บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 ตัวอย่างสาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ สาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำพุร้อนในหมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง, สระมรกต หมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม, น้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม และน้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่ ซึ่งนำมาแยกให้เป็นชนิดเดี่ยวได้ 2 ชนิด คือ *Chlorella* sp. และ *Synechococcus* sp. สำหรับชนิดที่นำมาศึกษาเป็นหลัก คือ *Synechococcus* sp. ซึ่งเป็นตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บมาจากบ่อพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่

2.1.2 แบคทีเรีย

Escherichia coli $DH_5\alpha$

2.1.3 ดีเอ็นเอพาหะ (plasmid vector)

pDrive Cloning Vector (QIAGEN)

2.1.4 ไพรเมอร์ (primer)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส $5' \longrightarrow 3'$
FORWARD DOMAIN 1	CT(C/T)TGTCC(C/T)TA(C/T)TGTGGTGT
REVERSE DOMAIN 1	GTGACATTCGGCGGT(A/G)TT
FORWARD DOMAIN 2	TGATGCCAACTCCCGC(C/T)T
REVERSE DOMAIN 2	GGCATACT(C/T)AC(A/C)GC(A/C/T)GGATT
FORWARD DOMAIN 3	GA(A/C)GAGAAC(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)GGA
REVERSE DOMAIN 3	TCGGTGGTTCTGCCAGCCAGTC

2.1.5 แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพด เตรียมเมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2547 โดยนางสาวประทุม ฤทธิสุนทร

2.1.6 แอคติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase

2.1.7 สำลี

2.1.8 ผ้าก็อซ

2.1.9 กระดาษฟอยล์ (aluminium foil)

2.1.10 กระติกไนโตรเจนเหลว

2.1.11 สารเคมี

2.1.11.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Boric acid	Hopkins&Williams
Bovin serum albumin	Sigma
Calcium chloride	Merck
Citric acid	Riedel-de Hean
Cobalt (II) chloride	Ajax chemicals
Copper sulphate	Ajax chemicals
Chloroform	Labscan
Deoxycholate sodium salt	Fluka
Dithiothreitol	Usb
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Glycerol	Sigma
Hydrochloric acid	Merck
Iron (II) sulphate	Merck
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Magnesium sulphate	Ajax chemicals
Methanol	BDH
Methyl viologen dichloride hydrate	Sigma-Aldrich
สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
N-(1-naphyl) ethylenediamine dihydrochloride	Sigma
Nicotinamide adenine dinucleotide	Sigma

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma
Potassium cyanide	Riedel-de Hean
Potassium nitrate	Carlo Erba
Salicylic acid	BDH
Sodium acetate	Merck
Sodium azide	Sigma
Sodium dithionite	Fluka
Sodium hydroxide	BDH
Sodium molybdate	Merck
Sodium nitrate	Ajax chemicals
Sodium nitrite	Ajax chemicals
Sodium thiocyanate	Sigma
Sulfanilamide	Sigma
Sulfuric acid	Merck
Triton X-100	Merck
Tween-20	APS
Zinc acetate	BDH

2.1.11.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Sigma-Aldrich
Amplicillin	Sigma-Aldrich
AMV Reverse Transcriptase	Promega
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-GAL)	Promega
Ethidium bromide	Biolabs
Taq DNA polymerase	Promega
Alkaline phosphatase	Sigma-Aldrich

2.2 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง	PG5002-S	Mettler
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง	AB204-S	Mettler
เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	5804R	Eppendorf
เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	J2-21	Beckman
เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก	Model Biofuge Pico	Sorval
เครื่องตรวจสอบ DNA (โดยวิธี Agarose gel electrophoresis)	AE-6100	ATTO
เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า	200/2.0	Bio-Rad
ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow	BSB3	Gelaire
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	OI3422	Paton scientific
หม้อนึ่งความดันไอ	ES-315	TOMY
ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °C	-	Memmert
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ heat block	D1200	Labnet International
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	TW 20	Julabo
เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ polymerase chain reaction	-	Hybaid&Eppendorf
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C	-	Bara laboratory
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C	-	SANYO
Hot plate	1000	Thermolyne
เครื่องอบแห้งควบคุมอุณหภูมิ	-	Binder
Magnetic Stirrer	MS101	Gem
เครื่องวัด pH	240	Corning
Spectrophotometer	8453	Hewlet Packard
Salintest	HI98203	Hanna instruments
เครื่องทำกระแสวนหรือวอร์เทกซ์	K-550-GE	Scientific Industries
เครื่องทำน้ำแข็ง	NT 126	Newton
เครื่อง UV light transilluminator	Vilber lourmat	Delta laboratory

2.3 วิธีการ

2.3.1. การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

2.3.1.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากบริเวณในบ่อน้ำร้อน หมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง สระมรกต หมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม น้ำตกร้อน หมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อม และน้ำพุร้อนเค็ม หมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่

2.3.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บสาหร่ายชนิดสีเขียว (green algae) และสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae/ cyanobacteria) ทั้งสาหร่ายที่ลอยในน้ำ (phytoplankton) โดยใช้ตาข่ายละเอียด (plankton net) ที่มีขนาดตาเท่ากับ 10 μm ช้อนตักสาหร่ายขึ้นจากแหล่งน้ำและเก็บกลุ่มสาหร่ายที่อยู่ที่ผิวดินใต้ท้องน้ำ (benthic algae) โดย ใช้ปากคีบ (forceps) คีบสาหร่าย (Stevenson, 1996) เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งเก็บน้ำในบ่อบรรจุขวดโพลีแอททิลีนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ ในห้องปฏิบัติการ

