ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hupL* เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม *A. halophytica* โดยวิธี Southern Blot Hybridization และเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เริ่มจากทำการเพาะเลี้ยง *A. halophytica* ในอาหารเหลว BG11 ที่มี Turk Island Salt Solution และสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส นำแผ่นเจลไปทำการบลอตกับเมมเบรนเพื่อให้ดีเอ็นเอย้ายไปอยู่บนแผ่นเมมเบรน และนำเมมเบรนไปบ่มกับตัวติดตามที่ได้จากชิ้นส่วนของยีน *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena siamensis* ที่ติดฉลากด้วย DIG-High Prime จากการทดลองพบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอเมื่อใช้ชิ้นส่วนของยีน *hoxH* เป็นตัวติดตามในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *A. halophytica* มาเพิ่มปริมาณยีน *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์อนุรักษ์นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy แล้วทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาวและตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าพลาสมิด pRhyd1.2 เป็นพลาสมิดลูกผสมระหว่างเวคเตอร์ pGEM-T Easy และผลิตภัณฑ์ PCR ของไพรเมอร์คู่ Rhyd1-Rhyd3 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของ *Arthrospira platensis* และ *Spirulina subsulsa* ถึง 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* ของ *A. halophytica* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ไซยาโนแบคทีเรียมีระดับการถอดรหัสของยีน *hoxH* สูงสุด คือ การชักนำด้วยก๊าซไนโตรเจน การเติมเหล็กและนิกเกิลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนโมลาร์และ 1 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย *A. halophytica* ภายใต้สภาวะที่มีการชักนำและสภาวะปกติ พบว่าเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีการชักนำเท่านั้นที่พบผลิตภัณฑ์ PCR ของ RT-PCR ของยีน *hoxH*

In cyanobacteria, hydrogenase enzymes can be divided into 2 classes. Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of this enzyme is encoded by *hupL*. Another enzyme, reversible hydrogenase catalyzes the reversible oxidation of molecular hydrogen to protons. The large subunit of latter enzyme is encoded by *hoxH*. This work aims to search and study nucleotide sequence of reversible hydrogenase in the halophilic cyanobacterium *A. halophytica* by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction (PCR) technique. *A. halophytica* was cultivated in BG11 containing Turk Island Salt solution medium. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform extraction method, digested with restriction enzyme *Hin*dIII and analyzed by agarose gel electrophoresis. Agarose gel was blotted on the nylon membrane in order that DNA was transferred to the membrane. Membrane was incubated with DIG-labeled *hoxH* probes of *Anabaena siamensis*. It was found that signal DNA of *A. halophytica* was found with *hoxH* probe. The *hoxH* gene was amplified by polymerase chain reaction with the conserved primers. Then the PCR product of *hoxH A. halophytica* was ligated to plasmid pGEM-T Easy and the recombinant plasmid was transformed to the competent cell *E coli* DH5α. Transformants were selected on ampicilin containing LB agar and based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNA was isolated from a white colony and digested by restriction enzyme *Eco*RI. The result showed that pRhyd1.2 is a recombinant plasmid of pGEM-T Easy vector and *hoxH* PCR product of *A. halophytica*. The Nucleotide sequence was analyzed and its amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by blast server. It was shown that HoxH of *A. halophytica* had the similarity to the reversible hydrogenase of *Arthrospira platensis* (89%) and *Spirulina subsulsa* (88%). In addition, transcriptional analysis of *A. halophytica hoxH* was studied by RT-PCR. It was found that optimal induction condition of *hoxH* transcription level were purging with nitrogen gas, adding iron and niekel to the final concentration of 50 nM and 1 μM, respectively. The PCR product of RT-PCR reaction of *hoxH* was found in cells grown under the induction condition but not under normal growth condition.