

ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินใน

*Rhizobium* sp. CU-A1



นางสาวดวงกมล ฐปมงคล

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4906-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENES ENCODING DIOXYGENASE FOR ACENAPHTHYLENE  
DEGRADATION IN *Rhizobium* sp. CU-A1



Miss Duangkamon Thupmongkhon

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4906-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนใน <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1
โดย	นางสาวดวงกมล ฐปมงคล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจีน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนิยวัน)

ดวงกมล ฐปมงคล : ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (GENES ENCODING DIOXYGENASE FOR ACENAPHTHYLENE DEGRADATION IN *Rhizobium* sp. CU-A1). อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช; 112 หน้า. ISBN 974-17-4906-6.

ได้แยกยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลาย D2 ที่เกิดจากการสอดแทรกโดยทรานสโปซอน Tn5 และมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีน ด้วยเทคนิคซาท์เทอร์นไฮบริไดเซชันโดยใช้ชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5 เป็นดีเอ็นเอติดตาม คัดแยกและโคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์ หากำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียงทรานสโปซอน จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 523 bp ที่ได้กับข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกับ  $\alpha$  subunit ของไดออกซิจีเนสใน *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W เท่ากับ 69% สร้างดีเอ็นเอติดตามจากชิ้นดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอนดังกล่าวด้วยวิธี PCR สามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอ BamHI-EcoRI ขนาด 5.9 kb ที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามเข้ายังพลาสมิด pBluescript KS(+/-) และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pDE จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอนี้ พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORFs) ทั้งหมด 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันตามลำดับดังนี้ ORF1 (*acnAc*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 76% กับ  $\alpha$  subunit ของไดออกซิจีเนสใน *Xanthobacter* sp. สายพันธุ์ 127W ORF2 (*acnAd*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 60% กับ  $\beta$  subunit ของไดออกซิจีเนสใน *Xanthobacter* sp. สายพันธุ์ 127W ORF3 (*acnAb*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 71% กับเฟอรรีดอกซินของไดออกซิจีเนสใน *Xanthobacter* sp. สายพันธุ์ 127W ORF4 (*acnB*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 67% กับไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนสใน *Xanthobacter* sp. สายพันธุ์ 127W ORF5 (*acnF*) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 65% กับอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 คือ ยีน *acnAbAcAd*

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4472262423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ Transposon Tn5/ acenaphthylene/ dioxygenase

DUANGKAMON THUPMONGKHON : GENES ENCODING DIOXYGENASE FOR ACENAPHTHYLENE DEGRADATION IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISER : KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 112 pp. ISBN 974-17-4906-6.

Genes encoding dioxygenase for acenaphthylene degradation from a transposon Tn5-induced *Rhizobium* sp. mutant strain D2, which is incapable of acenaphthylene degradation, were identified by Southern hybridization technique using transposon Tn5 fragment as DNA probe. DNA fragment with positive signal was isolated and cloned. The nucleotide sequence adjacent to transposon was sequenced. Comparison of amino acid sequence deduced from 523 bp nucleotide sequence with those in GenBank revealed 69% amino acid sequence homology to  $\alpha$  subunit of dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans* strain 127W. DNA-probe was generated from the DNA fragment adjacent to transposon by PCR. The 5.9 kb *Bam*HI-*Eco*RI positive fragment was cloned into pBluescript KS(+/-) and designated as pDE. The 5.9 kb nucleotide sequence revealed 5 Open Reading Frames (ORFs) in the same transcriptional orientation as following; ORF1 (*acnAc*) showed 76% homology to  $\alpha$  subunit of dioxygenase from *Xanthobacter* sp. 127W; ORF2 (*acnAd*) showed 60% homology to  $\beta$  subunit of dioxygenase from *Xanthobacter* sp. 127W; ORF3 (*acnAb*) showed 71% homology to ferredoxin of dioxygenase from *Xanthobacter* sp. 127W; ORF4 (*acnB*) showed 67% homology to dihydrodiol dehydrogenase from *Xanthobacter* sp. 127W; ORF5 (*acnF*), an incomplete ORF, showed 65% homology to aldehyde dehydrogenase from *Burkholderia* sp. RP007. This study is the first report of genes, *acnAbAcAd*, encoding dioxygenase for acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....

Field of study.....Industrial Microbiology.....Advisor's signature.....

Academic year...2003.....Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรรถชัย ภิญาญาคง ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นแก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ คุณธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ ที่มีส่วนในงานวิจัยช่วงต้น ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ความช่วยเหลือและกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณลุง พี่สาว และครอบครัวเมืองอำพัน ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ณ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	4
2.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียและยีสที่เกี่ยวข้อ.....	4
2.1.1 วิธีการย่อยสลายแนพธาลีน.....	5
2.1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธาลีน.....	9
2.1.3 ยีสที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลาย PAH.....	12
2.1.3.1 ยีสในกลุ่มคล้าย <i>nah</i> ( <i>nah</i> -like).....	12
2.1.3.2 <i>nah</i> ของ <i>Comamonas testosteroni</i> สายพันธุ์ GZ42.....	14
2.1.3.3 <i>nag</i> ของ <i>Ralstonia</i> sp. สายพันธุ์ U2.....	15
2.1.3.4 <i>phn</i> ของ <i>Burkholderia</i> sp. สายพันธุ์ RP007.....	15
2.1.3.5 ยีสสำหรับการย่อยสลาย PAHs ใน <i>Sphingomonas</i> sp.....	16
2.2 ออกซิจีเนส.....	16
2.2.1 โครงสร้างของ Ring-Hydroxylating Dioxygenase.....	18
2.2.2 ระบบขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport system).....	22
2.2.3 แนพธาลีนไดออกซิจีเนส.....	23
2.2.3.1 หน้าที่ของ $\alpha$ และ $\beta$ subunit ในการเร่งปฏิกิริยา.....	24
2.2.4 การประยุกต์ใช้ไดออกซิจีเนส.....	28
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	30

## สารบัญ (ต่อ)

3.3	แบคทีเรีย.....	32
3.4	พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	33
3.5	การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	35
3.6	ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย D2 ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization).....	36
3.6.1	เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe).....	36
3.6.1.1	สกัดพลาสมิด pSUP2021.....	36
3.6.1.2	เตรียมชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5.....	37
3.6.1.3	ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling.....	38
3.6.2	เตรียมในลอนเมมเบรนที่มีจีโนมดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 สำหรับการไฮบริไดซ์.....	40
3.6.2.1	สกัดจีโนมดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ สายพันธุ์กลาย D2.....	40
3.6.2.2	วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	41
3.6.2.3	ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 และสายพันธุ์ดั้งเดิมของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิด ต่างๆ.....	41
3.6.2.4	ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังในลอนเมมเบรน (Southern blot).....	42
3.6.3	ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> ด้วยดีเอ็นเอติดตาม ทรานสโปซอน Tn5.....	44
3.7	โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่.....	46
3.7.1	สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5...46	
3.7.2	สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน.....	47
3.7.3	ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....	47



## สารบัญ (ต่อ)

3.7.4	ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.3 เข้าสู่ <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรก อยู่ภายในขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก.....	48
3.7.4.1	ทำคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell).....	48
3.7.4.2	ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....	49
3.7.4.3	คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ.....	49
3.8	หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน.....	51
3.8.1	หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนและเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank.....	51
3.9	ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์ดั้งเดิม <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนอยู่ด้วย เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization).....	52
3.9.1	ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอข้างเคียง ทรานสโปซอน Tn5.....	52
3.9.2	ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	52
3.9.3	เตรียมดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	53
3.9.4	เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์.....	53
3.9.5	ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	54
3.10	โคลนขึ้นดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับ การย่อยสลายอะซีแนพริลีน.....	54
3.10.1	ไลเกตขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์ม รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	54
3.10.1.1	สกัดขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	54
3.10.1.2	สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน.....	54

## สารบัญ (ต่อ)

3.10.1.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์.....	55
3.10.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย อะซีแนพริลีน.....	56
4 ผลการทดลอง.....	57
4.1 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย D2 ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization).....	58
4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่.....	59
4.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอน.....	63
4.4 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายอะซีแนพริลีนด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน.....	65
4.4.1 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายอะซีแนพริลีน.....	65
4.4.2 ไฮบริดเซชันดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอ ติดตามที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน (DOX-probe).....	66
4.5 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายอะซีแนพริลีน.....	68
4.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน จากพลาสมิด pDE.....	73
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	83
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	97
ภาคผนวก ก.....	98
ภาคผนวก ข.....	99
ภาคผนวก ค.....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	112

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แบบที่เรีย.....	32
3.2 พลาสมิต.....	33
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์.....	34
3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว.....	39
3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามัที่ติดฉลาก.....	39



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	4
2.2	6
2.3	7
2.4	8
2.5	11
2.6	12
2.7	13
2.8	14
2.9	17
2.10	17
2.11	18
2.12	20
2.13	21
2.14	23
2.15	24

## สารบัญญรูป (ต่อ)

2.16 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและการหาบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe <sup>2+</sup> ใน Rieske center ของ $\alpha$ subunit	
ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ [2Fe-2S]	
ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe <sup>2+</sup> ที่บริเวณเร่ง.....	25
2.17 การส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่าง $\alpha$ subunit (Kauppi และคณะ, 1998).....	26
3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนโดยวิธี Capillary transfer.....	43
3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน.....	44
4.1 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ	
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5.....	58
4.2 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์กลาย D2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5.....	60
4.3 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5.....	61
4.4 ก.) อะกาโรสเจลของพลาสมิด pD2N ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อระบุตำแหน่งการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์	
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5.....	62
4.5 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pD2N.....	63
4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5.....	64
4.7 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม.....	65
4.8 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ	
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	67
4.9 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	68
4.10 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม C6 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	69
4.11 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pDE ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เดี่ยวชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก	
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	70

## สารบัญญรูป (ต่อ)

4.12 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pDE ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์คู่ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก	
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX.....	71
4.13 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pDE และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม DOX ในบริเวณชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการ สับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pDE เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pDEB (ข.) pDBH (ค.) และ pDS (ง.) .....	72
4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ สอดแทรกในพลาสมิด pDE ขนาด 5891 bp.....	79
4.15 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pDE ขนาด 5891 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม DOX ตำแหน่งสอดแทรก ของทรานสโปซอนในสายพันธุ้กลาย D2 และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ ต่างๆของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pDE.....	80
4.16 Phylogenetic tree ของ AcnAc.....	81
4.17 Phylogenetic tree ของ AcnAd.....	82
5.1 การเร่งปฏิกิริยาของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน <i>Burkholderia</i> sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999).....	86
5.2 Consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Alberts และคณะ, 2002).....	85
5.3 การเรียงตัวของยีนในส่วนวิถึบนของการย่อยสลายเนพธาไลน์ของกลุ่มคล้าย <i>nah</i> เปรียบ เทียบกับ <i>acn</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 .....	87

# บทที่ 1

## บทนำ

อะซีแนฟทิลีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งในกลุ่มสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไฮโคไลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม อะซีแนฟทิลีนเป็นสารประกอบที่พบได้ในน้ำมันดิบ ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ครีโอสท (creosote) (Wilson และ Jones, 1993) อะซีแนฟทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆ ปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมเกิดจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรม น้ำมัน ถ่านหิน การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิลที่ไม่สมบูรณ์ (Volkering และคณะ, 1992) สาร PAHs ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Keith และ Telliard, 1979) และพบว่าอะซีแนฟทิลีนมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็มในการทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ส่วนความเป็นพิษในมนุษย์ยังไม่ชัดเจนเพียงพอ แต่อาจทำให้เกิดอาการแพ้หรือการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจ (Lederer, 1985) นอกจากนี้สารอนุพันธ์บางตัวของอะซีแนฟทิลีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ได้ (LaVoie และ Rice, 1988) โดยสามารถแบ่งประเภทของสาร PAHs ตามลักษณะของการทำให้เกิดพิษได้ 2 ประเภท คือ พวกที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 1-3 วง ทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน (acutely toxic) และพวกที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีนมากกว่า 3 วง จะทำให้เกิดพิษต่อพันธุกรรม (genotoxic) (Juhasz และ Naidu, 2000) องค์การอนามัยโลกจึงกำหนดให้อะซีแนฟทิลีนและ PAHs ทั้งหมด 16 ชนิด เป็นสารพิษที่ควรให้ความสำคัญอันดับต้นๆ ในอันที่จะป้องกันการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม (WHO, 1983, อ้างถึงโดย Wilson และ Jones, 1993)

การบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมปัจจุบันมักจะใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) แทนวิธีการดั้งเดิม เช่น การเผาที่อุณหภูมิสูง การฝังกลบ เนื่องจากปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee และ Cutright, 1996) มีรายงานการนำจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งสายพันธุ์เดี่ยวหรือกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สาร PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโตซึ่งทำให้ความเป็นพิษของ PAHs หดไปเนื่องจากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) หรือการลดพิษลงบางส่วนเนื่องจากการเปลี่ยน PAHs ให้เป็นสารอื่น (transformation) (Gibson และ Subramanian, 1984; Cerniglia, 1992)

งานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานวิธีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดต่างๆ เช่น วิธีการย่อยสลายเนฟทาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988) วิธีการย่อยสลายพีแนทรีนโดย *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) วิธีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland และคณะ, 1995) วิธีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 (Khan และคณะ, 2001) เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายเนฟทาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 (Ensley และคณะ, 1982; Ensley และ Gibson, 1983; Yen และ Serdar, 1988) เป็นวิธีการย่อยสลาย PAH ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาค้นคว้าอย่างสมบูรณ์รวมทั้งมีการศึกษาถึงยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสและยีนที่เกี่ยวข้องมากที่สุด ในขณะที่ยังไม่มีรายงานการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดยสมบูรณ์ รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาถึงยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนในจุลินทรีย์

ศรัลยา แพงไทร (2543) ได้คัดแยก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานคร สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนและเนฟทาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และยังสามารถย่อยสลายพีแนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนฟทาลีนร่วมกับอะซีแนฟทาลีน ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์ (2545) ได้ติดตามยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดยเทคนิคไฮบริดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม pDI1 ที่จำเพาะต่อยีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) กับจีโนมดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในสภาวะความเข้มงวดต่ำ (low stringency) พบว่าไม่เกิดสัญญาณจากการไฮบริดเซชัน เพื่อศึกษายีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ต่างๆ ในวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีน รัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) จึงได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วย ทรานสโปซอน Tn5 จนได้สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีน

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการนำสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เกิดจากการสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn5 และมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนมาศึกษาหายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนด้วยเทคนิคซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn5 เป็นตัวติดตาม จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าว ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์ต่อไปในอนาคต



### วัตถุประสงค์

เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพติลินใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อประโยชน์ในการทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพติลินและปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียต่อไปในอนาคต



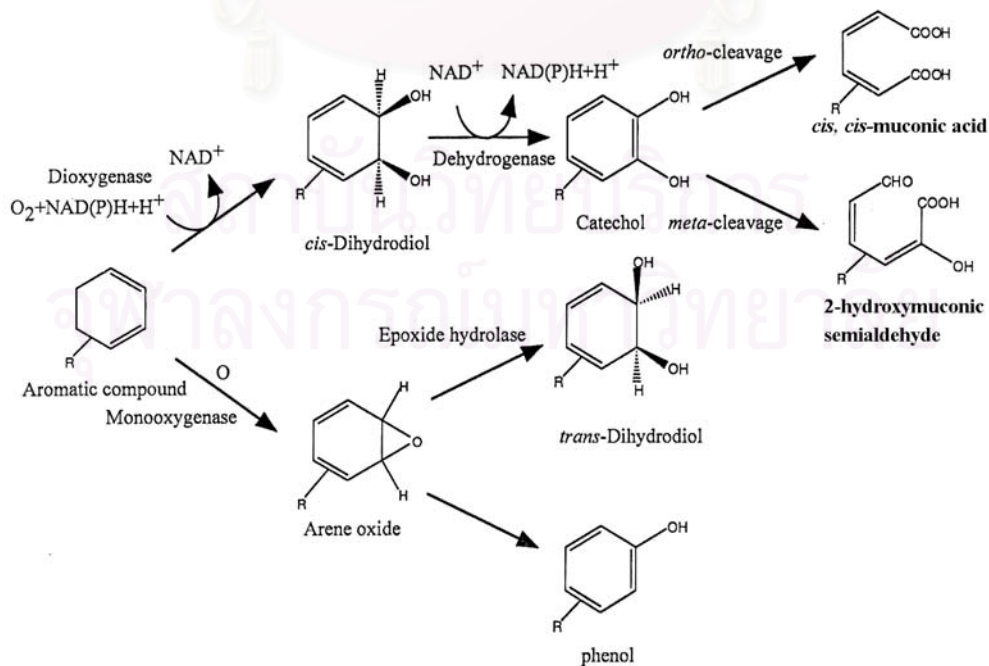
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้อง

การย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีอากาศโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ วิธีแรกซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นในแบคทีเรียเริ่มจากการนำออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) ซึ่งประกอบด้วย reductase ferredoxin และ terminal oxidase จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดย ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิด แล้วสับสเตรทที่คล้ายกับอะโรมาติกจะถูกตัดด้วยไดออกซิจีเนสผ่านทาง การแตกวงเบนซีนแบบ ออโร (intradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิด 2 อะตอมอยู่ติดกันได้ เป็น กรด ซิส, ซิส-มิวโคนิก หรืออีกวิธีหนึ่งผ่านทาง การแตกวงเบนซีนแบบ เมตา (extradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิดกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมา ในวิธีที่สองจุลินทรีย์บางชนิดจะใช้โมโนออกซิจีเนสเติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกได้เป็นแอโรนอีพอกไซด์ จากนั้นเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิดลงในโมเลกุล โดยกิจกรรมของอีพอกไซด์ไฮโดรเลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ทรานส-ไดไฮโดรไดออล หรืออีกวิธีหนึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทฟีนอล (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



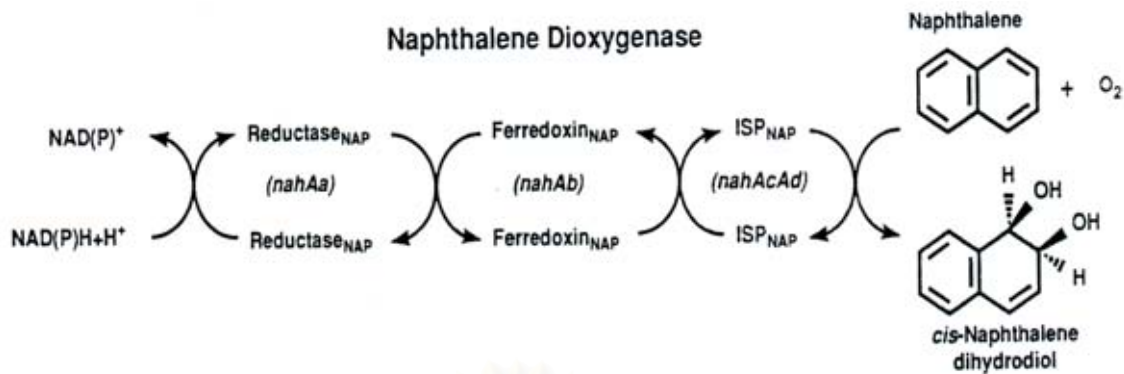
รูปที่ 2.1 วิธีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)

### 2.1.1 วิธีกรการย่อยสลายแนพธาลิน

แนพธาลินเป็นสาร PAH ที่มีโครงสร้างง่าย กล่าวคือประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงมาประกอบกัน จึงมีการใช้แนพธาลินเป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายสาร PAHs ที่มีโครงสร้างซับซ้อนชนิดอื่น ดังนั้นรายงานที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มุ่งเน้นที่การศึกษาแ่งมุมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลินเป็นหลัก จากรายงานแรกของ Davies และ Evans (1964) ที่กล่าวถึงการย่อยสลายแนพธาลินโดย *Pseudomonas* sp. และรายงานของ Yen และ Serdar (1982) ที่รายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลิน จึงทำให้มีศึกษาวิธีการย่อยสลายแนพธาลินรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายโดย *Pseudomonas putida* เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์อื่นอย่างกว้างขวาง (Yen และ Serdar, 1988; Eaton และ Chapman, 1992)

Yen และ Serdar (1988) ได้รายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลิน โดยการย่อยสลายแนพธาลินเริ่มจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกได้เป็น ซิส-1,2-แนพธาลินไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-naphthalene dihydrodiol) จากกิจกรรมของแนพธาลินไดออกซิจีเนส โดย Ensley และคณะ (1982) และ Ensley และ Gibson (1983) ได้รายงานถึงแนพธาลินไดออกซิจีเนสว่าประกอบด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ได้แก่ Reductase<sub>NAP</sub> Ferredoxin<sub>NAP</sub> และ Terminal oxidase หรือ Iron-sulfur flavoprotein (ISP<sub>NAP</sub>) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ large subunit ( $\alpha_2$ ) และ small subunit ( $\beta_2$ )

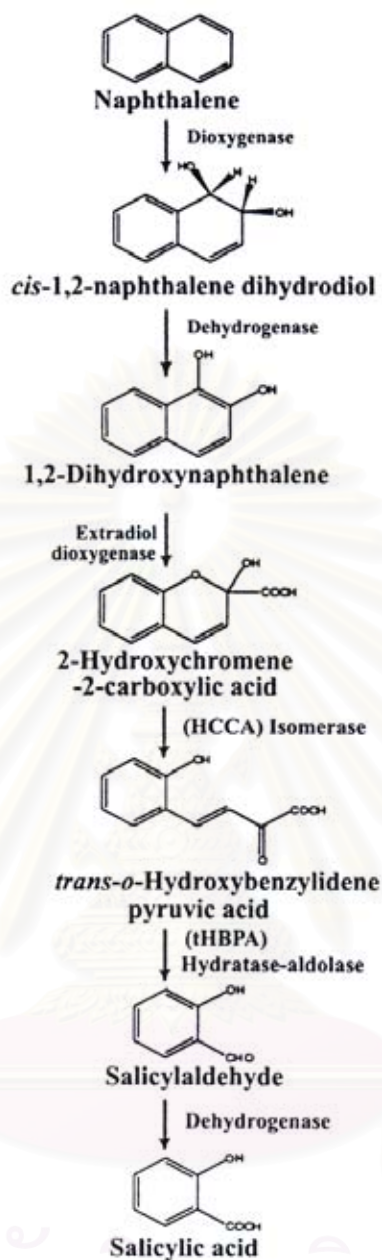
การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของแนพธาลินไดออกซิจีเนสเริ่มจากการส่งผ่านของอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH ไปยัง Reductase<sub>NAP</sub> จากนั้นส่งต่อไปยัง Ferredoxin<sub>NAP</sub> และ ISP<sub>NAP</sub> ตามลำดับ สุดท้าย ISP<sub>NAP</sub> จะเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาโดยตรงด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมยังวงเบนซีนของแนพธาลินเกิดผลิตภัณฑ์ ซิส-แนพธาลินไดไฮโดรไดออล ดังแสดงในรูปที่ 2.2



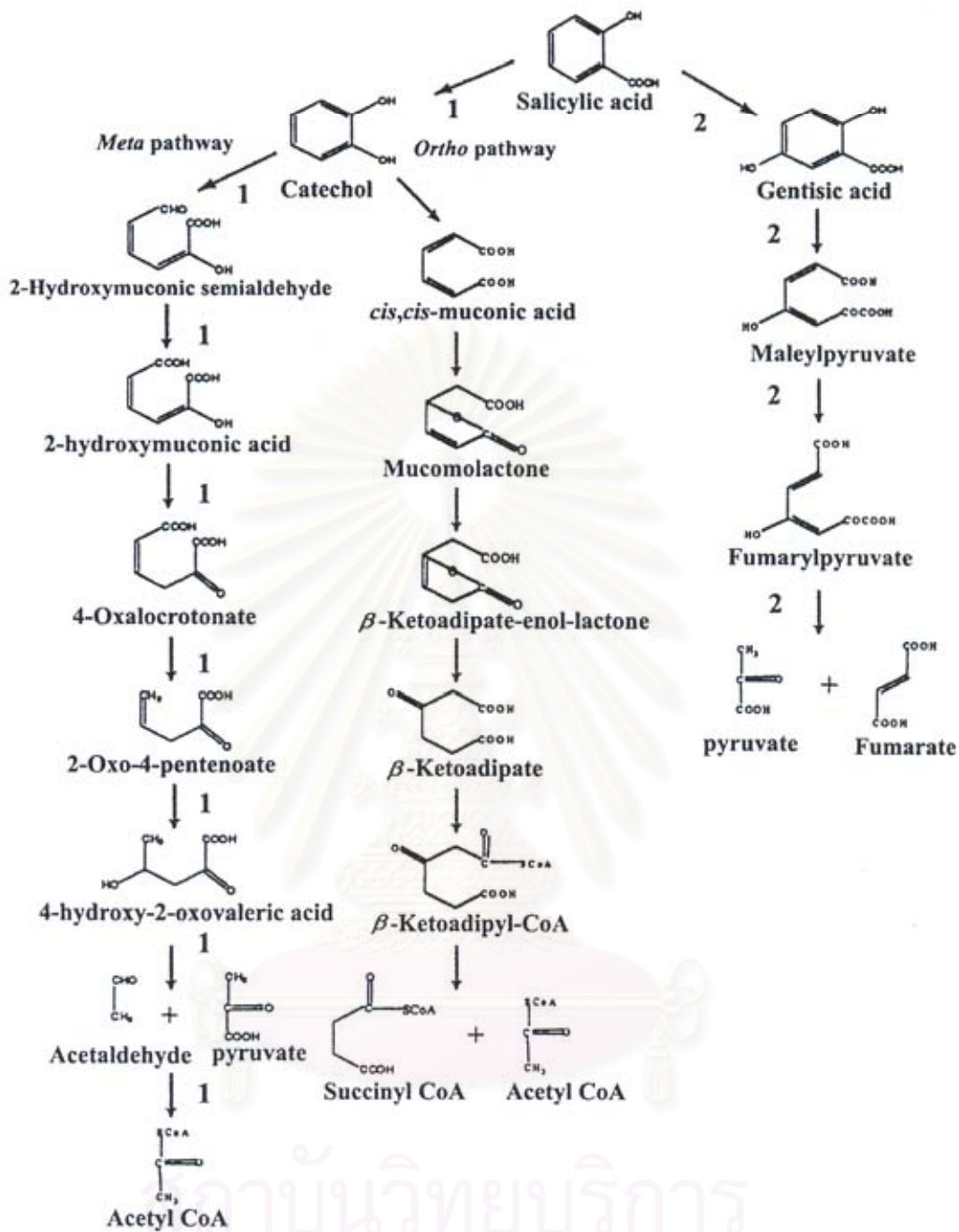
รูปที่ 2.2 การเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของแนพทาลีนไดออกซิจีเนสและยีนที่ประมวลรหัสแนพทาลีนไดออกซิจีเนสใน *Pseudomonas. putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988)

