บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จนถึงปัจจุบันยังไม่พบรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนที่สมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ กล่าวคือพบสารมัธยันต์ตัวสุดท้ายเป็น กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก (Selifonov และคณะ, 1996) และยังไม่พบรายงานใดที่ศึกษาการย่อยสลายต่อจาก กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่ายังไม่มีคาร์บอนตัวใดที่ถูกสลายไปเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเลย รวมทั้งไม่มีรายงานถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ในการวิจัยครั้งนี้ได้คัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนซึ่งทำได้โดยการติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ที่แทรกสอดเข้าในจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 ซึ่งมาจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยเทคนิคไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* (Tn*5* probe) ในสภาวะความเข้มงวดสูง เมื่อทราบตำแหน่งของทรานสโปซอน Tn*5* ภายในจีโนมแล้วจึงทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Eco*RI ขนาดประมาณ 9.2 กิโลเบส จากสายพันธุ์ E11 ซึ่งเป็นบริเวณที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์เข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) และให้ชื่อพลาสมิดว่า pTEM ภายหลังการยืนยันโคลนด้วยเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ได้คำนวณขนาดของดีเอ็นเอข้างเคียงที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยการหักลบขนาดของชิ้นทรานสโปซอน Tn*5* (5.8 กิโลเบส) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดประมาณ 3.4 กิโลเบส

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนปลายของทรานสโปซอนคล้ายคลึงกัน (terminal inverted repeats) (Reznikoff, 1993) จึงยังไม่สามารถนำพลาสมิด pTEM ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ต้องทำการสับโคลน (subcloning) พลาสมิด pTEM โดยตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส สับโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ให้ชื่อพลาสมิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า pTEB

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pTEB ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn*5* (TN5-OE primer) โดยมีทิศทาง 5' → 3' ออกจากชิ้นทรานสโปซอน และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบดูความเหมือน (homology) ในระดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ไม่มีความ

เหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนใดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs จึงได้เทียบหาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 ซึ่งจะทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำเข้าไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนของไฮดราเทส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ถอดรหัสมาจากยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน ดังนั้นชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ E11 จึงน่าจะเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium*

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ดังกล่าว ได้สร้างดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์นี้โดยออกแบบ forward primer (PHNF) และ reverse primer (PHNR) และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pTEB ที่มีส่วนของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ดังกล่าวเป็นแม่แบบ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ซึ่งมีขนาด 430 bp มาทำการติดฉลากด้วย DIG เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน (ดีเอ็นเอติดตาม AE หรือ AE-probe) ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ทำการติดตามตำแหน่งของยีนดังกล่าวภายในจีโนมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยเทคนิคไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนที่คล้ายกับกรดอะมิโนของไฮดราเทส-อัลโดเลส จากนั้นทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Hin*dIII ขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส ซึ่งให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม AE เข้าในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pWT

ในขั้นต้นได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในพลาสมิด pWT โดยเริ่มจากบริเวณดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว (เป็นรหัสของลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกับไฮดราเทส-อัลโดเลส) เมื่อนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบหาความเหมือนด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนของไฮดราเทส-อัลโดเลส ซึ่งถอดรหัสมาจากยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาต่อกันพบว่าสามารถจะถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนที่สมบูรณ์ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของไฮดราเทส-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ความเหมือนเท่ากับ 38%) ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนดังกล่าวมาข้างต้น ผลที่ได้จึง

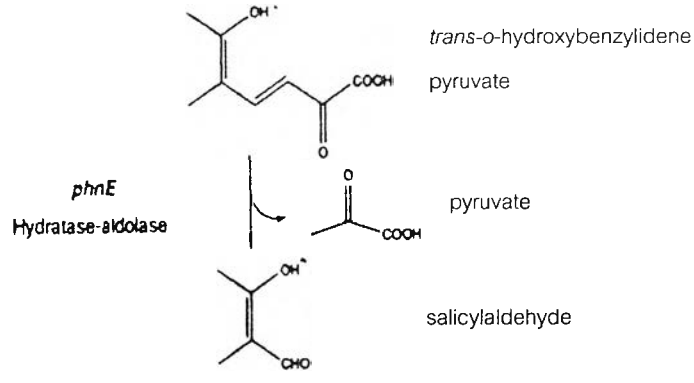
ยืนยันได้ชัดเจนว่าทรานสโปซอน Tn5 เข้าแทรกยังยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจริง และผลนี้มีความสอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ของสายพันธุ์กลาย E11 คือ สายพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถเจริญทั้งใน อะซีแนพธิลีน อะซีแนพโธควิโนน และ กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544)

