บทคัดย่อ

T144165

เอนไซม์ uptake hydrogenase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของโมเลกุลไฮโดรเจนไปเป็นโปรตอน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย โปรตีนหน่วยย่อยใหญ่ถูกถอดและแปลรหัสมาจากยีน *hup*L โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hup*L ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Anabaena siamensis* โดยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณอนุรักษ์ของยีน uptake hydrogenase (*hup*L) และทำการเพาะเลี้ยง *Anabaena siamensis* ในอาหารเหลว BG11 หลังจากนั้นแตกเซลล์ด้วยวิธีทางกล และสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอโดยใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hup*L ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 1,300 คู่เบสซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับที่คาดไว้ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาโคลนลงในพลาสมิด pGEM-T easy และทรานสฟอร์มเข้าไปยังแบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและจากการเกิดสีของปฏิกิริยากับสาร X-gal และ IPTG นำโคลนที่เจริญและเป็นสีขาวมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี dideoxy enzymatic chain termination พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,343 คู่เบส เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast server พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ uptake hydrogenase ของ *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis* และ *Nostoc* สายพันธุ์ PCC 7120 ถึงร้อยละ 84, 82 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Abstract

TE144165

Uptake hydrogenase catalyzes the oxidation of molecular hydrogen to protons. It is composed of 2 subunits. Large subunit is encoded by *hup*L. This study aims to sequence *hup*L gene of nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*. Degenerated primers of *hup*L gene were designed. *Anabaena siamensis* was cultivated in BG11 medium and cells were broken by mechanical method. Genomic DNA was isolated by phenol-chloroform method. PCR product of *hup*L gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method. It was found that PCR product with 1,300 bp that corresponds to expected size, was obtained. This PCR product was cloned into plasmid pGEM-T easy and transformed to *E. coli*. Transformants were selected on ampicilin containing LB agar and from color reaction with X-gal and IPTG. Plasmid DNA was extracted from white colonies and sequenced by dideoxy enzymatic chain termination method. A 1,343 bp of PCR product was sequenced. Their amino acid sequences were compared with other amino acid sequences reported in Genbank by Blast server and they showed high similarity to uptake hydrogenase of *Nostoc punctiforme* (84%), *Anabaena variabilis* (82%) and *Nostoc* sp. PCC 7120 (81%).