ซิส-1,2-แนพทาลีนไดไฮดรไดออล จะเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพทาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene) และ กรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid: HCCA) จากกิจกรรมของแนพทาลีนไดไฮดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และไดไฮดรอกซีแนพทาลีนดีไฮโดรจีเนสตามลำดับ จากนั้นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิกจะถูกออกซิไดส์เป็น ทรานส-ออโท-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvic acid: tHBPA) โดย HCCA ไอโซเมอเรส จากนั้นเปลี่ยนเป็นซาลิไซลัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) โดยการเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลส และซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3

จากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นคะทีคอล โดยซาลิไซเลทไฮดรอกซีเลส (salicylate hydroxylase) โดยคะทีคอลจะย่อยสลายต่อโดยแตกวงเบนซีนแบบ *ortho* จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซัคซินิล โคเอ และ อะซีติล โคเอ หรือการแตกวงแบบ *meta* จนกระทั่งสารมัธยันต์ที่พร้อมเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) ได้แก่ ไพรูเวท และอะซีทัลดีไฮด์ (Yen และ Gunsalus, 1982) นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกที่ไม่ผ่านทางคะทีคอล แต่ย่อยกรดซาลิไซลิกไปเป็นกรดเจนทิลิก เช่น การย่อยสลายซาลิไซลิกโดย *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) โดยกรดเจนทิลิกจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นมาริลไพรูเวท (maleylpyruvate) โดยเจนทิลิเนส-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentasate-1,2-dioxygenase) จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นไพรูเวทและฟูมาเรท (Zhou และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 วิธีบนของการย่อยสลายแนพทาลีนโดย *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982)



รูปที่ 2.4 วิธีล้างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)

## 2.1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน

การย่อยสลายอะซีแนพทิลีนมีการศึกษากันมาเป็นเวลานาน มีรายงานว่าแบคทีเรีย รา ไวท์รอต และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนได้ โดยส่วนใหญ่เป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลให้เป็นสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ (transformation) มีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน (Cerniglia, 1992)

Schocken และ Gibson (1984) รายงานว่า *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 ที่ย่อยสลายไบฟีนิล สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนร่วมกับอะซีแนพทิลีนแบบโคออกซิเดชันได้ การศึกษาการออกซิไดซ์ของอะซีแนพทิลีนจากการติดตามการสะสมของสารมัธยันต์โดยมีไบฟีนิลเป็นสารเหนี่ยวนำ พบว่ามีการเติมออกซิเจนเข้ายังส่วนวงไฮโคลเพนทีนของอะซีแนพทิลีนโดยการเร่งปฏิกิริยาของไดออกซิจีเนสได้เป็น ซีส-1,2-อะซีแนพทิลไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทิลีน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) โดยได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซีแนพทิลควิโนน (acenaphthenequinone) ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่ายังไม่เกิดการแตกวงไฮโคลเพนทีนของอะซีแนพทิลีนเพื่อให้อะซีแนพทิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

Komatsu และคณะ (1993) ได้รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเมื่อศึกษาสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อพบการสะสมของ กรด 1,8-แนพทาลีนไดคาร์บอกซิลิก (1,8-naphthalene dicarboxylic acid) แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถทำการแตกวงไฮโคลเพนทีนในโครงสร้างของอะซีแนพทิลีนได้

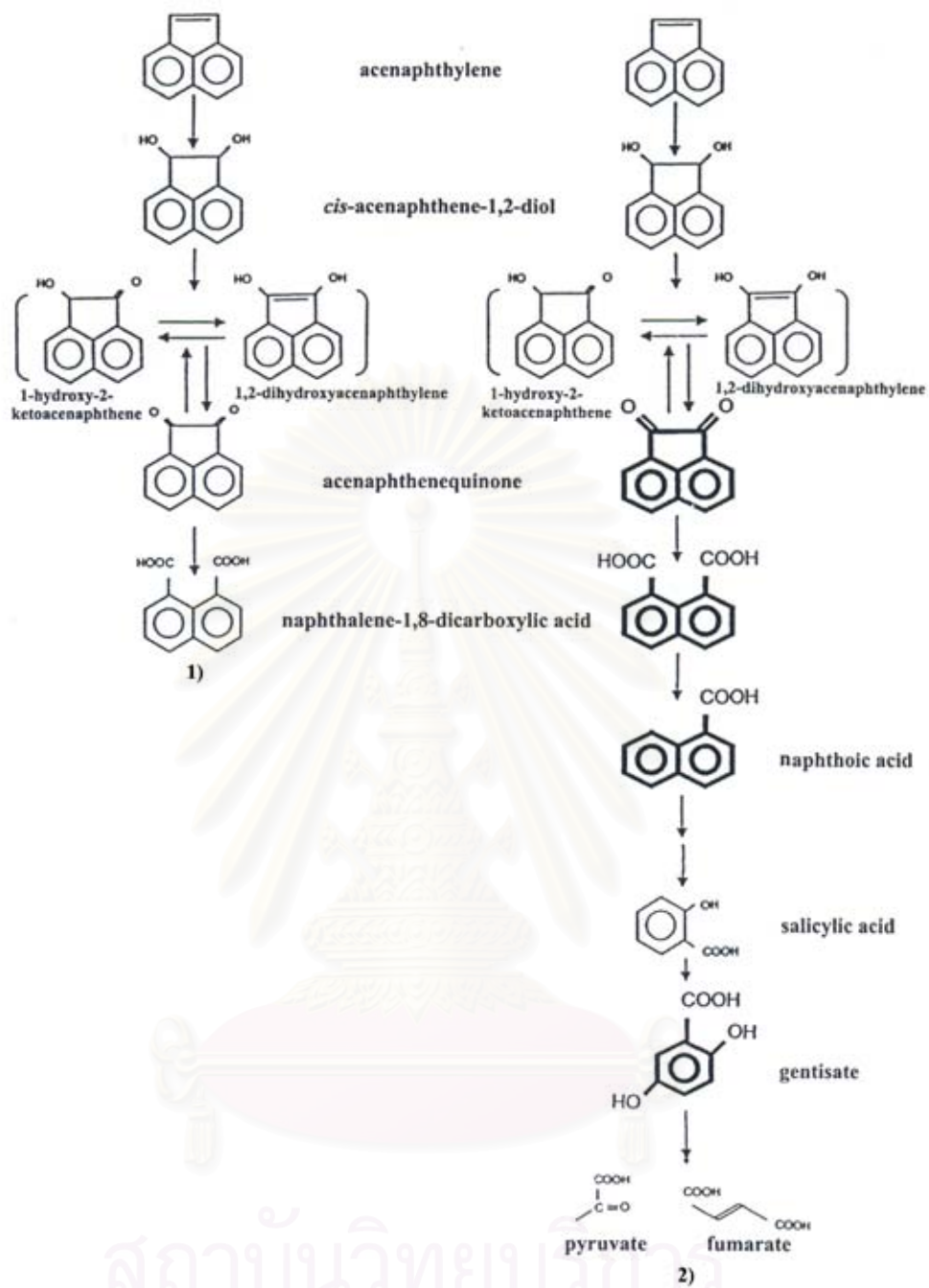
Selifonov และคณะ (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ริคอมบิแนนท์ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพทิลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเหมือนกับที่เคยค้นพบแล้วในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ได้เป็น ซีส-1,2-อะซีแนพทิลไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพทิลีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพโท-1,2-ควิโนน และ กรด 1,8-แนพทาลีนไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ (2545) ศึกษาสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 ให้มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีดีน พบว่ามีสายพันธุ์ A53 สะสมอะซีแนพรีนควิโนน สายพันธุ์ B1 สะสมกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก สายพันธุ์ B5 สะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) จากการวิเคราะห์สารมัธยันต์สามารถทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 น่าจะใช้วิถีเดียวกับ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ในการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนไปจนถึงกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และยังพบว่ากรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก น่าจะย่อยสลายจนกระทั่งได้กรดเจนทิลิก



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



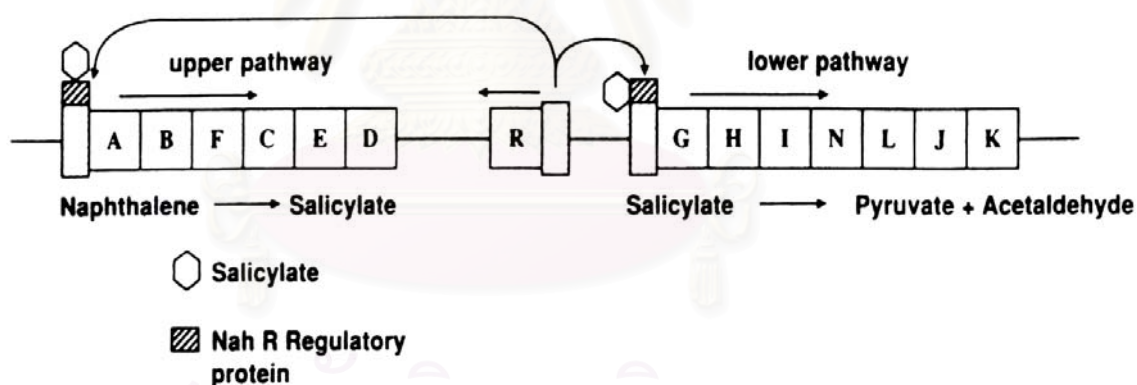


รูปที่ 2.5 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีน 1) *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1(Selifonov และคณะ, 1996) 2) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณทริกพันธุ์, 2545; Poonthripun และคณะ, 2003)

## 2.1.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAH

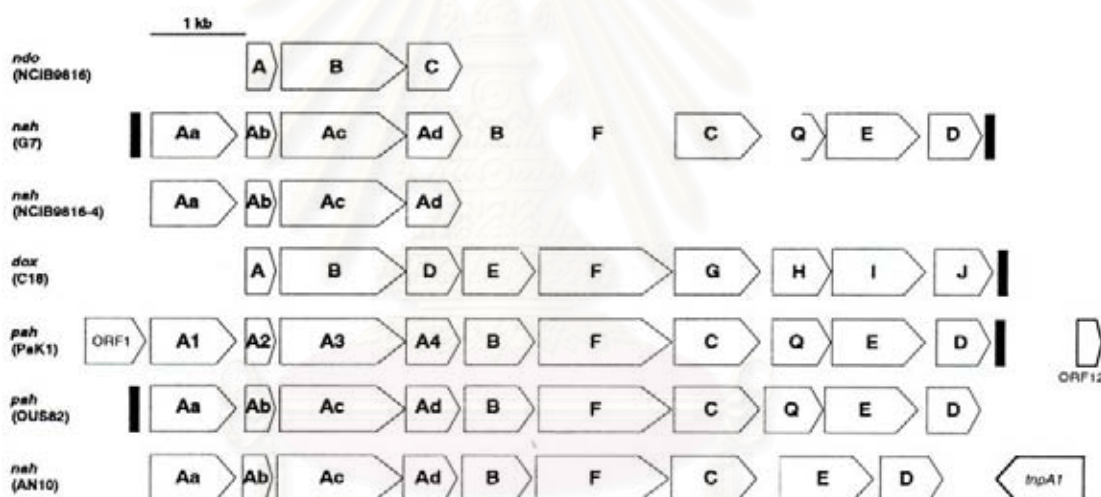
### 2.1.3.1 ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like)

Yen และ Gunsalus (1982) ได้รายงานว่พลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มีการจัดเรียงตัวของยีนเป็น 2 โอเปอรอน (operon) คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน upper pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยเนฟธาลินไปเป็นซาลิไซเลท และ โอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน lower pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยซาลิไซเลทผ่านทางคะทีคอลและย่อยสลายต่อจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวทและอะซีตัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยมีระบบยีนควบคุม (regulatory genes) คือ *nahR* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างโอเปอรอน *nah* และ *sal* โดยมีการจัดเรียงตัวของยีนในทิศทางตรงกันข้าม ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ได้แก่ ซาลิไซเลท และผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* (Yen และ Gunsalus, 1982; Schell, 1983)



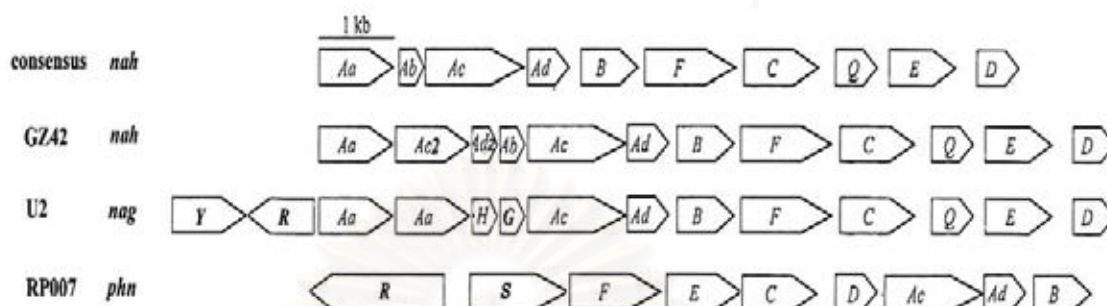
รูปที่ 2.6 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาลินและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982) *nahA*: เนฟธาลินไดออกซิจีเนส *nahB*: เนฟธาลินไดไฮดรไดออกซิไฮโดรจีเนส *nahC*: ไดไฮดรอกซีเนฟธาลินไดออกซิจีเนส *nahD*: HCCA ไอโซเมอเรส *nahE*: tHBPA ไฮดรอกซี-อัลโดเลส *nahF*: ซาลิไซลัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส *nahG*: ซาลิไซเลทไฮดรอกซีเลส *nahH*: คะทีคอล-2,3-ไดออกซิจีเนส *nahI*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส *nahJ*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ไฮโดรเลส *nahK*: 4-ออกซาโลโครโทเนทดีคาร์บอกซิเลส *nahL*: 2-ออกโซเพนท์-4-อีโนเอทไฮดรอกซีเลส *nahN*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ไฮโดรเลส

การศึกษาวีธีการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่มักรายงานถึง *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ย่อยสลายเนฟทาลินและพีแนนทรีน การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องรวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคล้ายกับ *nah* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลินของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และ คณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาได้แก่ *ndo* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988) *dox* ของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *pah* ของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1994) *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) และ *nah* ของ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) เป็นต้น ตัวอย่างการเรียงของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายเนฟทาลิน ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในส่วนวิถีบนของการย่อยสลายเนฟทาลินของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816, *P. putida* สายพันธุ์ G7, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82, *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003) *nahA*: เนฟทาลินไดออกซิจีเนส *nahB*: เนฟทาลินไดไฮโดรไดออกซิติไฮโดรจีเนส *nahC*: ไดไฮดรอกซีเนฟทาลินไดออกซิจีเนส *nahD*: HCCA ไอโซเมอเรส *nahE*: tHBPA ไฮดราเทส-อัลโดเลส *nahF*: ซาลิไซลัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส

นอกจากการศึกษาอื่นในกลุ่มคล้าย *nah* แล้ว ปัจจุบันได้มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่มีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เพิ่มขึ้น ตัวอย่างการเรียงตัวของยีนในกลุ่มนี้ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nah* ของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ42, *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2, *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

#### 2.1.3.2 *nah* ของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ42

Goyal และ Zylstra (1996) รายงานว่า *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ42 ที่ย่อยสลายเนพธาซีน เมื่อนำมาไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม *nah* พบว่าไม่เกิดสัญญาณจากการไฮบริดซ์ แสดงว่ายีนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างจาก *nah* เมื่อศึกษารายละเอียดของยีนพบว่ามี ความแตกต่างจาก *nah* กล่าวคือ พบ *nahAc2* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit แทรกอยู่ระหว่าง *nahAa* และ *nahAb* ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.1.3.3. *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2

Zhou และคณะ (2001) ศึกษา *nag* ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มอยู่บนพลาสมิดของเชื้อ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 โดยประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาไลน์ผ่านทางเจเนทีสเททประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *nagAaGHAbAcAdBFCQED* ซึ่งคล้ายกับยีนในส่วนวิถีบนของพลาสมิด NAH7 ยกเว้น *nagGH* ที่มีตำแหน่งแทรกอยู่ระหว่าง *nagAa* และ *nagAb* และบริเวณถัดลงมาจาก *nagD* มียีนอีก 1 กลุ่มที่ประกอบด้วย *nagJIKLMN* ซึ่งประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเจเนทีสเทท โดยคาดว่ายีนทั้งสองกลุ่มจะถอดรหัสร่วมกัน (cotranscribe) เป็นโอเปอรอน

### 2.1.3.4. *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ทำการศึกษา *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาไลน์และพีแนนทรีน พบว่า *phn* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* โดย *phn* มีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มดังนี้ *phnFECDAcAdB* ในขณะที่ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* มีการจัดเรียงตัว ดังนี้ *nahAaAbAcAdBFCQED* ตามลำดับ สิ่งที่แตกต่างอย่างชัดเจนนอกจากการจัดเรียงตัวของยีนคือพบ *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซิจีเนสในส่วน  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินและรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า PhnB (ดีไฮโดรจีเนส) มีความคล้ายกับดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายไบฟีนิลมากกว่าวิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์และพีแนนทรีน ส่วน PhnC จัดอยู่ใน Class III extradiol dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มใหม่ และมียีนควบคุมเป็น *phnR* และ *phnS* แทน *nahR* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.1.3.5 ยีนสำหรับการย่อยสลาย PAHs ใน *Sphingomonas* sp.

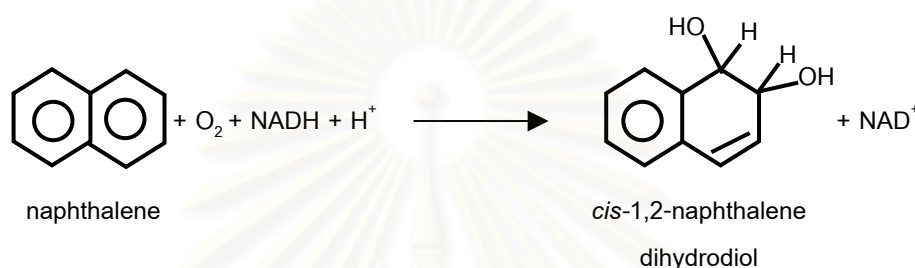
Romine และคณะ (1999) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199; Takeuchi และคณะ, 2001) มีพลาสมิด pNL1 ขนาด 184 กิโลเบส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิดจาก *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 โดยยีนที่พบเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร ไบฟีนิล แนนทาลีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล กระจายอยู่ในพลาสมิด จากการระบุตำแหน่งของยีนต่างๆ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนนทาลีนที่พบในแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนในระดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 กับกรดอะมิโนที่ประมวลผลห้สจากยีนในกลุ่มที่คล้าย *nah* พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายแนนทาลีนเป็นซาลิไซเลตได้ แสดงว่ายีนในส่วนวิถีที่ขาดหายไปน่าจะเกิดจากการทดแทนการทำงานโดยยีนที่ประมวลผลห้สสำหรับเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่น วิถีการย่อยสลายไบฟีนิลที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทอื่นๆ ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนในวิถีล่างนั้นไม่พบ *nahG* ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลายแนนทาลีนผ่านทางคะทีคอล แสดงว่าการย่อยสลายแนนทาลีนในส่วนวิถีล่างของสายพันธุ์นี้อาจจะไม่ผ่านวิถีการย่อยสลายคะทีคอล หรืออาจจะมีเอนไซม์ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายคะทีคอล

## 2.2 ออกซิจีเนส (Oxygenase)

ออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนยังสารประกอบอินทรีย์ ออกซิจีเนสมีหลายชนิด ซึ่งแตกต่างกันทางโครงสร้าง กลไกการทำงาน และความต้องการโคเอนไซม์ (coenzyme) ในการเร่งปฏิกิริยา โดยสามารถจำแนกออกซิจีเนสได้ 2 กลุ่ม ตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา คือ โมโนออกซิจีเนส (monooxygenase) และ ไดออกซิจีเนส (dioxygenase) ซึ่งเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนหนึ่งและสองอะตอมเข้ายังโมเลกุลของสับสเตรทตามลำดับ แต่การจำแนกกลุ่มของออกซิจีเนสเป็นโมโนออกซิจีเนสหรือไดออกซิจีเนส โดยใช้ความแตกต่างของลักษณะการเร่งปฏิกิริยานั้นยังไม่ชัดเจน (Mason และ Cammack, 1992; Butler และ Mason, 1997) เนื่องจากมีรายงานกล่าวว่าโกลูอินไดออกซิจีเนสและแนนทาลีนไดออกซิจีเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาโมโนออกซิจีเนสได้ โดยสามารถออกซิไดส์ indene และ indan ไปเป็น 1-indanol และ 1-indanol ตามลำดับ (Wackett และคณะ, 1988; Brand และคณะ, 1992)

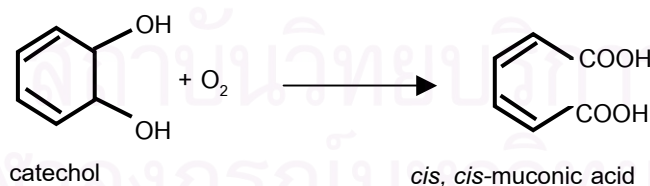
ไดออกซิจีเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกในหลายขั้นตอน โดยสามารถจำแนกไดออกซิจีเนสตามลักษณะของการเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน เอนไซม์นี้ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น NADH หรือ NADPH ในปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนยังวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-ไดออล (*cis*-diol) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น แนพธาลีนไดออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันโดยแนพธาลีนไดออกซิจีเนส

2. ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ ในปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติกของสารอนุพันธ์ไฮดรอกซิล (ได- หรือ ไตร-) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น คะทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.10

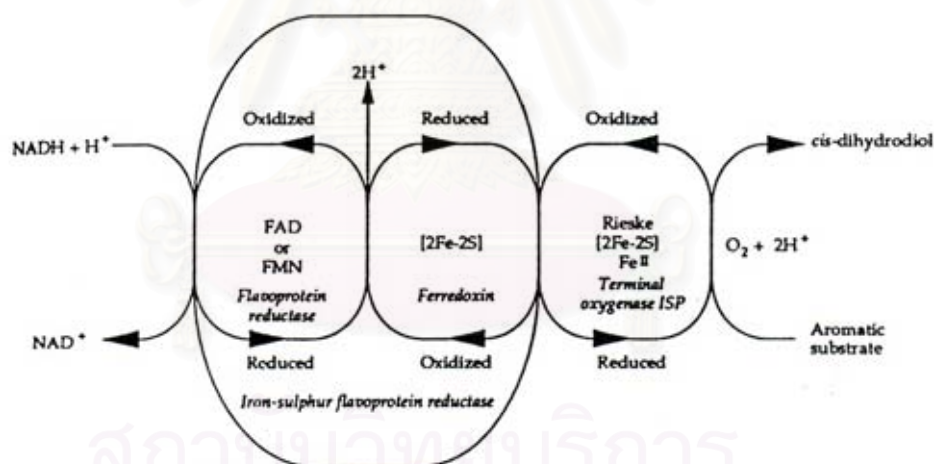


รูปที่ 2.10 การเร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติกโดยกะทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส

## 2.2.1 โครงสร้างของ Ring-Hydroxylating Dioxygenase

การศึกษาระบบการทำงานของเอนไซม์ ring-hydroxylating dioxygenase มีการศึกษา กันอย่างกว้างขวาง โดยรายงานแรกของ Gibson และคณะ (1968, 1970) ได้รายงานไดออกซิจี เนสของ *Pseudomonas putida* ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิไดส์เบนซีนไปเป็น ซิส-1,2-ไดไฮดรอกซี- ไฮโคลเฮกซะ-3,5-ไดอีน (*cis*-1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene) จึงทำให้มีการศึกษาไดออกซิ จีเนสจากจุลินทรีย์อื่นๆ อย่างกว้างขวาง ไดออกซิจีเนสจัดเป็น non-heme iron dioxygenase ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารประกอบอะโรมาติกได้เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล หรือ กรด ซิส-ไดออล คาร์บอกซิลิก

ring-hydroxylating dioxygenase ทุกชนิดเป็นระบบการทำงานของเอนไซม์ที่ประกอบ ด้วยโปรตีน 2-3 ชนิด ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับส่งอิเล็กตรอน คือ iron-sulfur flavoprotein หรือ flavoprotein และ iron-sulfur ferredoxin ซึ่งจะส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังเทอร์มินัลออกซิจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของ ring-hydroxylating dioxygenase (Butler และ Mason, 1997)

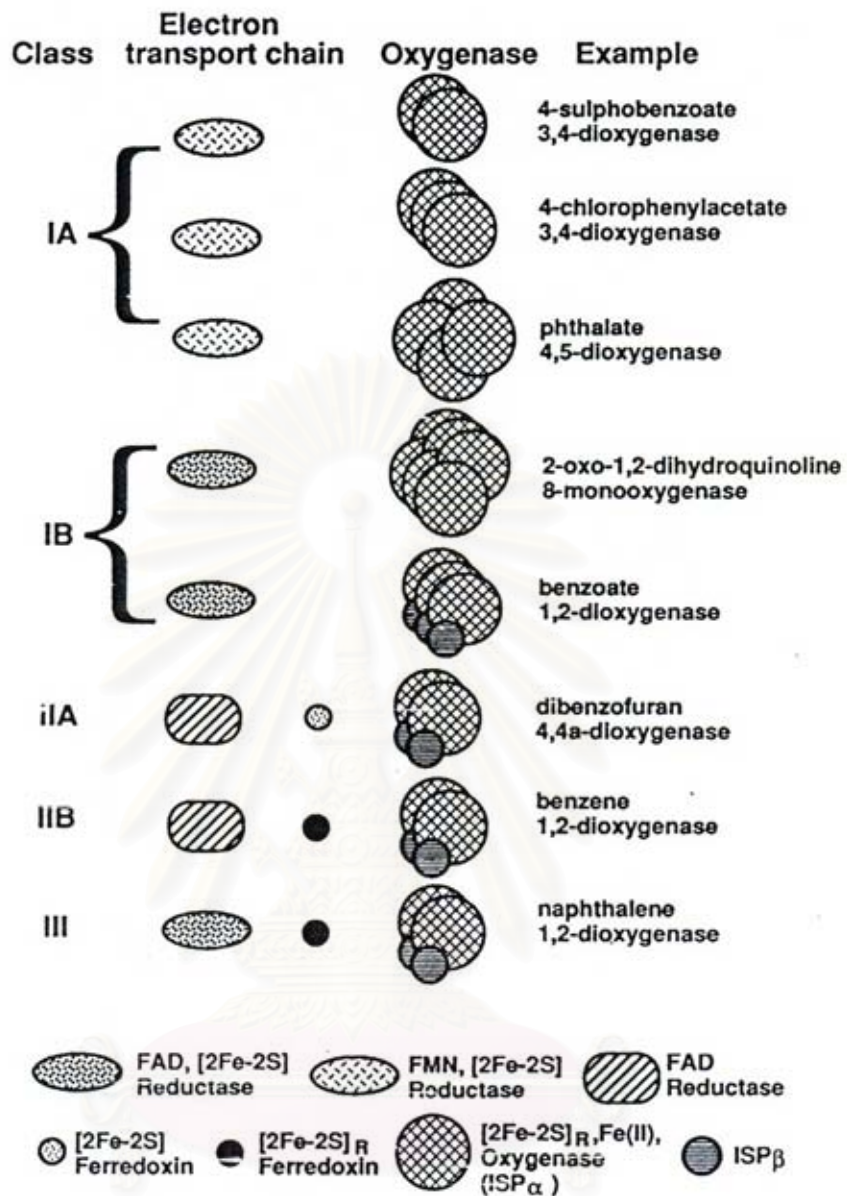


Batie และคณะ (1992) จึงได้จำแนกไดออกซีจีเนสออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความแตกต่างของจำนวนและขนาดของ subunit ในส่วนเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส และรีดักเทส คือ

1. Class I เป็นไดออกซีจีเนสที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ รีดักเทส และเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส โดย Class I สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามหมู่พรอสทีติก (prosthetic group) ในส่วนรีดักเทส ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Class IA และ Class IB ซึ่งมี FAD และ FMN ตามลำดับ
2. Class II เป็นไดออกซีจีเนสที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ รีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน และเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามประเภทของ [2Fe-2S] cluster คือ Class IIA และ Class IIB ซึ่งมี [2Fe-2S] cluster เป็น plant-type iron sulfur และ Rieske-type iron sulfur ตามลำดับ
3. Class III เป็นไดออกซีจีเนสที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ รีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน และเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส โดย [2Fe-2S] cluster ในของกลุ่มนี้จัดเป็น Rieske-type iron sulfur ดังแสดงในรูปที่ 2.12



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.12 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในแต่ละกลุ่ม (Butler และ Mason, 1997)

Warlen และคณะ (1996) ได้จำแนกกลุ่มไดออกซิจีเนสส์ใหม่โดยใช้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของ  $\alpha$  subunit และชนิดของสับสเตรท โดยสามารถจำแนกไดออกซิจีเนสส์ได้ 4 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.13 คือ

1. กลุ่มโทลูอิน/ไบฟีนิล เป็นไดออกซิจีเนสส์จากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ที่ใช้ในการย่อยสลาย โทลูอิน เบนซีน ไอโซโพรพิลเบนซีน คลอโรเบนซีน และไบฟีนิล

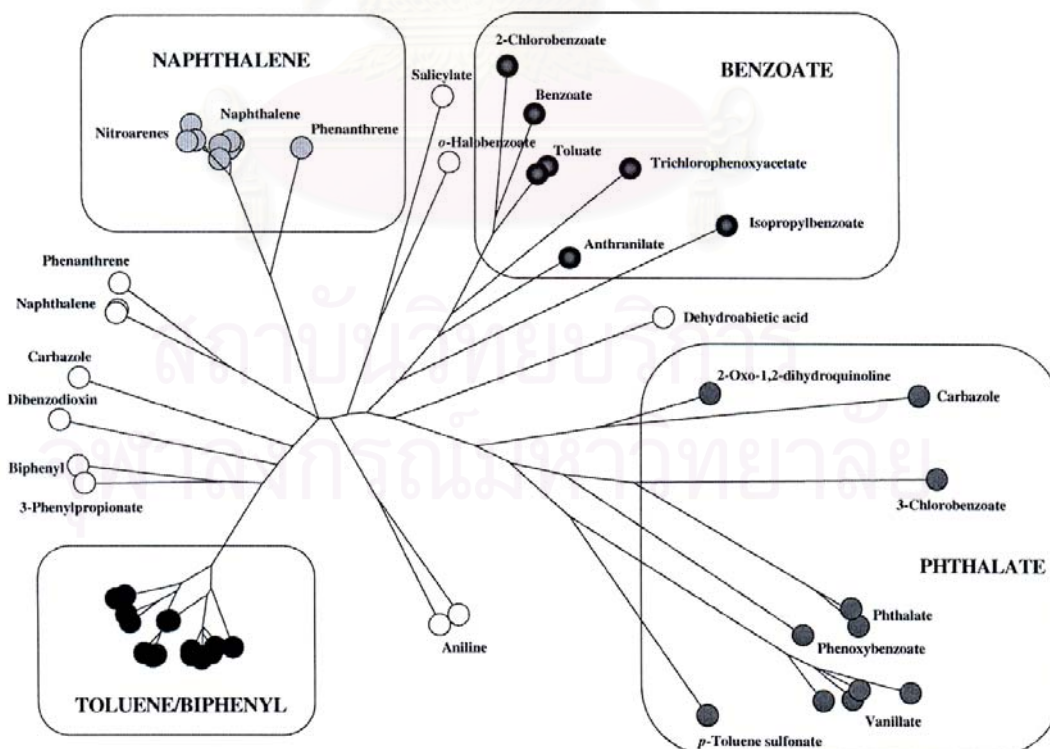
2. กลุ่มแนพธาไลน์ เป็นไดออกซิจีเนสส์จากแบคทีเรียแกรมลบ ที่ใช้ในการย่อยสลาย แนพธาไลน์ ฟีนแอนทริน ไนโตรเบนซีน และไนโตรโทลูอิน

3. กลุ่มเบนโซเอท เป็นไดออกซิจีเนสส์ที่ใช้ในการย่อยสลาย เบนโซเอท โทลูเอท แอนธรานิเลท 2-คลอโรเบนโซเอท ไตรคลอโรฟีนอกซีอะซีเตท และ ไอโซโพรพิลเบนโซเอท

โดยไดออกซิจีเนสส์ทั้ง 3 กลุ่มนี้ จะมีโครงสร้างเป็น heteromultimer ที่ประกอบด้วย  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit

4. กลุ่มพธาเลท เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลาย โดยมีโครงสร้างเป็น  $\alpha_n$  ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งไมโนออกซิจีเนสส์ และไดออกซิจีเนสส์

นอกจากนี้ยังพบว่าไดออกซิจีเนสส์บางตัวที่ย่อยสลายสาร PAHs ชนิดเดียวกัน แต่ไม่จัดอยู่ในไดออกซิจีเนสส์ทั้ง 4 กลุ่ม เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งแตกต่างกัน เช่น แนพธาไลน์ไดออกซิจีเนสส์ของ *Rhodococcus* sp.



รูปที่ 2.13 การจัดกลุ่มไดออกซิจีเนสส์โดยใช้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$  subunit (Warlen และคณะ, 1996)

## 2.2.2 ระบบขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport system)

### 1. รีดักเทส (reductase component)

รีดักเทสเป็นโปรตีนหน่วยแรกที่ทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอน โดยจะรับอิเล็กตรอนจาก NADH ไปส่งยังรีดอกซ์เซ็นเตอร์ที่อยู่ถัดไป โดยส่วนรีดักเทสนี้สามารถรับอิเล็กตรอนจาก NADH ได้ครั้งละ 2 อิเล็กตรอน แต่สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังรีดอกซ์เซ็นเตอร์ถัดไป ได้เพียงครั้งละ 1 อิเล็กตรอนเท่านั้น

### 2. เฟอรัรีดอกซิน (ferredoxin component)

เฟอรัรีดอกซินทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากส่วนรีดักเทส ไปส่งยังเทอร์มินัลออกซิจีเนส โดยส่วนเฟอรัรีดอกซินนี้จะพบเฉพาะใน Class II และ Class III เท่านั้น

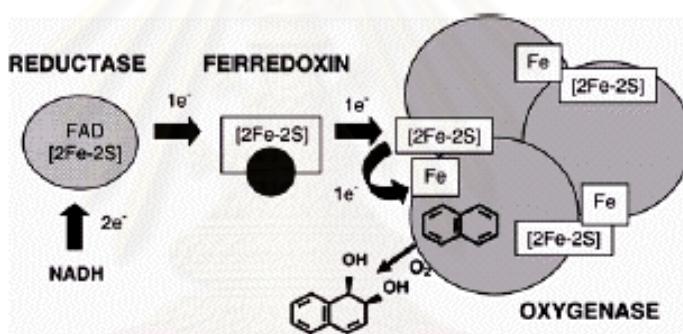
### 3. เทอร์มินัลออกซิจีเนส (terminal oxygenase)

เทอร์มินัลออกซิจีเนส ประกอบด้วย [2Fe-2S] cluster และ mononuclear non-heme iron ( $Fe^{2+}$ ) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับและเกิดการเร่งปฏิกิริยา โดย Class IA ในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนส จะพบเฉพาะ  $\alpha$  subunit ในขณะที่ Class IB ประกอบด้วย  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ที่มีโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  ส่วน Class II และ Class III มีทั้ง  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ที่มีโครงสร้างเป็น  $\alpha_2\beta_2$  และ  $\alpha_3\beta_3$  โดยในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนส จะมีหนึ่ง [2Fe-2S] cluster ต่อ  $\alpha\beta$  dimer หรือ  $\alpha$  monomer

การขนส่งอิเล็กตรอนในส่วนประกอบต่างๆ ของ ring-hydroxylating dioxygenase เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของ Fe ใน [2Fe-2S] cluster ซึ่งจะทำหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนไปยังรีดอกซ์เซ็นเตอร์ที่อยู่ถัดไป โดยสามารถจำแนก [2Fe-2S] cluster ตามลักษณะกายภาพได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Plant-type [2Fe-2S] cluster และ Rieske-type [2Fe-2S] cluster (Butler และ Mason, 1997)

### 2.2.3 แนนพธาลีนไดออกซิจีเนส

แนนนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIB9816-4 เป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นต้นแบบของเอนไซม์ในกลุ่ม Rieske non-heme iron oxygenase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษาแง่มุมต่างๆ อย่างกว้างขวาง การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของแนนนพธาลีนไดออกซิจีเนส เริ่มจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH ไปยังรีดักเทส ที่ประกอบด้วย FAD และ [2Fe-2S] cluster และส่งไปยัง [2Fe-2S] cluster ของเฟอร์รีดอกซิน จากนั้นอิเล็กตรอนจะส่งต่อไปยังเทอร์มินัลออกซิจีเนส ที่ประกอบด้วย 3[2Fe-2S] และ  $3\text{Fe}^{2+}$  ซึ่งเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงเบนซีนของแนนนพธาลีน ดังแสดงในรูปที่ 2.14 (Parales และคณะ, 2003) โดยเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแนนนพธาลีนไดออกซิจีเนสมีโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  ดังแสดงในรูปที่ 2.15 (Kauppi และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.14 การเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างของระบบการทำงานของแนนนพธาลีนไดออกซิจีเนส (Parales และคณะ, 2003)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.15 โครงสร้างส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแอนพาลินไดออกซิจีเนส (Kauppi และคณะ, 1998)

### 2.2.3.1 หน้าทีของ $\alpha$ และ $\beta$ subunit ในการเร่งปฏิกิริยา

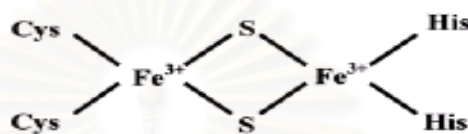
การศึกษาหน้าที่การทำงานของ  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit พบว่ากรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ  $\alpha$  subunit ในแอนพาลินไดออกซิจีเนส ทำหน้าที่ควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท โดย  $\alpha$  แต่ละหน่วยประกอบด้วย 2 domain คือ

1. Rieske domain ซึ่งมี [2Fe-2S] โดย  $\text{Fe}^{3+}$  อะตอมแรกจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน Cys-81 Cys-101 ในขณะที่  $\text{Fe}^{3+}$  อีกอะตอมจะเกิดพันธะซัลไฟด์กับกรดอะมิโน His-83 และ His-104
2. catalytic domain ซึ่งมี  $\text{Fe}^{2+}$  ที่บริเวณเร่ง จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน His-208 His-213 Asp-362 และโมเลกุลของน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.16

ก.)

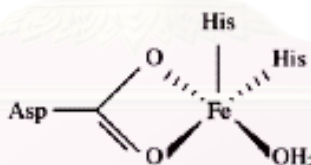
			81	83		101	104	
9816-4	NahAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C SY H	GWGFSGN GELQS
DNT	DntAc	FLNV	C	R	H	RGKTI VDAEAGNAKGFV	C GY H	GWGYGSN GELQS
JS42	NtdAc	FLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C GY H	GWGYGSN GELQS
LB400	BphA	FLNQ	C	R	H	RGMRI CRSDAGNAKAFT	C SY H	GWAYDIAGKLVN
KF707	BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRI CRSDAGNAKAFT	C SY H	GWAYDIAGKLVN
KKS102	BphA1	FLNQ	C	R	H	RGMRI CRSDAGNAKAFT	C TY H	GWAYDIAGNLVN
PpF1	TodC1	FLNQ	C	R	H	RGMRI CRADAGNAKAFT	C SY H	GWAYDTAGNLVN
P51	TcbAa	FLNQ	C	R	H	RGMRI CRSDAGNAKAFT	C SY H	GWAYDTAGNLVN

Consensus **C** - X - **H** - X<sub>15-17</sub> - **C** - X<sub>2</sub> - **H**



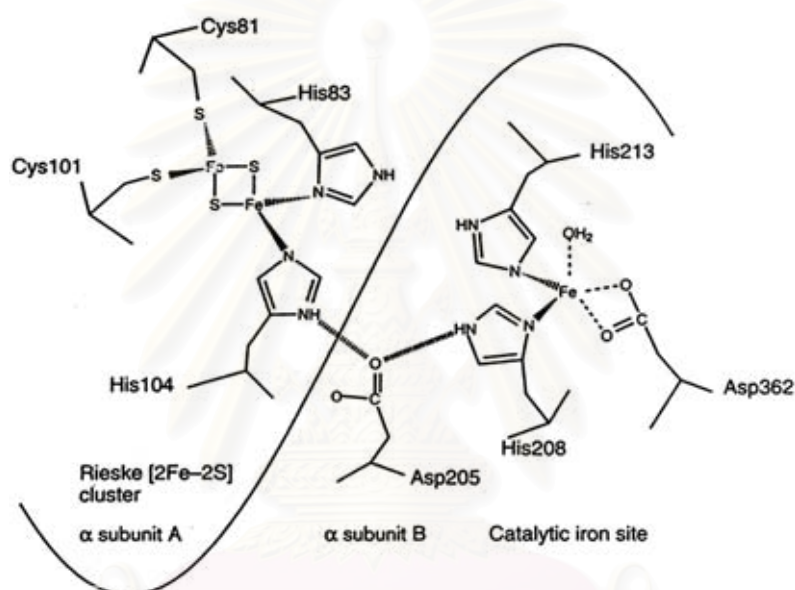
ข.)

			208	213		362			
9816-4	NahAc	ENFVGDAY	H	VGWT.	H	ASSLRSG	RTFGPAGFWESD	D	NDNMETAS
DNT	DntAc	ENFVGDIY	H	IGWT.	H	ASILRAG	RSTGPAGYWESD	D	NDNM. VLS
JS42	NtdAc	ENFVGDIY	H	VGWT.	H	AAALRAG	RSIGPAGFWESD	D	NDNMETLS
KKS102	BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGVLSS	F'TFNQGGTYEQD	D	GENWVEVQ
KF707	BphA1	EQFCSDMY	H	AGTMS	H	LSGILAG	RTFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
LB400	BphA	EQFCSDMY	H	AGTTT	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
F1	TodC1	EQFCSDMY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RSFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ
P51	TcbAa	EQFCSDAY	H	AGTTS	H	LSGILAG	RNFSAGGVFEQD	D	GENWVEIQ



รูปที่ 2.16 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและการหาบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ  $\text{Fe}^{2+}$  ใน Rieske center ของ  $\alpha$  subunit ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ  $[\text{2Fe-2S}]$  ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ  $\text{Fe}^{2+}$  ที่บริเวณเร่งเกิดเป็นสาร 2-His-1-carboxylate 9816-4: NahAc ของแบคทีเรียไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4, DNT: DntAc ของ 2,4-ไดไนโตรโทลูอินไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. DNT, JS42: NtdAc ของ 2-ไนโตรโทลูอินไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. JS42, KKS102: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KKS102, KF707: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KF707, LB400: BphA ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. LB400, F1: TodC1 ของโทลูอินไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. F1, P51: TcbAa ของไตรคลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. P51

Kauppi และคณะ (1998) ศึกษาโครงสร้างผลึกแนพธาลีนไดออกซีจีเนสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIB9816-4 ในส่วนเทอร์มินัลออกซีจีเนส พบว่ามีโครงสร้างเป็น  $\alpha_3\beta_3$  โดย  $\alpha$  subunit จะจับกับ  $\beta$  subunit ด้วยพันธะไฮโดรเจน และบริเวณเร่งการเกิดปฏิกิริยาประกอบด้วย [2Fe-2S] cluster และ  $Fe^{2+}$  ของ  $\alpha$  subunit คนละหน่วยที่อยู่ใกล้กัน โดยมีกรดอะมิโน Asp-205 จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ His-104 ซึ่งจับกับ [2Fe-2S] cluster ของ  $\alpha$  subunit หนึ่ง และ His-208 ที่จับ  $Fe^{2+}$  ของ  $\alpha$  subunit ที่อยู่ใกล้เคียง ทำหน้าที่สำคัญในการส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่าง  $\alpha$  subunit ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 การส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่าง  $\alpha$  subunit (Kauppi และคณะ, 1998)

ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนของ  $\beta$  subunit ในการเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซีจีเนส จากการศึกษาพบว่าเฉพาะ  $\alpha$  subunit ของแนพธาลีนไดออกซีจีเนส 2-ไนโตรโทลูอีนไดออกซีจีเนส และ 2,4-ไดไนโตรโทลูอีนไดออกซีจีเนสเท่านั้น ที่ควบคุมความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ในขณะที่  $\beta$  subunit ไม่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา หรือความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท (Kauppi และคณะ, 1998; Parales และคณะ, 2003)



นอกจากการศึกษาแอนทราลินไดออกซิจีเนสแล้ว ปัจจุบันได้มีรายงานไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่น เช่น

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ศึกษา *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสเป็น  $\alpha$  subunit และ  $\beta$  subunit ของพีแนทรีนไดออกซิจีเนสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีน พบ *phnAc* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ  $\alpha$  subunit ของยีนกลุ่มคล้าย *nahAc* เท่ากับ 56% ในขณะที่ *phnAd* มีความเหมือนกับ *nahAd* เพียง 32-36% โดยขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินและรีดักเทส แต่การทำงานของพีแนทรีนไดออกซิจีเนสยังคงปกติ

Saito และคณะ (2000) ศึกษา *phdABCD* ซึ่งประมวลรหัสเป็น  $\alpha$  subunit  $\beta$  subunit เพอร์ริดอกซิน และรีดักเทส ของพีแนทรีนไดออกซิจีเนสใน *Nocardiodes* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่สามารถย่อยสลายพีแนทรีนผ่านทางพลาเลท พบว่า *phdAB* ที่ประมวลรหัส  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ *narAaAb* และ *nidAB* ที่ประมวลรหัส  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ของ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ I24 เท่ากับ 52-56% และยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับยีนที่ประมวลรหัส  $\alpha$  subunit และ  $\beta$  subunit ของไดออกซิจีเนสชนิดอื่นๆ ต่ำกว่า 40% *phdC* ที่ประมวลรหัสส่วนเพอร์ริดอกซินจัดเป็น [3Fe-3S] type หรือ [4Fe-4S] type ซึ่งแตกต่างจากไดออกซิจีเนสชนิดอื่นที่จัดเป็น [2Fe-2S] type นอกจากลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit และชนิดของเพอร์ริดอกซินที่แตกต่างกับไดออกซิจีเนสชนิดอื่นแล้ว ยังพบว่าการเรียงตัวของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสก็แตกต่างกับไดออกซิจีเนสอื่นที่เรียงตัวเป็นกลุ่ม โดยพบ *phdGH* ที่ประมวลรหัสไฮดรอกซี-อัลโดเลส และอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสแทรกอยู่ระหว่างยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนส คือ *phdABGHCD*

Khan และคณะ (2001) รายงาน *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 ที่สามารถย่อยสลาย ไพรีน ฟลูออแรนทรีน แอนทราซีน เบนโซ (เอ) ไพรีน พบ *nidAB* ซึ่งประมวลรหัสเป็น  $\alpha$  subunit และ  $\beta$  subunit ของไดออกซิจีเนส *nidA* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับยีนประมวลรหัส  $\alpha$  subunit ของ *Nocardiodes* sp. สายพันธุ์ KP7 *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 และสายพันธุ์ I24 ประมาณ 42-50% ในขณะที่ *nidB* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับยีนประมวลรหัส  $\beta$  subunit ของ *Nocardiodes* sp. สายพันธุ์ KP7 เท่ากับ 56% และ *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ I24 เท่ากับ 43-46% โดยขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินและรีดักเทส และพบว่าการเรียงตัวของ *nidBA* ซึ่งไม่มีรายงานในไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียอื่นๆ

จากรายงานที่กล่าวมาพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีเอนไซม์ประมวลรวมรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs เพียง 1 ชุด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียบางชนิดมีเอนไซม์ประมวลรวมรหัสไดออกซีจีเนสมากกว่า 1 ชุด เช่น Romine และคณะ (1999) รายงานว่า *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ที่สามารถย่อยสลายไบฟีนิล แนพทาซีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล มีเอนไซม์ประมวลรวมรหัสไดออกซีจีเนสในส่วน  $\alpha$  subunit และ  $\beta$  subunit 6 ชุด คือ [bphA1(a-f)] และ [bphA2(a-f)] ในขณะที่พบในส่วนเฟอร์ริดอกซิน และรีดักเทสเพียง 1 ชุด คือ bphA3 และ bphA4 กระจายตัวอยู่บนพลาสมิด pNL1 ขนาด 184 กิโลเบส

## 2.2.4 การประยุกต์ใช้ไดออกซีจีเนส

การบำบัดสาร PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพ การติดตามเอนไซม์ไดออกซีจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการบ่งบอกขั้นต้นถึงความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไป ด้วยการติดตามความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนอินโดลไปเป็นอินดิโก (Ensley และคณะ, 1983) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำปฏิกิริยาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทดลองเพื่อหาเชื้อที่ย่อยสลายสาร PAHs จากการทดลองหาเอนไซม์ที่ประมวลรวมรหัสไดออกซีจีเนสในขั้นต้น โดยมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อตรวจหาเอนไซม์ประมวลรวมรหัสไดออกซีจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs เช่น เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) การโคลน (Cloning) และการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน (Transposon mutagenesis) โดยใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งหรือใช้หลายเทคนิคพร้อมกัน

นอกจากนี้ยังมีการนำอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนไดออกซีจีเนสมาใช้ในการผลิตสารเคมีที่ใช้ในภาคอุตสาหกรรม เพื่อลดปัญหาของเสียที่เกิดจากภาคอุตสาหกรรมหรือที่เรียกว่า Green chemistry (Kauppi และคณะ, 1998) โดยนำไดออกซีจีเนสได้นำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการสังเคราะห์สารเคมีที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้โดยวิธีทางเคมี

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sunyo, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น WB 14 ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Geniell G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Pico ของบริษัท Kendro, Germany.
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
  - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวหมุนเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ION-check10 ของบริษัท Radiometer, France.
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  รุ่น REVCO ULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  รุ่น MDF-U536D ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
14. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.

- Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
15. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
  16. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab<sup>TM</sup> Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท Seoulin Bioscience, Korea.
  17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
  18. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
  19. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
  20. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
  21. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
  22. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
  23. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลาไรซ์ ของบริษัท Polaroid, USA.
    - แผ่นกรองแสงสีแดง
    - ฟิล์มโพลาไรซ์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
  24. ชุดคอมพิวเตอร์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น UNIVERSAL HOOD ใช้โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 ของบริษัท Bio- Rad, USA.

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตเน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan.
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
8. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ของบริษัท E Merck, Germany.
9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.

10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.
  11. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E Merck, Germany.
  12. สีบรมมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
  13. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) ของบริษัท Sigma, USA.
  14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O) ของบริษัท Sigma, USA.
  15. SDS (sodium dodecyl sulfate), (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>OSO<sub>3</sub>) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
  16. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
  17. สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
  18. เรสทริกชันเอนไซม์ทุกชนิดของบริษัท Promega, USA.
  19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
  20. 100 bp DNA ladder ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
  21. Taq DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA.
  22. KOD DNA polymerase ของบริษัท TOYOBO, Japan.
  23. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA.
  24. ไลเกส (ligase) ของบริษัท Promega, USA.
  25. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
  26. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
  27. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
  28. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
  29. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.
  30. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
  31. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit ของบริษัท BIO101, USA.
  32. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.
  33. ถังไดแอลลีซิส Cellu • Sep T3 ของบริษัท Membrane Filtration Products, USA.
- หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนม/ โฟนีโนม	เอกสารอ้างอิง
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 $\alpha$	$\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> - <i>argF</i> )U169	Hanahan, 1983
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนพติลิน	ศรัลยา แพงไตร, 2543
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ D2	Km <sup>r</sup> , สายพันธุ์ถูกถ่ายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งไม่ สามารถย่อยสลายอะซีแนพติลิน	ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544

### 3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

#### ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนมไทป์/ ฟีนোটายป์	เอกสารอ้างอิง
pSUP2021	Tn5(Km <sup>r</sup> ), Cm <sup>r</sup> , Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>+</sup> , pBR325 replicon	Simon และคณะ, 1983
pBluescript KS(+/-)	Ap <sup>r</sup> , $\alpha$ lac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-11Zf(+/-)	Ap <sup>r</sup> , $\alpha$ lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pD2N	Ap <sup>r</sup> มีชิ้นส่วน <i>Bam</i> HI-/ <i>Eco</i> RI จากดีเอ็นเอของ สายพันธุ์กล้วย D2 ขนาดประมาณ 7 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pDE	Ap <sup>r</sup> มีชิ้นส่วน <i>Eco</i> RI จากดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 5.9 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pDEB	Ap <sup>r</sup> มีชิ้นส่วน <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI จาก pDE ขนาดประมาณ 1.4 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pDBH	Ap <sup>r</sup> มีชิ้นส่วน <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III จาก pDE ขนาดประมาณ 1.8 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pDS	Ap <sup>r</sup> มีชิ้นส่วน <i>Sal</i> I จาก pDE ขนาดประมาณ 2.3 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( $T_m$ )	เอกสารอ้างอิง
TN5-OE	5'-GGTCCGTTTCAGGACGCTAC-3' (64 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตนไชย- ยงค์, 2545
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (56 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท Promega, USA
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	บริษัท Promega, USA
DOXF	5'-AAAGTGACCGAATACCT-3' (48 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXF-1	5'-CACGATTACGACCGAGA-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXF-2	5'-AGATCATGTCGGATGTG-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXF-3	5'-CGCAATCGCCTCAACCT-3' (58 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXR	5'-CGATTCCTCAACCATAG-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXR-1	5'-GCCTTCGCATTGCCAGA-3' (54 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXR-2	5'-CCAGTACAGGAATTGTT-3' (48 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXR-3	5'-ACATCGGTCCGCGACTT-3' (54 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
FD1	5'-TCGGCTCCGCGGATGA-3' (54 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
FD2	5'-TCTACATCGACTGCTGA-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
FD3	5'-CAGCGCCTTTGACGAGA-3' (54 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
FD4	5'-ACTTCGATGGCGGTATC-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้



### 3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ กานามัยซิน (Km) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมพิซิลิน (Ap) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C

3.5.2 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในอาหารแข็ง เป็นเวลา 2-3 วัน หรือในอาหารเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สำหรับสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. เลี้ยงเช่นเดียวกันแต่มีการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ปี

### 3.6 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization)

#### 3.6.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

##### 3.6.1.1 สกัดพลาสมิด pSUP2021

สกัดพลาสมิด pSUP2021 ซึ่งมีทรานสโปซอน Tn5 จาก *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครพิวเจอร์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แชนลงยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มเหนียวและใสขึ้น ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนที่จะหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.6.1.2 เตรียมชิ้นส่วนของทรานสไปซอน Tn5

ตัดพลาสมิด pSUP2021 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	0.5-10 ไมโครกรัม	
10X บัฟเฟอร์	1/10	ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	3-5	ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการ
ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง		

จากนั้นแยกพลาสมิดที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 0.7% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เกล่งในแบบพิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข22) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ลงในช่องวิ่งจากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ หรือชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่วิ่งจนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีโนลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข23) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของทรานสไปซอน Tn5 ออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (BIO101, USA) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งนำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครพิวจ์ เติมสารละลายโซเดียมไอโอไดด์ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 45-55 °C เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติมสารแขวนลอยที่เข้ากันของ glass milk ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายดีเอ็นเอเข้ากันกับ glass milk แล้วบ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างบ่มให้กลับหลอดเบาๆ เพื่อป้องกัน glass milk ตกตะกอนทุก 1-2 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash ปริมาตร 500-700 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง แต่ครั้งที่ล้างให้กระจายตะกอนออกให้หมดแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ระบายแห้งตะกอนแล้วชะดีเอ็นเอออกจากตะกอน glass milk ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยกระจายตะกอนออกให้เข้ากันดีในน้ำ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ถ่ายส่วนน้ำใสที่มีชิ้นดีเอ็นเอละลายอยู่ไปยังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บรักษาชิ้นดีเอ็นเอไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.6.1.3 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ คู่มือสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.2 ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอ แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.4

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ตารางที่ 3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว

หลอดที่เจือจาง	ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอต่อ DNA dilution buffer ( $\mu$ l)
1. 1 : 100	1/99
2. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 3.3	15/35
3. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 10	5/45
4. หลอดที่ 2 เจือจาง 1 : 10	5/45
5. หลอดที่ 3 เจือจาง 1 : 10	5/45

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอด 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำความคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกับวิธีการข้างต้นแล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่ง ทิ้งไว้ให้แห้ง ตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรนด้วยการวางเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปผายต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.5

### ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามทีติดฉลาก

หลอดที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Blocking solution	2
2	Antibody solution (1 : 5,000 ใน Blocking solution)	3
1	Blocking solution	1
3	Maleic acid buffer	1
4	Detection buffer	1
5	Color-substrate solution	5-30

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มีดจนเกิดจุดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์สีม่วง น้ำเงิน เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้ล้างแถบทดสอบด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง เทียบสีที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีความเข้มข้นดังนี้ 50, 15, 5, 1.5, 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

3.6.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 สำหรับการไฮบริไดซ์

3.6.2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข25) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของโปรตีนเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข17) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข20) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข19) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่

เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปไว้ในหลอดไมโครพีพ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโพรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยให้แห้งสนิท แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

### 3.6.2.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

3.6.2.3 ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 และสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 และสายพันธุ์ดั้งเดิมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังแสดงในข้อ 3.6.1.2 จากนั้นแยกชั้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซิส

### 3.6.2.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

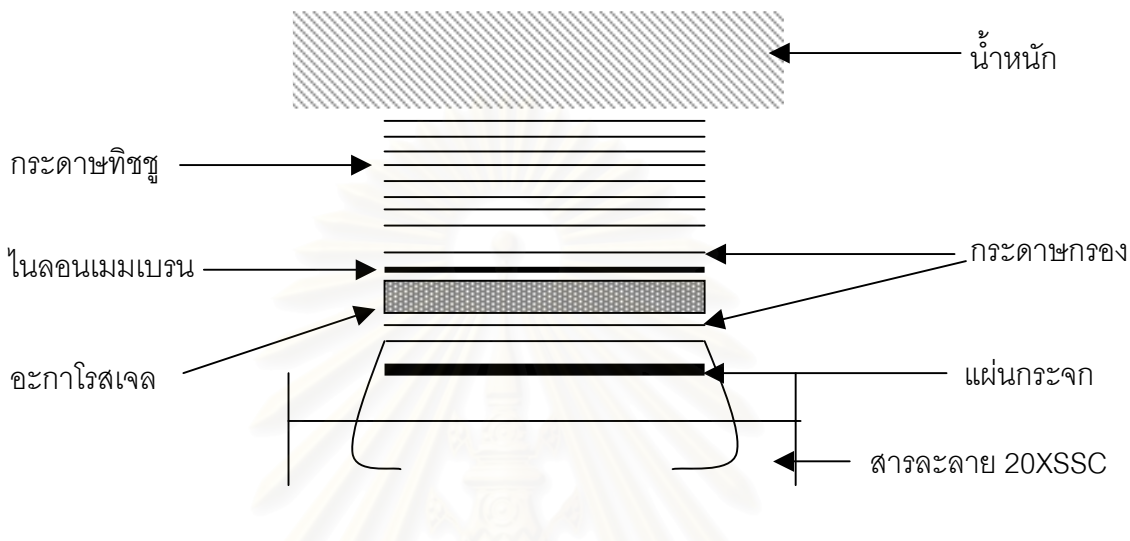
นำดีเอ็นเอของสายพันธุ์กล้วย D2 ที่ตัดแล้วจากข้อ 3.6.2.3 มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) และใช้พลาสมิด pSUP2021 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นย้ายอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยล้างชิ้นอะกาโรสเจลด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ในกล่องพลาสติก โดยให้สารละลายท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หรือเติมให้ท่วมอะกาโรสเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข7) เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

การถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ กำหนดขนาด A คือขนาดเท่ากับขนาดของแผ่นอะกาโรสเจล ขนาด B คือขนาดความกว้างเท่ากับด้านกว้างของอะกาโรสเจลแต่ความยาวจะยาวกว่าด้านยาวของอะกาโรสเจล ตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาด A จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด A จำนวน 2 แผ่น และขนาด B จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษทิชชูให้มีขนาด A เพื่อใช้เป็น paper towel สูงประมาณ 5 เซนติเมตร การจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเติม 20XSSC (ภาคผนวก ข8) ซึ่งเป็น transfer buffer ลงในกล่องพลาสติกปริมาตรพอประมาณ นำกระดาษกรองขนาด B ที่อิมมัวด้วย 20XSSC วางพาดบนแผ่นกระจกโดยให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแตะในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นสะพานให้ 20XSSC เคลื่อนที่ขึ้นมา จากนั้นวางกระดาษกรองขนาด A ที่อิมมัวด้วย 20XSSC ซ้อนขึ้นด้านบน แล้วนำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงด้านบนในลักษณะที่ค้ำหน้าเจลลงด้านล่าง วางไนลอนเมมเบรนที่อิมมัวด้วย 20XSSC ลงบนเจล ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในแต่ละชั้น จากนั้นจึงวางกระดาษกรองขนาด A แล้ววางชั้นของกระดาษทิชชูและน้ำหนักกดด้านบน ตามลำดับ



ยึดชั้นต่างๆให้มั่นคงด้วยกระดาษขาว และระวังไม่ให้ชั้นทึบๆแตะโดนอะกาโรสเจลหรือกระดาษกรองด้านล่าง ตั้งทิ้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ขึ้นมาเป็นเวลาข้ามคืน

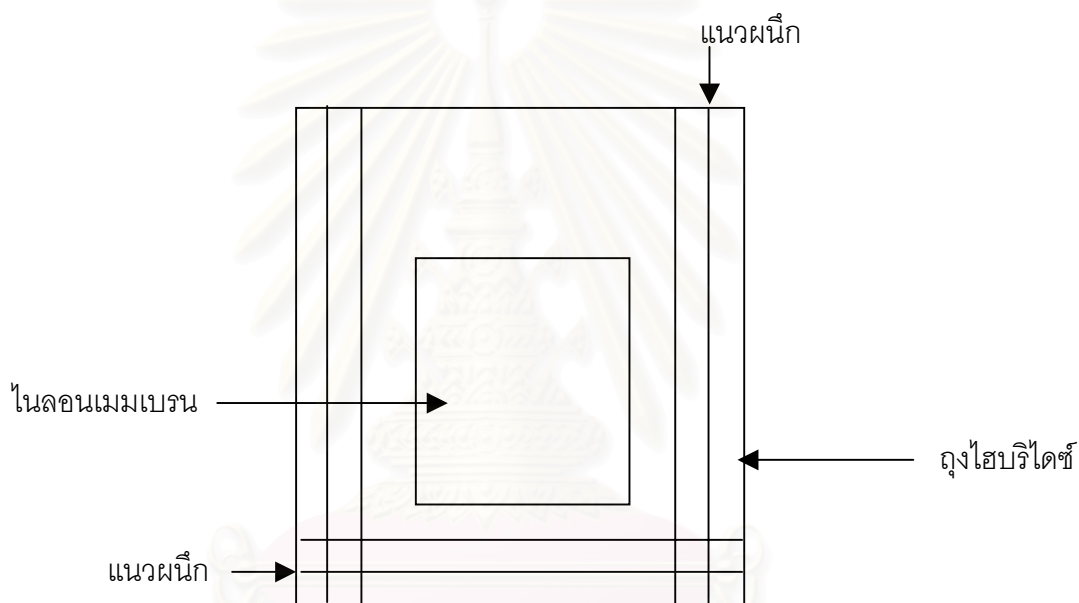


รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน โดยวิธี Capillary transfer

ภายหลังจากการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ยกชั้นกระดาษทึบๆที่อยู่ออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่งเพื่อเป็นการระบุตำแหน่งของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องล้างด้วย 2XSSC (ภาคผนวก ข9) โดยการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งและตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนด้วยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผชิญแสงอัลตราไวโอเล็ตประมาณ 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

### 3.6.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยเครื่องผนึกที่ใช้ความร้อนดังรูปที่ 3.2 เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข12) ซึ่งอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42 °ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นผนึกปิดให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 สำหรับการไฮบริไดซ์ โดยเติมดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดเบาๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อดีเนเจอร์สายดีเอ็นเอติดตาม ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดซ์

เมื่อทำพีไฮบริโดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ที่  
แล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นผึ่งด้านข้างถุงเหมือนเดิม เทสารละลาย  
ดีเอ็นเอติดตามทรานสไปซอน Tn5 ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ใส่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดผนึก  
ด้านบน 2 ครั้ง นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 42 °C ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง)  
สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วกลับนำมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอด  
พลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-  
3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 10 นาที (ระวัง  
อย่าต้มจนเดือดเพราะสารละลาย DIG Easy Hyb จะเสียสภาพ)

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริโดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออก  
โดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย  
2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่า  
เบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย  
0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข11) ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ไฮบริโดเซชันได้กับดีเอ็นเอติดตามทรานสไปซอน  
Tn5 ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime  
Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข12) ตามวิธีของบริษัท  
ผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วน  
เกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข12) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาณ  
ท่อมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution  
(ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม  
antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate  
(ภาคผนวก ข12) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อน  
ใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง  
แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร  
เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20  
มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมสับสเตรท NBT/BCIP (ภาค  
ผนวก ข12) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer  
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอน  
เมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดผึ่งด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริโดเซชัน จากนั้นเทสับสเตรทที่

เตรียมไว้ลงในถุง ใส่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับสับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ชับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

### 3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่

#### 3.7.1 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ตัดดีเอ็นเอสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วย เรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Eco*RI ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโพรเซส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 โดยเทียบผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution โดยล้างถุงไดอิเล็กทริกที่เตรียมไว้ (ภาคนวท ๖30) ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปิดปลายด้านหนึ่งของถุงโดยใช้ตัวหนีบ (clamp) นำอะกาโรสเจลที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแยกใส่ลงในถุงไดอิเล็กทริก เติมบัฟเฟอร์ 1XTAE ที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่เกิน 400 ไมโครลิตร ใส่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมดแล้วปิดปลายอีกด้านที่เหลือ ทำอิเล็กโทรโพรเซสชิ้นเจลในบัฟเฟอร์ 1XTAE ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกจากเจลมาอยู่ที่สารละลาย จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าและทำอิเล็กโทรโพรเซสซ้ำ ใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับถุงไดอิเล็กทริกหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย นำสารละลายที่ได้มาปั่นเพื่อกำจัดเศษอะกาโรสเจลที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 1XTAE สู่อหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสติกด้วยเอธานอล โดยเติมโซเดียมอะซิเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคนวท ๖24) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมเอธานอลสัมบูรณ์ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที หรือ ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที นำไป

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหยเอธานอลให้แห้ง ละลาย ดีเอ็นเอกลับในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.7.2 สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดพลาสมิด pBluescript KS(+/-) (Stratagene) จาก *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ BamHI/EcoRI แล้วนำพลาสมิดที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีซันดีเอ็นเอ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.1 ละลายพลาสมิดที่ได้ในน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุด้วยปริมาตรที่เหมาะสม

### 3.7.3 ไลเกชัน (ligation) ซันดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ไลเกชันซันดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/EcoRI ในข้อ 3.7.3 ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ซันดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 ประมาณ 300 นาโนกรัม	3 ไมโครลิตร
พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ BamHI/EcoRI	
ประมาณ 50-200 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร
10X ไลเกชันบัฟเฟอร์	1 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	4 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างซันดีเอ็นเอสอดแทรกและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.7.4 ทรานสฟอร์มรีคอมบีแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.3 เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  และคัดเลือกรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ในจีนดีเอ็นเอสอดแทรก

#### 3.7.4.1 ทำคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ทำด้วยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเชื้อโคลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* DH5 $\alpha$  ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5

เตรียมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย CaCl<sub>2</sub> ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นเติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub> ที่ปลอดเชื้อและเย็นความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD<sub>600</sub> ที่ต้องการ ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็นจำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วในการหมุนเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตกตะกอนเซลล์และสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> ในอ่าง น้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย MgSO<sub>4</sub>/CaCl<sub>2</sub> แช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครพิวค์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$

#### 3.7.4.2 ทรานส์ฟอร์มมีรีคอมบีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานส์ฟอร์มมีรีคอมบีแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.3 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบีแนนท์พลาสมิดที่ไลเกตได้จากข้อ 3.7.4 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที โดย heat shock ที่อุณหภูมิ  $42^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเชื้อ และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

#### 3.7.4.3 คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบีแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5 $\alpha$  ซึ่งมีรีคอมบีแนนท์พลาสมิดที่มีทรานส์โปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5 $\alpha$  ที่ทรานส์ฟอร์มมีรีคอมบีแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.7.4.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข27) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside) ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตรไว้แล้ว หลังจากเกลี่ยเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาข้ามคืน

คัดเลือกทรานสเฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินโดย  
 คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน  
 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมา  
 สกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดั่งขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อ  
 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวค์ นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว  
 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก  
 ข21) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้น  
 เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข21) ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ  
 กลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข21) ที่เย็น  
 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็น  
 เวลา 3-5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะ  
 ส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมเอธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2  
 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมา ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 °C  
 เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว  
 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเอธานอลสัมบูรณ์ทิ้ง บั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอ  
 ที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัด ปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการบั่นล้าง  
 เก็บตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง สุดท้ายนำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปประเหยให้  
 แห้งสนิทแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A  
 เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ  
 -20 °C

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization  
 (Sambrook และ Russell, 2001) โดยตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งโคลนให้  
 ชัดเจน ระหว่างนั้นแช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ต้ม  
 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที นำเมมเบรนออก  
 จากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาหยด  
 ลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5  
 ไมโครลิตร โดยใช้พลาสมิด pSUP2021 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด  
 pBluescript KS(+/-) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) เมื่อหยดตัวอย่างครบและแห้ง  
 แล้วนำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเล็ตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้  
 ติดกับเมมเบรนแล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม Tn5 จากข้อ 3.6.1 ด้วยวิธีการและขั้นตอน



ตามที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3 เมื่อได้กลุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามแล้วนำกลุ่มโคลน มาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วนำไปทำ Dot blot hybridization ซ้ำอีกครั้ง เพื่อหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ที่ให้ผลบวกกับ ดีเอ็นเอติดตามไปตัดด้วยเอนไซม์ที่จำบริเวณที่โคลน (cloning site) เพื่อแยกชิ้น ดีเอ็นเอสอดแทรกออกจากพลาสมิดเวกเตอร์แล้วนำไปทำ Southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอ ติดตาม Tn5 ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3

### 3.8 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย อะซีแนฟลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน

3.8.1 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนและเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ TN5-OE (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์, 2545) ซึ่งจำเพาะต่อลำดับเบสของปลายทรานสโปซอน Tn5 ทำโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด ในข้อ 3.7.4.3 ที่สกัดจาก *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่อยู่ติดกับทรานสโปซอนที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้เข้าไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

### 3.9 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์ดั้งเดิม *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนอยู่ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization)

#### 3.9.1 ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5

ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 ที่หาได้จากข้อ 3.8 ซึ่งคาดว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวน่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน จากนั้นออกแบบทั้ง forward primer และ reverse primer ตั้งชื่อว่า DOXF และ DOXR ตามลำดับ

#### 3.9.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

- MgCl <sub>2</sub> ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์)	3 ไมโครลิตร
- 10X Taq DNA polymerase buffer (ความเข้มข้นสุดท้าย 1X Taq DNA polymerase buffer)	5 ไมโครลิตร
- สารละลาย DOXF primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	2.5 ไมโครลิตร
- สารละลาย DOXR primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์)	2.5 ไมโครลิตร
- สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว) (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์)	1 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (ปริมาณสุดท้าย 2.5 หน่วย)	0.5 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบจากข้อ 3.7.4.3 ความเข้มข้น 10 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	34.5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร

โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ	เป็นเวลา 3 นาที	} 30 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 48 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ 72 °ซ	เป็นเวลา 4 นาที	

ดำเนินการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 3.9.3 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม DOX

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.9.2 มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการออกจากดีเอ็นเออื่นๆ และสกัดแยกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวออกจากอะกาโรสเจล จากนั้นตัดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1

### 3.9.4 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริด

ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม จากนั้นทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปสู่ไนลอนเมมเบรนตามขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.2

3.9.5 ไฮบริโดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX

นำในลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจากข้อ 3.9.4 มาไฮบริโดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม DOX ซึ่งได้เตรียมไว้ในข้อ 3.9.3 ตามขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3 โดยมีดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอร์ริเมอร์สในข้อ 3.9.2 เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด pBluescript KS(+/-) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control)

3.10 โคลนขึ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพติลิน

3.10.1 โลกทัศน์ขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายั้งพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มริคอม บีแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$

3.10.1.1 สกัดขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม DOX

ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตัดอะกาโรสเจลให้กลุ่มตรงบริเวณที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม DOX โดยเทียบผลจากการไฮบริโดซ์ในข้อ 3.10.5 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีในข้อ 3.7.1

3.10.1.2 สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดพลาสมิด pBluescript KS(+/-) (Stratagene) จาก *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* แล้วนำพลาสมิดที่ตัดแล้วมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนพลาสมิดแล้วละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยปริมาณที่เหมาะสม (น้อยกว่าปริมาณเริ่มต้นก่อนที่จะสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)

### 3.10.1.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์

กำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นปลายเปิด โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากการเจือจาง Alkaline phosphatase จากหลอดตั้งต้น ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ด้วยการใช้ส่วนผสมของการเจือจางดังนี้

Alkaline phosphatase 1 หน่วยต่อไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	10 ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	89 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	100 ไมโครลิตร
ผสมให้เข้ากัน (ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งหรือเก็บรักษาไว้ใช้ได้ที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}\text{C}$ ไม่เกิน 1 สัปดาห์)	