2.3.1.3 การตรวจสภาพของน้ำในบ่อน้ำร้อน

2.3.1.3.1 ลักษณะของสี และกลิ่นของน้ำ

โดยใช้สายตาและการดมกลิ่น

2.3.1.3.2 อุณหภูมิ สภาพความเป็นกรด-ด่างและความเค็มของแหล่งน้ำ

โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ pH meter และ Salintest จุ่มลงในน้ำให้ห่างจากขอบบ่อประมาณ 1 เมตร เพื่อวัดอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและความเค็ม ตามลำดับ

2.3.1.3.3 ปริมาณไนเตรตในแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ salicylic acid method ประยุกต์จากวิธีของ Cataldo และคณะ (1975) โดยนำน้ำตัวอย่าง 100 μl มาทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน conc. H_2SO_4 ปริมาตร 0.4 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นปรับ pH ให้เป็นด่าง (pH>12) ด้วย 4 N NaOH ปริมาตร 4.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็น ถ้ามีไนเตรตสารละลายจะเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 410 นาโนเมตรและใช้ KNO_3 ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.3.1.3.4 ปริมาณไนไตรต์ในแหล่งน้ำ

ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ในห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างน้ำ 500 µl มาทำปฏิกิริยากับ 1% (w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl ปริมาตร 250 µl ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 250 µl เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ถ้ามีไนไตรต์สารละลายจะมีสีชมพูอมม่วงซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร และใช้ $NaNO_2$ ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายและแยกตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บมาให้เป็นสาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ

นำสาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534) ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในเครื่อง Illuminated shaker ที่มีความเร็ว 150 rpm ภายในห้องที่มีความเข้มแสง 120 µphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 35 °C จนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารนั้นมาแยกให้เป็นชนิดเดี่ยว ๆ โดยใช้วิธี streak plate โดยนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาขีดลาก (streak) ด้วย loop บนอาหารแข็ง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยวางจานเพาะเชื้อในที่มีแสง 120 µphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 2 สัปดาห์ สังเกตดูโคโลนีของสาหร่ายที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ถ้าพบโคโลนีที่เป็นเซลล์เดี่ยวถ่ายลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l พร้อมทั้งตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยว ๆ หรือไม่ ถ้าเป็นสาหร่ายชนิดที่เป็นเส้นสาย ให้ตัดวุ้นส่วนที่มีปลายสายสาหร่ายเจริญเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำมาวางบนอาหารแข็งใหม่ เพาะเลี้ยงต่อไปจนสาหร่ายเจริญแผ่ขยายออกไปทำซ้ำหลายๆ ครั้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยว ๆ หรือไม่ ถ้าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยวๆแล้วจึงตัดวุ้นส่วนที่มีปลายสายสาหร่ายเจริญเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ใส่ลงในอาหารเหลว BG-11 เพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป

2.3.3 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.

2.3.3.1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ใช้สูตรอาหาร BG-11 (พิมพรรณ ตันสกุล, 2534) และเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 g/l เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสาหร่าย ทำการฆ่าเชื้ออาหารโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอที่ระดับความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2.3.3.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ให้เซลล์เริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm ประมาณ 0.20 ในอาหารปริมาตร 125 ml นำฟลาสก์เพาะเลี้ยงสาหร่ายวางไว้ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิ 30±1 ˚C และแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน

2.3.4 คัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษา

2.3.4.1 วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (NR) แบบ *in vivo*

ดัดแปลงจากวิธีของ Harley (1993) โดยนำเซลล์สาหร่ายประมาณ 0.5 g (น้ำหนักสด) มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml แล้วดูดตัวอย่างปริมาตร 200 μl ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ที่มีสารผสมของบัฟเฟอร์ 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 30 mM KNO_3 และ 5%(w/v) propanol ปริมาตร 0.3 ml ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆกันคือ 30, 60, 90, 120 และ150 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดังกล่าว หยุดปฏิกิริยาโดยต้มหลอดทดลองในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl ปริมาตร 0.25 ml และทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02 % (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 0.25 ml เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็กเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณอัตราการเพิ่มของไนไตรต์ต่อเวลา มีหน่วยเป็น nmole/min โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ $NaNO_2$ และเทียบกับปริมาณของโปรตีน มีหน่วยเป็น nmole/min /mg protein

2.3.4.2 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย 2 ชนิด ได้แก่ *Chlorella* sp. และ *Synechococcus* sp.

