


การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนและการติดฉลาด
ด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1



นางสาวธัญญา เกรียงไกรพิพัฒน์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0565-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF BLOCKED MUTANTS ACCUMULATING
ACENAPHTHYLENE DEGRADING INTERMEDIATES AND GREEN
FLUORESCENT PROTEIN LABELLING *RHIZOBIUM* SP. CU-A1



Miss Thanyanuch Kriangkripipat

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 2001
ISBN 974-03-0565-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพ
ธิลีนและการติดผลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium*
sp. CU-A1

โดย

นางสาวธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีชัยวัน)

ัญญาช เกียรติไพพัฒน์ : การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแชนพธิดีนและการติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1 (CONSTRUCTION OF BLOCKED MUTANTS ACCUMULATING ACENAPHTHYLENE DEGRADING INTERMEDIATES AND GREEN FLUORESCENT PROTEIN LABELLING *RHIZOBIUM* SP. CU-A1). อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 117 หน้า. ISBN 974-03-0565-2

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมสามารถย่อยสลายอะซีแชนพธิดีนหรือแอนพธิดีนเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เพื่อศึกษาวิธีการย่อยสลายอะซีแชนพธิดีนของสายพันธุ์ CU-A1 ได้ใช้ทรานสโพรซอนเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์นี้โดยคอนจูเกชัน กับ *Escherichia coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 เมื่อใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะที่วัฒนธรรมผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและคัดแยกทรานสคอนจูแกนต์บนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก 1.0 กรัมต่อลิตรและสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ประสิทธิภาพของการ ทรานสโพลีชันสูงที่สุดเท่ากับ 4.75×10^{-5} ต่อจำนวนเซลล์ผู้รับ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีไฮบริดไฮบริดไฮบริดพบว่าทรานสโพรซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* จากทรานสคอนจูแกนต์ทั้งหมด 15,370 สายพันธุ์พบสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายหรือไม่เจริญในอะซีแชนพธิดีนและแอนพธิดีนจำนวน 21 สายพันธุ์ การศึกษาการเจริญของสายพันธุ์กลายต่างๆ ในอะซีแชนพธิดีน แอนพธิดีนและสารมัธยันต์และผลการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) พบว่า *Rhizobium* ย่อยสลายอะซีแชนพธิดีนเป็นอะซีแชนพโรควิโนน กรดแอนพธิดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกและกรดเจนทิลิกตามลำดับ และย่อยสลายแอนพธิดีนเป็นกรดเจนทิลิก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการสร้าง *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-GFP2 ซึ่งมียีน *gfp* เป็นเครื่องหมายโดยใช้ภาวะในการคอนจูเกชันที่เหมาะสม สายพันธุ์ CU-GFP2 มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแชนพธิดีนในอัตราเดียวกับสายพันธุ์ CU-A1 พร้อมทั้งแสดงการเรืองแสงสีเขียว

ภาควิชา จุลชีววิทยาลายมือชื่อ.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรมลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4172306123: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ Transposon mutagenesis/ acenaphthylene/ naphthalene/ gentisic acid

THANYANUCH KRIANGKRIPIPAT : CONSTRUCTION OF BLOCKED MUTANTS ACCUMULATING ACENAPHTHYLENE DEGRADING INTERMEDIATES AND GREEN FLUORESCENT PROTEIN LABELLING *RHIZOBIUM* SP. CU-A1. THESIS ADVISOR : KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat. 117 pp. ISBN 974-03-0565-2

Rhizobium sp. CU-A1, isolated from petroleum-contaminated soil in Thailand, is able to utilize acenaphthylene or naphthalene as sole carbon and energy sources. In order to elucidate the acenaphthylene catabolic pathways, transposon Tn5 was employed as inducer for mutagenesis in this strain via conjugation with *Eschericia coli* strain S17-1 harboring suicide plasmid pSUP2021. The highest transposition efficiency of 4.75×10^{-5} per recipient was obtained by mixing both donor and recipient at their early log phase with the ratio of 1 : 1, and incubating at 30 °C for 24 hours, followed by selecting on CFMM agar containing 1.0 g/l protocatechuic acid and 50 µg/ml kanamycin. The random insertion of transposon Tn5 to the DNA of *Rhizobium* was verified by Southern hybridization. From 15,370 transconjugants obtained, 21 mutants which are deficient in oxidation or inability to utilize acenaphthylene and naphthalene, were identified. Growth on acenaphthylene, naphthalene and other intermediates with subsequent TLC analysis of intermediates accumulated in Tn5-induced mutants revealed that strain CU-A1 may degraded acenaphthylene through acenaphthoquinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and gentisic acid respectively, and naphthalene was also oxidized to gentisic acid. Moreover, *Rhizobium* sp. strain CU-GFP2 containing *gfp* gene was successfully constructed by using the optimal conjugation conditions. The strain CU-GFP2 can degrade acenaphthylene at the same rate as strain CU-A1 and show green fluorescence.

Department Microbiology

Field of study Industrial Microbiology

Academic year 2001

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น ต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา จันทองจิ้น ที่กรุณาได้รับเป็นประธาน กรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีนิยวัน ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการในการสอบ และให้ความรู้ คำแนะนำ ต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุจิตมา รัฟเพิร์ท ที่กรุณาให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยในช่วงต้นของการศึกษา

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ใน สถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนสำหรับการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณย่า และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนและความ ช่วยเหลือตลอดจนกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
3. ผลการทดลอง.....	51
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	86
5. ข้อเสนอแนะในการวิจัย.....	102
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	119
ภาคผนวก ข.....	122
ประวัติผู้เขียน.....	132

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทาลีน.....	2
1.2 แบคทีเรียที่ใช้พลาสมิด pSUP2021 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5.....	14
1.3 การใช้ทรานสโปซอน Tn5 ในการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของ <i>Rhizobium</i>	17
2.1 แบคทีเรียและพลาสมิด.....	26
2.2 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว.....	35
2.3 ขั้นตอนการทดลองสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอติดตาม.....	35
3.1 การดำนสารปฏิชีวนะของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB...	46
3.2 การดำนสารปฏิชีวนะของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB.....	46
3.3 ความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ <i>E. coli</i> เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM.....	48
3.4 การเจริญของ <i>Rhizobium</i> สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาที่คูอิก ความเข้มข้นต่างๆ.....	51
3.5 ประสิทธิภาพของทรานโพสิซอนเมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์และระยะเวลาต่างๆ ในการคอนจูเกตของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อแขวนลอยเซลล์ผสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร.....	54
3.6 ประสิทธิภาพของทรานโพสิซอนเมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์และระยะเวลาต่างๆ ในการคอนจูเกตของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อแขวนลอยเซลล์ผสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 15 ไมโครลิตร.....	55
3.7 ความบกพร่องของ <i>Rhizobium</i> สายพันธุ์กลายในการเจริญในอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	59
3.8 ค่า R_f และลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของสารมัธยันต์ a และ b กับเปรียบเทียบสารตัวอย่าง.....	74

3.9 การเจริญของ *Rhizobium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแนพธาซีน กรดซาลิไซลิกและกรดเจนทิสิกเป็นแหล่งคาร์บอน.....75