จากนั้นเพิ่มปริมาตรของสารละลายพลาสมิดเวกเตอร์จากข้อ 3.10.1.2 ให้มีปริมาตร 40 ไมโครลิตร ตามที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด แล้วทำส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-)/EcoRI 1-5 ไมโครกรัม	40 ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์	5 ไมโครลิตร
Alkaline phosphatase 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50 ไมโครลิตร
บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Alkaline phosphatase ที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตรเท่าเดิมลงไปอีกครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C}$ ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนี้สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนด้วยเอทานอลตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.2 สุดท้ายละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายดีเอ็นเอได้และน้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้น)	

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.10.1.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ในข้อ 3.10.1.3 ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต ดังแสดงในข้อ 3.7.3

### 3.10.2 คัดเลือกทรานสเฟอร์แมนที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลิน

คัดเลือกทรานสเฟอร์แมนที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลินด้วยวิธี Dot blot hybridization ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.4. แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม DOX จากข้อ 3.9.3 ด้วยวิธีการและขั้นตอนตามที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.4.3 เมื่อคัดเลือกกลุ่มโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้แล้วก็นำกลุ่มโคลนมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลน แล้วนำไปทำ Dot blot hybridization ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามไปตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ที่จุดจำบริเวณที่โคลน (cloning site) เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกออกจากพลาสมิดเวกเตอร์ จากนั้นนำไปทำ Southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3

เมื่อคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.9 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบางส่วนที่อยู่ข้างเคียงทรานสไปซอน Tn5 ที่ทราบข้อมูลแล้วก่อนหน้านี้ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนได้มาจาก primer walking บางส่วนได้มาจากการสืบโคลนและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกครบถ้วนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาแผนผังการตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยละเอียด รวมทั้งหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลินโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และรวมไปถึงการหาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็กรอบอ่านรหัสเปิดโดยเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX

## บทที่ 4

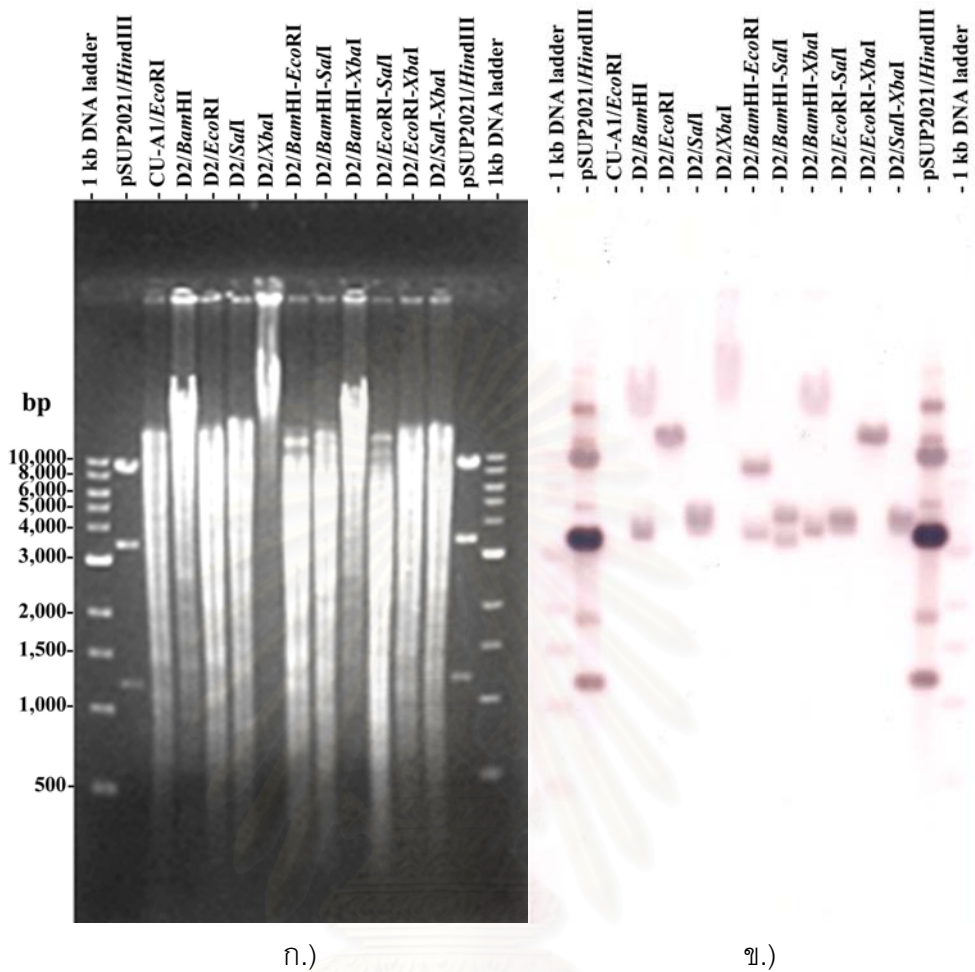
### ผลการทดลอง

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้กลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน ได้สายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน และศึกษาความสามารถในการเจริญในแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่าสายพันธุ์กลาย D2 ไม่สามารถเจริญในอะซีแนพริลีน และเนพธาไลน์ แต่สามารถเจริญในอะซีแนพโรควิโนน และกรดเนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก น่าจะเกิดจากการสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn5 ที่ยื่นประมวลรหัสไดออกซิจีเนส

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน จากสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน ด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชัน โดยใช้ตัวติดตามทรานสโปซอน Tn5

#### 4.1 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

ติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่สอดแทรกอยู่ในดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 โดยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับตัวติดตาม Tn5 ทำการไฮบริไดซ์ในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) กับดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ตามที่ได้บรรยายในข้อ 3.6.2.3 ผลไฮบริไดเซชันเป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์ต่างกัน ในขณะที่สายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งไม่มีทรานสโปซอนอยู่ไม่ให้เกิดสัญญาณการไฮบริไดซ์ ส่วนพลาสมิด pSUP2021 ที่ตัดด้วย *Hind*III จะให้สัญญาณเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่นำไปใช้สร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5



รูปที่ 4.1 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ชนิดต่างๆ ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม ทรานสโปซอน Tn5

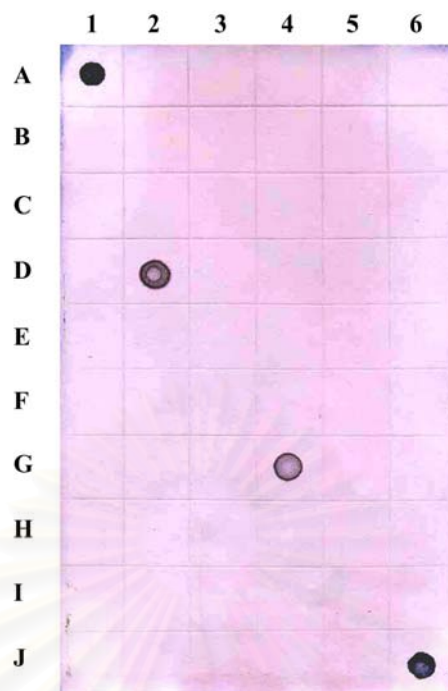
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#### 4.2 โคลนขึ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 ทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่ เลือกชนิดเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอสายพันธุ์กลาย D2 ที่ให้สัญญาณขนาดที่เหมาะสมในการโคลน ได้แก่ *Bam*HI และ *Eco*RI ซึ่งจะให้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 7 กิโลเบส มาโคลนเข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตามวิธีการดังกล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$

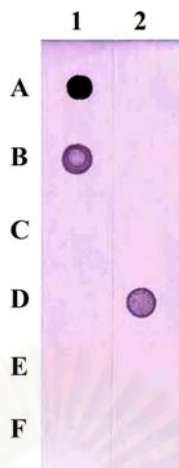
การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่ทำได้โดยคัดเลือกด้วยวิธี Blue/White selection โดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 560 โคลน จากนั้นสุ่มผสมโคลนทั้งหมด 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5 ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.4.3 ผลสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.2 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีขึ้น ดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างกลุ่ม D2 และ G4



รูปที่ 4.2 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ กลาย D2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5

ช่องที่ A1 และ J6	พลาสมิด pSUP2021 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 และ J5	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-J4	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม

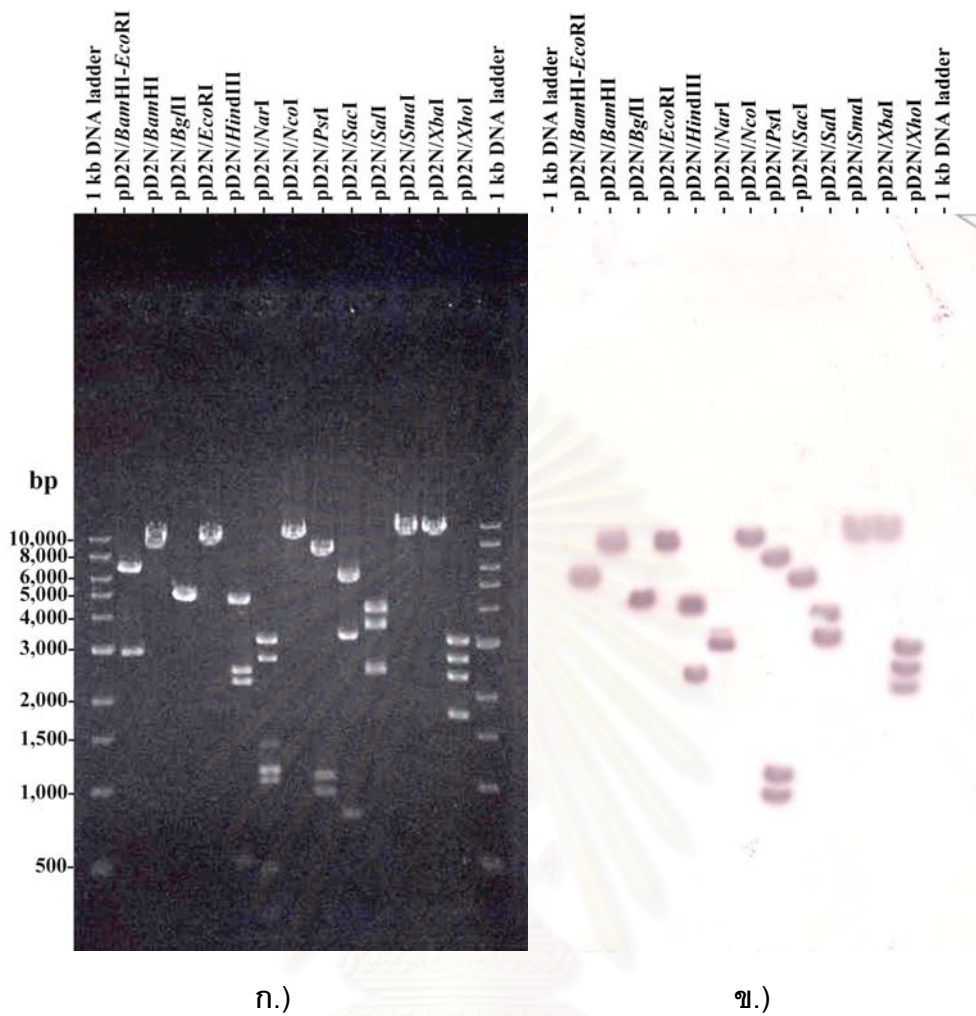
คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D2 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ B1 และ D2 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงเลือกโคลน D2 มาศึกษา และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pD2N ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D2 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5

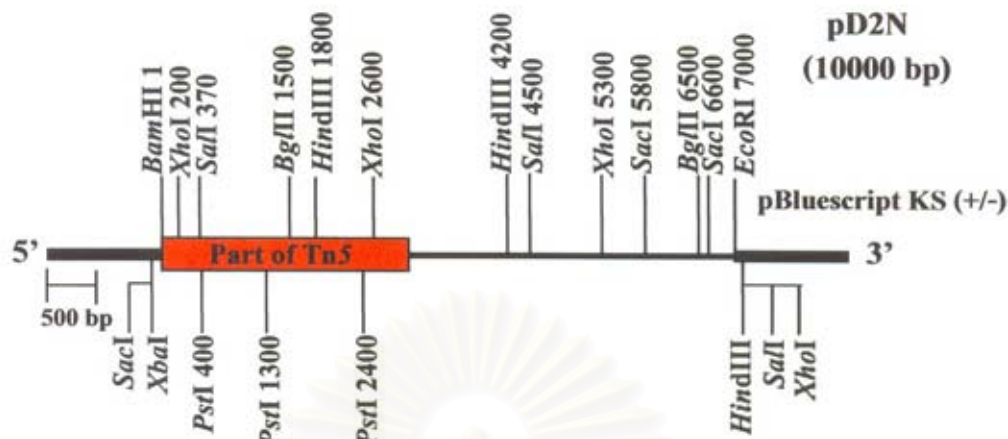
ช่องที่ A1	พลาสมิด pSUP2021 (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ B1-F2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม D2

จากนั้นตัดพลาสมิด pD2N ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Eco*RI และเอนไซม์ *Xba*I/*Eco*RI และเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทำเซาท์เธอร์นไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5 เพื่อระบุตำแหน่งการตัดเอนไซม์และตำแหน่งดีเอ็นเอติดตามบนชิ้นดีเอ็นเอดังแสดงในรูปที่ 4.4 และยังเป็น การยืนยันโคลนด้วยเซาท์เธอร์นไฮบริไดซ์โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม Tn5 โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นใน ส่วน ดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) ที่ถูกตัดออกจากตำแหน่งโคลน (cloning site) ของพลาสมิด pBluescript KS (+/-) ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Eco*RI ขนาดประมาณ 7.0 กิโลเบส จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างแผนที่เอนไซม์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.4 ก.) อะกาโรสเจลของพลาสมิด pD2N ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อระบุตำแหน่งการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม Tn5

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pD2N

#### 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนโดยใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn5 (TN5-OE primer) ซึ่งมีทิศทาง 5' → 3' ออกจากทรานสโปซอน ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงในรูปที่ 4.6 เมื่อนำไปเทียบความเหมือน (homology) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX ซึ่งจะทำให้การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน ผลแสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโน  $\alpha$  subunit ของไดออกซิจีนเนสที่ถอดรหัสมาจาก *dbdCa* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W เท่ากับ 69% (Accession NO.AB121977.1) ซึ่งสามารถย่อยสลายไดเบนโซโทอิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