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. และสารสกัดหยาบและสารละลายเอนไซม์ NR ของสาหร่ายชนิด *Chlorella* sp. ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR และปริมาณของโปรตีนตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 และ 2.4.9 ตามลำดับ แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้เทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ก่อนบ่มที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าว

2.3.5 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของสาหร่ายโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เขย่าขวดเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้เซลล์สาหร่ายกระจายอย่างสม่ำเสมอแล้วดูดอาหารเพาะเลี้ยงพร้อมเซลล์สาหร่ายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

2.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่าย

เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงสาหร่าย มาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ Salicylic acid method ประยุกต์จากวิธีของ Cataldo และคณะ (1975) โดยนำตัวอย่างอาหารเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 µl และปริมาณไนตรตอยู่ในช่วง 0.1-0.5 µmole/100 µl มาทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน conc. H_2SO_4 ปริมาตร 0.4 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นปรับ pH ให้เป็นด่าง (pH>12) ด้วย 4 N NaOH ปริมาตร 4.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็น ถ้ามีไนเตรตสารละลายจะเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 410 นาโนเมตร และใช้ KNO_3 ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย

เก็บตัวอย่างอาหารมาวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างอาหารมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 500 µl และมีปริมาณไนไตรต์ในช่วง 0.005-0.03 µmole/500 µlมาทำปฏิกิริยากับ 1% (w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl ปริมาตร 250 µl ทำให้เกิดสี โดยการเติม 0.02% (w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ถ้ามีไนไตรต์สารละลายจะมีสีชมพูอมม่วงซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร และใช้ $NaNO_2$ ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.3.8 การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vitro*

2.3.8.1 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์สำหรับใช้ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เก็บตัวอย่างสาหร่าย โดยนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4700 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกสองครั้ง โดยตกตะกอนที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำตะกอนที่ได้บดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดที่มีบัฟเฟอร์ สกัด (50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT)

นำสารสกัดที่ได้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที แยกสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนตะกอนมาละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

2.3.8.2 วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และIkawa (1993) เริ่มจากผสมบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 100 µl, 0.1 M $NaNO_3$ ปริมาตร 100 µl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 µl เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมสารสกัดเอนไซม์ที่เตรียมได้ปริมาตร 200 µl

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและหยุดปฏิกิริยาที่ต่าง ๆกันคือ 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที ด้วย 1%sulfanilamide ใน 1.5 N HCl ปริมาตร 250 µl ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02 %(w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 250 µl เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลอดที่มีตะกอนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณอัตราการเพิ่มของไนไตรต์ต่อเวลา มีหน่วยเป็น nmole/min โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ $NaNO_2$และนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีนอีกครั้ง ซึ่งมีหน่วยเป็น nmole/min/mg protein

2.3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ประยุกต์จากวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารสกัดเอนไซม์มาเติมด้วย 5% deoxycholate 0.4 ml จากนั้นผสมสารละลายของสาหร่ายกับ 2% Na_2CO_3 ใน 0.4 N NaOH ปริมาตร 3 ml และสารละลายคอปเปอร์ทาร์เทรต (1% $CuSO_4$ + 2% Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) ปริมาตร 0.3 ml ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ bovin serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.3.10 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Synechococcus* sp.

2.3.10.1 ศึกษาผลของก๊าซออกซิเจนต่ออัตราการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. ในสูตรอาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ในสภาวะที่มีแสง 120 µphoton m^{-2} s^{-1} เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันและอุณหภูมิ 35 ˚C แต่เลี้ยงสาหร่าย 2 แบบที่ต่างกันคือ

แบบที่ 1 เลี้ยงสาหร่ายในเครื่อง Illuminated shaker เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm

แบบที่ 2 วางฟลาสก์ตัวอย่างสาหร่ายไว้เฉยๆโดยไม่มีการเขย่า

เก็บตัวอย่างสาหร่ายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและเก็บอาหารเลี้ยงสาหร่ายเพื่อศึกษาปริมาณไนเตรตที่ลดลงและปริมาณไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารตามวิธีในข้อที่ 2.4.6 และ2.4.7 ตามลำดับ ทุกวันเป็นระยะเวลา 14 วัน

2.3.10.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. โดยใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกันคือ

2.4.10.2.1 อาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 g/l ซึ่งมีการเติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM

2.4.10.2.2 อาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 g/l ซึ่งมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0, 6.25 และ 12.5 g/l

เพาะเลี้ยงสาหร่ายตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2 เก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.3.11 ศึกษาสภาวะที่ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. ทำงานได้สูงสุด

2.3.11.1 การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์

เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 ประมาณ 0.5 กรัม (น้ำหนักสด) โดยการตกตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 4700 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกสองครั้งโดยตกตะกอนที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำตะกอนที่ได้บดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดที่มีบัฟเฟอร์สกัด MOPS-NaOH pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 50 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM DTT และ 1 mM PMSF นำสารสกัดที่ได้ตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 20 นาที แยกสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมและส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรน โดยส่วนของตะกอนนั้นละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วน วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR และปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2 และ2.4.9 ตามลำดับ

2.3.11.2 ศึกษาผลของความเค็มในอาหารที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร BG-11 ที่เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l และโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้

ก. ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์

ข. โซเดียมคลอไรด์ 12.5 g/l

ค. โซเดียมคลอไรด์ 6.25 g/l

เพาะเลี้ยงสาหร่ายตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2 เก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อนำไปศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR และปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2 และ 2.4.9 เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.3.11.3 ศึกษาผลของไนเตรตในอาหารที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เลี้ยงสาหร่ายในอาหาร 4 สูตรที่แตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 BG-11 ที่มี 4.4 mM $NaNO_3$