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 (Selifonov และคณะ, 1996).....	4
1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยราไทรอท <i>Trametes versicolor</i> (Johannes และคณะ, 1998).....	6
1.3 วิธีการย่อยสลายเนพธาลินเป็นกรดซาลีไซลิก (upper pathway) (Yen และ Gunsalus, 1982).....	8
1.4 วิธีการย่อยสลายกรดซาลีไซลิกเป็นไพรูเวทและอะซีทิลโคเอ (lower pathway) (Yen และ Gunsalus, 1982)	9
1.5 ทรานสโปซอน Tn5 (Jilk และคณะ, 1996).....	10
1.6 พลาสมิด pSUP2021 (Simon และคณะ, 1983).....	13
1.7 พลาสมิด pUT-miniTn5km neo คือยีนนีโอมัยซินฟอสโฟทรานเฟอเรส I end และ O end คือปลายด้านในและปลายด้านนอกของทรานสโปซอน Tn5 ความยาว 19 คู่เบส ter คือจุดหยุดการถอดรหัส tnp คือยีนทรานสโปเอส bla คือยีนดื้อต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน mobRP4 คือ oriT และยีนที่เกี่ยวข้องในการส่งพลาสมิดในกระบวนการคอนจูเกชัน oriR6K คือจุดเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Artiguenave และคณะ, 1997).....	15
1.8 โครงสร้างของ green fluorescent protein (Carson, 1987).....	18
1.9 กลไกในการเรืองแสงของ GFP(Cody และคณะ, 1993).....	19
2.1 แผนภาพแสดงวิธีย้ายดีเอ็นเอโดยหลักการ capillary transfer จากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน.....	37
2.2 ลักษณะการผนังกึ่งพลาสติกสำหรับทำไฮบริโดเซน.....	38
3.1 ลักษณะการเจริญของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ.....	49
3.2 ผลของกรดโปรโตคาที่คูอิก ต่อการเจริญของ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1 ในอาหารเหลว LB..50	
3.3 รูปแบบการเพิ่มจำนวนของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT.....	52

- 3.4 รูปแบบการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT.....53
- 3.5 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ข.) สัญญาณจากเซาท์เทอร์นไฮบริดซ์เซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5.....56
- 3.6 *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย (วงกลม) ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน และให้อะซีแนฟลิซินในรูปแบบไอระเหย.....57
- 3.7 ก. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1 ได้แก่ G12 G39 G101 G531 และ K283 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1.....60
- 3.7 ข. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 2 ได้แก่ H1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1.....61
- 3.7 ค. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 3 ได้แก่ B1 B5 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1.....62
- 3.7 ง. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 4 ได้แก่ A35 A53 E32 และ G62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1.....63-64
- 3.8 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟลิซิน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1.....65
- 3.9 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟโรควิโนน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1.....66
- 3.10 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซีลิก หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1.....67
- 3.11 ลักษณะอาหารเหลว CFMM ที่มีแนพธาไลน์ หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1.....68
- 3.12 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย อะซีแนฟลิซิน โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) ACE หมายถึงอะซีแนฟลิซิน ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ a.....70
- 3.13 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อย สลายอะซีแนฟโรควิโนน โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) QUI หมายถึงอะซีแนฟโรควิโนน ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ a.....70

- 3.14 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายกรดเนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) NDC หมายถึงกรดเนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ a.....71
- 3.15 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายเนพทาลีน โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) NAP หมายถึงเนพทาลีน ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ b.....71
- 3.16 สารมัธยันต์ a ซึ่งสะสมจากการย่อยสลายกรดเนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก.....72
- 3.17 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ ที่สะสมในสายพันธุ์กลาย A53 และ E11 เปรียบเทียบกับกรดเจนนทิลิก (1) กรดซาลิไซลิก (2) และกรดโปรโตคาทีคูอิก (3) ในระบบตัวชะ ก.) ตัวชะระบบที่ 1 ข.) ตัวชะระบบที่ 2.....73
- 3.18 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ a และ b ที่เกิดจากการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับกรดเจนนทิลิก.....76
- 3.19 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของ ก.) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB ข.) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและให้อะซีแนพทิลีนในรูปไอระเหย.....78
- 3.20 การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีน เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1.....79
- 4.1 ตำแหน่งการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ที่เป็นไปได้ในสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1.....85
- 4.2 ตำแหน่งการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ที่เป็นไปได้ในสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 2.....87
- 4.3 การย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (เส้นประ) เทียบกับ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) (เส้นทึบ).....90

บทที่ 1

บทนำ

อะซีแนพธิลีน

อะซีแนพธิลีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons หรือ PAHs) อะซีแนพธิลีนมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม พบอะซีแนพธิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆ เป็นส่วนประกอบในน้ำมันดิบ ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม ถ่านหิน น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) และครีโอโซท (creosote) (Wilson และ Jones, 1993) อะซีแนพธิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆ ปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อมจากการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและถ่านหิน การรั่วไหลระหว่างการขนส่งและจัดเก็บและการกำจัดกากของเสียจากกระบวนการอุตสาหกรรมดังกล่าว เนื่องจากสาร PAHs เป็นสารอันตรายร้ายแรงซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) การเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเกิดทารกในครรภ์ที่มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) องค์การอนามัยโลกจึงกำหนดให้อะซีแนพธิลีนและสาร PAHs ทั้งหมด 16 ชนิด เป็นสารพิษที่ควรให้ความสำคัญในอันดับต้นๆ ในอันที่จะป้องกันการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม (WHO, 1983, อ้างถึงโดย Willson และ Jones, 1993) ประเทศไทยมีการกำหนดพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 โดยจัดประเภทของสาร PAHs เป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 7 คือวัตถุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย, 2535)

แม้ว่าการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยอะซีแนพธิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่นๆ สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การเผาที่อุณหภูมิสูง (incineration) การฝังกลบ (landfill) และการบำบัดทางเคมีเป็นต้น (Cookson, 1995) แต่การบำบัดโดยการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) ซึ่งเป็นวิธีการนำสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารพิษอันตรายในสิ่งแวดล้อม ได้เปรียบกว่าวิธีบำบัดด้วยวิธีอื่นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์จะย่อยสลายสาร PAHs บางชนิดอย่างสมบูรณ์ (mineralization) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงาน หรือสาร PAHs บางชนิดอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน (partially transformed) ซึ่งมีความเป็นพิษลดลงหรือหมดความเป็นพิษ กระบวนการทั้งสองนี้อาจเกิดโดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Cerniglia, 1992) กระบวนการบำบัดอาจใช้วิธีกระตุ้น

จุลินทรีย์ท้องถิ่นในแหล่งปนเปื้อนนั้ให้ย่อยสลายสาร PAHs (biostimulation) หรือวิธีเติมจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ลงไปในแหล่งปนเปื้อน (bioaugmentation) ซึ่งวิธีการนี้มีความจำเป็นต้องทราบถึงลักษณะทางสรีรวิทยา กายภาพและชีวภาพ รวมถึงวิธีการย่อยสลายสาร PAHs ของจุลินทรีย์ชนิดนั้นซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งเพื่อให้การบำบัดสาร PAHs เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

การย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมีการศึกษากันมาเป็นเวลานาน มีรายงานว่าแบคทีเรียและราไวท์รอก สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้ดังสรุปชนิดของจุลินทรีย์ไว้ในตารางที่ 1.1 โดยเกือบทั้งหมดเป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล (transformation) พบเพียงแบคทีเรียเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Cerniglia, 1992) ถึงแม้ว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายเหมือนกัน

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<u>แบคทีเรีย</u>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	Chapman, 1979
<i>Beijerinckia</i> sp.	Schocken และ Gibson, 1984
<i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4	Komatsu และคณะ, 1993
<i>Pseudomonas cepacia</i> สายพันธุ์ F297	Grifoll และคณะ, 1995
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 (pRE695)	Selifonov และคณะ, 1996
<u>ราไวท์รอก</u>	
<i>Trametes versicolor</i>	Johannes และคณะ, 1998