      10          20          30          40          50
5' TTGTGTATAA GAGTCAGCTA CATGACGATC CTCGGGCCGA AAGTGACCGA
                                     DOXF primer→
      60          70          80          90          100
ATACCTGACT GCCGGACCGG CCTATGAGGA AGCGACGCGC CGCCTGGGCA
      110         120         130         140         150
AGTCGCGGAC CGATGTACAC TTGTGTCACT GCAACATTTT CCCGAATCTG
      160         170         180         190         200
TCGTTCCTGG CAGGAATCAA CACGGTCCGC ATGTGGCAGC CACGCGGCC
      210         220         230         240         250
CAACGAGATC GAGGTCTGGA CCTTCACCGT GGTGGACAAG ACCGCCCCGG
      260         270         280         290         300
CCGAGATCAA GGAAGAATGG AGCCGCAACG TTTCGCGCAC CTTCTCGGCA
      310         320         330         340         350
GGTGGCGTGT TCGAGCAGGA CGATGGCGAG AACTGGTGC GACATCCAGCA
      360         370         380         390         400
GGTGCTGAAG GGGCACGTCG CCCAGCAGCA GAAGTTCAAC ATCGAGATGG
      410         420         430         440         450
CCTCTCACAC GATTACGACC GAGAATCCCG AGGGCTTTCC TGGGATCAGC
      460         470         480         490         500
TTCGCGTACA CCTATGGTTG AGGAATCGGC ACGCGGAATG TATCGCTACT
                                     ← DOXR primer
      510         520         530         540
GGACGCAGAT CATGACAGCC CCGGACTGGC CCTCCATCCG 3'

```

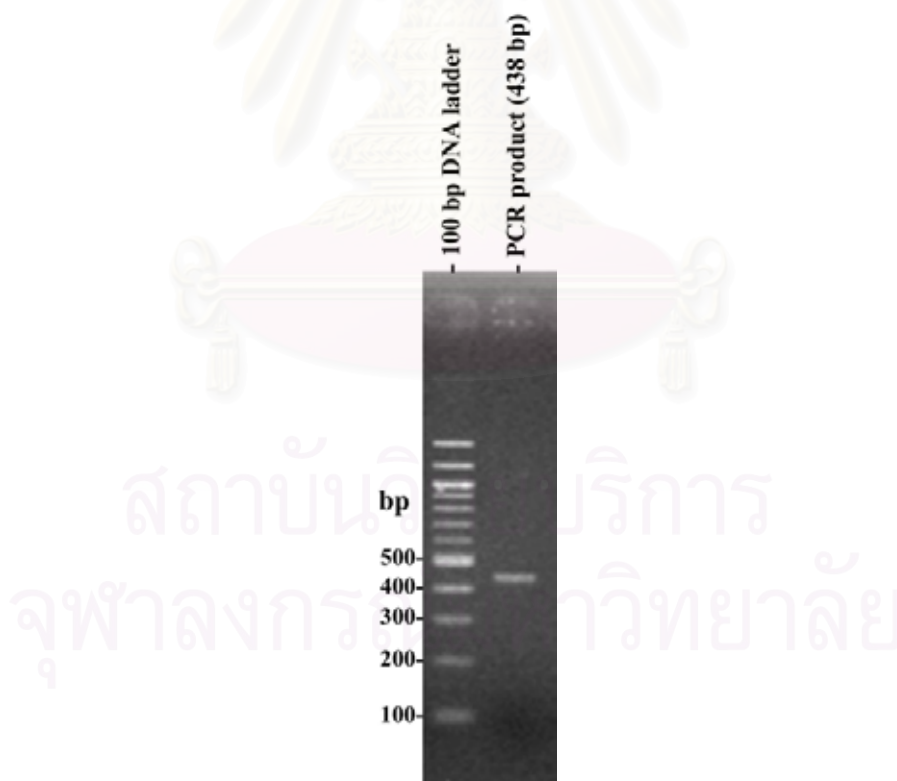
รูปที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นอักษรหนาแสดงถึงส่วนที่เป็นทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรปกติคือ ดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างดีเอ็นเอติดตาม DOX และลูกศรแสดงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.4 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธินด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน

4.4.1 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิน

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 สามารถนำมาใช้ในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอดังกล่าวโดย forward primer ตั้งชื่อว่า DOXF และ reverse primer ตั้งชื่อว่า DOXR โดยบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.6 จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.9.2 โดยใช้พลาสมิด pD2N ที่มีส่วนของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ดังกล่าวเป็นแม่แบบ ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) มีขนาด 438 bp ตามที่คาดหมายดังแสดงในรูปที่ 4.7 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการติดฉลากด้วย DIG ตามขั้นตอนและวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.1 ตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่าดีเอ็นเอติดตาม DOX (DOX-probe)

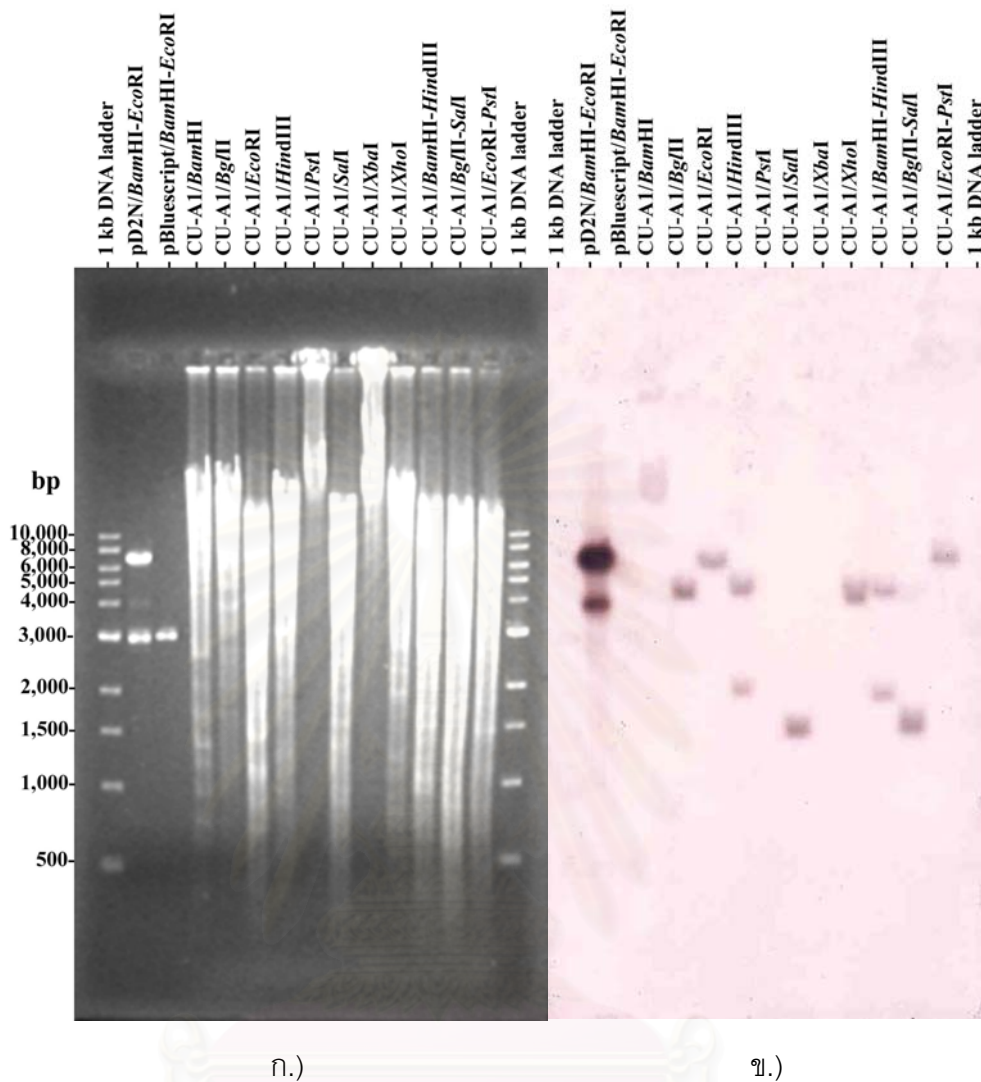


รูปที่ 4.7 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม

4.4.2 ไฮบริดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน (DOX-probe)

หาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน โดยนำดีเอ็นเอติดตาม DOX มาไฮบริดซ์ในสภาพความเข้มข้นสูง (high stringency) กับดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ผลการไฮบริดซ์เป็นดังที่แสดงในรูปที่ 4.8 พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เกิดสัญญาณจากการไฮบริดซ์ขนาดต่างๆ กัน ในขณะที่พลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Eco*RI (ตัวควบคุมผลลบ) ไม่ให้สัญญาณการไฮบริดซ์ และพลาสมิด pD2N ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Eco*RI (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณเฉพาะส่วนแทรกสอดขนาดประมาณ 7.0 กิโลเบส



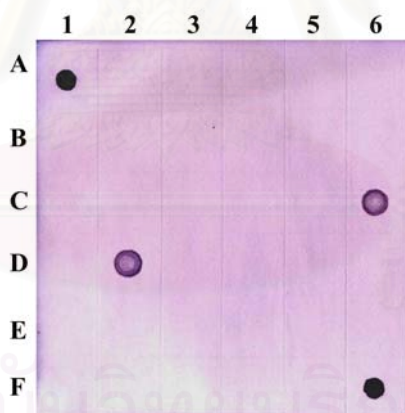


รูปที่ 4.8 ก.) อดกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ต่าง ๆ ข.) สัญญาณจากเซาท์เทอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX

#### 4.5 โคลนขึ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน

ผลไฮบริโดเซชันที่ได้ในข้อ 4.4 ทำให้ทราบตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในบริเวณที่ศึกษาอยู่ดังกล่าว ซึ่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้สัญญาณที่แตกต่างกัน ในที่นี้คัดเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 5.9 กิโลเบส เพื่อการโคลนโดยการเชื่อมดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ายังพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตามวิธีการในข้อ 3.10.1 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$

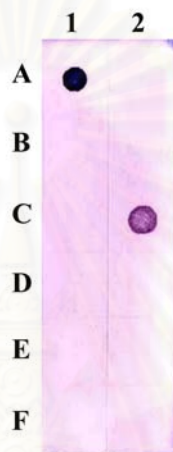
สำหรับวิธีการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในบริเวณดังกล่าวทำได้โดยขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 4.2 จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX ตามวิธีการในข้อ 3.7.4.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริโดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.9 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างกลุ่ม C6 และ D2



รูปที่ 4.9 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX

ช่องที่ A1 และ F6	พลาสมิด pD2N (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2 และ F5	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ A3-F4	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนผสม

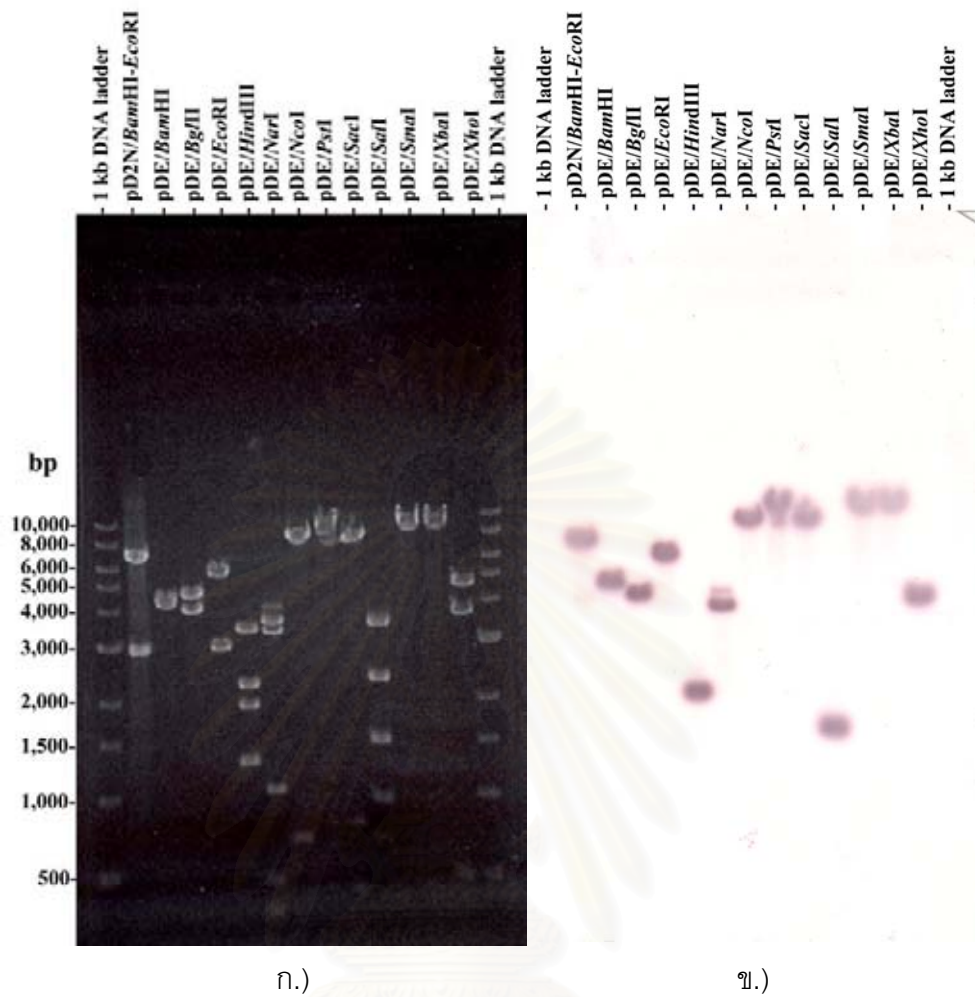
คัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม C6 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาคัดแยกให้ได้โคลนที่ต้องการ โดยแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX อีกครั้งตามวิธีการที่ได้กล่าวแล้วใน 3.7.4.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.10 ตามสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่าโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) คือ C2 ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pDE



รูปที่ 4.10 Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม C6 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX

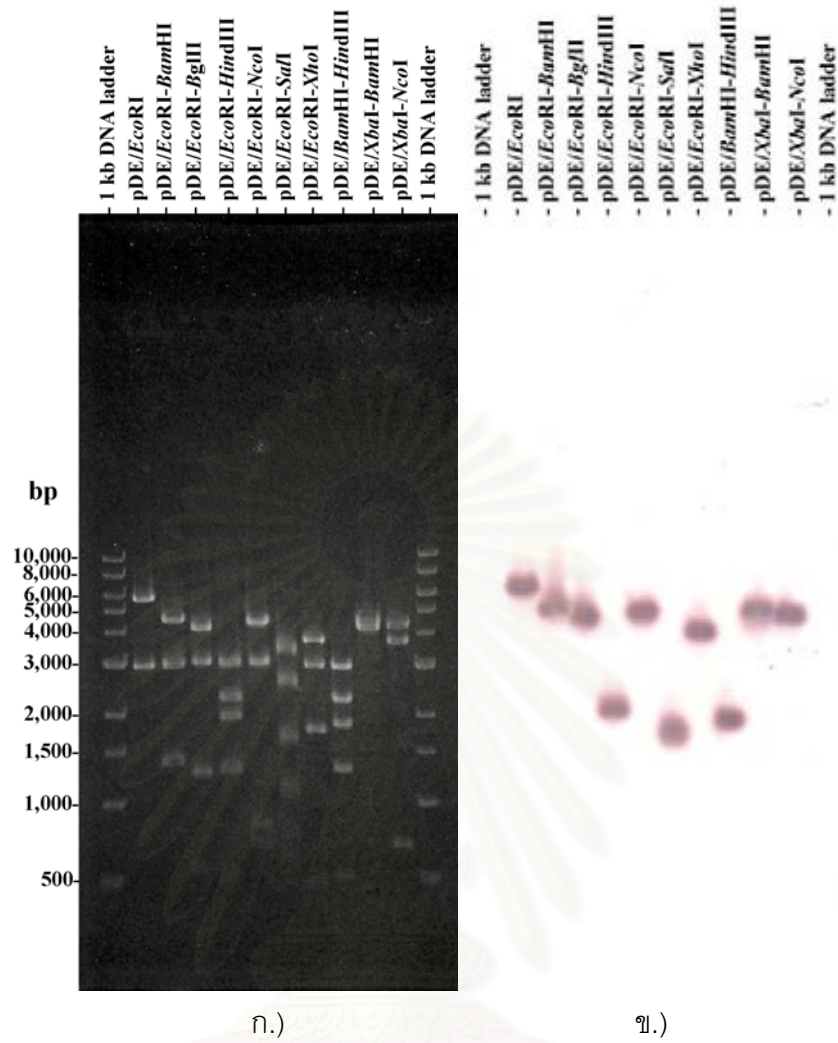
ช่องที่ A1	พลาสมิด pD2N (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องที่ A2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องที่ B1-F2	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนจากตัวอย่างกลุ่ม C2

จากนั้นตัดพลาสมิด pDE ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และเอนไซม์ *XbaI* ชนิดต่างๆ และทำเซาท์เธอร์นไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX เพื่อระบุตำแหน่งเอนไซม์และตำแหน่งดีเอ็นเอติดตามบนชิ้นดีเอ็นเอดังแสดงในรูปที่ 4.11 และ 4.12 และยังเป็นที่ยืนยันโคลนด้วยเซาท์เธอร์นไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นในส่วนดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) ที่ถูกตัดออกจากตำแหน่งโคลน (cloning site) ของพลาสมิด pBluescript KS (+/-) ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ขนาดประมาณ 5.9 กิโลเบส นอกจากนี้นำไปสร้างแผนที่เอนไซม์ภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 4.13

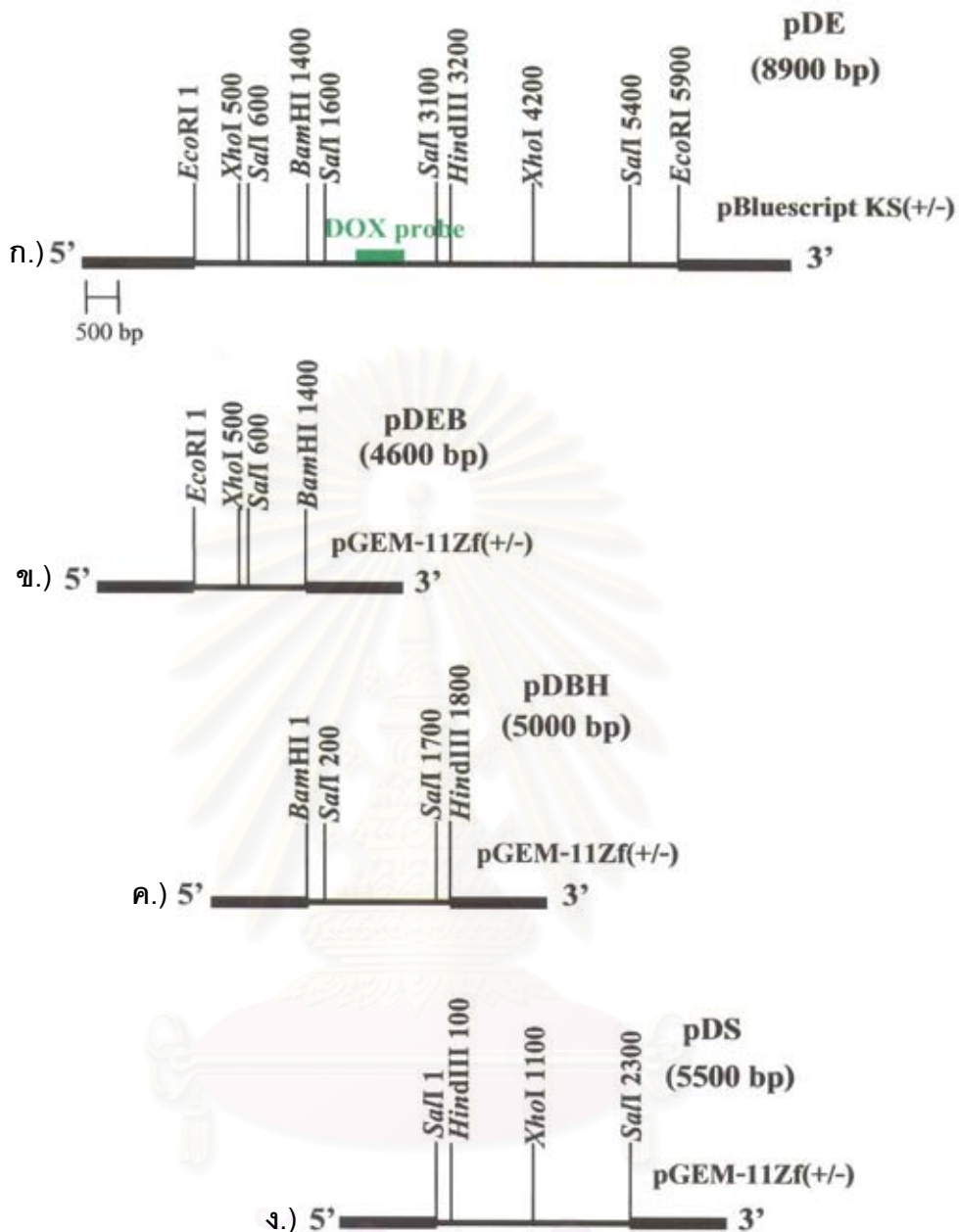


รูปที่ 4.11 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pDE ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เดี่ยวชนิดต่างๆ เพื่อหาดำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pDE ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์คู่ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.) สัญญาณจาก เซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม DOX



รูปที่ 4.13 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pDE และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม DOX ในบริเวณขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสับโคลนขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pDE เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pDEB (ข.) pDBH (ค.) และ pDS (ง.)

#### 4.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแวนพิลีนจากพลาสมีด pDE

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมีดพาหะในรีคอมบิแนนท์พลาสมีดของสับโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมีด

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมีด pDE ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 5891 bp ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.14 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank (ภาคผนวก ค) ได้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 434 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับ  $\alpha$  subunit ของไดออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *dbdCa* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 76% ให้ชื่อ ORF1 ว่า *acnAc*

2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 185 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับ  $\beta$  subunit ของไดออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *dbdCb* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 60% ให้ชื่อ ORF2 ว่า *acnAd*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 101 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับเพอร์ริดอกซินของไดออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *dbdCc* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 71% ให้ชื่อ ORF3 ว่า *acnAb*

4. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 277 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับไดไฮโดรไดออกซิไดไฮโดรจีเนส (dihydrodiol dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดย *dbdD* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 67% ให้ชื่อ ORF4 ว่า *acnB*

5. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 466 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดย *phnF* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 65% ให้ชื่อ ORF5 ว่า *acnF* ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัสที่ตำแหน่งสุดท้ายของ ORF

พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ และตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.15 จากรูปนอกจากจะแสดงบริเวณจุดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกของ พลาสมิดี pDE โดยสมบูรณ์แล้วยังได้แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่เป็น ORF ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและแสดงตำแหน่งที่ทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดในสายพันธุ์กลาย D2 ด้วย

นอกจากนี้ยังนำลำดับกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (*acnAc*) และกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (*acnAd*) มาสร้าง phylogenetic tree ใช้โปรแกรม Clustal W version 1.6 ทำ multiple alignment และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.572c (SEQBOOT, NEIGHBOR และ CONSENSE) ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ



1 5' GAATTCCTCGGCACCCGCATGGTATTCCACACCGGGTAGTCCACATATGCGGTTTCGAG  
61 GTTCAGCGCGGCGAGGGGCGGATAGGCCGCCATAATCGCGTCGCGGCTGTGAAACAGCGC  
121 GGCCAGAAGCGCCTTGACTCGTTCGTTCGGGAACATGCGCGCCGACCACCAGCACATTGTC  
181 CCAGGTGAGCATCATGATTGGCTTCTCGACGCCGACCCGAACCGGCGGGCGTACTTC  
241 CGTGAAATAGTAGGTTCGGCCGATGCTTGCACCGCTGCTAAGGCCGCTCGCCCGAGGC  
301 AACTTCCAGGAAGCGGACCCCGCCGACTGAGGCGCCGACTTCGGCCACCTTCGGCCCGCC  
361 CACCGCGAAAAAGGCAGCATCCGTCTGCCCCGAAACAAGCGCGTCGGCTCCGCGGATGAG  
421 TTCGGGCATCGGCACGCCGACCACTTCGTCATAGCTGATCCCGTCGGCTCGAGCAGCGC  
481 GCTCACCAAGTGGGCGGTTGAGCGGAAACGCCTCCCAACCGGAGGGCACACGCATACCCTT  
541 GAGGTCGGACACGCGAATCATTTTTCGAGTCGGCTCGCACGAAAAGCCCGACCGGGAAGGA  
601 ATTGATCCGGCCACGACCCGCGAGTTCGGCATCGCGCCGAATATTCGCCGACCCGTC  
661 GACTGCGGTGATCACATCGTTGATATCATTCAGCGAATACTCGGCCAGCGCGTCGTTGAC  
721 GGCCTGCATCATCTGGCTGTTGCCGCCATAGGGCTGAACAACCAGCCTGCCACCGTCGGC  
781 CTTGCGGGCCTCGGCGGGATGACCGACGCCATGGTGTTCATACAGAACCAGCGGGCGG  
841 GGTGCAATCGCCTCAACCTGCGCAGAAGCATTGCCTGACACCAGACACGCAAAAATTGC  
901 GACCGTCGAAAGTCGTGCCGAAAACAGCTTGCTCATTTTTCATCCTCCCTTGTGTCGAT  
961 GCGCTGGTCTGGATCTTACCTCCCTGCCAGTCCGGCAAAAGAATGTTATCCAGATTTAG  
1021 AAAATTGAAAGCATGCTTTTTTTTTATTGCCGAGATTTTCAGAATGCGATAACAAGCTGTG  
-35  
1081 GAGCTTGGGGATCGCGGAGGGGCTGTTTGGTCCCAGGCCAATTTTTGTTCCAACGGGAGG  
-10 RBS  
1141 AAGTTCAAATGAATGCCAGTGTGCAGGGCGCTTTGCGCTCATACTCCGACGCCGAAATTC  
ORF1 (*acnAc*) →  
1201 TCGGGATGATTGACGAGAAAGCCGGAGTCTACAATCCGAAGATCTACACGGACGAATCGC  
1 M I D E K A G V Y N P K I Y T D E S L  
1261 TCTACAAGCTTGAAGTGGAGCGCATCTTCGCCCCGACCTGGGTCTGCATGGGCCATGAGT  
20 Y K L E L E R I F A R T W V C M G H E S  
1321 CGCAGATTGCCAAGCCGGGTGACTTCATCACGGCTACATCGGCGAGGATCCTGTCGTCG  
40 Q I A K P G D F I T A Y I G E D P V V V  
1381 TGTCGCGGCAGAAGGATGGAAGCATTGCGGTGTTCTGAACCAGTGTTCGGCATCGCGGTA  
60 S R Q K D G S I R V F L N Q C R H R G M  
1441 TGCGCATCTGCCGCGCCGACTCTGGCAATGCGAAGGCGTTACCTGCACCTACCATGGCT  
80 R I C R A D S G N A K A F T C T Y H G W  
Rieske [2Fe-2S] binding motif  
1501 GGGCCTACAACCAGGGCGGCGAACTTGTGTCAGTGTCCCAGTGGAGCAGGAAGCCTTCGGTG  
100 A Y N Q G G E L V S V P M E Q E A F G G

(มีต่อหน้าถัดไป)

1561 GCTGCCTGAACAAGAAGGAGTGGGGCCCGAAGCAGGCGGGGTCGACACCTACAAGGTC  
 120 C L N K K E W G P K Q A R V D T Y K G L

1621 TGATCTTCGCGAACTGGGATGCTGAAGCTCCATCGCTTGACGAGTATCTGGGCGAGCCA  
 140 I F A N W D A E A P S L D E Y L G E A K

1681 AATTCTACATGGACATCATGCTCGACCGCTGCGAGGGCGGCACAGAGGCGGTGCCCGCA  
 160 F Y M D I M L D R C E G G T E A V P G I

1741 TCCAGAAGTGGGTCATCCCCTGCAACTGGAAGTTCGCTGCCGAGCAGTTTGGCTCGGATG  
 180 Q K W V I P C N W K F A A E Q A A S D A

1801 CCTACCACGCCGGCAGACCTCACATCTGTCCGGCATCATGGCGGGCGTGCCGGACGACG  
 200 Y H A G T T S H L S G I M A G V P D D V  
 mononuclear Fe<sup>2+</sup> binding motif

1861 TGGATCTGTCGAGGTGCGACCCGCCACCACGGGGCTGAACGTCCACATGTGCAACGCC  
 220 D L S Q V A P P T T G L N V H M S N G H

1921 ACGGCTGCGGCTGTTCTTGCGCAACCCGATGTTCTACATGACGATCCTCGGGCCGAAAG  
 240 G C G L F L R N P M F Y M T I L G P K V

1981 TGACCGAATACCTGACTGCCGGACCGGCCTATGAGGAAGCGACGCGCCGCTGGGCAAGT  
 260 T E Y L T A G P A Y E E A T R R L G K S

2041 CGCGGACCGATGTACACTTGTGTCACTGCAACATTTTCCCGAATCTGTGCTTCCCTGGCAG  
 280 R T D V H L C H C N I F P N L S F L A G

2101 GAATCAACACGGTCCGCATGTGGCAGCCACGCGGCCCAACGAGATCGAGGTCTGGACCT  
 300 I N T V R M W Q P R G P N E I E V W T F

2161 TCACCGTGGTGGACAAGACCGCCCCGGCCGAGATCAAGGAAGAATGGAGCCGCAACGTTT  
 320 T V V D K T A P A E I K E E W S R N V S

2221 CGCGCACCTTCTCGGCAGGTGGCGTGTTCGAGCAGGACGATGGCGAGAACTGGTGCAGCA  
 340 R T F S A G G V F E Q D D G E N W C D I

2281 TCCAGCAGGTGCTGAAGGGGCACGTGCGCCAGCAGCAGAAGTTCAACATCGAGATGGCCT  
 360 Q Q V L K G H V A Q Q Q K F N I E M A S

2341 CTCACACGATTACGACCGAGAATCCCGAGGGCTTTCCCTGGGATCAGCTTCGCGTACACCT  
 380 H T I T T E N P E G A P G I S F A Y T Y

2401 ATGGTGAAGGAATCGGCACGCGGAATGTATCGCTACTGGACGAGATCATGACAGCCCCGG  
 400 G E E S A R G M Y R Y W T Q I M T A P D

2461 ACTGGCCCTCCATCCGCGAGATCAAGCCGCTTCCGGTTGCGGCGGAATTAACGCTCCACTG  
 420 W P S I R E I K P L P V A A E \*

2521 GCGGCGACAGTTCGCTGACTAGTCAGATAGTCAGCCGGAATGCCCGGCAGGCACCATAAT

RBS                      ORF2 (*acnAd*) →

2581 GCATTGGGAGGAAACCATGCTCGATACTACCTTCAAAACCGCCTTTGAGCGCAAGCCGAA  
 1 M L D T T F K T A A E R K P K

2641 GACCGTTTCCCTTGAGCTTTCAGCACGAGGTGGAACAATTCTGTACTGGGAGACTAAGCT  
 16 T V S L E L Q H E V E Q F L Y W E T K L

2701 GCTGACGGATCGCCGTTACGAGGAATGGTTCGGCCTTCTCGCTTCGGATCTGCGCTATTG  
 36 L T D R R Y E E W F G L L A S D L R Y W

(มีต่อหน้าถัดไป)

2761 GATGCCGATACGCTCGACCAGGATCATGCGCGAAGTCGCTCAGGAATACACCGACGAGAA  
 56 M P I R S T R I M R E V A Q E Y T D E N

2821 CGGCTTCGCCCATTTTGACGACAACCTGGCACACGATGAAGGGCCGGATCAAGAAGATCAT  
 76 G F A H A D D N W H T M K G R I K K I M

2881 GTCGGATGTGGGCTGGTCCGAGAACCCGGCCTCGCGTCTGCGGTATCTGGTCGGCAACGT  
 96 S D V G W S E N P A S R L R Y L V G N V

2941 GATGATCGTACCCGAGAGCGACAACGAGCTGAATGTCGTTTCCGCGATGATGATCTACCG  
 116 M I V P E S D N E L N V V S A M M I Y R

3001 CACGCGGCAGGAGCGTCACTGGACGTGTTTCGCTTTCGAGCGCCACGATGTGCTGCGTCG  
 136 T R Q E R Q L D V F A C E R H D V L R R

3061 CGTCGACAGCGAGGCCGGTTTCGAGATTGCGAGCCGTAAGGTTCTGGTGGATCAGAGCAC  
 156 V D S E A G F E I A S R K V L V D Q S T

3121 GATCCTGTGAAACAACCTCAGCTTCTTCTTCTGA TAGGGGGAAAAATGGCGTGGACAAAA  
 176 I L S N N L S F F F \* M A W T K

3181 GCTTTCCTTCGGCAGACCTGCCGGAGGGAGAAAATGAAACAATTTGCCGGGGCGGCAGAG  
 6 A F P S A D L P E G E M K Q A A G A A E

3241 CCGATCCTGATCTGCAAGCTGGGCGGCAAGGTGCACGCTGTTTCAGGATACCTGCACGCAC  
 26 P I L I C K L G G K V H A V Q D T C T H

3301 GACACCTGGTCGCTAGCAGATGGCTTCTGGAGGACGGGATCGTCGAGTGCAGCCTTCAC  
 46 D T W S L A D G A L E D G I V E C S L H  
**Rieske [2Fe-2S] binding motif**

3361 TTCGCAAAGTTCTGTGTAAGAACTGGTCAAGTTAAGGCGCTTCTGCCTGTGACGCCCTC  
 66 F A K F C V R T G Q V K A L P A C D A L

3421 AAGGTCTTCCAGCAAAAATCGAGAACGACTTTATCTACATCGACTGCTGATACAGAATT  
 86 K V F P A K I E N D A I Y I D C \*

3481 ACGAAAGCAAAGGGAGGAAAAGCAATGCAACTCAAGGATCAAGTCGCGCTCGTGACGGGC  
 1 M Q L K D Q V A L V T G

3541 GCGGGTCAGGTCTTGGTCGGGCCATTGTGAGCGATACGTGGAAGAGGGTGCACACGTC  
 13 G G S G L G R A I V E R Y V E E G A H V

3601 GCAATCTTCGATCGTTTCGACGAACGCATCGAAGAAGTTACGCGGGCGCTTGGCGGCAAG  
 33 A I F D R S H E R I E E V T R A L G G K

3661 GTCATTGGCATCGCCGGCGACGTGCGCGAGATGGCCGACAACAAGCGGGCAGTGGTTGAA  
 53 V I G I A G D V R E M A D N K R A V V E

3721 TGTGTGAAGGCTTTTGGCAAACCTTGATACCCTGGTCGGCAATGCCGGCGTCTGGGACTGG  
 73 C V K A A G K L D T L V G N A G V W D W

3781 TCGAAATCGTGGTGTCCACAGCGGACGATGCACTCGTCAGCGCCTTTGACGAGATGTTTC  
 93 S K S L V S T A D D A L V S A A D E M F

3841 GCGATCAACGTCAAAGTTACGTCCTTGCTGCCAAGGCGGCGTTGCCCGAGCTGTACAAA  
 113 A I N V K G Y V L A A K A A L P E L Y K

3901 TCCAAGGGGCAGATGATCTTACC GCCTCGAATGCATCGTTCTATCCTGGTGGCGGCGGC  
 133 S K G Q M I F T A S N A S F Y P G G G G

(มีต่อหน้าถัดไป)

3961 GTTCTCTACACCGCGACGAAACATGCCGTGGTCGGTATGATCAAGCAGATGGCGCACGAG  
 153 V L Y T A T K H A V V G M I K Q M A H E  
 4021 TTCGCGCCTCATGTGCGGGTTAACGGCGTCGCCCTGGCGGTATCGGCGGCAGCAACCTT  
 173 F A P H V R V N G V A P G G I G G S N L  
 4081 GCCGCGCATCGGTGCCCTTGGCCAGGCGGGACAGAAGTTCTCGGAGCTGCCGCTGAACGAC  
 193 A G I G A L G Q A G Q K F S E L P L N D  
 4141 CTGATGAAGCAGATGCTGCCGCTCGAGCGAGCGTTCCACGCTCGGGAATATGCCGGTGCA  
 213 L M K Q M L P L E R A F H A R E Y A G A  
 4201 TATGTGTTCTTCGCAAACCGCAAGGACAACCAGCCGGGAACCGGCGGCGTGCTGAACTTC  
 233 Y V F F A N R K D N Q P G T G G V L N F  
 4261 GATGGCGGTATCGGCATGCGTGGCTTCGCGTCCGCAAACATGGGCGCCGAACCTGGTCGAA  
 253 D G G I G M R G F A S A N M G A E L V E  
 4321 GCCTTCGGTAACGCCTTGAATCGGCCGGGGCAGTTTCGAACTCTGTTACCGGATCGAACCT  
 273 A F G N A \*  
 4381 GCTTCGGGGCTGATATGACCGACTGTCTTAGACCGGACCGAGCCGGTTGATGGCTGTTGC  
 4441 GCCCGCATGGCTACCGGGTGCGGGCATCGACAAACCAACAG**GGAGG**AAACGCA**ATGG**GATA  
 1 RBS ORF5  
M D T  
 (*acnF*) →  
 4501 CTTTGTCTATATCGACAACGAGGCGCGCGGCGGACTGACAACGAAACCTTCGCCCGCC  
 4 L L Y I D N E A R G A T D N E T F A R R  
 4561 GCTCGCCGGTGACCGGCGAGGTCGTCACCCAGGGGGCCGCGGCGAAGTCGGAGGATGCGC  
 24 S P V T G E V V T Q G A A A K S E D A L  
 4621 TTGCGGCGATCGATTCCGGCGCAGCGCGCATTTCGTGACTTGGTCCCAGACCGGTCCGGGCC  
 44 A A I D S A Q R A F V T W S Q T G P G Q  
 4681 AGCGTCGCGTGCTGCTGATGCGCGCCGCCGACGAGATCGAGAAGCGCACCGAAGACTTTG  
 64 R R V L L M R A A D E I E K R T E D A V  
 4741 TCGTCGCCATGAAGGGCGAGGTTGGCGCCGGCGAGCTCTGGGCGCGCTTCAACGTGATGC  
 84 V A M K G E V G A G E L W A R F N V M L  
 4801 TTGCGGCGAACGTGTTCCGCGAAGCCGCAGCAATGACCACGCAGATTTCAGGGGCGCACCA  
 104 A A N V F R E A A A M T T Q I Q G R T I  
 4861 TTCCCTCGGACAAGCCGGGTACGCTGTGATGACCGTGCGCCAGCCGGTTGGCGTAATCC  
 124 P S D K P G T L S M T V R Q P V G V I L  
 4921 TCTCGATCGTCCGTGGAACGGGCCGATCGTGCTGGCGGCGCGCCATCGCCTATCCGC  
 144 S I V P W N G P I V L A A R A I A Y P L  
 4981 TAATGTGCGGCAACACGGTCGTTTTCCGTGCCTCGGAAACCTCGCCCAAGACGCACGCCC  
 164 M C G N T V V F R A S E T S P K T H A L  
 5041 TGGTGGCAGAGGCAGTCTATGCCGAGAGTTCCCGGCCGGAACGCTGAACTTCGTGACCA  
 184 V A E A V Y A A E F P A G T L N F V T N  
 5101 ACGATCCGAAGGACGCCCCGAAGTCATCGAGACCATGATCGCCACCCGGCGGTGCGCC  
 204 D P K D A P E V I E T M I A H P A V R R

(มีต่อหน้าถัดไป)