สูตรที่ 2 BG-11 ที่มี 8.8 mM $NaNO_3$

สูตรที่ 3 BG-11 ที่มี 17.6 mM $NaNO_3$

สูตรที่ 4 BG-11 ที่มี 35.2 mM $NaNO_3$

เพาะเลี้ยงสาหร่ายตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2 เก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR และปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2 และ2.4.9 เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.3.11.4 ศึกษาอายุของสาหร่ายที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เก็บตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2 ทุกวันเป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm และศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2 นอกจากนี้เก็บอาหารเลี้ยงสาหร่ายเพื่อ ศึกษาปริมาณไนเตรตในอาหารที่ลดลงและไนไตรต์ในอาหารที่เพิ่มขึ้นตามวิธีในข้อที่ 2.4.6 และ2.4.7 ตามลำดับ

2.3.11.5 ศึกษาผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เพาะเลี้ยงตัวอย่างสาหร่ายตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2 ทำการศึกษาผลของแสงที่ระดับความเข้มแสง 120 μphoton/m^2/s ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ NR เมื่อสาหร่ายมีอายุ 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก 3 ชั่วโมง เพื่อนำมาศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.11.6 ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ใช้ pH ช่วง 2-11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ กันดังนี้

ก. pH ช่วง 2-6 ใช้บัฟเฟอร์ Acetate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ข. pH ช่วง 7-9 ใช้บัฟเฟอร์ Tris- HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ค. pH ช่วง 10-11 ใช้บัฟเฟอร์ carbonate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ0.5 mM DTT มาวิเคราะห์

แอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2 ซึ่งในแต่ละชุดทดสอบจะมีสารผสมที่มีความต่างกันที่บัฟเฟอร์คือใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิดดังกล่าว ที่มี pH ต่าง ๆ กัน

2.3.11.7 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR วิธีในข้อที่ 2.4.8.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-70 °Cโดยใช้ Digital Dry Bath ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิได้

2.3.12 ศึกษาสมบัติของของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

การศึกษาสมบัติของของเอนไซม์ NR ใช้ตัวอย่างสาหร่าย *Synechococcus* sp. ที่มีอายุ 10 วัน ซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อที่ 2.4.3.2

2.3.12.1 ศึกษาผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม 20 µM FAD ร่วมกับ 20 µM Molybdate ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 µl, 20 µM FAD ปริมาตร 100 µl และ 20 µM Molybdate ปริมาตร 100 µl เพียงอย่างเดียวลงในสารผสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ NR และชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารทั้งสองและวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.2 ศึกษาผลของ Hydroquinone ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม 20 µM Hydroquinone ปริมาตร 100 µl กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าวและวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.3 ศึกษาผลของ NADH และNADPH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ0.5 mM DTT ซึ่งเตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีโดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม 0.2 mM β-NADH ปริมาตร 100 µl, 0.2 mM β-NADPH ปริมาตร 100 µl และชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารทั้งสองลงในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีและศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.4 ศึกษาผลของ Methyl viologen ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

ดัดแปลงตามวิธีของ Steward และคณะ (2002) โดยนำสารสกัดเอนไซม์ NR ใน MOPS-NaOH buffer pH 7.5 ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 200 µl ผสมน้ำกลั่น 100 µl แล้วเติม 0.5 mg/ml ของ methyl viologen ปริมาตร 100 µl ผสมสารในหลอดให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสารผสมซึ่งประกอบด้วย 4 mg/ml ของ sodium dithionite, 4 mg/ml sodium bicarbonate และ 0.1 M sodium nitrate ปริมาตร 100 µl จับเวลาที่ 0, 20, 40 และ60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ก๊าซออกซิเจนแก่ปฏิกิริยาด้วยการเขย่าอย่างรุนแรงด้วยวอร์เทกซ์ แล้วเติม sulfanilamide ใน 1.5 N HCl และ0.02%(w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride อย่างละ 0.25 ml นำสารละลายที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ที่ได้เทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.5 ศึกษาผลของ Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Sodium thiocyanate (NaSCN), Arsenic trioxide (As_2O_3) และ Sodium azide (NaN_3) ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ใน 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ซึ่งเตรียมได้จากวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม $K_3Fe(CN)_6$, NaSCN, As_2O_3และ NaN_3 ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 50 µl ลงในสารผสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ NR และวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.6 ศึกษาผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

นำตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายที่ผ่านการบดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดด้วยMOPS -NaOH buffer pH 7.5 แล้วมาเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง centrifuge 5804R ด้วยความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 20 นาที เลือกส่วนของตะกอนสกัดอีกครั้งด้วย MOPS-NaOH buffer pH 7.5 ที่มีความเข้มข้นของ อะซีโตนเท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนตะกอนและส่วนสารละลายที่ได้ไประเหยอะซีโตนที่อุณหภูมิห้องในตู้ควันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำส่วนของตะกอนละลาย

ด้วย MOPS-NaOH buffer pH 7.5 นำสารสกัดที่ได้และส่วนของสารละลายไปศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR โดยแบ่งชุดการศึกษาออกเป็น 3 ชุด ตามสารผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีดังนี้

ชุดที่ 1 0.1 M $NaNO_3$ 100 µl, 0.1 M Tris-HCl 100 µl, น้ำกลั่น 100 µl และสารสกัดเอนไซม์ 200 µl

ชุดที่ 2 0.1 M $NaNO_3$ 100 µl, 0.1 M Tris-HCl 100 µl, สารผสมของ ของ FAD กับ molybdate ความเข้มข้น 100 µM ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 µl, และสารสกัดเอนไซม์ 200 µl