การย่อยสลายอะซีแนฟทีลินโดยแบคทีเรีย

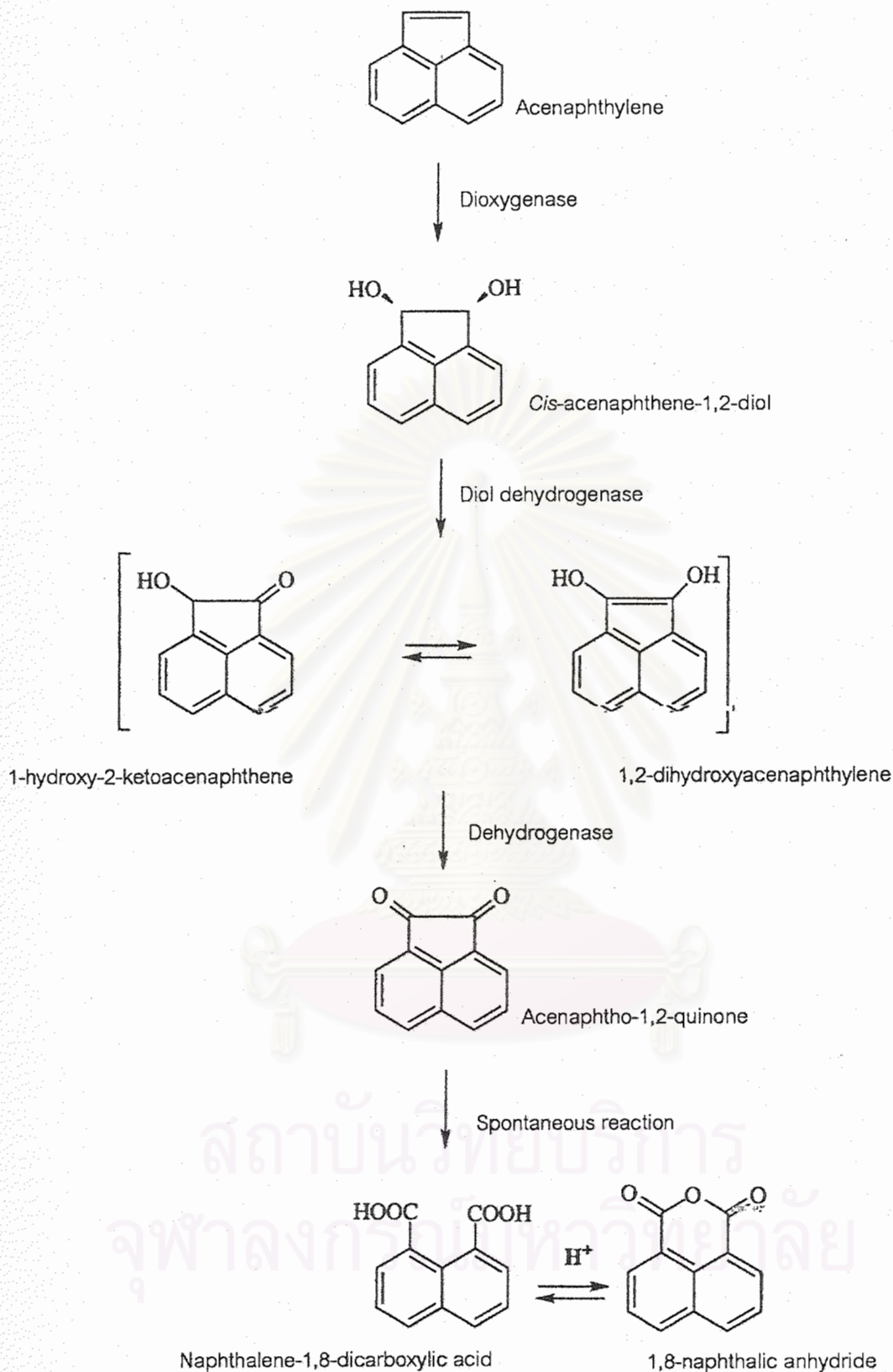
แบคทีเรียจะย่อยสลายอะซีแนฟทีลินโดยการเติมออกซิเจนบนวงไฮโคลเพนทีนของอะซีแนฟทีลิน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดไฮโดรไดออล (*cis-acenaphthene-1,2-dihydrodiol*) โดยอาศัยกิจกรรมของไดออกซีจีเนส จากนั้นผลิตภัณฑ์นี้จะถูกออกซิไดส์เป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนฟทีลิน (*1,2-dihydroxyacenaphthylene*) และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนฟทีน (*1-hydroxy-2-ketoacenaphthene*) ซึ่งเป็น tautomer ผลิตภัณฑ์จะถูกออกซิไดส์หรือรีดิวซ์ด้วยดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทสจนกลายเป็น อะซีแนฟโท-1,2-ควิโนน (*acenaphtho-1,2-quinone*) ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้จะแตกตัวได้เองทำให่วงไฮโคลเพนแทนแตกออกได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรด 1,8-แนฟธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก (*1,8-naphthalenedicarboxylic acid*) (Selifonov และคณะ, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 1.1

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ F297 ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนครีโอสเท สามารถออกซิไดส์อะซีแนฟทีลินเป็นสารมัธยันต์และผลิตภัณฑ์สุดท้ายต่างๆ ได้แก่ อะซีแนฟทีน-1-โอน (*acenaphthene-1-one*) อะซีแนฟโท-1,2-ควิโนน กรด 1,8-แนฟธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก และ 1,8-แนฟธาอิกแอนไฮไดรด์ (*1,8-naphthalicanhydride*)

Komatsu และคณะ (1993) คัดแยกแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 จากแหล่งดินบริเวณที่ทิ้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีลินเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน และพบกรด 1,8-แนฟธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก เป็นสารมัธยันต์

