# 2.วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**วัสดุ**

สาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ในการศึกษา คือ สาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อนใน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง ซึ่งนำมาแยกให้เป็นชนิดเดี่ยวๆได้ 3 ชนิด และชนิดที่นำมาศึกษาเป็นหลัก คือ *Phormidium tenue* (Menegh) Gomont

สำลี

ผ้าก็อซ

กระดาษฟอยล์ (aluminium foil)

กระติกไนโตรเจนเหลว

กระดาษกรอง ขนาด 125 มิลลิเมตร

**สารเคมี**

สารเคมีชนิดวิเคราะห์ ที่ใช้ในการทดลองซื้อจากบริษัท ดังนี้

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Acetic acid | Lab-scan |
| Acrylamide | Sigma |
| Ammonium dihydrogen orthophosphate | BDH |
| Ammonium persulphate | Merck |
| Ammonium sulphate | Merck |
| Anti-rabbit igG (whole molecule) peroxidase conjugate | Sigma |
| BCIP/NBT solution (5-bromo-4-chloro-3-indoly phosphate/nitro blue tetrazolium) | Sigma |
| Bisacrylamide (N, N'-methylene diacrylamide) | Fluka |
| Boric acid | Hopkins&Williams |
| Bovin serum albumin | Sigma |
| Bromophenol blue | Merck |
| Calcium chloride | Merck |

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| 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 | Sigma |
| Ethylenediaminetetraacetic acid | Fluka |
| Folin-Ciocalteu's-phenol reagent | Merck |
| Glycerol | Sigma |
| Glycine | Fluka |
| Hydrochroric acid | Merck |
| Iron (II) sulphate | Merck |
| Magnesium chloride | Ajax Chemicals |
| Magnesium sulphate | Fluka |
| Manganese (II) chloride | Ajax Chemicals |
| $\beta$-Mercaptoethanol | Merck |
| Methanol | Lab-scan |
| N-(1-naphyl) ethylenediamine dihydrochloride | Sigma |
| Nicotinamide adenine dinucleotide | Sigma |
| Nitrate reductase from corn seeding | Sigma |
| Octyl $\beta$ -D-glucopyranoside | Sigma |
| ([Octyl phenoxy] polyethoxyethanol) | USB |
| Phenylmethylsulfonylfluride | BDH |
| Potassium cyanide | Riedel-de Haen |
| Potassium nitrate | Carlo Erba |
| Potassium sodium tartrate | Fluka |

| สารเคมีที่ใช้ | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|
| Salicylic acid | BDH |
| Sodium azide | Sigma |
| Sodium chloride | Lab-scan |
| Sodium dodecyl sulphate | 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 |
| Tris-(hydroxmethyl)-aminomethane | Sigma |
| Triton X-100 | Merck |
| Tween-20 | APS |
| Zinc acetate | BDH |
| Zinc sulphate | Hopkins&Williams |

**อุปกรณ์**

| 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 |

| อุปกรณ์ที่ใช้ | รุ่น | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| Power Supply | AE-8130 | ATTO |
| Slab gel electrophoresis apparatus | AE-6400 | ATTO |
| Spectrophotometer | 8453 | Hewlet Packard |
| Vortex | K-550-GE | Scientific Industries |

## วิธีการ

### 2.1. การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

#### 2.1.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง

บริเวณในบ่อน้ำร้อนและธารน้ำจากบ่อน้ำร้อนใน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง

#### 2.1.2 การตรวจสภาพของน้ำในบ่อน้ำร้อนและธารน้ำจากบ่อน้ำร้อน

2.1.2.1 ลักษณะของสี และกลิ่นของน้ำ

โดยใช้สายตาและการดมกลิ่น

2.1.2.2 อุณหภูมิและสภาพความเป็นกรด-ด่าง ของแหล่งน้ำ

โดยใช้เทอโมมิเตอร์และใช้ pH meter จุ่มลงในน้ำให้ห่างจากขอบบ่อประมาณ 1 เมตร เพื่อวัดอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ตามลำดับ