```

5161  GCGTCAACTTCACCGGCTCGACCAACGTCGGCCGGATCATAGGCGAGAAATGCGGCCGCC
224    V N F T G S T N V G R I I G E K C G R H
      NAD+ binding fold

5221  ATCTCAAGCGGTGCATCCTGGAGCTTGGCGACAAGTCGCCGATGGTCTGCTGCGCGATG
244    L K R C I L E L G D K S P M V V L R D A
      Active site of aldehyde dehydrogenase

5281  CCGACATCGACGGCGCAGTGAACGCGACGATTTTCGGAGCCTTTCTCTACCAGGGACAGA
264    D I D G A V N A T I F G A A L Y Q G Q I

5341  TCTGCATGTCGACCGAGCGGGTCATCGTCGAGGAGCCGATCGCCGACGCCTTCGTAGAGA
284    C M S T E R V I V E E P I A D A F V E K

5401  AGCTTGCGGCACGCGCTGCCAGCTTCAGGCCGGCGACCCGCGCACCCAGGCCGCCTGCG
304    L A A R A A Q L Q A G D P R T Q A A C A

5461  CACTTGGCCCCGTCGTGAGCCAGGGTGCCGACAGCCGGCTAAACGCACTTCTTGACGACG
324    L G P V V S Q G A A D R L N A L L D D A

5521  CAGTCGCCAAGGGGGCGGAGCTCAGGTCCGGCGGTCACGCCGACCACACGCTGATGTCGG
344    V A K G A E L R S G G H A D H T L M S A

5581  CGACCGTGCTTGACGGTGTACCTCAAAGATGCGCATCTATTCCGAAGAAGCCTTCGGCC
364    T V L D G V T S K M R I Y S E E A F G P

5641  CCATCCTGCAAGTGATCCGGGTGAAGGACGCAGACGAGGCGGTGCACGTTGCCAACGACA
384    I L Q V I R V K D A D E A V H V A N D T

5701  CGGAATATGGTCTCTCGTCCGCCGTGTTCCGGTACCGACATGACCCGTGCGCTCGATGTGG
404    E Y G L S S A V F G T D M T R A L D V A

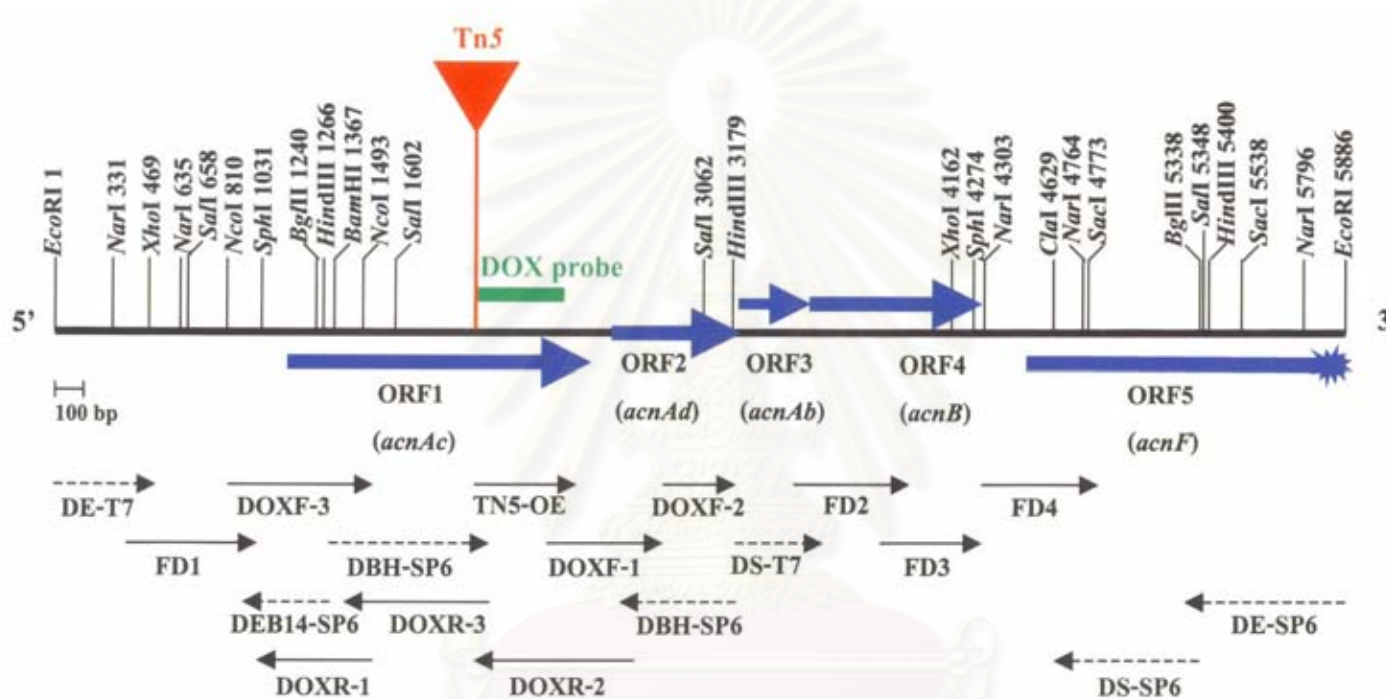
5761  CGATGCGCATCCAGACCGGTTCTGTCCACATTAACGGCGCCACCGTCGCCAACGAGGCGC
424    M R I Q T G S V H I N G A T V A N E A Q