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายอะซีแนฟทีลินโดยแบคทีเรีย

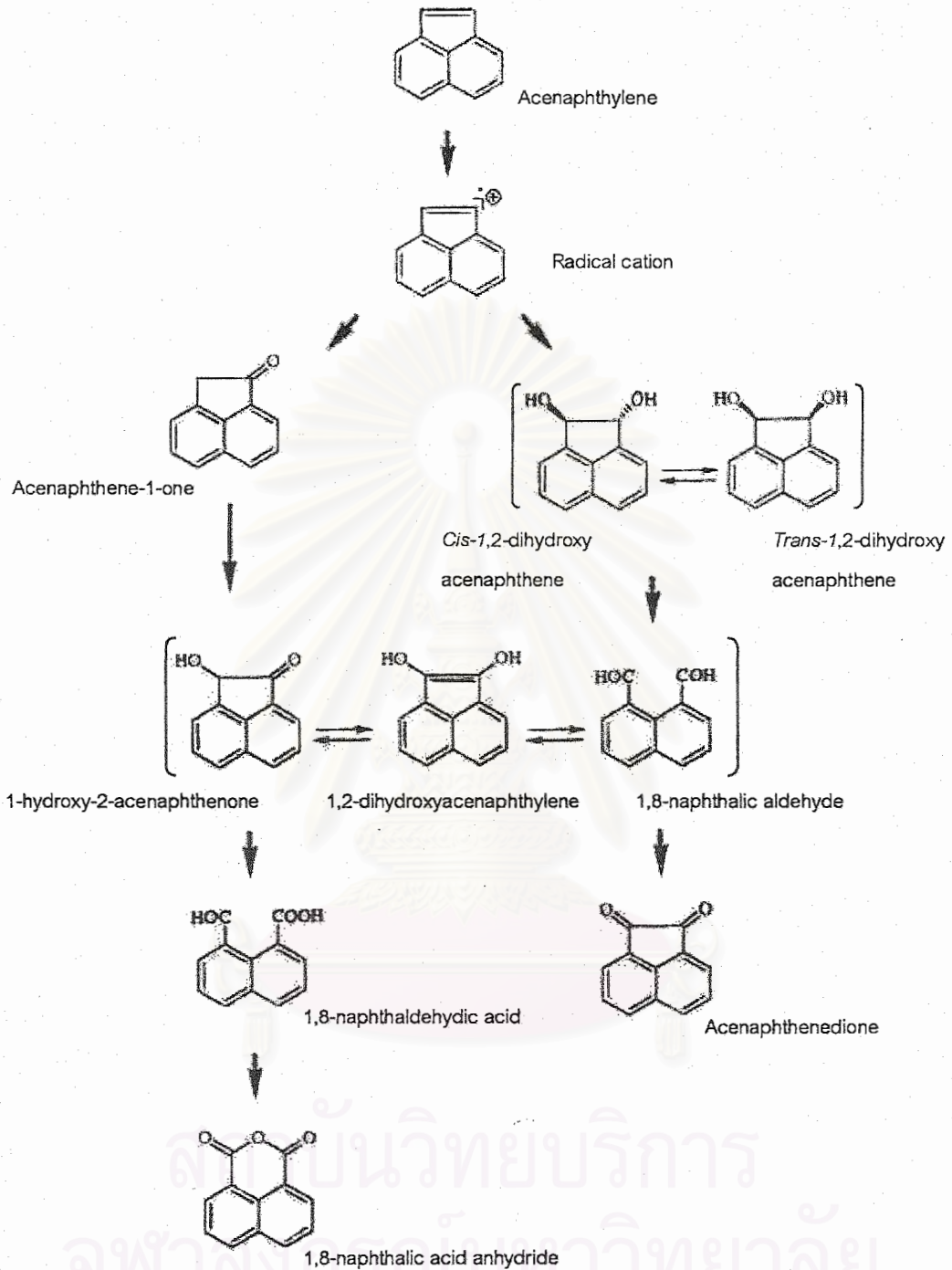
ยังไม่มีรายงานถึงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องโดยตรงในวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลิน อย่างไรก็ตาม ไดออกซีจีเนสของแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs เป็น 1,2-ไดไฮโดรไดออล สามารถออกซิไดส์วงไฮโคลเพนทีนของอะซีแนฟทีลินได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดออล เช่น แนฟธาไลน์ไดออกซีจีเนสจาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 เป็นต้น ดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทสไม่ทราบชนิดของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 สามารถออกซิไดส์ ซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดออลเป็นอะซีแนฟโทควิโนน นอกจากนี้ยังพบว่าอะซีแนฟโทควิโนนสามารถแตกตัวเป็นกรดแนฟธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ได้เองโดยไม่ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ (Selifonov และคณะ, 1996)



รูปที่ 1.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (Selifonov และคณะ, 1996)

การย่อยสลายอะซีแนพทีลินโดยราไวท์รอต

เอนไซม์ย่อยสลายลิกนินของราไวท์รอตเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ซึ่งได้แก่ ลิกนินเปอร์ออกซิเดส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ราจะผลิตเอนไซม์เหล่านี้เมื่อเข้าสู่ระยะที่มีการเจริญเต็มที่หรือในภาวะที่จำกัดปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ (Kotterman และคณะ, 1994) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นจึงสามารถย่อยสลายลิกนินซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยวงอะโรมาติกที่ซับซ้อนได้ จากสมบัติในข้อนี้จึงมีผู้สนใจศึกษาการย่อยสลายสาร PAHs ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะสาร PAHs ที่มีโมเลกุลใหญ่ (Hammel และคณะ, 1986; Kotterman และคณะ 1994) การศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีลินด้วยแลคเคสจากราไวท์รอต *Trametes versicolor* พบว่าอะซีแนพทีลินจะถูกออกซิเดสเป็น radical cation ซึ่งไม่เสถียรและเปลี่ยนรูปเป็น ซิส-และ ทรานส-1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทีน และอะซีแนพทีน-1-โอน จากนั้นผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะถูกออกซิเดสเป็น 1,8-แนพทาลิกอัลดีไฮด์ (1,8-naphthalic aldehyde) และ tautomer ซึ่งสารตัวกลางทั้งสามตัวนี้จะถูกออกซิไดส์เป็น 1,2-อะซีแนพทีนไดโอน (1,2-acenaphthenedione) และกรด 1,8-แนพทาลาลดีไฮด์ริก (1,8-naphthalaldehydic acid) ซึ่งสกัดได้ในรูปกรดแนพทาลิกแอนไฮไดด์ ดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยราไวท์รอต *Trametes versicolor* (Johannes และคณะ, 1998)

การย่อยสลายอะซีแนพทีลินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hopskins และคณะ, 1962)

วงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพทีลินจะถูกออกซิไดส์โดยไซโตโครม P₄₅₀ ให้เป็นอะซีแนพทีลินอีพอกไซด์ และเติมไฮโดรเจนและหมู่ไฮดรอกซิลลงในโมเลกุลโดยกิจกรรมของอีพอกไซด์ไฮโดรเลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส- และ ทรานส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออล ซิส- และ ทรานส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออลกลูคูโรเนท และกรด1,8-แนพทาลีนไดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ยังพบอะซีแนพทีน-1-อิน ในส่วนสกัดที่เป็นกรด

การศึกษาวิถีการย่อยสลายสาร PAHs

ในปัจจุบันการศึกษาวิถีการย่อยสลายสาร PAHs และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายสาร PAHs ได้มีการนำเทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการศึกษาอย่างกว้างขวางเช่น

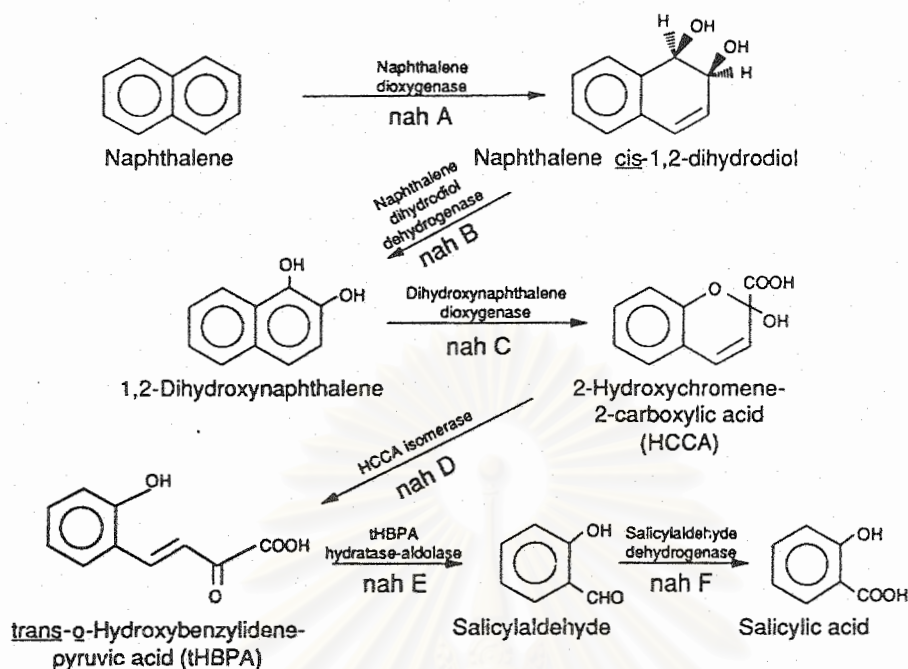
วิธีการสร้างห้องสมุด DNA

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ได้ศึกษายีนในวิถีการย่อยสลายพีแนทรีนของ *Burkholderia* sp. โดยใช้วิธีการสร้างห้องสมุด DNA และคัดเลือกโคลนที่มียีนไดออกซิจีเนส ซึ่งไดออกซิจีเนสของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายสาร PAHs ส่วนใหญ่จะสามารถเปลี่ยนอินโดล (indole) เป็นอินดิโก (indigo) ซึ่งมีสีฟ้าได้ด้วย