จากนั้นได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นทั้งสองสายในพลาสมิด pWT โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของสับโคลน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีขนาด 4574 bp เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปเทียบความเหมือนในระดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนใดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs จึงได้เทียบหาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 จากข้อมูลความเหมือนในระดับกรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม BlastX และการหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 4.15 ประกอบ)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) เท่ากับ 33% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับฟลาวิน (flavin) ภายในโมเลกุลของ FAD ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33-43 ของ ORF1 โดยบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน TVAGANAAGGD คล้ายกับรายงานที่เสนอโดย Eggink และคณะ (1990) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนเป็น TX_6AXGD (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase system) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไรโซพีนเป็นสารประกอบประเภท inositol ที่สร้างโดย bacteroid ในรากพืช (Bahar และคณะ, 1998) โดยเอนไซม์ออกซิจีเนสนี้ใน *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs

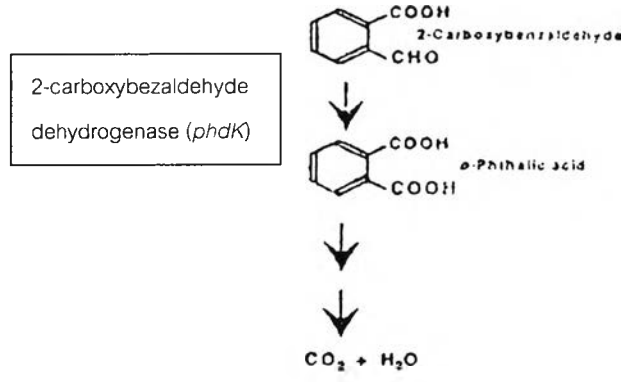
กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือยีน *acnE* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% เอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid

(tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน และทำงานในลักษณะเดียวกันในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 การเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือยีน *acnK* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของ aldehyde dehydrogenase superfamily (F/Y)(I/T)G(S/E)(T/P)XX (G/F) (Horn และคณะ, 1991) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 226-233 ของ ORF3 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ FIGSAATG และยังพบว่าตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์นี้มีความใกล้เคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 227-234 (FIGSTDTG) ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 250-257 ของ ORF3 โดยประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ LELGGKNP ซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่ง (active site) ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวเป็น LELGGKSP 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ให้เป็น กรด *o*-phthalic ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 การเร่งปฏิกิริยาของ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko และคณะ, 2000) เท่ากับ 38% ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่การทำงานของโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่แน่นอน

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) ที่ตำแหน่งสุดท้ายของ ORF ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 43% short-chain dehydrogenase ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ β-oxidation ในสายพันธุ์ PA01 ซึ่งกระบวนการ β-oxidation นี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs

เมื่อพิจารณาความเกี่ยวข้องของ ORF กับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนพบว่า ORF1 ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (putative ferredoxin reductase) เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับฟลาวินภายในโมเลกุลของ FAD ของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 มีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่ ORF1 นั้นเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์การเปรียบเทียบความเหมือนกับกรดอะมิโนของโปรตีนใน GenBank อาจเป็นการเปรียบเทียบเพียงบางส่วนกับฐานข้อมูล สำหรับการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปนั้นต้องการไดออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลาย ไดออกซิจีเนสประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส

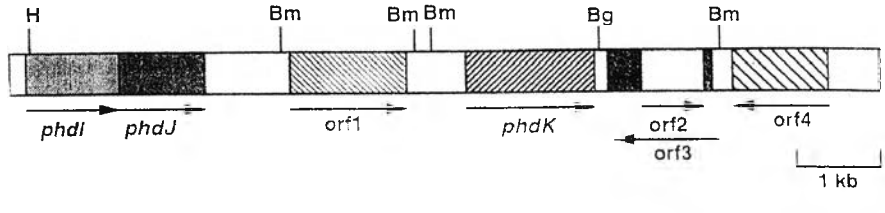
เฟอร์รีดอกซิน ISP large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) (Ensley และคณะ, 1982) ซึ่งเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำงานของไดออกซิจีเนส แต่พบรายงานได้กล่าวว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ขาดส่วนที่เป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสไปแต่การทำงานของไดออกซิจีเนสยังคงปกติเนื่องจากการทดแทนการทำงานของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสที่ไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยาในเซลล์เจ้าบ้าน (Simon และคณะ, 1993) ดังนั้นในกรณี ORF1 นี้ยังไม่สามารถที่จะสรุปได้แน่นอนว่ามีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนหรือไม่ การสรุปจะแน่ชัดขึ้นเมื่อมีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วน หรือศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญในอะซีแนพธิลีนและการแสดงออกของยีน

จากลักษณะของกรอบอ่านรหัสเปิดที่พบใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าส่วนที่น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนคือ ORF2 และ ORF3 หรือยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นไฮดราเทส-อัลโดเลส (putative hydratase-aldolase) และโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (putative aldehyde dehydrogenase) ตามลำดับ โดย ORF2 และ ORF3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวที่แตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*, *ndo*, *dox*, *pah*) (Simon และคณะ, 1993; Kurkela และคณะ, 1988; Denome และคณะ, 1993; Takizawa และคณะ, 1994) ซึ่งเป็นยีนกลุ่มที่ค่อนข้างมีการอนุรักษ์อย่างสูง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 4574 bp ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่โคลนอยู่ในพลาสมิด pWT ไปทำการเทียบความเหมือนใน GenBank แล้วไม่พบความเหมือนกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ใดแม้แต่กลุ่มคล้าย *nah* การจัดเรียงตัวของยีนที่ถอดรหัสเป็น putative hydratase-aldolase และ putative aldehyde dehydrogenase อยู่ติดกัน (*acnEK*) ซึ่งเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ที่ยีนจัดเรียงตัวเป็นโอเปอรอนดังนี้ *nahAaAbAcAdBFCQED* โดย *nahF* ถอดรหัสเป็นอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และ *nahE* ถอดรหัสเป็นไฮดราเทส-อัลโดเลส ซึ่งระหว่าง 2 ยีนดังกล่าวมียีนอื่นคั่นและลำดับของยีนสลับที่กัน เมื่อเทียบการจัดเรียงตัวของยีนดังกล่าวกับยีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ซึ่งมีความคล้ายกรดอะมิโนของ ORF2 หรือยีน *acnE* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ RP007 ซึ่งยีน *phnF* ที่ถอดรหัสเป็นอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของสายพันธุ์ RP007 อยู่ติดกับยีน *phnE* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลส (*phnFE*) ภายในโอเปอรอนเดียวกัน

เมื่อเทียบยีน *acnEK* กับยีนของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ซึ่งประมวลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่คล้ายกับกรดอะมิโนจาก ORF3 หรือยีน *acnK* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* ยังคงมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ KP7 โดย

ยีน *phdK* ที่ถอดรหัสเป็น 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส อยู่ใกล้ยีน *phdJ* ที่ถอดรหัสเป็น *ทรานส*-คาร์บอกซีเบนซอลไพรูเวตอัลโดเลส มากที่สุดแต่มี ORF อื่นคั่น (*phdJ*, ORF1, *phdK*)

นอกจากนี้ยังพบว่าการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* สายพันธุ์นี้อาจจะไม่อยู่รวมกันเป็น cluster เหมือนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่ (Simon และคณะ, 1993; Denome และคณะ, 1993; Takizawa และคณะ, 1994) โดยพบว่ามี ORF4 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ORF ที่คาดว่าน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน (ORF2 และ ORF3) หรืออาจจะคั่น ORF5 ที่ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ดังที่ได้เคยมีรายงานมาโดยรายงานไม่ได้กล่าวถึงหน้าที่การทำงานในปฏิกิริยาการย่อยสลาย PAHs ที่แน่ชัด (Denome และคณะ, 1993) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อาจไม่อยู่รวมเป็น cluster ได้ เช่น Iwabuchi และ Harayama (1997) ได้รายงานว่าโคลนที่มียีนประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน มีดีเอ็นเอแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาด 1,455 bp ประกอบด้วย 7 Open Reading Frames (ORFs) มีส่วนที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทาง *o*-phthalate ทั้งหมด 3 ยีน และ อีก 4 ORFs ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน การจัดเรียงตัวของ ORF ต่างๆเป็นดังนี้ คือ ยีน *phdI* ประมวลรหัส 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธเอตไดออกซิจีเนส, ยีน *phdJ* ประมวลรหัส *ทรานส*-คาร์บอกซีเบนซอลไพรูเวตอัลโดเลส, ORF1, ยีน *phdK* ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส, ORF2/ORF3 และ ORF4 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 5.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามี ORF1-ORF4 ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนแทรกอยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน



รูปที่ 5.3 การจัดเรียงตัวของ ORFs ภายในดีเอ็นเอสอดแทรกของโคลนที่มียีนเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทาง *o*-phthalate ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

นอกจากนี้ Romine และคณะ (1999) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิดจาก *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ได้แก่ ไบฟีนิล แนพธาลีน *เมตา*-ไซลีน *พารา*-ครีซอล และพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนที่พบในเชื้อสายพันธุ์นี้ ได้แก่ ยีน *nahE* *nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างๆกันและถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* โดยแสดงให้เห็นว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มียีนดังกล่าวแตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นตามที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงตัวของยีน โดยยีนอาจจะกระจัดกระจายไม่อยู่รวมกับเป็น cluster แต่การสรุปจะชัดเจนยิ่งขึ้นถ้าทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนต่อจากชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิด pWT ทั้งในส่วนต้นและปลายเพิ่มเติมเพื่อตรวจหายีนอื่นที่เหลือเพื่อการระบุตำแหน่ง การจัดเรียงตัวของยีนที่ชัดเจนขึ้น