ชุดที่ 3 0.1 M $NaNO_3$ 100 µl, 0.1 M Tris-HCl 100 µl, hydroquinone ความเข้มข้น 100 µM ปริมาตร 100 µl และสารสกัดเอนไซม์ 200 µl

ชุดที่ 4 สารผสม 4 mg/ml ของ sodium dithionite, 4 mg/ml sodium bicarbonate, 0.1 M sodium nitrate ปริมาตร 100 µl และ 0.5 mg/ml Methyl viologen 100 µl

ชุดที่ 1 ถึง 4 วิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสแบบวิธีที่ดัดแปลงตาม Nakamura และ Ikawa (1993) ในข้อที่ 2.4.8.2 และชุดที่ 4 วิเคราะห์ตามแบบวิธีของ Steward และคณะ (2002) ในข้อที่ 2.4.12.3

2.3.12.7 ศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำสารสกัดเอนไซม์ NR ที่สกัดด้วย MOPS-NaOH buffer pH 7.5 และ MOPS-NaOH buffer ที่มี 10% อะซีโตนผสมอยู่ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 70, 60, 50, 40, 30, 4, 0, -20 และ-80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดดังกล่าววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดให้กลับสู่อุณหภูมิปกติ แล้วนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.8 ศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C ใน Digital Dry Bath เป็นระยะเวลาที่ต่างกันคือ 30, 60, 90 และ120 นาที หลังจากที่บ่มครบระยะเวลาที่กำหนดนำสารสกัดดังกล่าวมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สภาพของสารสกัดหยาบกลับมาสู่อุณหภูมิปกติ หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.12.9 ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส ในสารสกัดหยาบด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลงตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979)

นำสารสกัดหยาบสาหร่าย *Synechococcus* sp. 300 µl ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จำนวน 4 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็กที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 2 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอนและบ่มเซลล์สาหร่ายด้วย TBS (25 mM Tris –HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) 3 ครั้ง ๆ 5 นาที แล้วบ่มเซลล์สาหร่ายด้วย 10 % non-fat milk ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย TTBS (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำหลอดที่ 2 และ 4 มาบ่มด้วย antibody ต่อไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพด (Primary antibody) ปริมาตร 300 µl โดยมีอัตราส่วนแอนติบอดีต่อ TTBS ที่มี 1% non-fat milk เท่ากับ 1: 500 ส่วนหลอดที่ 1 และ 3 บ่มด้วย TTBS ที่มี 1% non-fat milk ปริมาตร 300 µl บ่มทั้ง 4 หลอดนาน 2 ชั่วโมงและนำมาล้างด้วย TTBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำหลอดที่ 3 และ 4 มาบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (secondary antibody) ในอัตราส่วนแอนติบอดีต่อ TTBS ที่มี 1% non-fat milk เท่ากับ 1: 10,000 ส่วนหลอดที่ 1 และ 2 บ่มด้วย TTBS ที่มี 1% non- fat milk จำนวน 300 µl บ่มทั้ง 4 หลอดนาน 2 ชั่วโมง และนำมาล้างด้วย TTBS 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ล้างต่อด้วย TBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ย้อมด้วยสับสเตรตของ alkaline phosphatase ปริมาตร 100 µl สังเกตสีที่เกิดขึ้น

2.3.13 การศึกษาจลนศาสตร์

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ NR ต่อ สับสเตรต โดยใช้เอนไซม์ NR ทำปฏิกิริยากับ KNO_3 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 และ 6.4 mM จากนั้นนำไปทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.4.8.2 แล้วคำนวณค่า K_m และ V_{max} จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ 1/[S]

2.3.14 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

2.3.14.1 เก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 (อุปกรณ์และทุกขั้นตอนปราศจากเชื้อ) แบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วนำหลอดดังกล่าวเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ -80, -20 และ4 °C (ในการทดลองนี้ไม่สามารถเก็บสารสกัดหยาบดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ เนื่องจากเมื่อทำการตรวจสอบโดยการขีดลาก (streak) สารสกัดดังกล่าวบนอาหาร nutrient agar เมื่อครบเวลาต่างๆ พบว่าตั้งแต่ 48 ชั่วโมงจะมีเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) เก็บผลแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ทุกวันเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยนำหลอดสารสกัดตัวอย่างที่เก็บไว้ที่

อุณหภูมิต่าง ๆ มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาครึ่งชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดละลายและกลับสู่สภาวะอุณหภูมิปกติ หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์แอคติวิตีของสารสกัดตัวอย่างดังกล่าวตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.14.2 เก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.3.13.1 ซึ่งในขั้นตอนการละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์มีการใช้บัฟเฟอร์ต่างกันดังนี้

ชุดที่ 1 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT

ชุดที่ 2 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 5% กลีเซอรอล

ชุดที่ 3 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 10% กลีเซอรอล

ชุดที่ 4 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 15% กลีเซอรอล

ชุดที่ 5 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 20% กลีเซอรอล

หลังจากที่ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ข้างต้นเรียบร้อย แล้วแบ่งสารสกัดที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5 ml เก็บไว้ที่ -20 และ4 °C เมื่อต้องการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR จึงนำหลอดสารสกัดตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาครึ่งชั่วโมงเพื่อให้สารสกัดละลายและกลับสู่สภาวะอุณหภูมิปกติ หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์แอคติวิตีของสารสกัดตัวอย่างดังกล่าวตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.14.3 เก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ใน L-Proline ที่ระดับความเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 ซึ่งในขั้นตอนการละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์มีการใช้บัฟเฟอร์ต่างกันดังนี้

ชุดที่ 1 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT

ชุดที่ 2 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 1 M L-Proline

หลังจากที่ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ข้างต้นเรียบร้อยแล้ว แบ่งสารสกัดที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5 ml เก็บไว้ที่ -20 และ 4 °C เมื่อต้องการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ NR จึงนำหลอดสารสกัดตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาครึ่งชั่วโมง เพื่อให้สารสกัดละลายและกลับสู่สภาวะอุณหภูมิปกติ หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์แอคติวิตีของสารสกัดตัวอย่างดังกล่าวตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.14.4 เก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์แบบแห้งจากวิธีการ freeze dry

เตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ NR ตามวิธีในข้อที่ 2.4.8.1 นำส่วนตะกอนของสารสกัดที่เตรียมได้ชั่งน้ำหนัก แล้วแบ่งปริมาณของตะกอนออกเป็นสองชุดเท่ากัน (นำหนักสดเท่ากับ 2.5g) โดยชุดที่ 1 ละลายตะกอนด้วย 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ปริมาตร 5 ml และชุดที่ 2 ละลายตะกอนด้วย 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 10% acetone ปริมาตร 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วมาเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง centrifuge 5804R ด้วยความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนตะกอนและส่วนสารละลาย นำสารสกัดทั้งสองส่วนระเหย acetone ในตู้ควันเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแบ่งส่วนตะกอนที่ได้ละลายด้วย 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ในอัตราส่วน 1:2 รวมทั้งส่วนสารละลายไปศึกษาแอคติวิตีของ NR ตามแบบวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ในข้อที่ 2.4.8.2 เก็บส่วนตะกอนที่เหลือไว้ในที่อุณหภูมิ -20 °C ข้ามคืน หลังจากนั้นทำตะกอนของสารสกัดเอนไซม์ให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry ด้วยเครื่อง Freeze-Dryer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้แบ่งเป็นสองชุด โดยชุดที่ 1 ละลายด้วย 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT และชุดที่ 2 ละลายด้วย 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี 1 mM EDTA, 1 mM PMSF และ 0.5 mM DTT ที่มี 5% glyceral ในอัตราส่วน 1:2 แล้วนำสารสกัดที่ได้ศึกษาแอคติวิตีของ NR ตามแบบวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ในข้อที่ 2.4.8.2

2.3.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบจำแนกสองทาง (two way Analysis of Variances) ระหว่างสองปัจจัยคือ สารให้อิเล็กตรอนกับความเข้มข้น Acetone สำหรับการศึกษาเรื่องผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ NR และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Ducan's multiple range test (Ducan, 1955) โดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.0

2.3.16 การโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar สำหรับเอนไซม์ NR ในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

2.3.16.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนส่วนของยีน nar ในสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนส่วนของยีน nar ซึ่งแปลรหัสของเอนไซม์ NR เริ่มจากการรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ NR จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีอยู่แล้วในธนาคารยีน (GenBank) ผ่านฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Clustal X 1.81

2.3.16.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

2.3.16.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเซลล์สาหร่าย

ดัดแปลงจากวิธีของ Abdullah และคณะ (1995) นำตะกอนเซลล์สาหร่าย 3 g บดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำตะกอนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml ที่มีบัฟเฟอร์สกัดอาร์เอ็นเอ [(100 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA และ1% SDS) ต่อ phenol (1:1,v/v)] ที่ผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C ปริมาตร 20 ml ผสมบัฟเฟอร์กับเซลล์สาหร่ายให้เข้ากัน เติม Chloroform อัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 20 ml เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,700 x g นาน 15 นาที ที่ 4 ^{o}C ดูดสารละลายส่วนบนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอน แล้วนำสารละลายที่ได้มาสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่งด้วยสารละลาย phenol:chloroform อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 ml หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,700 x g นาน 10 นาที ที่ 4 ^{o}C ดูดสารละลายส่วนบนออกโดยไม่ให้รบกวนตะกอน หลังจากนั้นแบ่งสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 ml แล้วนำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย 3 M Sodium acetate pH 5.2 อัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 20 µl หลังจากนั้นเติม isopropanol 0.8 % ของปริมาตรสุทธิของสารละลาย นำสารสะลายหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 20 นาทีด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol วางตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.3.16.2.2 การทำบริสุทธิ์อาร์เอ็นเอรวมจากสาหร่ายโดยวิธีการใช้ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากข้อ 2.3.15.2.1 ผสมกับบัฟเฟอร์ RLT ซึ่งมีส่วนประกอบของ guanidine thiocyanate ปริมาตร 400 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา

หลังจากนั้นเติม 70% ethanol ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำสารละลายใส่ในคอลัมน์ RNeasy mini หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เติม 700 µl บัฟเฟอร์ RW1 ซึ่งมี ethanol เป็นองค์ประกอบลงในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 500 µl บัฟเฟอร์ RPE ซึ่งเป็นเป็นบัฟเฟอร์สำหรับล้างคอลัมน์ (wash buffer) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จำนวนสองครั้ง ทำการชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 µl หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที หาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร รวมถึงตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมจากค่า OD_{260}/OD_{280} และทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เก็บอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ไว้ที่ -80 °C