การก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5

Yen และ Gunsalus (1982) ศึกษาวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนโดยกลายพันธุ์ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน พบว่าชุดเอนไซม์ต่างๆ ที่ประมวลรหัสโดยยีน *nahABFCQED* หรือเรียกว่า upper pathway เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนเป็นกรดซาลิไซลิกดังรูปที่ 1.3

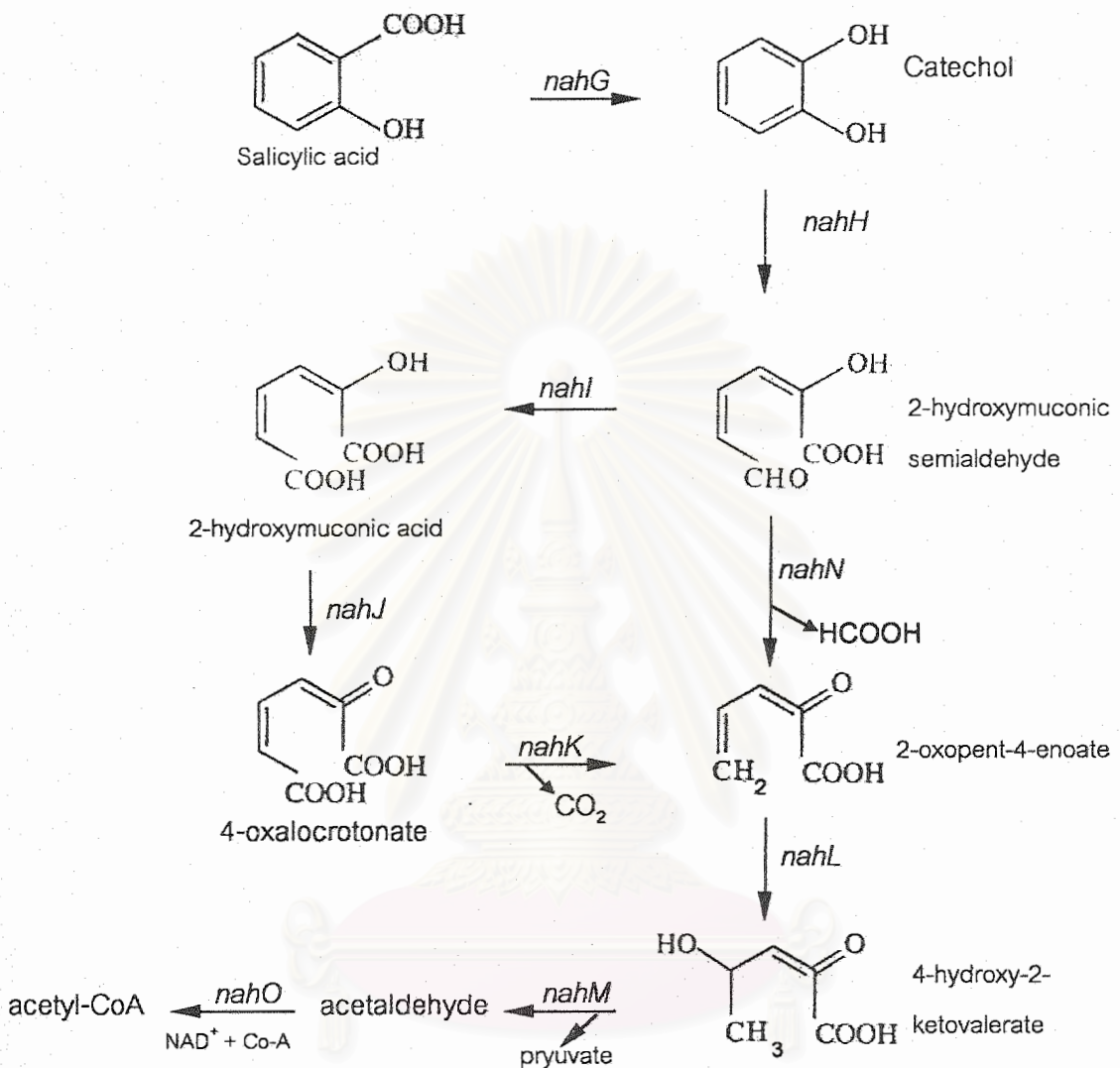
สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.3 วิธีการย่อยสลายแนพธาลินเป็นกรดซาลิไซลิก (upper pathway) (Yen และ Gunsalus, 1982)

จากนั้นกรดซาลิไซลิกจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไพรูวิกและอะเซทิลดีไฮด์ โดยชุดเอนไซม์ที่ประมวลผลโดยยีน *nahGHINLOMKJXY* หรือเรียกว่า lower pathway ได้ดังรูปที่ 1.4 โดยมี *nahR* เป็นยีนควบคุม (Yen และ Gunsalus, 1985) เมื่อยีน *nahA-D* ถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 จะเป็นผลให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญในแนพธาลินและสะสมสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ แต่สามารถเจริญได้ในกรดซาลิไซลิก ส่วนยีน *nahG* และ *nahI-K* เมื่อถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 จะเป็นผลให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญในกรดซาลิไซลิกแต่สามารถย่อยสลายแนพธาลินเป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ เมื่อทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดบนดีเอ็นเอบริเวณเหนือยีน *nahA* จะยับยั้งการถอดรหัสของยีน *nahA-D* และยับยั้งการแสดงออกของยีน *nahG-K* เมื่อแทรกสอดบนดีเอ็นเอเหนือยีน *nahG* แสดงว่าเอนไซม์ในวิธีการย่อยสลายแนพธาลินของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 ประกอบด้วยสองโอเปอรอน และจัดเรียงตำแหน่งของยีนในโอเปอรอนโดยติดตามตำแหน่งแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้รูปแบบการตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายเป็นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทรานสโปซอน Tn5 แทรก

สอดในยีน *nahR* ซึ่งเป็นยีนควบคุม เป็นผลให้อิโอบีออน *nah* ไม่สามารถแสดงออกได้ (Yen และ Gunsalus, 1985)



รูปที่ 1.4 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นไพรูเวตและอะซีทิลโคเอ (lower pathway) (Yen และ Gunsalus, 1982)

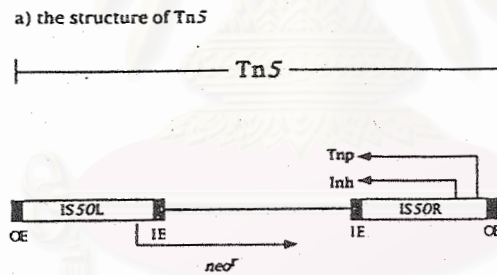
นอกจากนี้ Monticello และคณะ (1985) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DBT2 ย่อยสลายเนฟทาลีนเป็นกรดซาลิไซลิกและย่อยสลายคะทีคอลด้วยเอนไซม์ในวิถี *meta*-pathway โดยการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 และ Foght และ Westlake (1996) ศึกษาวิธีการย่อย

สลายพีแนทรีนของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ LP6a ด้วยการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5

ทรานสโปซอน Tn5

ทรานสโปซอน คือ ดีเอ็นเอซึ่งสามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่งที่อยู่ไปแทรกสอดลงบนดีเอ็นเอตำแหน่งใหม่แบบไม่จำเพาะ โดยมีทรานสโปเซสทำหน้าที่ควบคุมและเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนที่ของทรานสโปซอน และเรียกกระบวนการเคลื่อนที่ของทรานสโปซอนว่าทรานสโปซิชั่น (transposition)

ทรานสโปซอน Tn5 (Larry และ Wendy, 1997) เป็นทรานสโปซอนในกลุ่มคอมโพสิททรานสโปซอน (composite transposon) เกิดจาก IS50 สองหน่วยแทรกสอดบนดีเอ็นเอตำแหน่งใกล้เคียงกันแต่วางตัวในทิศทางกลับกัน ทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง IS50 ทั้งสองหน่วยซึ่งประกอบด้วยยีนดื้อต่อสารปฏิชีวนะนีโอมัยซิน บลิโอมัยซินและสเตรปโตมัยซิน เคลื่อนที่ไปพร้อมกับการเคลื่อนที่ของ IS50 ดังแสดงในรูปที่ 1.5



b) the end terminal sequences

OE : CTGaCTCTTataCacAagT (-) strand
 GACTgAGAAtatGTgTtca (+)strand
 1 . . . 5 . . . 10 . . . 15 . . . 19

IE : CTGtCTCTTgatCAgAtcT (-) strand
 GACaGAGAActaGtcTagA (+)strand

รูปที่ 1.5 ทรานสโปซอน Tn5 (Jilk และคณะ, 1996)

การก่อการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน

การก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอนอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อทรานสโปซอนเข้าสู่เซลล์ผู้รับที่ต้องการกลายพันธุ์แล้ว ทรานสโปซอนจะเคลื่อนที่แทรกสอดในตำแหน่งต่างๆ บนดีเอ็นเอแบบสุ่มซึ่งทำให้เกิดผลคือ ทำให้ยีนสูญเสียหน้าที่ (insertion inactivation) ถ้าทรานสโปซอนแทรกสอดในยีนใดจะทำให้ยีนนั้นไม่ต่อเนื่อง ซึ่งปรากฏการณ์นี้ทำให้เกิดการหยุดการถอดรหัสของยีนนั้นเนื่องจาก transcriptional terminator หรือรหัสหยุดของทรานสโปซอนทำให้หน้าที่ของยีนนั้นเสียไป หรือ โพลาร์มิวเทชัน (polar mutation) เนื่องจาก transcriptional terminator หรือรหัสหยุดของทรานสโปซอน นอกจากมีผลต่อยีนที่ถูกแทรกสอดแล้วอาจมีผลยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่ใช้โปรโมเตอร์ร่วมกันเช่น ยีนในโอเปอรอนเดียวกัน จึงทำให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะต่างๆ (Harwood, 1993)

ทรานสโปซอนไม่สามารถเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียได้เอง จึงต้องอาศัยพลาสมิดพาหะเพื่อเพิ่มจำนวนและนำทรานสโปซอนเข้าสู่เซลล์ การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์สามารถทำได้หลายวิธีเช่น ทรานสเฟอร์เมชัน อิเล็กโทรพอเรชันและคอนจูเกชัน สองวิธีแรกแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพสูงแต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและราคาแพง วิธีคอนจูเกชันเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดที่สุดแต่ต้องอาศัยพลาสมิดที่มีประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันสูงและไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ผู้รับ

ประโยชน์และข้อด้อยของทรานสโปซอน Tn5

การก่อการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีข้อมูลเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับยีนหรือระบบของยีนที่ศึกษา เนื่องจากเป็นการศึกษาภายในเซลล์ซึ่งสะดวกและประหยัดกว่าการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ จึงมีการนำทรานสโปซอนมาใช้กลายพันธุ์แบคทีเรียอย่างกว้างขวาง ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Dennis และ Zylstra, 1998) ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ทรานสโปซอน Tn5 เนื่องจาก

1. มีการใช้ทรานสโปซอน Tn5 เพื่อศึกษาระบบยีนในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดรวมถึง *Rhizobium* โดยวิธีคอนจูเกชันซึ่งวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงประหยัดและขั้นตอนไม่ยุ่งยาก (Simon และคณะ, 1983)
2. ทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่หลากหลายและก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างถาวร (Hom และคณะ, 1984)
3. โดยทั่วไปทรานสโปซอน Tn5 จะแทรกสอดบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียผู้รับเพียง 1 ชุด ทำให้สามารถติดตามตำแหน่งของยีนที่สนใจและทราบถึงปฏิสัมพันธ์ของยีนนั้นกับระบบยีนในวิถีเมตาบอลิซึมต่างๆ (Hom และคณะ, 1984)

4. สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ถูกแทรกสอด โดยการโคลนลงบนเวกเตอร์ และใช้ปลายของทรานสโปซอนเป็นไพรเมอร์ (Parke, 1995)

อย่างไรก็ตามพลาสมิดที่สร้างขึ้นเป็นพาหะของทรานสโปซอนและการใช้ทรานสโปซอน Tn5 อาจมีข้อจำกัดในบางกรณีเช่น

1. จุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของพลาสมิดพาหะบางชนิดเช่น pSUP2021 (Simon และคณะ, 1983) สร้างจากพลาสมิดที่เพิ่มจำนวนได้ในแบคทีเรียกลุ่ม enteric ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้จึงไม่สามารถใช้พลาสมิดเหล่านี้ในการกลายพันธุ์

2. ยีนที่สนใจศึกษาจะต้องมียีนเพียงชุดเดียวที่แสดงออกถึงลักษณะฟีโนไทป์นั้นๆ ถ้าใช้ทรานสโปซอน Tn5 ในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียชนิดนี้ ยีนหนึ่งที่ถูกแทรกสอดไปจะมีอีกยีนหนึ่งสามารถทำหน้าที่ทดแทนเช่น *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 มียีนที่ประมวลรหัสสำหรับซาลิไซเลทไฮดรอกซีเลสจำนวน 2 ชุด (Bosch และคณะ, 1999) จึงไม่พบสายพันธุ์กลายที่บกพร่องในการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นคะทีคอล

3. ทรานสโปซอน Tn5 มีขนาด 5.7 กิโลเบสซึ่งทำให้ขึ้นดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งแทรกสอดมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงยากแก่การโคลนขึ้นดีเอ็นเอลงบนเวกเตอร์ และทรานสโปซอน Tn5 ยังมียีนที่ต่อสสารปฏิชีวนะบลิโอมัยซินและสเตรปโตมัยซิน ทำให้แบคทีเรียที่ต่อสสารปฏิชีวนะสองชนิดนี้ไม่สามารถกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 (Dennis และ Zylstra, 1998)

4. ทรานสโปซอน Tn5 อาจมีการเคลื่อนที่จากดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แทรกสอดไปยังดีเอ็นเอตำแหน่งใหม่ (precious excision) ทำให้สายพันธุ์กลายไม่เสถียร (Dennis และ Zylstra, 1998) Meade และคณะ (1982) และ Hom และคณะ (1984) รายงานว่า *Rhizobium japonicum* *R. meliloti* เกิด precious excision ด้วยความถี่ 10^{-8} - 10^{-9} ต่อรุ่น

5. ทรานสโปซอน Tn5 สามารถแทรกสอดบนดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้เพียง 1 ชุด เนื่องจากยีนที่ประมวลรหัสสำหรับทรานสโปเสสและโปรตีนยับยั้ง จะขัดขวางการทรานสโปสิชันของทรานสโปซอน Tn5 ชุดใหม่ ถ้าต้องการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของยีนสองยีนขึ้นไปของระบบเมตาบอลิซึมจะต้องเปลี่ยนไปใช้ทรานสโปซอนชนิดอื่น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการสร้างดีเอ็นเอติดตามหลายชนิด (DE Lorenzo และคณะ, 1990)