5821  AGGCTCCTTATGGTGGGACCAAGGCAAGTGGGTGGGGTCGTTTTCGACAGCCAGGCTGTGA
444    A P Y G G T K A S G W G R F D S Q A V I

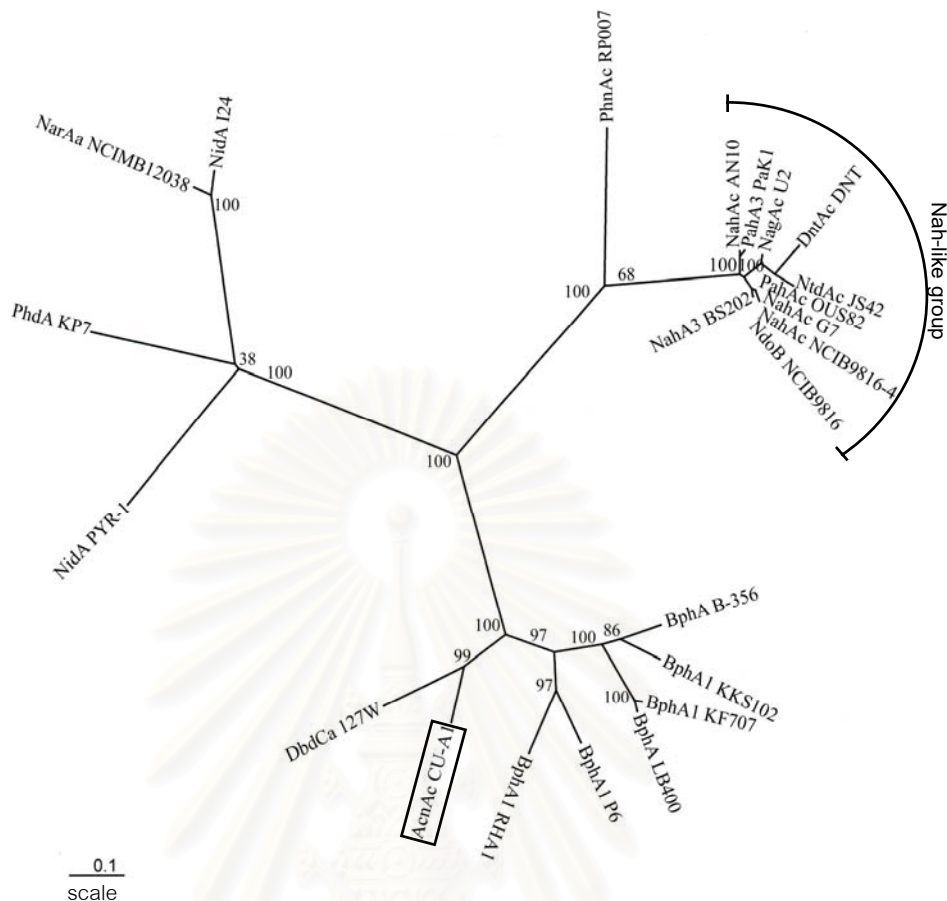
5881  TCGAGGAATTC 3'
464    E E F

```

รูปที่ 4.14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pDE ขนาด 5891 bp ลูกศรแสดงทิศทาง การถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน ตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย \* แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ตำแหน่ง -35 และ -10 เป็นบริเวณโปรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาเป็น putative ribosome binding site (RBS) กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดเดียวกันแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงินและกรดอะมิโนที่อยู่ต่างกรอบอ่านรหัสเปิดแสดงด้วยอักษรสีแดงและสีเขียว กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม



รูปที่ 4.15 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pDE ขนาด 5891 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม DOX ตำแหน่งสอดแทรกของทรานสโปซอนในสายพันธุกรรม D2 และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pDE ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตัวต่างๆตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย  $\longrightarrow$  เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ  $\dashrightarrow$  เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย  $\star$  แสดง ORF ที่ยังไม่สมบูรณ์



รูปที่ 4.16 Phylogenetic tree ของ AcnAc จากการ alignment เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัส  $\alpha$  subunit ของไดออกซิจีเนส 23 ชนิด Bootstrap analysis 100 replicons. ตัวอักษรในวงเล็บแสดง GenBank accession number. BphA, *Comamonas testosteroni* B-356, (U47637); BphA1, *Pseudomonas* sp. KKS102, (D17319); BphA, *Burkholderia cepacia* LB400, (M86348); BphA1, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, (M83673); BphA1, *Rhodococcus globerulus* P6, (X80041); BphA1, *Rhodococcus* sp. RHA1, (D32142); PhnAc, *Burkholderia* sp. RP007, (AF061751); NahA3, *Pseudomonas putida* BS202, (AF010471); NdoB, *Pseudomonas putida* NCIB9816, (M23914); NahAc, *Pseudomonas putida* NCIB9816-4, (U49496); NahAc, *Pseudomonas putida* G7, (M86949); PahAc, *Pseudomonas putida* OUS82, (AB004059); NagAc, *Ralstonia* sp. U2, (AF036940); NtdAc, *Pseudomonas* sp. JS42, (U49504); DntAc, *Burkholderia cepacia* DNT, (U62430); NahAc, *Pseudomonas stutzeri* AN10, (AF039533); PahA3, *Pseudomonas aeruginosa* PaK1, (D84146); NidA, *Rhodococcus* sp. I24; (AF121905); NarAa, *Rhodococcus* sp. NCIMB12038, (AF0822663); PhdA, *Nocardioideis* sp. KP7, (AB017794); NidA, *Mycobacterium* sp. PYR-1, (AF249301); DbdCa, *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W, (AB121977.1)





## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนจากการติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่แทรกสอดเข้าไปในจีโนมดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ปักพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน โดยเทคนิคไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 (Tn5 probe) ในสภาวะความเข้มข้นสูง จากนั้นโคลนขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI/*Eco*RI ขนาดประมาณ 7 กิโลเบส ที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามจากสายพันธุ์กลาย D2 เข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตั้งชื่อพลาสมิดว่า pD2N หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอแทรกสอดพลาสมิด pD2N โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn5 (TN5-OE primer) โดยมีทิศทาง 5'→3' ออกจากขึ้นทรานสโปซอน ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เมื่อนำไปหาความเหมือน (homology) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX ซึ่งจะแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนของ  $\alpha$  subunit ของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่ถอดรหัสมาจาก *dbdCa* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) ในวิถีการย่อยสลายไดเบนโซโทโอฟิน ดังนั้นขึ้นดีเอ็นเอดังกล่าวของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ D2 จึงน่าจะเป็นส่วนหนึ่งของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ดังกล่าว ได้สร้างดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์นี้โดยออกแบบ forward primer (DOXF) และ reverse primer (DOXR) และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้พลาสมิด pD2N เป็นแม่แบบนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ซึ่งมีขนาด 438 bp มาติดฉลากด้วย DIG เพื่อนำไปใช้เป็นตัวติดตามยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนส (ดีเอ็นเอติดตาม DOX หรือ DOX-probe) ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ติดตามตำแหน่งของยีนดังกล่าวภายในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม DOX โคลนขึ้นดีเอ็นเอ *EcoRI* ซึ่งให้สัญญาณไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม DOX ขนาดประมาณ 5.9 กิโลเบส เข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) และตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pDE ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งสองสายในพลาสมิด pDE โดยใช้วิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของสับโคลน นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5891 bp ไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX

เมื่อนำกรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม BlastX มาพิจารณาพร้อมกับตำแหน่งจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) สามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 4.15 ประกอบ)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) หรือ *acnAc* ลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ  $\alpha$  subunit ของไดออกซีจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *dbdCa* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) ที่สามารถย่อยสลายไดเบนไซโทไธโอพีนเท่ากับ 76% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ Rieske [2Fe-2S] คือ  $CX_1HX_{15-17}CX_2H$  (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) (Mason และ Cammack, 1992) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 74-97 ของ ORF1 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้  
**CRHRGMRICRADSGNAKAFTCTYH**

นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนบริเวณ catalytic domain ซึ่งจับ  $Fe^{2+}$  ที่บริเวณเร่ง คือ  $DX_2HX_{4-5}H$  (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) (Jiang และคณะ, 1996) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 198-207 ของ ORF1 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้  
**DAYHAGTTSH** และคล้ายกับกรดอะมิโนบริเวณ catalytic domain ซึ่งจับ  $Fe^{2+}$  ที่บริเวณเร่งของ แนนพาลีนไดออกซีจีเนสของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIB9816-4 คือ **DAYHVGWTH** (Kauppi และคณะ, 1998)

จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ *acnAc* ดังแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่า *acnAc* อาจจัดเป็นเป็นไดออกซีจีเนสชนิดใหม่ซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในการออกซิโดสอะซีแนพริลีนไปเป็น ซิส-อะซีแนพริลีน-1,2-ไดออล โดย *acnAc* มีความคล้ายกับยีนในกลุ่มที่ย่อยสลายไปฟีนิล เช่น *bphA1* ของ *Rhodococcus* sp. RHA1 มากกว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* ที่ย่อยสลายแนนนพาลีนและฟีแนนทรีน เช่น *nahAc* ของ *Pseudomonas* sp. G7

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือ *acnAd* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ  $\beta$  subunit ที่ประมวลรหัสไดออกซีจีเนสโดย *dbdCb* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 60% จึงเป็นไปได้ว่า *acnAd* น่าจะเป็นหน่วยหนึ่งของระบบเอนไซม์ไดออกซีจีเนส

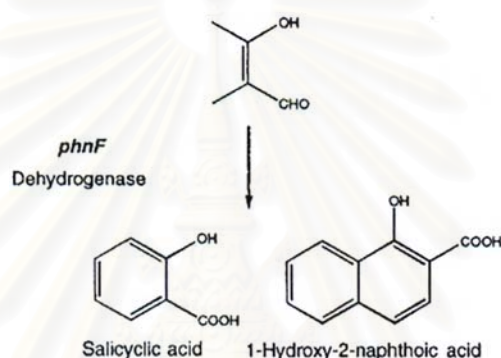
จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของ *acnAd* ดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่า *acnAd* อาจจัดเป็นเป็นไดออกซีจีเนสชนิดใหม่ซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในการออกซิโดสอะซีแนพริลีนไปเป็น ซิส-อะซีแนพริลีน-1,2-ไดออล โดย *acnAd* มีความคล้ายกับยีนในกลุ่มที่ย่อยสลายไปฟีนิล เช่น *bphA2* ของ *Rhodococcus* sp. RHA1 มากกว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* ที่ย่อยสลายแนพธาดีนและพีแนนทรีน เช่น *nahAd* ของ *Pseudomonas* sp. G7

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือ *acnAb* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเฟอริดอกซินที่ประมวลรหัสโดย *dbdCc* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 71% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ Rieske [2Fe-2S] คือ  $CX_1HX_{15-17}CX_2H$  (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) (Mason และ Cammack, 1992) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 43-65 ของ ORF3 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ **CTHDTWLSLADGALEDGIVECSLH** โดยเฟอริดอกซินนี้จะรับอิเล็กตรอนจากส่วนรีดักเทสและส่งต่อไปยังส่วนเทอร์มินัลไดออกซีจีเนส (Butler และ Mason, 1997)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) หรือ *acnB* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *dbdD* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Accession No. AB121977.1) เท่ากับ 67% โดยไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนสต้องการ  $NAD^+$  ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในการออกซิโดสไดไฮโดรไดออล ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) หรือ *acnF* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดย *phnF* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 65% เอนไซม์นี้ต้องการ  $NAD^+$  และออกซิเจนหนึ่งอะตอมต่อปฏิกิริยาเปลี่ยนซาลิไซลัลดีไฮด์ให้เป็นกรดซาลิไซลิก พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ  $NAD^+$  ของ aldehyde dehydrogenase superfamily **(FY)(I/T)G(S/E)(T/P)XX(G/F)** (Horn และคณะ, 1991) ในลำดับกรดอะมิโนที่ 226-233 ของ ORF5 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ **FTGSTNVG** และยังพบว่าตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์นี้มีความใกล้เคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 226-233 (**FTGSTRVG**) ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 249-256 ของ ORF5 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ LELGDKSP ซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่ง (active site) ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวเป็น LELGGKSP โดยอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนซาลิไซลัลดีไฮด์ให้เป็นกรดซาลิไซลิกในวิถีการย่อยสลายเนพธาดีน และทำงานในลักษณะเดียวกันในวิถีการย่อยสลายพีแนทรีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 5.1 ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่พบรหัสหยุดการแปลรหัสที่ตำแหน่งสุดท้ายของ ORF



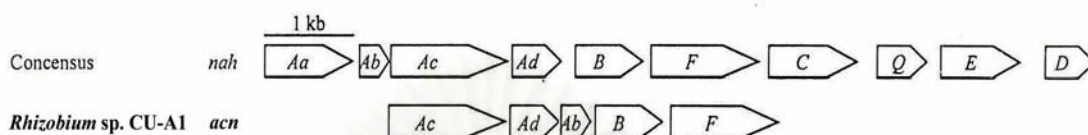
รูปที่ 5.1 การเร่งปฏิกิริยาของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นโปรโมเตอร์ (promoter) เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-TTCCAA-3' และ 5'-TCAAAT-3' ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ซึ่งคล้ายกับกับ consensus sequence ของ -35 region และ consensus sequence ของ -10 region ของโปรโมเตอร์ที่รายงานโดย Alberts และคณะ (2002) ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 Consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Alberts และคณะ, 2002)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่พบใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ทั้ง 5 กรอบมีการจัดเรียงตัวของ *acnAcAdAbBF* คล้ายกับการจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*, *ndo*, *dox*, *pah*) (Simon และคณะ, 1993; Kurkela และคณะ, 1988; Denome และคณะ, 1993; Takizawa และคณะ, 1994) ซึ่งเป็นยีนกลุ่มที่มีการอนุรักษ์สูง ดังแสดงในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 การเรียงตัวของยีนในส่วนวิถึบนของการย่อยสลายแวนพธาลีนของกลุ่มคล้าย *nah* เปรียบเทียบกับ *acn* ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

*acnAcAdAb* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าเป็นประมวลรหัสเป็น  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit และเฟอร์รีดอกซินของไดออกซิจีเนสใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 น่าจะเป็นองค์ประกอบของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนและแวนพธาลีน ไม่พบส่วนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ซึ่งเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำงานของไดออกซิจีเนส แต่มีรายงานว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ไม่พบเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส แต่การทำงานของไดออกซิจีเนสยังปกติ อาจเนื่องจากมีทดแทนการทำงานของเฟอร์รีดอกซินที่ไม่อยู่เป็น cluster เดียวกัน เช่น พีแนนทรินไดออกซิจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ซึ่งมีเฉพาะยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสเพียง *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit เท่านั้น ไม่พบยีนส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและรีดักเทส จากรายงานของ ลูตีวรดา นินทนางศา (2546) พบยีน *acnL* มีความเหมือนกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (putative ferredoxin reductase) เรียงตัวอยู่ในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนในส่วนวิถึที่ถัดลงมาจากรดแวนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกกลมา (*acnNMLEK*) ซึ่งส่วนเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสนี้ อาจเป็นหน่วยหนึ่งของไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน คล้ายกับรายงานของ Romine และคณะ (1999) ที่พบว่ายีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนส *bphA4* ซึ่งประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของ *Novosphingium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 อยู่ในโอเปอรอนที่แยกออกมาต่างหากจากยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสส่วนอื่นๆ

Selifonov และคณะ (1996) รายงานว่าแนพธาลีนไดออกซิจีเนสสามารถออกซิไดส์อะซีแนพธาลีนไปเป็น ซิส-อะซีแนพธาลีน-1,2-ไดออกอล งานวิจัยนี้พบว่าทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดที่ขึ้นประมวลรหัสส่วน  $\alpha$  subunit ของสายพันธุ์กลาย D2 ทำให้เกิดความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนและแนพธาลีน จึงคาดว่าไดออกซิจีเนสที่พบในงานวิจัยนี้ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 นอกจากจะออกซิไดส์อะซีแนพธาลีนแล้ว ยังสามารถออกซิไดส์แนพธาลีนได้ด้วย ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ที่กล่าวว่าพีแนนทรีนไดออกซิจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 สามารถออกซิไดส์แนพธาลีนไปเป็น ซิส-แนพธาลีน-1,2-ไดออกอล และยังพบรายงานของ Krivobok และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า *pdoA1B1* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ 6PY1 สามารถออกซิไดส์ได้ทั้งไพรีน และพีแนนทรีน

ไดออกซิจีเนสเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก นอกจากจะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันแล้ว ยังพบไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก เช่น คะทีคอล-2,3-ไดออกซิจีเนส ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงเบนซีนแบบ เมตา (*meta*-cleavage dioxygenase) โดยจะออกซิไดส์กะทีคอลไปเป็น 2-ไฮดรอกซีมีไควนอลีน เซมิอัลดีไฮด์ ซึ่งมีสี่เหลี่ยม (Shindo และคณะ, 1995) หรือกะทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส ที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงแบบ ออโธ (*ortho*-cleavage dioxygenase) โดยจะออกซิไดส์กะทีคอลไปเป็น กรด ซิส,ซิส-มิวไควนอลีน (Yen และ Serdar, 1988) แต่พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เลี้ยงด้วยแนพธาลีนหรือกรดซาลิไซลิกไม่สามารถออกซิไดส์กะทีคอลเป็น 2-ไฮดรอกซีมีไควนอลีน เซมิอัลดีไฮด์ หรือกรด ซิส,ซิส-มิวไควนอลีน และยังพบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับ Rieske และบริเวณอนุรักษ์ของ catalytic domain ของ *acnAc* จึงเป็นไปได้ว่าไดออกซิจีเนสที่พบในงานวิจัยนี้จัดเป็นไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนและแนพธาลีนมากกว่าไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงเบนซีน

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 หรือ *acnB* ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเป็ ซิส-ไดไฮโดรไดออกอลดีไฮโดรจีเนส น่าจะออกซิไดส์ ซิส-อะซีแนพธาลีน-1,2-ไดออกอล ไปเป็นอะซีแนพโทควิโนนและอาจจะออกซิไดส์ ซิส-แนพธาลีน-1,2-ไดออกอล ไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีนได้ด้วย ซึ่งคล้ายกับไดไฮโดรไดออกอลดีไฮโดรจีเนสของ *Pseudomonas putida* ที่นอกจากจะออกซิไดส์ ซิส-แนพธาลีน-1,2-ไดออกอลได้แล้ว ยังพบว่าสามารถออกซิไดส์ ซิส-ไดไฮโดรไดออกอลของแอนทราซีนพีแนนทรีน ไบฟีนิล โทลูอิน เอธิลเบนซีน และเบนซีนได้ด้วย (Patel และ Gibson, 1974,1976)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 หรือ *acnF* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนหมู่อัลดีไฮด์ให้เป็นหมู่คาร์บอกซิล โดยอาจจะเปลี่ยนซาลิไซลัลดีไฮด์ไปเป็นกรดซาลิไซลิกในวิธีการย่อยสลายแนพธาไลน์ หรืออาจจะทำหน้าที่เช่นเดียวกันในส่วนของวิถีที่ตัดลงมาจากกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. อาจจะอยู่รวมกันเป็น cluster เมื่อทรานสโพซอน Tn5 แทรกสอดที่ *acnAc* ซึ่งเป็นยีนแรกที่อยู่ถัดลงมาจากโปรโมเตอร์ ทำให้เกิดความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนและแนพธาไลน์ อาจเกิดจากรหัสหยุดของทรานสโพซอน Tn5 มีผลต่อยีนที่ถูกแทรกสอดและยังอาจมีผลยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่ใช้โปรโมเตอร์เดียวกัน เช่น ยีนในโอเปอรอนเดียวกัน ทำให้เกิดโพลาร์มิวเทชันกับยีนอื่นในโอเปอรอนเดียวกันด้วย (Berg และ Berg, 1987) หรือยีนอาจจะกระจัดกระจายไม่อยู่รวมกันเป็น cluster จึงทำให้สายพันธุ์กลาย D2 สามารถเจริญในอะซีแนพโทควิโนน และกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ในวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน คล้ายกับรายงานของ Romine และคณะ (1999) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิดจาก *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ได้แก่ ไบฟีนิล แนพธาไลน์ เมตา-ไซลีน พารา-คริสซอล โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาไลน์ที่พบในสายพันธุ์นี้ ได้แก่ *nahE* *nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างๆ กันและถูกค้นด้วยยีนจากวิธีการย่อยสลายสารอื่น

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานแรกทีกล่าวถึง *acnAbAcAd* ซึ่งประมวลรหัสไดออกซิจีเนส และยังพบ *acnB* และ *acnF* ที่ประมวลรหัสไฮโดรไดออกซิไฮโดรจีเนส และอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และมีการเรียงตัวของ *acnAcAdAbBF* คล้ายกับยีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) โดยไดออกซิจีเนสที่พบในงานวิจัยนี้น่าจะเร่งปฏิกิริยาการไฮดรอกซิเลชันซึ่งนอกจากจะออกซิไดส์อะซีแนพทิลีนแล้วยังสามารถออกซิไดส์แนพธาไลน์ได้ด้วย ซึ่งจะสรุปได้แน่นอนขึ้นหากมีการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท และการแสดงออกของยีนเพิ่มเติม

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ฐิติวรรณ นินทนาวงศา. 2546. การแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพรีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยรงค์. 2545. การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์. 2544. การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพรีลินและการติดตามด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริวัตร ปุณทริกพันธ์ 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลินโดยสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรัลยา แพงไตร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดซ์อะซีแนพรีลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science Taylor & Francis Group. pp. 299-274.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons.



- Batie, C. J., Ballou, D. P., and Correll, C. J. 1992. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferase. In Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes. (F. Müller, ed.), pp. 544-554. Boca Raton: CRC Press.
- Berg, C. M., and Berg, D. E. 1987. Uses of transposable elements and maps of known insertions. In Ingraham, J. L., Brooks L. K., Magasanic, B., Schaechter, M., and Umbarger, H. E. (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. 2: 1170-1109. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.
- Brand, J. M., Cruden, D. L., Zylstra, G. J., and Gibson, D. T. 1992. Stereospecific hydroxylation of indan by *Escherichia coli* containing the cloned toluene dioxygenase genes from *Pseudomonas putida* F1. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3407-3409.
- Butler, C. S., and Mason, J. R. 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. Adv. Microb. Physiol. 38: 47-84.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Davies, J. I., and Evans, W. C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads: The ring-fission mechanism. Biochem. J. 91: 251-261.
- Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.
- Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: Construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bacteriol. 174: 7542-7554.
- Ensley, B. D., and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.

- Ensley, B. D., Gibson, D. T. and Laborde, A. L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 149: 948-954.
- Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., and Gibson, D. T. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science. 222: 167-169.
- Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Microbial Degradation of Organic Compounds. pp. 181-252. Gibson, D. T. (ed.). New York: Marcel Dekker.
- Gibson, D. T., Koch, J. R., and Kallio, R. E. 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. Biochemistry. 7: 2653-2662.
- Gibson, D. T., Maseles, F. C., and Kallio, R. E. 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. Biochemistry. 9: 1631-1635.
- Goyal, A. K., and Zylstra, G. J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230-236.
- Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R. 1992. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Appl. Environ. Microbiol. 58:1874-1877.
- Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(2): 225-243.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. 8: 268-273.
- Horn, J. M., Harayama, S., and Timmis, K. N. 1991. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. Mol. Microbiol. 5: 2459-2474.
- Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179(20): 6488-6494.

- Jiang, H., Parales, R. E., Lynch, N. A., and Gibson, D. T. 1996. Site-directed mutagenesis of conserve amino acids in the alpha subunit of toluene dioxygenase: potential mononuclear non-heme iron coordination sites. J. Bacteriol. 178(11): 3133-3139.
- Juhasz, A. L., and Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodegradation & Biodegradation. 45(2000): 57-88.
- Kauppi. B., Lee K., Carredano E., Parales R. E., Gibson D. T., Eklund H., and Ramaswamy S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenases. Structure. 6: 571-586.
- Keith, L. H., and Telliard, W. A. 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13: 416-423.
- Khan, A. A., Wang, R-F., Cao, W-W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. PYR-1.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., and Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176(8): 2439-2443.
- Komatsu, T, Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.
- Krivobok, S., Kuony S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., and Jouanneau Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. 185(13): 3828-3841.
- Kurkela, S., Lehv slaiho, H., Palva, E. T., and Teeri, T. H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816. Gene. 73: 355-362.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.

- LaVoie, E. J. and Rice, J. E. 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. In: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships. pp. 151-156. vol. 1. Yang, S. K., and Silverman, B. D. (eds.). (n.p.): CRC Press.
- Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. p.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.
- Lee, S., and Cutright, T. J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.
- Mason, J. R., and Cammack, R. 1992. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46: 277-305.
- Parales, R. E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 271-278.
- Patel, T. R., and Gibson, D. T. 1974. Purification and properties of (+)-*cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 119: 879-888.
- Patel, T. R., and Gibson, D. T. 1976. Bacterial *cis*-dihydrodiol dehydrogenases: Comparison of physicochemical and immunological properties. J. Bacteriol. 128: 842-850.
- Poonthrigpun, S., Petsom, A., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Juntongjin, K., and Pinphanichkarn, P. 2003. Identification of accumulated intermediates from the degradation of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1 transposon mutants. BioThailand 2003: Technology for Life. p. 304. Jul. 17-20. Pattaya: PEACH.
- Romine, M. F., Still Well, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181(5): 1585-1602.
- Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: Expression in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 182(8): 2134-2141.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schell, M. A. 1983. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7. J. Bacteriol. 153: 822-829.
- Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48(1): 10-16.
- Selifonov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 507-514.
- Shindo, T., Ueda, H., Sazuku, E., and Nishimura, H. 1995. A catechol 2,3 dioxygenase gene as report. Bioscience Biotech. Biochim. 59: 314-315.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene. 127: 31-37.
- Simon, R., Priefer, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.
- Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. Microbiol transformation and degradation of toxic organic chemicals. In Young, L. Y. and Cerniglia, C. E. (ed.). New York: Willey-Liss, Inc., pp. 269-306.
- Takeuchi, M., Hamana, K., and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1405-1417.
- Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S., and Kiyohara, H. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2444-2449.
- Volkering, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van Andel, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon; effect of substrate availability on bacteria growth kinetics. Appl. Microbiol Biotechnol. 36: 548-552.

- Wackett, L. P., Kwart, L. D., and Gibson, D. T. 1988. Benzylic monooxygenation catalysed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. Biochemistry. 27: 1360-1367.
- Warlen, D., Kohler, H-PE., and van der Meer, J. R. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. J. Biol. Chem. 271: 4009-4016.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon (PAHs): a review. Environ. Pollut. 81: 229-246
- Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 874-878.
- Yen, K. M., and Serdar, C. M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*. Crit. Rev. Microbiol. 15: 247-268.
- Zhou, N., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183(2): 700-708.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (2YT broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	16.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที



## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. ก๊าซเซอร์คอล

นำก๊าซเซอร์คอลมาหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

#### 2. สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นของสารละลาย
กานามัยซิน	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
แอมพิซิลลิน	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กานามัยซินและแอมพิซิลลินทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพอร์ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

#### 3. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

Rnase A

Collection tube

QIAprep Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสติกครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และเติมเอทานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

#### 4. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit (BIO101, USA)

ประกอบด้วย

Nal solution

Glassmilk

New wash

ทำการสกัดพลาสติกตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

#### 5. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

#### 6. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

## 7. Neutralization buffer

Trismabase	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 8. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	0.3 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 9. สารละลาย 2XSSC

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 10. สารละลาย 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

## 11. สารละลาย 0.5XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง

## 12. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

ประกอบด้วย

- หลอดหมายเลข 1. DIG-High Prime, 5X conc.
- หลอดหมายเลข 2. DIG-labeled control DNA 5 µg/ml
- หลอดหมายเลข 3. DNA dilution buffer
- หลอดหมายเลข 4. Anti-Digoxigenin-AP Conjugate 750 U/ml
- หลอดหมายเลข 5. NBT/BCIP, 50X conc.
- ขวดหมายเลข 6. Blocking solution, 10X conc.
- ขวดหมายเลข 7. DIG Easy Hyb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37 °C)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

### Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลือโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

### Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกาทดลอง

### Detection buffer

Trismabase	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

### 13. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่างเป็น 8.0

Trismabase ( $C_4H_{11}NO_3$ )	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

### 14. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ต่างเป็น 8.0

EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ )	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0

เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 15. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 16. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242 กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1 มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100 มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

#### 17. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7 โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

## 18. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวที่ 60-65 °C จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ไม่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน ดูดชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับ 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ไม่ปรับความเป็นกรด-ด่าง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

## 19. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิมิตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

## 20. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 °C

## 21. สารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด

สารละลาย I

กลูโคส	50 มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	25 มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0	10 มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## สารละลาย II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.2 มล. เข้ากับน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 8.8 มล. แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 1.0 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

## สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตทเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. กับกรดอะซีติกเข้มข้นปริมาตร 11.50 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

## 22. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโคส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 23. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด



#### 24. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

#### 25. สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

#### 26. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

#### 27. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ในหลอดปิดสนิทและมีด

#### 28. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

#### 29. สารละลายผสม dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว)

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรสารละลาย 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

### 30. กุ้งไตแอลลิซิสสำหรับทำ Electroelution

แช่กุ้งไตแอลลิซิสที่ตัดให้ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ในสารละลาย 3% โซเดียมโบคาร์บอเนต ใน 1 mM EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างกุ้งไตแอลลิซิสด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ย้ายกุ้งไตแอลลิซิสไปแช่ในสารละลาย 1 mM EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาทีอีกครั้ง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

### การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BlastX

Query หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนที่เปรียบเทียบใน GenBank

+ หมายถึง กรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน

#### 1. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF1

gi|37651310|dbj|BAC98956.1| alpha subunit of terminal oxygenase  
[Xanthobacter polyaromaticivorans] Length = 433

Score = 656 bits (1692), Expect = 0.0  
Identities = 305/398 (76%), Positives = 342/398 (85%), Gaps = 1/398 (0%)  
Frame = +3

Query: 20 GVYNPKIYTDESLYKLELERIFARTWVCMGHESQIAKPGDFITAYIGEDPVVSRQKDGS 199  
G Y+P+IYT E LY+LELERIFAR+WVCMGHE+QI K GD+ AYIGEDPVVV RQKD S  
Sbjct: 27 GRYSPEIYTSEDLYQLELERIFARSWVCMGHETQIPKAGDYQAAYIGEDPVVVVRQKDNS 86

Query: 200 IRVFLNQCRHRGMRICRADSGNAKAFTCTYHGWAYNQGGELVSVPMQEAFGGCLNKKEW 379  
IRVFLNQCRHRGMRICR D GNAKAFTC YHGWAY+ G LVSVPMEQEAFGG LNK EW  
Sbjct: 87 IRVFLNQCRHRGMRICRVDGGNAKAFTCPYHGWAYDTAGNLVSVPMQEAFGGKLNKAEW 146

Query: 380 GPKQARVDTYKGLIFANWDAEAPSLDEYLGEAKFYMDIMLDRCEGGTEAVPGIQKWVIP 559  
GPKQARV+TYKGLIFANWD AP+LD YLG+AKFYMDIMLDR EGGTE + G+QK+VIP  
Sbjct: 147 GPKQARVETTYKGLIFANWDESAPNLDTYLGDPAKFYMDIMLDRAEGGTEVITGVQKQFVIPA 206

Query: 560 NWKFAAEQFASDAYHAGTTSHLSGIMAGVPDDVDLSQVAPPTTGLNVHMSNGHCGLFLR 739  
NWKFAAEQF SDAYHAGTT+H+SGL+AGVP DLS+V PPT G+NV++ NGHGCGLF R  
Sbjct: 207 NWKFAAEQFGSDAYHAGTTAHSVSGIIAGVPAGTDLSKVQPPTDGMNVYIGNGHGCGLFSR 266

Query: 740 NPMFYMTILGPKVTEYLTAGPAYEEATRRLGKSRTDVHLCHCNIFPNLSFLAGINTVRMW 919  
NPMFY I GP++TEYLT+GPAYEEA +RLG+ R DV+LCH N+FPNLSFL G+NTVRMW  
Sbjct: 267 NPMFYQVICGPQLTEYLTSGPAYEEAVKRLGQGRADVNLCHMNVFPNLSFLTGLNTVRMW 326

Query: 920 QPRGPNEIEVWTFVVDKTAPAEIKEEWSRNVSRFTSAGGVFEQDDGENWCDIQVVLKGH 1099  
QPRGPNE+E+WTFV+VD+TAP IKEEW RN+ RTFSA GVFEQDDGENW DIQ VL+GH  
Sbjct: 327 QPRGPNEMELWTFVLDRTAPDNIKEEWRNMVSRFTSASGVFEQDDGENWNDIQHVLRGH 386

Query: 1100 VAQQQKFNIEMASHTI-TTENPEGFPGISFAYTYGEES 1210  
VA+QQ FNIEMA HT+ +T GFPG SFAYTY EES  
Sbjct: 387 VARQQPFNIEMAQHTVQSTSIAPGFPGESFAYTYAEEES 424

## 2. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF2

gi|37651311|dbj|BAC98957.1| beta subunit of terminal oxygenase  
[Xanthobacter polyaromaticivorans] Length = 187

Score = 241 bits (616), Expect = 6e-63  
Identities = 113/187 (60%), Positives = 145/187 (77%), Gaps = 2/187(1%)  
Frame = +2

Query: 18 MLDTTFKTAFERKPKTVSLELQHEVEQFLYWETKLLTDRRYEWFGLLASDLRYWMPIRS 197  
MLDT ++AF+ KP+ +S+ELQHE+EQF YWE KL+ DRR+EEWF L++ D++YW P+RS  
Sbjct: 1 MLDTASQSAFQVKPELISVELQHEIEQFYWEAKLMADRRWEEWFLMSKDIKWAPLRS 60

Query: 198 TRI-MREVAQEYTDENGFAHFDDNWHTMKGRICKIMSDVGWSENPASRLRYLVGNVMIVP 374  
TR E EYTDE GF HF DNW ++ GRI+KI SDVGWSENPASRLR++VGNV+I  
Sbjct: 61 TRSHAAEAKLEYTDEKGFHGFADNWSSLDGRIRKITSVDVGWSENPASRLRHIVGNVLIWK 120

Query: 375 ESDNEL-NVVSAMMIYRTRQERQLDVFACERHDLRRVDSEAGFEIASRKVLVDQSTILS 551  
+ ++ +V +++M YR RQERQ D FA ER D +RRVD GFEI RK+L+DQST+LS  
Sbjct: 121 DRQADVVDVSTSLMTYRNRQERQDTFFAAERQDRIRRVDDACGFEIVERKILIDQSTLLS 180

Query: 552 NNLSFFF 572  
NN+SFFF  
Sbjct: 181 NNISFFF 187

## 3. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF3

gi|37651312|dbj|BAC98958.1| ferredoxin [Xanthobacter polyaromaticivorans]  
Length = 110

Score = 153 bits (386), Expect = 1e-36  
Identities = 71/100 (71%), Positives = 80/100 (80%)  
Frame = +1

Query: 17 MAWTKAFPSADLPEGEMKQFAGAAEPILICKLGGKVHAVQDTCTHDTWLSLADGFLEDGIV 196  
M W P ADLPEG+MK F G AEPILIC + G+V+AVQDTCTHDTWSL DG+L+ IV  
Sbjct: 1 MPWNYVLPALDLPEGDMKVFNGGAEPILICNVGDQVYAVQDTCTHDTWLSLADGFLYLDGHIV 60

Query: 197 ECSLHFAKFCVRTGQVKALPACDALKVFPKIEENDFIYID 316  
ECSLH AKF VRTG+VKALPAC ALK+FP KIEN IY+D  
Sbjct: 61 ECSLHMAKFDVRTGEVKALPACKALKIFPIKIENGEIYVD 100

## 4. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF4

gi|37651313|dbj|BAC98959.1| dihydrodiol dehydrogenase [Xanthobacter  
polyaromaticivorans] Length = 275

Score = 371 bits (953), Expect = e-102  
Identities = 184/271 (67%), Positives = 211/271 (77%)  
Frame = +1

Query: 23 VALVTGGGSGLGRAIVERYVEEGAHVAFDRSHERIEEVTRALGGKIVIGIAGDVREMAN 202  
VALVTGGGSGLG+AIVER++ EGA VAI DRS ER++EV GGKV+G +GDVR MADN  
Sbjct: 6 VALVTGGGSGLGKAIIVERFLAEGAKVAAILDRSEERVQEVVAMFVGKVVGTSGDVRSMADN 65

Query: 203 KRAVVECVKAFGKLDTLVGNAGVWDWSKSLVSTADDALVSAFDEMFAINVKGYVLAAKAA 382  
 K AV CV+AFGK+DTLVGNAGVWD++ S+ T+++ L A DE+ IN+KGY+LAAKAA  
 Sbjct: 66 KAAVARCVEAFGKIDTLVGNAGVWDYNASIAGTSEEKLAEAIDELVGINLKGYILAANKAA 125

Query: 383 LPELYKSKGQMIFTASNASFYPPGGGGVLYTATKHAVVGMKQMAHEFAPHVRVNGVAPXX 562  
 LPELYK+KG IFT SNA FYPPGGGGVLYTA+KH VVGMKQ+AHE+APH+RVNGVAP  
 Sbjct: 126 LPELYKTKGNIFTVSNAGFYPPGGGGVLYTASKHGVVGMKQLAHEWAPHIRVNGVAP-G 184

Query: 563 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXKSELPLNDLMKQMLPLERAFHAREYAGAYVFFANRKNQPGT 742  
 +FS LPL+DLMKQMLPLE+AF+A EY G YVFFANRKN P T  
 Sbjct: 185 GIGGISRGFPSSLQEGIRFSNLPLDDLMKQMLPLEKAFYASEYTGgyVFFANRKNQNGPAT 244

Query: 743 GGVLNFDGGGIGMRGFASANMGAELVEAFGNA 835  
 G VLNFDGGGIGMRGF S NMG EL E F A  
 Sbjct: 245 GSVLNFDGGGIGMRGFMSPNMGKELDEKFRGA 275

## 5. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF5

gi|3820515|gb|AAD09868.1| dehydrogenase PhnF [Burkholderia sp. RP007]  
 Length = 483

Score = 600 bits (1547), Expect = e-170  
 Identities = 303/466 (65%), Positives = 357/466 (76%)  
 Frame = +3

Query: 14 MDTLLYIDNEARGATDNETFARRSPVTGEVVTQGAAAKSEDALAAIDSAQRAVFTWSQTG 193  
 MDT L IDN AT TF RRSP TGE+VT+ AAA DA+AA DSA A+ +WS TG  
 Sbjct: 1 MDTQLIIDNADVPATAAATFERRSPTTGELVTRAAAASVADAIAAADSAAAAYRSWSTTG 60

Query: 194 PGQRRVLLMRAADEIEKRTEDFVVMKGEVAGELWARFNVMLAANVFREAAAMTTQIQG 373  
 P +RR +L++AAD +E RT +F M EVGA +LWA NVMLAAN+FREAAA+TTQIQG  
 Sbjct: 61 PTERRRILLKAADLLEARTPEFSRVMALVWAGSADLWAGVNVMLAANLFRREAAALTTQIQG 120

Query: 374 RTIPSDKPGTLSMTVRQPVGVILSIVPWNQPIVLAARAIAYPLMCGNTVVFRASETSPKT 553  
 TIP+DK G LSMTVRQPVGVILSI PWNQPIVLAARAIAYPL+CGNTVVFRASE SPKT  
 Sbjct: 121 ETIPTDKAGVLSMTVRQPVGVILSIAPWNGPVVLAARAIAYPLVCGNTVVFRASELSPKT 180

Query: 554 HALVAEAVYAAEFPAAGTLNFVTNDPKDAPEVIETMIAHPAVRRVNFVTGSTNVGRIIGKC 733  
 H L+ + + A P G LN VTN P+DAPEV++ +IAHPAVRR+NFTGST VGR+I EK  
 Sbjct: 181 HMLIVDVLDRDAGLPPGVLVAVTNAPQDAPEVVDALIAHPAVRRINFTGSTRVGRVIAEKA 240

Query: 734 GRHLKRCILELGDKSPMVVLRDADIDGAVNATIFGAFLYQGQICMSTERVIVEEPIADAF 913  
 RHLKRC+LELG K+P+VVL DADID AV A +FGAFLYQGQICMSTER++V+E IAD F  
 Sbjct: 241 ARHLKRCLELGGKAPLVVLDADIDEAVKAAVFGAFLYQGQICMSTERIVVDEKIADTF 300

Query: 914 VEKLAARAAQLQAGDPRTQAACALGPVVSQGXKXXXXXXXXXXXXXXXXXKGAELRSGGHADHTL 1093  
 V + AARA +L GDP T C +GP++ + +GA + +GG AD +  
 Sbjct: 301 VARFAARARELPGDPATCGGCVVGPMIVRESGDRINAMINDAVNQGANVVAGGFADGAV 360

Query: 1094 MSATVLDGVTSMRIYSEEFGPILQVIRVKDADEAVHVANDTEYGLSSAVFGTDMTRAL 1273  
 M AT++D VT MRIY EE FGPI V+R KDAD+AV +ANDT YGLSSAVFG D+TRAL  
 Sbjct: 361 MPATIVDRVTPAMRIYDEETFGPIITTVRAKDADAVRIANDTAYGLSSAVFGRDVTRAL 420

Query: 1274 DVAMRIQTGSVHINGATVANEAPYGGTKASGWGRFDSQAVIEEF 1411  
 VAMRI+ GS HING+TV NEAPYGGTKASG+GRFD +AVI+EF  
 Sbjct: 421 SVAMRIEAGSCHINGSTVQNEAPYGGTKASGYGRFDGRAVIDEF 466

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงกมล ฐปมงคล เกิดเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดลพบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย