a]	0.084±0.026[b]
7	0.138±0.035[a]	0.168±0.043[a]	0.056±0.013[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.6.2 เก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในกลีเซอรอล (G) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 21 แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส เมื่อเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้นเท่ากับ 0, 5, 10,15 และ20%

วันที่เก็บตัวอย่าง	อุณหภูมิ 4 ºC					อุณหภูมิ -20 ºC				
	0 % G	5 % G	10 % G	15 % G	20 % G	0 % G	5 % G	10% G	15 % G	20 % G
0	0.313±0.005^{a}	0.311±0.002^{a}	0.315±0.004^{a}	0.314±0.003^{a}	0.314±0.005^{a}	0.313±0.005^{a}	0.311±0.002^{a}	0.315±0.004^{a}	0.314±0.003^{a}	0.314±0.005^{a}
1	0.256±0.004^{a}	0.307±0.011^{b}	0.308±0.003^{b}	0.303±0.004^{b}	0.272±0.025^{b}	0.291±0.004^{b}	0.305±0.003^{b}	0.291±0.010^{b}	0.307±0.006^{a}	0.268±0.005^{a}
4	0.204±0.007^{b}	0.295±0.003^{d}	0.291±0.004^{d}	0.288±0.002^{d}	0.208±0.003^{b}	0.152±0.004^{a}	0.269±0.006^{c}	0.269±0.003^{c}	0.275±0.012^{c}	0.211±0.011^{b}
7	0.131±0.004^{a}	0.263±0.003^{fg}	0.259±0.003^{f}	0.269±0.003^{gh}	0.160±0.004^{c}	0.141±0.003^{b}	0.221±0.002^{e}	0.228±0.009^{e}	0.270±0.001^{h}	0.179±0.006^{d}
10	0.111±0.005^{a}	0.195±0.003^{c}	0.212±0.003^{de}	0.217±0.004^{e}	0.113±0.007^{a}	0.108±0.003^{a}	0.198±0.003^{c}	0.208±0.002^{d}	0.255±0.004^{f}	0.152±0.004^{b}
14	0.085±0.001^{b}	0.159±0.003^{d}	0.193±0.003^{e}	0.187±0.003^{e}	0.073±0.011^{a}	0.074±0.003^{a}	0.154±0.011^{d}	0.196±0.003^{e}	0.240±0.001^{f}	0.114±0.001^{c}
20	0.053±0.002^{ab}	0.115±0.009^{d}	0.144±0.002^{e}	0.157±0.005^{f}	0.055±0.006^{b}	0.045±0.001^{a}	0.115±0.001^{d}	0.174±0.003^{g}	0.224±0.002^{h}	0.101±0.002^{c}
25	0.038±0.003^{a}	0.061±0.005^{b}	0.089±0.003^{c}	0.101±0.004^{d}	0.039±0.005^{a}	0.039±0.002^{a}	0.090±0.001^{c}	0.159±0.003^{e}	0.166±0.013^{e}	0.091±0.001^{c}
30	0.026±0.001^{ab}	0.033±0.002^{c}	0.054±0.003^{d}	0.054±0.002^{d}	0.028±0.003^{b}	0.022±0.002^{a}	0.075±0.004^{e}	0.153±0.002^{h}	0.142±0.002^{g}	0.080±0.001^{f}

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ

ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

1.6.3 เก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ใน L-Proline ที่ระดับความเข้มข้น 1 M

ตารางที่ 22 แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH pH 7.5 ที่มี L-Proline ความเข้มข้น 1M ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 ºC

อุณหภูมิ (ºC) / วันเก็บตัวอย่าง	4		-20	
	MOPS-NaOH	MOPS-NaOH + L-Proline	MOPS-NaOH	MOPS-NaOH+ L-Proline
0	0.313±0.005[a]	0.314±0.003[a]	0.313±0.005[a]	0.314±0.003[a]
1	0.256±0.004[a]	0.288±0.017[b]	0.291±0.004[a]	0.263±0.008[b]
4	0.204±0.007[a]	0.273±0.003[b]	0.152±0.004[c]	0.228±0.008[d]
7	0.131±0.004[a]	0.230±0.004[b]	0.141±0.003[c]	0.196±0.001[d]
10	0.111±0.005[a]	0.210±0.004[b]	0.108±0.003[a]	0.163±0.005[c]
14	0.085±0.001[a]	0.194±0.002[b]	0.074±0.003[c]	0.140±0.002[d]
20	0.053±0.002[a]	0.163±0.002[b]	0.045±0.001[c]	0.118±0.004[d]
25	0.038±0.003[a]	0.142±0.005[b]	0.039±0.002[a]	0.108±0.002[c]
30	0.026±0.001[a]	0.109±0.006[b]	0.022±0.002[a]	0.104±0.003[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ
ตัวเลขในแนวนอนที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

3. อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ใช้อาหารสูตร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534) ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน เตรียมสารเป็น stock 20 เท่า เมื่อจะใช้จึงนำมาเจือจาง ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหาร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534)