2.1.2.3 ปริมาณไนเตรตในแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ salicylic acid method ประยุกต์จากวิธีของ Cataldo และคณะ (1975) โดยนำน้ำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน conc. $H_2SO_4$ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นปรับ pH ให้เป็นด่าง (pH>12) ด้วย NaOH ความเข้มข้น 4 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็น ถ้ามีไนเตรตสารละลายจะเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 410 นาโนเมตร และใช้ $KNO_3$ ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.1.2.4 ปริมาณไนไตรต์ในแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ในห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างน้ำ 500 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 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 ถ้ามีไนไตรต์สารละลายจะมีสีชมพูอมม่วงซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร และใช้ $NaNO_2$ ในการทำกราฟมาตรฐาน

**2.1.3 วิธีการเก็บตัวอย่างสาหร่าย**

เก็บสาหร่ายชนิดสีเขียว (green algae) และสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae / cyanobacteria) ทั้งสาหร่ายที่ลอยในน้ำ (phytoplankton) โดยใช้ตาข่ายละเอียด (plankton net) ช้อนตักสาหร่ายขึ้นจากแหล่งน้ำ และเก็บกลุ่มสาหร่ายที่อยู่ที่ผิวดินใต้ท้องน้ำ (benthic algae) โดยใช้ปากคีบ (forceps) คีบสาหร่าย (Stevenson, 1996) และเก็บน้ำในบ่อหรือน้ำในลำธารบรรจุในขวดพลาสติก ก่อนจะนำสาหร่ายไปเพาะเลี้ยง โดยล้างสาหร่ายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้สะอาดก่อนนำไปใส่ในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ อาหารสูตร BG-11 เพื่อใช้สาหร่ายในการศึกษาต่อไป

**2.2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายและปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ในเซลล์สาหร่าย**

เลี้ยงสาหร่ายในอาหารเหลวสูตร BG-11 และเพาะเลี้ยงใน Illumination shaker ซึ่งสามารถตั้งอุณหภูมิได้ โดยตั้งที่ 45 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 175 $\mu$mole $m^{-2}$ $s^{-1}$ ตลอดเวลา และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง ที่เป็นเซลล์สาหร่าย และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย ทุกวันเพื่อนำไปวิเคราะห์

ก. ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายตามวิธีการหาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในแหล่งน้ำ (ข้อ 1.2.3 และ 1.2.4 ตามลำดับ)

ข. ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในเซลล์สาหร่าย ซึ่งมีวิธีการคือ

นำเซลล์สาหร่ายพร้อมอาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 40 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรอง No. 4 จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยการบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วบดต่อในบัฟเฟอร์ 50 mM MOPS pH 7.5 ที่มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ และ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์มาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรต และไนไตรต์ (ตามวิธีข้อ 1.2.3 และ 1.2.4 ตามลำดับ) โดยเทียบกับปริมาณ โปรตีน มีหน่วยเป็น $\mu$mole/mg.protein

**2.3. แยกตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บมาให้เป็นสาหร่ายชนิดเดี่ยว ๆ และวิเคราะห์การทำงาน (activity) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบบ *in vivo***

**2.3.1 การแยกสาหร่ายให้เป็นชนิดเดี่ยว ๆ**

นำสาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อนมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ในเครื่อง Illuminated shaker ที่ให้แสง 175 $\mu$mole $m^{-2}$ $s^{-1}$ ตลอดเวลาจนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารนั้นมาแยกให้เป็นชนิดเดี่ยวๆ โดยมีวิธีการแยกสาหร่าย 2 วิธี คือ

2.3.1.1 วิธี streak plate โดย นำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาขีดลาก (streak) ด้วย loop บนอาหารแข็ง BG-11 เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยวางจานเพาะเชื้อ ในที่มีแสง เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ สังเกตดูโคโลนี (colony) ของสาหร่ายที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ถ้าพบโคโลนีที่เป็นเซลล์เดี่ยว ถ่ายลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11พร้อมทั้งตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยว ๆ หรือไม่ ถ้าเป็นสาหร่ายชนิดที่เป็นเส้นสาย ให้ตัดวุ้นส่วนที่มีปลายสายสาหร่ายเจริญเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำมาวางบนอาหารแข็งใหม่ เพาะเลี้ยงต่อไปจนสาหร่ายเจริญแผ่ขยายออกไป ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยว ๆ หรือไม่ ถ้าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ แล้วจึงตัดวุ้นส่วนที่มีปลายสายสาหร่ายเจริญ เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆใส่ลงในอาหารเหลว BG-11 เพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป

2.3.1.2 วิธีทำเจือจางเซลล์สาหร่าย โดย นำเซลล์แขวนลอยสาหร่าย (suspension) มาเจือจางด้วยอาหารเหลว BG-11 ให้ได้ความเข้มข้น $10^{-1}$ , $10^{-2}$, $10^{-3}$ และ $10^{-4}$ เท่า ซึ่งในความเข้มข้นที่มีความเจือจางมาก จะเหลือสาหร่ายที่มีปริมาณมากเพียงชนิดเดียว จึงสามารถแยกสาหร่ายที่มีปริมาณน้อยกว่าออกไปได้ หลังจากนั้นตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าได้สาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ หรือไม่ แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป

**2.3.2 หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบบ *in vivo***

ดัดแปลงจากวิธีของ Harley (1993) โดยนำเซลล์สาหร่ายประมาณ 0.5 กรัม (น้ำหนักสด) มาผสมกับบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่มี $KNO_3$ 30 มิลลิโมลาร์ และ propanol 5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลาต่างๆ กัน คือ 10, 20 และ 30 นาทีโดยให้มีการเขย่าตลอดเวลาในที่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.1 M zinc acetate และต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 1%(w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.02%(w/v) N-(1-napthyl) ethylenediamine dihydrochloride เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 20 นาที แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นอัตราการเพิ่มของไนไตรต์ต่อเวลา มีหน่วยเป็น μmole/min โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ $KNO_2$

**2.4. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของสาหร่าย *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont**

เพาะเลี้ยงสาหร่ายชนิดสายขนาดเล็กซึ่งระบุชนิดได้ คือ *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont โดยใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่างกัน คือ

2.4.1 อาหารสูตร BG-11 ซึ่งมีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 1.1, 8.82, 17.6 และ 35.3 mM และเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 4 g/l ให้แสง 175 μmole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลา

2.4.2 อาหารสูตร BG-11 ซึ่งมีโซเดียมไนเตรต 17.6 mM ที่มีการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ คือ 2 g/l, 4 g/l และ 6 g/l

สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรต่างๆ คือ ให้แสงตลอดเวลา โดยใช้ความเข้ม 2 ระดับ คือ 175 และ 622 μmole $m^{-2}s^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที และให้เซลล์สาหร่ายเริ่มต้นในอาหารมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ประมาณ 0.1

หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายเพื่อวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยใช้ 2 วิธี คือ

ก. การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

เขย่าขวดสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแล้วดูดอาหารเพาะเลี้ยงพร้อมสาหร่ายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสาหร่ายทุกวัน

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

เขย่าขวดสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแล้วดูดอาหารเพาะเลี้ยงพร้อมสาหร่ายปริมาตร 2 มิลลิลิตรมาหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์สาหร่ายด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำกลั่นแล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง นำเซลล์สาหร่ายมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยประยุกต์วิธีของ Lowry *et al.* (1995) เริ่มต้นด้วยการเติม 5% deoxycholate 0.4 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นผสมสารละลายของสาหร่ายกับ 2% $Na_2CO_3$ ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและสารละลายคอปเปอร์ทาร์เทรต (1% $CuSO_4$ + 2% Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ bovin serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

### 2.5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ใช้สาหร่าย *Phormidium tenue* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้แสง 620 μmole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลา และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

**2.5.1 การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์**

เก็บตัวอย่างสาหร่ายโดยการนำสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.4-0.6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรอง No.4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ทำให้เซลล์แตกโดยการบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงบดกับบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ที่มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไซโตพลาสซึม และนำส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรน ไปละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วน ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) เริ่มจากผสมบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร $KNO_3$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร NADH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารสกัดเอนไซม์ที่ได้มา 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และหยุดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆกันโดยการเติม 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 หลอดที่มีตะกอนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นอัตราการเพิ่มของไนไตรต์ต่อเวลา มีหน่วยเป็น μmole/min โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ $KNO_2$

**2.5.2 ศึกษาผลของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตี**

2.5.2.1 บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด

ใช้บัฟเฟอร์ ต่างๆ กัน 4 ชุด คือ

ก. MOPS pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ DTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ Chymostatin ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ข. MOPS pH 7.5 ความเข้มข้น50 มิลลิโมลาร์ ที่มี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