2.3.16.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวม

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ไปทำการเจือจาง 30 เท่าและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยคำนวณจากอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 40 ng/µl ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 (OD_{260}=1) จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอได้ดังสมการ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = (ค่า OD 260 nm)(dilution factor)(40 ng/µl)

2.3.16.2.4 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

ก. การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสง

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ มาตรวจสอบคุณภาพจากค่า OD_{260}/OD_{280} อาร์เอ็นเอรวมที่คุณภาพดีซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 หากมีดีเอ็นเอ โปรตีนหรือสารละลายฟีนอลปะปน ค่าOD_{260}/OD_{280}จะได้ค่าน้อยกว่า 1.8

ข. การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำอาร์เอ็นเอรวมมาตรวจสอบคุณภาพ โดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม เติม 100 ml ของ 1×TAE บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย Tris-base 1 M, glacial acetic acid 0.57 ml และ 0.5 M EDTA 1 ml อุ่นให้ร้อนเขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรส ละลายจนหมด ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50-55 °C แล้วจึงเทอะกาโรสลงในถาดเสียบหวีลงไปเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องดึงหวีออกและนำเจลที่เตรียมไว้ใส่ในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยให้ 1×TAE บัฟเฟอร์สูงท่วมผิวเจล นำสารละลายอาร์เอ็นเอหรือสารละลายที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ผสมกับ

loading buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.25% bromphenol blue และ 4% sucrose ใส่ในช่องของเจลที่เตรียมไว้ ผ่านกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร ปล่อยให้ตัวอย่างเคลื่อนที่ไปจนถึงปลายเจลโดยสังเกตจากสีน้ำเงินของ bromphenol blue ที่ผสมใน loading buffer นำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 mg/ml เป็นเวลา 1-2 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบอาร์เอ็นเอหรือ PCR product โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต

2.3.16.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว (One step RT-PCR) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ (OneStep RT-PCR Kit) ดังวิธีการจากบริษัท QIAGEN โดยมีส่วนผสมในการทำ RT-PCR ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

สารเคมี	ปริมาตร
5x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer	10 µl
10 mM dNTPs	2 µl
Forward primers (µmole)	5 µl
Reverse primers (µmole)	5 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme	2 µl
อาร์เอ็นเอแม่แบบ (Template RNA) 1 pg-2 µg	1 µl
น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ RNase	25 µl
ปริมาตรรวม	50 µl

ผสมสารดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm นาน 2 นาที เพื่อให้ส่วนผสมรวมกันที่ก้นหลอด จากนั้นจึงใช้สภาวะในการทำ RT-PCR ด้วยเครื่อง PCR ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สภาวะการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Reverse transcription	50°C	30 นาที	1
2. Initial PCR activation step	95°C	15 นาที	1
3. Denaturation	94°C	1 นาที	1
		1 นาที	1
		1 นาที	1
4. Annealing	50°C	1 นาที	5
	52°C	1 นาที	10
	55°C	1 นาที	20
5. Extension	72°C	1 นาที	1
	72°C	1 นาที	1
	72°C	1 นาที	1
6. Final Extension	72°C	10 นาที	1

แบ่ง PCR product ที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เพื่อตรวจสอบขนาดของแถบ PCR product หากมี PCR product ขนาดที่ต้องการแต่มี PCR product ขนาดอื่นๆปนอยู่ด้วย ให้นำ PCR product ส่วนที่เหลือมาทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนอะกาโรส 1.0 % อีกครั้ง เพื่อตัดเจลที่มี PCR product ขนาดของแถบที่ต้องการออกมา โดยใช้ชุดอุปกรณ์สกัดแยกของบริษัท QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit)

2.3.16.4 การสกัด PCR product ออกจากเจลโดยวิธีใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

นำชิ้นเจลที่มี PCR product ขนาดที่ต้องการไปชั่งน้ำหนัก แล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 mlเติมบัฟเฟอร์ QG ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นบัฟเฟอร์ TAE (Tris-acetate/EDTA) หรือบัฟเฟอร์ TBE (Tris-borate/EDTA)) ปริมาตร 500 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดดีเอ็นเอออกมา นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที เติมบัฟเฟอร์ QG อีกครั้งเพื่อกำจัดอะกาโรสที่เหลือในคอลัมน์

จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 750 µl ของบัฟเฟอร์ PE ซึ่งมี ethanol เป็นส่วนประกอบ วางคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำการชะ PCR product ที่ดูดซับกับ silica-gel membrane ของคอลัมน์ออกมาโดยใช้ 40 µl ของ 10 mM Tris buffer pH 8.5

2.3.16.5 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยวิธีใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

นำ PCR productใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 µl นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 µl และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 µl วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนสารละลายที่ได้ไว้เชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป

2.3.16.6 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

2.3.16.6.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน E. *coli* $DH_5\alpha$

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย E. *coli* $DH_5\alpha$ บนจานอาหารวุ้น Luria Bertaini (LB agar) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB 100 ml เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมงหรือจนมีความขุ่นเมื่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ค่า 0.5-0.6 ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml แช่ในน้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วย 0.1 M $CaCl_2$ ที่เย็นจัดปริมาตร 5 ml วางไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.1 M $CaCl_2$ ใน 15% glycerol ที่เย็นจัดปริมาตร 4 ml แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 200 µl เก็บไว้ที่ -80 °C

2.3.16.6.2 การเชื่อม PCR product กับดีเอ็นเอพาหะ

นำ PCR product ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะคือ pDrive Cloning Vector (QIAGEN) การเชื่อม PCR product ทำโดยใส่ PCR product 3.5 µl ในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วเติมดีเอ็นเอพาหะ 0.5 µl ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 2 นาที นำหลอดวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที เติม 10X ligation buffer 6 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C นำดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ที่ได้จากการเชื่อมดีเอ็นเอพาหะกับ PCR product เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* $DH_5\alpha$ เพื่อเพิ่มจำนวน

2.3.16.6.3 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน E. *coli* $DH_5\alpha$

ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) เมื่อต้องการนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* $DH_5\alpha$ ให้นำผลจากการเชื่อม PCR product กับดีเอ็นเอพาหะจากข้อ 2.4.16.6.2 มาเติมในหลอดขนาด 1.5 ml ที่มี *E. coli* $DH_5\alpha$ ปริมาตร 150 µl แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาที นำเซลล์มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลานำมาวางในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC ปริมาตร 100 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 45 นาที และเขย่าหลอดทุกๆ 15 นาที จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 µg/µl และเคลือบผิวอาหารด้วย 3 µl ของ 50 mg/ml X-Gal นำมาบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °C เลือกโคโลนีที่มีสีขาวและสีฟ้าซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 ml ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin 100 µg/µl โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม

2.3.16.7 การสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม

ดัดแปลงจาก Holmes and Quigley (1981) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง มาบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ปิเปตอาหารเหลวส่วนบนออกไป เติมสารละลาย STET buffer ซึ่งประกอบด้วย 8% Sucrose (w/v), 5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl และ50 mM EDTA (pH 8.0) 200 µl ผสมสารโดยใช้วอร์เทกซ์ เติมสารละลาย Lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 5 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30-45 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ซึ่งตะกอนดังกล่าวสามารถเขี่ยออกไปโดยใช้ไม้จิ้มฟัน เติม 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 1 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติม 5% CTAB ปริมาตร 20 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.2 M NaCl ปริมาตร 300 µl จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 300 µl ผสมสารโดยใช้วอร์เทกซ์ เป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 220 µl เก็บไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือเก็บในไนโตรเจนเหลว 15 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายออกไปโดยไม่ให้รบกวนตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 700 µl สองครั้ง เท 70% ethanol แล้วคว่ำหลอดบนกระดาษซับ ละลายพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

30-50 ไมโครลิตร แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% เพื่อเลือกโคลนที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวควบคุม

การตรวจสอบดีเอ็นอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I เริ่มต้นโดยนำดีเอ็นเอลูกผสมที่มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมมาตรวจสอบอีกครั้ง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I (Biolabs) ซึ่งขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น คาดว่าเป็นส่วนของยีนที่ต้องการศึกษาซึ่งเชื่อมอยู่กับดีเอ็นเอพาหะและสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoR I

สารเคมี	ปริมาตร
1X NE Buffer EcoR **I**	5 µl
ดีเอ็นเอลูกผสม (5 µg)	X µl
เอนไซม์ EcoR **I** (20,000 unit/ml)	0.05 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	Y µl
ปริมาตรรวม	50 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของดีเอ็นเอลูกผสมเป็น 1 µg

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 50 µl

ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด นำสารผสมที่ได้มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง สำหรับดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนที่ต้องการศึกษาเชื่อมอยู่ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ EcoR I แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% จะพบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ที่เชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะในขั้นตอน 2.3.15.6.2 นำดีเอ็นเอลูกผสมดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3.16.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

นำดีเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 2.3.16.7 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยผสมสารดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาตร/ปฏิกิริยา
Big Dye Terminator ready reaction mix	2 µl
Big Dye sequencing buffer	1 µl
ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant plasmid) 150-300 ng	X µl
ไพรเมอร์ (T7 หรือ SP6) 1.6 pmole	1 µl
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	Y µl
ปริมาตรรวม	10 µl

X คือ ปริมาตรที่มีปริมาณรวมของดีเอ็นเอลูกผสมเป็น 150-300 ng

Y คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ทำให้ปริมาตรรวมเป็น 10 µl

ผสมสารเคมีข้างต้นให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้สารผสมตกลงก้นหลอด จากนั้นนำมาทำ PCR โดยสภาวะดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	96 °C	1 นาที	1
2.Denaturation	96 °C	10 นาที	25
3.Annealing	50 °C	5 นาที	
4.Extension	60 °C	4 นาที	
5.Final Extension	60 °C	7 นาที	1

นำ PCR product ที่ได้ 10 µl มาเติมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 ml ที่มี 125 mM EDTA 2.5 µl และabsolute ethanol 30 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C ดูดสารละลายส่วนใสส่วนบนออกให้หมดและทำให้แห้งโดยการใช้ Digital dry bath ที่ 90 °C เป็นเวลา 1 นาที

เก็บหลอดตัวอย่างในที่ทึบแสงที่ -20 °C นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Automated DNA Sequencer ณ ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3.16.9 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำลำดับดีเอ็นเอและกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. มาเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในธนาคารยีน (GenBank) (http://www .ncbi.nlm.nih.gov) โดย ใช้ Clustal X program