สารเคมี	ความเข้มข้น (g/l)
$NaNO_3$	1.50
K_2HPO_4	0.03
$MgSO_4.7H_2O$	0.075
$CaCl_2.2H_2O$	0.027
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	0.001
Na_2CO_3	0.02
Trace metal mix A5	1.0 ml

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของ Trace metal mix A_5

สารเคมี	ความเข้มข้น (mg/l)
H_3BO_4	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.81
$ZnSO_4.7H_2O$	0.222
$NaMoO_4.2H_2O$	0.390
$CuSO_4.5H_2O$	0.0079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.0494

เติมธาตุอาหารเหล่านี้ลงใน Deionized water 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์สำหรับการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส4.1 บัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

50 mM MOPS-NaOH buffer pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF

MOPS	10.4620	g
EDTA	0.3720	g
DTT	0.7712	g
PMSF	0.1742	g

ละลาย PMSF ใน DMSO 10 ml คนอย่างแรงด้วยแท่งแก้วจนสารละลายหมด แล้วค่อย ๆ เติมลงในน้ำกลั่น ปริมาตรประมาณ 750 ml หลังจากนั้นค่อย ๆ ละลายสารทีละตัว เมื่อสารละลายหมด ค่อย ๆ ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.5 ด้วย 4 N NaOH เมื่อได้ pH เท่ากับ 7.5 จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ประยุกต์มาจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานไนไตรต์</u>

1. เตรียมหลอดทดลองที่มีไนไตรต์ 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 และ 0.03 μmole ในสารละลายปริมาตร 0.5 ml โดยใช้สารละลาย 0.2 mM KNO_2

2. เติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl 0.25 ml

3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethyllenediamine 0.25 ml เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

สารผสมสำหรับการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	0.1	0.3
0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0	0.1	0.1
0.1 M KNO_3	0.1	0.1
sample	0.2	-

1. เริ่มปฏิกิริยาโดยเติม sample ในหลอดขนาด 1.5 ml ที่มีสารผสมของ 0.1 M Tris-HCl Buffer pH 8.0, 0.1 M KNO_3และ น้ำกลั่น ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 20, 40, 60 และ 80 นาที

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl 0.25 ml

3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethyllenediamine 0.25 ml เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4.3 การหาปริมาณโปรตีน

ประยุกต์จากวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 2 mg/ml มาใส่หลอดทดลองให้มีโปรตีนปริมาณ 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 µg ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 0.1 ml ต่อหลอด

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

สารผสมสำหรับการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	-	0.1
สารละลายโปรตีนมาตรฐาน	0.1	-
5 % Deoxycholate	0.4	0.4
2 % Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH	3.0	3.0
1 % $CuSO_4$+ 2% Na/K tartrate	0.1	0.1

เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciacalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) 0.3 ml เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การหาปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่าง

เจือจางโปรตีนในสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 20-100 µg/ml นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

4.4 การวัดปริมาณไนไตรต์

ประยุกต์จากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนไตรต์

1. เตรียมหลอดทดลองที่มีไนไตรต์ 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 และ 0.03 µmole ในสารละลายปริมาตร 0.5 ml โดยใช้สารละลาย 0.2 mM KNO_2

2. เติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl 0.25 ml

3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02 % (w/v) N-(1-napthyl) ethyllenediamine 0.25 ml เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดปริมาณไนไตร์ตในสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้วให้ได้ปริมาณไนไตรต์อยู่ในช่วง 0.005-0.03 µmole ต่อ 0.1 ml นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณไนไตรต์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานไนไตรต์

4.5 การวัดปริมาณไนเตรต

ประยุกต์จากวิธีของ Cataldo และคณะ (1975)

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนเตรต

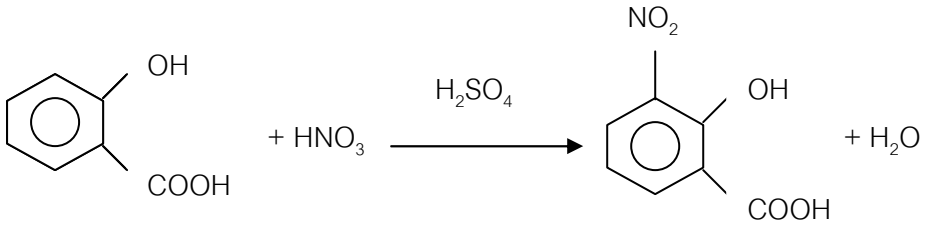
เตรียมหลอดทดลองที่มี KNO_3 เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 μmole ต่อ 0.1 ml จากสารละลาย 5 mM KNO_3

ส่วนประกอบ	ปริมาตรในการวิเคราะห์ (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	-	0.1
KNO_3 ความเข้มข้นต่างๆ	0.1	-
5% Salicylic acid ใน conc. H_2SO_4	0.4	0.4

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม 4 N NaOH 4.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

<u>การวัดปริมาณไนเตรตในสารละลายตัวอย่าง</u>

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้วให้ได้ปริมาณไนเตรตอยู่ในช่วง 0.1-0.5 μmole ต่อ 0.1 ml นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณไนเตรตเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานไนเตรต



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซาลิซิลิก

5. การเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษา การโคลนของบางส่วนของยีน Nar สำหรับเอนไซม์ NR ของ สาหร่ายชนิด Synechococcus sp.