ค. Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ DTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ Chymostatin ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ง. Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ DTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

2.5.2.2 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ แอคติวิตี

ใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ กัน 2 ชนิด คือ

ก.Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ข. MOPS pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

2.5.2.3 วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

โดยการแยกเซลล์สาหร่ายออกเป็น 4 ชุดแล้วนำเซลล์สาหร่ายมาทำให้แตกโดยการบดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นจึงบดกับบัฟเฟอร์ต่างๆ ทั้ง 4 ชนิด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที แยกเอาส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรนไปละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (สารสกัดหยาบเอนไซม์) จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยใช้บัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.5.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์**

2.5.3.1 pH ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ใช้ pHช่วง 2-11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่างๆ กันดังนี้

ก. pH ช่วง 2-6 ใช้บัฟเฟอร์ Acetate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ข. pH ช่วง 6.5-9 ใช้บัฟเฟอร์ Tris- HCl ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ค. pH ช่วง 9.5-11 ใช้บัฟเฟอร์ carbonate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

2.5.3.2 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่ใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดคือ 50 มิลลิโมลาร์ MOPS pH 7.5 ที่มี EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิดดังกล่าว ที่มี pH ต่างๆ กันที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.5.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์**

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 35-70 องศาเซลเซียส โดยใช้ Digital Dry Bath ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิได้ ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.5.5 ศึกษาผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์**

2.5.5.1 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ใช้บัฟเฟอร์ที่มีสารดีเทอร์เจนต์ต่างๆ กัน ดังนี้

ก. มี SDS ความเข้มข้น 5%

ข. มี deoxycholate ความเข้มข้น 5%

ค. มี octyl phenoxy polyethoxy ethanol ความเข้มข้น 5%

ง. มี Triton X-100 ความเข้มข้น 5%

จ. มี octyl D-glucopyranoside ความเข้มข้น 5%

ฉ. มี Tween-20 ความเข้มข้น 5%

ช. CHAPS ความเข้มข้น 5%

2.5.5.2 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์และเติมสารละลายดีเทอร์เจนต์ต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4% ในสารผสมที่ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

## 2.6. ศึกษาสภาวะในการเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงที่สุด

### 2.6.1 ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่มีอายุต่าง ๆ กัน

เก็บตัวอย่างสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ให้แสง ความเข้ม 175 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทุกวันเพื่อนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโต และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

### 2.6.2 ศึกษาผลของไนเตรตที่มีในอาหารต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้อาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยให้มีโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรและมีโซเดียมไนเตรตในอาหารความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ ให้แสง ความเข้ม 175 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ 2 วันซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 จะให้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด ในการเก็บตัวอย่างจึงเก็บสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 ทุกชุดการทดลอง

มาสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แล้วนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.6.3 ศึกษาผลของโซเดียมไบคาร์บอเนตที่มีในอาหารเลี้ยงสาหร่ายต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้อาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยให้มีโซเดียมไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์และมีโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 5, 10, 20, 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ ให้แสง ความเข้ม 175 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 ทุกชุดการทดลองมาสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แล้วนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.6.4 ศึกษาผลของแสงต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์**

เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้อาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยให้มีโซเดียมไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์และมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์ ให้แสงความเข้ม 175-732 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 ทุกชุดการทดลอง มาสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แล้วนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

**2.7. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

ใช้สาหร่าย *P. tenue* ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงโดยให้มีโซเดียมไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์และมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์ ให้แสงที่ความเข้ม 620 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

**2.7.1 ศึกษาความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

2.7.1.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมสารสกัดเอนไซม์จากสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ประมาณ 0.3 มาสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แยกเอาส่วนตะกอนมาละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดและบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดที่มี glycerol 40% จะได้สารสกัดหยาบเอนไซม์ 2 แบบ คือเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดและเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดซึ่งมี glycerol 40%

2.7.1.2 การเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

แบ่งสารสกัดเอนไซม์ทั้ง 2 แบบไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส), 4, -20 และ - 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์ทั้ง 2 แบบที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 7 วันมาวิเคราะห์แอคติวิตีโดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1 นำค่าแอคติวิตีที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์คงเหลือของเอนไซม์

