บทคัดย่อ

T150977

ในไซยาโนแบคทีเรีย เอนไซม์ไฮโดรจีเนสสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด เอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hupL* เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอนและปฏิกิริยาผันกลับ โดยหน่วยย่อยใหญ่ของเอนไซม์นี้ถูกถอดและแปลรหัสโดยยีน *hoxH* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hupL* และ *hoxH* ของไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* เริ่มต้นโดยออกแบบไพรเมอร์ของยีน *hupL* และ *hoxH* เพาะเลี้ยง *A. siamensis* ในอาหารเหลว BG11 และแตกเซลล์ด้วยวิธีกล สกัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำจีโนมิคดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* และ *hoxH* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเชื่อมกับเวคเตอร์สำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (pGEM-T Easy หรือ pDrive) หลังจากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากปฏิกิริยาการเกิดสีกับ X-Gal และ IPTG สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีสีขาวและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดลองได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hupL* จำนวน 1,596 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์อัพเทคไฮโดรจีเนสของ *Nostoc punctiforme* (87%), *Anabaena variabilis* (86%) และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 (85%) สำหรับรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hoxH* จำนวน 1,461 คู่เบส เมื่อเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนและนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยโปรแกรม Blast server พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันสูงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์รีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสของ *A. variabilis* (85%), *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 (85%), *Spirulina platensis* (73%), *Synechocystis* สายพันธุ์ PCC 6803 (73%) และ *Spirulina subsulsa* (70%) หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนของยีน *hupL* และ *hoxH* มาติดฉลากด้วย DIG-High Prime และใช้เป็นตัวติดตามสำหรับตรวจสอบยีนไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยเทคนิค Southern blot hybridization โดยพบสัญญาณแถบของยีนอัพเทคไฮโดรจีเนสใน *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* และ *Nostoc carneum* ในขณะที่พบสัญญาณแถบของยีนรีเวอร์สซิเบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ศึกษา รวมถึงไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดียว *Gloeocapsa* sp. Kuetzig

ABSTRACT

TE150977

In cyanobacteria, hydrogenase enzymes can be classified 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 this enzyme is encoded by *hoxH*. This study aims to sequence *hupL* and *hoxH* genes of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Degenerated primers of *hupL* and *hoxH* genes were designed. *A. siamensis* was cultivated in BG11 medium and cells were broken by mechanical method. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform method. The PCR products of *hupL* and *hoxH* genes were amplified by polymerase chain reaction method. They were ligated into plasmid PCR cloning vector (pGEM-T Easy or pDrive) and transformed to competent *E. coli* DH5α. Transformants were selected on ampicilin containing LB agar based on the color reaction with X-Gal and IPTG. Plasmid DNAs were extracted from white colonies and sequenced. A 1,596 bp of *hupL* PCR product was sequenced. The amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by Blast server and showed the high similarity to the uptake hydrogenase of *Nostoc punctiforme* (87%), *Anabaena variabilis* (86%) and *Nostoc* sp. PCC 7120 (85%). For reversible hydrogenase, a 1,461 bp of *hoxH* PCR product was sequenced. The amino acid sequence was compared to the other amino acid sequences reported in GenBank by Blast server and showed the high similarity to the reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* (85%), *Nostoc* sp. PCC 7120 (85%), *Spirulina platensis* (73%), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (73%) and *Spirulina subsulsa* (70%). The fragments of *hupL* and *hoxH* genes were labeled with the DIG-High Prime and used as probes for Southern blot hybridization to detect hydrogenase genes in other cyanobacteria. Uptake hydrogenase signal was found in *Calothrix* sp. Agardh, *Fischerella muscicola*, *Hapalosiphon delicatulus* and *Nostoc carneum* whereas reversible hydrogenase signal was found in all cyanobacteria investigated including the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. Kuetzig.