5.1 การเตรียมอาหาร LB (Luria Bertaini) medium (Sambrook และ คณะ, 1989)

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 ml ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.2 การเตรียมอาหาร SOC (SOC medium)

Tryptone	20	g
Yeast extract	5	g
NaCl	0.5	g

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 950 ml เขย่าจนกระทั่งสารละลายหมด เติมสารละลาย 250 mM KCl ml (สารละลาย KCl เตรียมได้จากการละลาย KCl 1.86 g ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 mM) ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 5 N NaOH (ปริมาตร 0.2 ml) ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 1 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนึ่งเรียบร้อยแล้วปล่อยให้อุณหภูมิของอาหารลดลงเหลือประมาณ 60°C จึงเติมสารละลาย 1 M glucose ปริมาตร 20 ml (1 M glucose เตรียมโดยการละลาย glucose 18 g ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 ml หลังจากน้ำตาล glucose ละลาย ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นและทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน)

5.3 การเตรียม Phenol : Chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 (v/v)

ผสม Chloroform และ isoamyl alcohol ด้วยอัตราส่วน 24:1 จากนั้นนำไปผสมกับสารละลาย phenol อิ่มตัวปริมาตรเท่ากันโดยส่วนใหญ่จะผสม phenol อิ่มตัวเมื่อต้องการใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้หลังผสมแล้วให้เติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

5.4 การเตรียม 1 M $CaCl_2$

ละลาย $CaCl_2.6\,H_2O$ 14.7 g ในน้ำบริสุทธิ์ milli-Q ปริมาตร 100 ml ทำสารละลายให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านฟิลเตอร์ 0.22 ไมครอน และแบ่งเป็นส่วนๆ ขนาด 1 ml เก็บไว้ที่ -20 °C

5.5 การเตรียม 0.5 M EDTA pH 8.0

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetraacetate . $2\,H_2O$ หนัก 186.1 g เติมน้ำ 800 ml กวนอย่างแรงโดยใช้แท่งแม่เหล็ก เติมเกล็ด NaOH ลงไปจนได้ pH 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.6 การเตรียม Ethidium bromide (10 mg / ml)

ชั่ง Ethidium bromide 1 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 ml กวน โดยแท่งแม่เหล็กจนละลาย เก็บในขวดสีชาอุณหภูมิห้อง โดยในขณะเตรียมให้สวมถุงมือ และระวังอย่าหายใจเอา Ethidium bromide เข้าไปเพราะผง Ethidium bromide มีสมบัติเป็น Strong mutagen

5.7 การเตรียม IPTG (Isopropylthio – β –D-galactoside)

ชั่ง IPTG 2 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน แบ่งเป็นส่วนๆ ขนาด 1 ml เก็บไว้ที่ -20 °C

5.8 การเตรียม X-gal (Bromo-40-Chloro-3-indolyl-β-D- galactoside)

ละลาย X-gal 20 mg ใน Dimethyl formamide 1 ml และเก็บไว้ในหลอดห่อ Foil ที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ต้องกรอง สารละลายที่ได้ควรเป็นสารละลายไม่มีสี ถ้ามีสีออกเหลืองไม่ควรใช้

5.9 การเตรียม 1 M $MgCl_2$

ละลาย $MgCl_2$ .6 H_2O 203.3 g ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่นและทำให้ปราศจากเชื้อโดยฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.9 การเตรียม เอนไซม์ RNase A

เตรียมโดยการชั่ง RNase A 10 mg ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 µl แล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ -20 °C เอนไซม์ยังทำงานได้ดีแม้จะผ่านการแช่แข็งและละลาย (Freeze – thaw) หลายครั้ง

5.10 การเตรียมยาปฏิชีวนะ ampicillin (100 mg/ml)

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก E. *coli* ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมจะเตรียมเก็บเป็น stock ที่-20 ๐C สำหรับยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 mg/ml เตรียมโดยการชั่ง ampicillin sodium salt 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ml

5.11 การเตรียม 50X TAE buffer

Tris-base	108	g
Glacial acetic acid	55	g
0.5 MEDTA (pH 8.0)	40	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้1,000 ml และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.12 การเตรียม 3 M Sodium acetate (pH 5.2)

ชั่ง Sodium acetate.2 H_2O 408.1 g ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 750 ml เติม glacial acetic acid จนได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 1 และทำให้ปราศจากเชื้อฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer ณ ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์