**2.7.2 ศึกษาผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (เช่นเดียวกับในข้อ 2.2.7.3.ก) มาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม 10 ไมโครโมลาร์ FAD ร่วมกับ 10 ไมโครโมลาร์ โมลิบดินัม, 10 ไมโครโมลาร์ FAD เพียงอย่างเดียวและ 10 ไมโครโมลาร์ โมลิบดินัม เพียงอย่างเดียวลงในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตี

**2.7.3 ศึกษาผลของ แอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (เช่นเดียวกับในข้อ 2.2.7.1.ก) มาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยเติม 0.1 โมลาร์แอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตี

**2.7.4 ศึกษาผลของ $Mg^{2+}$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (เช่นเดียวกับในข้อ 2.2.7.1.ก) มาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตี

**2.7.5 ศึกษาผลของ sodium azide ($NaN_3$) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (เช่นเดียวกับในข้อ 2.2.7.1.ก) มาวิเคราะห์หา แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยเติมโซเดียมเอไซด์ (sodium azide , $NaN_3$) ให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตี

**2.7.6 ศึกษาความจำเพาะต่อ NADH และ NADPH ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส**

ใช้สารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด มาศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งสับสเตรตที่ใช้ได้แก่ $KNO_3$, NADH และ NADPH แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ

ชุดที่ 1 ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยศึกษาแอคติวิตีเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 ใช้ความเข้มข้นของ $KNO_3$ ในช่วง 0-30 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ NADH ในช่วง 0-0.2 มิลลิโมลาร์

ชุดที่ 2 ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยศึกษาแอคติวิตีเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 ใช้ความเข้มข้นของ $KNO_3$ ในช่วง 0-30 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ NADPH ในช่วง 0-0.2 มิลลิโมลาร์

ค่า $K_m$ ของสับสเตรต หาได้จาก Lineweaver-Burk double reciprocal plot

## 2.8 ศึกษาผลของไนโตรเจน ในรูปของไนเตรต แอมโมเนียม และไนเตรตร่วมกับแอมโมเนียม

### 2.8.1. อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย

ใช้อาหารสูตร BG-11 โดยดัดแปลงเป็น

2.8.1.1 สูตรไม่มีไนโตรเจน

2.8.1.2 สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเตรต ความเข้มข้น 0.05, 1.0 และ 17.6 มิลลิโมลาร์

2.8.1.3 สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม ความเข้มข้น 0.1,1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์

2.8.1.4 สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต ความเข้มข้น 0.1,1.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์

### 2.8.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ให้แสงที่ความเข้ม 622 $\mu$mole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลาและเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

### 2.8.3 การเก็บตัวอย่าง การเตรียมสารสกัดเอนไซม์จากสาหร่ายและการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกวัน มาสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แล้วนำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาวิเคราะห์แอคติวิตีโดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังข้อ 2.5.1

## 2.9. ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในสารสกัดหยาบด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976)

โดยนำสารสกัดหยาบสาหร่าย *P. tenue* 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นละลายตะกอน

และบ่มเซลล์ สาหร่ายด้วย TBS (25 mM Tris –HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ที่มี 2.5% non-fat milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย TBS ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิม นาน 2 นาที จากนั้นนำหลอดที่ 2 และ 4 มาบ่มด้วย antibody ต่อ ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพด (Primary antibody) จำนวน 300ไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนแอนติบอดีต่อ TTBS ที่มี 1% non-fat milk ( 25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) เท่ากับ 1: 500 ส่วนหลอดที่ 1 และ 3 บ่มด้วย TTBS ที่มี 1% non-fat milk จำนวน 300 ไมโครลิตร บ่มทั้ง 4 หลอดนาน 2 ชั่วโมงและนำมาล้างด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นนำหลอดที่ 3 และ 4 มาบ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (secondary antibody) ในอัตราส่วนแอนติบอดีต่อ TTBS ที่มี 1% non-fat milk เท่ากับ 1: 1000 ส่วนหลอดที่ 1 และ 2 บ่มด้วย TTBS ที่มี 1% non-fat milk จำนวน 300 ไมโครลิตร บ่มทั้ง 4 หลอดนาน 2 ชั่วโมงและนำมาล้างด้วย TTBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ล้างต่อด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ย้อมด้วยสับสเตรตของ alkaline phosphatase