พลาสมิดพาหะและ *E. coli* สำหรับการก่อกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5

Simon และคณะ (1983) ได้สร้างพลาสมิด pSUP2021 ขนาดประมาณ 11 กิโลเบส (รูปที่ 1.6) เพื่อเป็นเวกเตอร์พาหะนำทรานสโปซอน Tn5 เข้าสู่เซลล์ผู้รับโดยวิธีคอนจูเกชัน พลาสมิดนี้ประกอบด้วย origin of transfer (*oriT*) จากพลาสมิด RP4 ซึ่งเป็นส่วนที่ DNA-nicking protein (สร้างโดยยีน *mob*) จัดจำได้อย่างจำเพาะ มีจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (*oriV*) ของ พลาสมิด

pBR325 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่เพิ่มจำนวน (replicate) ได้ในแบคทีเรียกลุ่ม Enteric bacteria เท่านั้น เมื่อเซลล์ผู้รับที่ไม่อยู่ในกลุ่มนี้ได้รับพลาสมิด pSUP2021 ทรานสโปซอน Tn5 จะแยกตัวออกจากพลาสมิดแล้วเข้าแทรกสอดบนดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับและพลาสมิดจะถูกทำลายไป ส่วนแบคทีเรียผู้ให้คือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ S17-1 ได้มีการดัดแปลงพันธุ์โดยแทรกสอดยีน *tra* สำหรับสร้าง sex pilus ของพลาสมิด RP4 เข้าในโครโมโซม Simon และคณะได้ทดลองนำพลาสมิด pSUP2021 และ *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ที่สร้างขึ้นมาใช้ทำลายพันธุ์เชื้อ *Rhizobium meliloti* โดยวิธีคอนจูเกชันปรากฏว่า Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มและประสิทธิภาพของทรานสโปสิชันประมาณ 10^{-4} ต่อเซลล์ผู้รับ



รูปที่ 1.6 พลาสมิด pSUP2021 (Simon และคณะ, 1983)

ภายหลังมีการใช้พลาสมิด pSUP2021 ในการก่อการกลายพันธุ์โดยทรานสโปซอน Tn5 ในแบคทีเรียต่างๆ ดังตัวอย่างในตารางที่ 1.2

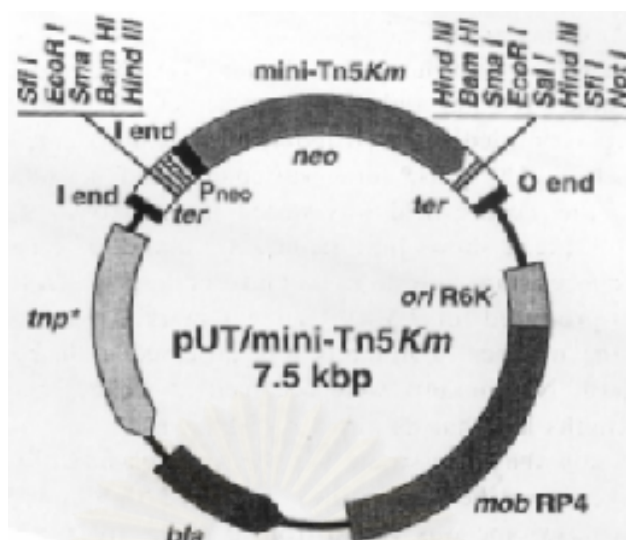
ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.2 การก่อการกลายพันธุ์โดยใช้พลาสมิด pSUP2021 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 ในแบคทีเรียต่างๆ

แบคทีเรีย	เอกสารอ้างอิง
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Xu และคณะ, 1988
<i>Escherichia coli</i> และ <i>Enterobacter aerogenes</i>	Parke, 1990
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rodriguez-Palenzuela และคณะ, 1991
<i>Xanthomonas campestris</i>	Hu และคณะ, 1992
<i>Sorangium cellulosum</i>	Jaoua และคณะ, 1992
<i>Pseudomonas perfectomarina</i>	Zumft และคณะ, 1992
<i>Rhizobium meliloti</i>	Lagares และคณะ, 1992

พลาสมิดพาหะและ *E. coli* สำหรับการก่อการกลายพันธุ์โดย ini-Tn5

mini-Tn5 เป็นทรานสโปซอนที่สร้างขึ้นโดย DE Lorenzo และคณะ (1990) ส่วนที่เคลื่อนที่ที่จะแทรกสอดบนดีเอ็นเอเป้าหมายประกอบด้วยปลาย inverted repeats ของ IS50 และยื่นต่อต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ส่วนที่เป็นยื่น *trp* (ทรานสโปสเสส) จะถูกแยกออกมาอยู่บนเวกเตอร์ จึงเป็นผลให้ mini-Tn5 มีขนาดเล็กกลงมาก เซลล์ที่รับ mini-Tn5 จึงไม่มีทรานสโปสเสสและโปรตีนยับยั้งทำให้สามารถรับ mini-Tn5 ได้หลายชุด นอกจากนี้ DE Lorenzo และคณะได้ใส่ multiple cloning site เพิ่มลงไป สำหรับโคลนยีนที่ต้องการลงบนโครโมโซมของแบคทีเรียอย่างถาวร ตัวอย่างเวกเตอร์พาหะคือ pUT/mini-Tn5 Km (รูปที่ 1.7) มี *oriT* ของพลาสมิด RP4 และมีจุดเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของฟาจ R6K ซึ่งต้องการโปรตีน π ในการจำลองดีเอ็นเอ ดังนั้นเซลล์ผู้ให้จึงจำเป็นต้องมี λ pir lysogen พลาสมิดชนิดนี้จึงเพิ่มจำนวนได้เช่น *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ pir (Herrero และคณะ, 1990) เป็นต้น



รูปที่ 1.7 พลาสมิด pUT/mini-Tn5 Km neo คือยีนนีโอมัยซินฟอสโฟทรานเฟอเรส I end และ O end คือปลายด้านในและปลายด้านนอกของทรานสโปซอน Tn5 ความยาว 19 คู่เบส ter คือจุดหยุดการถอดรหัส tnp คือยีนทรานสโปเอส bla คือยีนดื้อต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน mobRP4 คือ oriT และยีนที่เกี่ยวข้องในการส่งพลาสมิดในกระบวนการคอนจูเกชัน oriR6K คือจุดเริ่มการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Artiguenave และคณะ, 1997)

ประสิทธิภาพของทรานสโพสิชัน (transposition efficiency)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันของทรานสโปซอน Tn5 เมื่อใช้วิธีคอนจูเกชันได้แก่

1) พลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะ พลาสมิดพาหะที่ดีจะต้องมีประสิทธิภาพในการคอนจูเกชันสูงแต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ผู้รับ (Hom และคณะ, 1984) ทรานสโพสิชันประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือพลาสมิดเข้าสู่เซลล์และการเคลื่อนที่ของทรานสโปซอน Tn5 Beringer และคณะ (1978) รายงานว่าพลาสมิด RP4 ถ่ายทอดจาก *E. coli* สู่ *Rhizobium* ด้วยความถี่ 10^{-2} ต่อเซลล์ผู้รับ ในขณะที่ความถี่ในการเคลื่อนที่ของทรานสโปซอน Tn5 ประมาณ 10^{-5} - 10^{-6} ต่อเซลล์ผู้รับ ดังนั้นประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันจะต่ำกว่าความถี่ในการคอนจูเกชันเสมอ

2) สายพันธุ์ของ *Rhizobium* Simon และคณะ (1983) ทดลองทำการคอนจูเกชัน *E. coli* ที่มีพลาสมิด pSUP1011 (ทรานสโปซอน Tn5) กับ *R. meliloti* และ *R. japonicum* โดยใช้ภาวะเดียวกันพบว่าประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันเท่ากับ 5×10^{-5} และ 4.2×10^{-6} ต่อเซลล์ผู้รับตามลำดับ

3) อายุของเซลล์ที่ใช้ในการคอนจูเกชัน Yen และ Gunsalus (1982) ใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะทวีคูณ Simon และคณะ (1983) ใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญอยู่ในระยะทวีคูณ ในขณะที่ Parke (1993) และ Dehio และ Meyer (1997) ใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญเต็มที่ (stationary phase) ในการคอนจูเกชัน

4) ระยะเวลาที่ใช้ในการคอนจูเกชันซึ่งแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของ *Rhizobium* เช่น Selvaraj และ Iyer (1983) ใช้เวลาในการคอนจูเกต *E. coli* สายพันธุ์ WA803 ที่มีพลาสมิด GS9 กับ *R. meliloti* สายพันธุ์ JJ1 GS1002 และ GS1003 โดยใช้เวลา 4 12 และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ จึงมีค่าประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันสูงสุดเท่ากับ 4×10^{-3} 4×10^{-4} และ 1×10^{-4} ต่อเซลล์ผู้รับตามลำดับ ในขณะที่ Hom และคณะ (1984) ใช้เวลาในการคอนจูเกต *E. coli* สายพันธุ์ SM-10 ที่มีพลาสมิด pSUP1011 กับ *R. japonicum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์เจริญช้าเป็นเวลา 4 วัน จึงมีค่าประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันสูงสุดเท่ากับ 4.2×10^{-6} ต่อเซลล์ผู้รับ

5) อัตราส่วนของเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับ มีการใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับที่หลากหลายในการคอนจูเกชันเพื่อให้ได้ทรานสคอนจูเกนต์จำนวนมากเช่น Yen และ Gunsalus (1982) และ Selvaraj และ Iyer (1983) ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับเท่ากับ 1 : 1 Hom และคณะ (1984) ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับเท่ากับ 5 : 1 Simon และคณะ (1983) ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับเท่ากับ 1 : 5 Kunte และ Galinski (1995) ใช้อัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับเท่ากับ 1: 6.4 และ 1: 8.2 เป็นต้น

การก่อการกลายพันธุ์ *Rhizobium* โดยทรานสโปซอน Tn5

ได้มีการใช้ทรานสโปซอน Tn5 ในการก่อการกลายพันธุ์ *Rhizobium* เพื่อประโยชน์ต่าง ๆ กันเช่น การศึกษาแหล่งซัลเฟอร์ของ *Rhizobium eliti* (Tate และคณะ, 1997) การใช้ทรานสโปซอน Tn5 เพื่อเป็นเครื่องหมายสำหรับติดตามการอยู่รอดของ *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae ในแหล่งเกษตรกรรม (Cullen และคณะ, 1998) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการนำทรานสโปซอน Tn5 มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของ *Rhizobium* หลากหลายสายพันธุ์ตัวอย่างในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 การใช้ทรานสโปซอน Tn5 ในการศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของ *Rhizobium*

สายพันธุ์ของ <i>Rhizobium</i>	เอกสารอ้างอิง
<i>R. meliloti</i>	Watson และ Rastogi, 1993
<i>R. sp.</i> (Acacia) สายพันธุ์ GRH2	Lopez-Lara และคณะ, 1995
<i>R. meliloti</i> สายพันธุ์ EFB1	Lloret และคณะ, 1998
<i>R. leguminosarum</i>	Reid และ Poole, 1998
<i>R. etli</i> สายพันธุ์ KIM5s	Vinuesa และคณะ, 1999
<i>R. tropici</i>	Botero และคณะ, 2000

การติดตาม *Rhizobium sp.* สายพันธุ์ CU-A1

ในการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ไปใช้ในกระบวนการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารดังกล่าว จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงวิถีและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์นั้นก่อน นอกจากนี้กระบวนการติดตามเชื้อที่มีประสิทธิภาพจะช่วยอำนวยความสะดวกในการติดตามเชื้อจุลินทรีย์ในระบบนิเวศน์จำลอง ในปัจจุบันนี้มีวิธีการติดตามจุลินทรีย์ได้หลายวิธีเช่น การใช้ rRNA (Jansson และ Prosser, 1997) การใช้ luciferase (Unge และคณะ, 1999) และการใช้โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein) (Errampalli และคณะ, 1998) เพื่อเป็นตัวติดตาม

Green fluorescent pretein (GFP)

GFP เป็นโปรตีนที่เรืองแสงได้ด้วยตัวเอง พบในแมงกะพรุน *Aequorea victoria* โปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 หน่วย เรียงตัวเป็นรูปทรงกระบอก (β -can) ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์แบบบีตา 11 สายเรียงตัวแบบ antiparallel เป็นรูปทรงกระบอก (สีเขียว) ภายในทรงกระบอกประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์แบบเกลียวอัลฟา (สีน้ำเงิน) มีโครโมฟอร์ (สีแดง) บรรจุอยู่ตรงกลางและมีปลายเป็นเพปไทด์สายเกลียว (สีฟ้า) (Carson, 1987) ดังรูปที่ 1.8

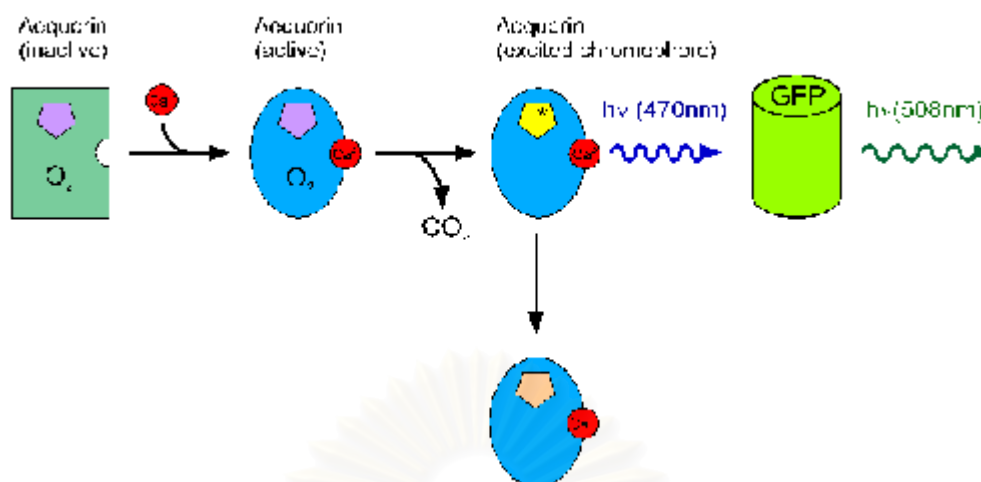


รูปที่ 1.8 โครงสร้างของ green fluorescent protein (Carson, 1987)

กลไกในการเรืองแสงของ GFP (Cody และคณะ, 1993)

การเรืองแสงของโปรตีน GFP ต้องการปัจจัย 3 ประการคือ ออกซิเจน แคลเซียมไอออน และพลังงานแสงซึ่งโปรตีน GFP ดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่มีความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร ภายในโครโมฟอร์ประกอบด้วยโครงสร้างอะโปโปรตีนน้ำหนักมวล 21.4 กิโลดัลตัน เรียกว่า aequorin ซึ่งประกอบด้วยออกซิเจนและ coelentraine (รูปห้าเหลี่ยมสีม่วงแดง) เมื่อแสงความยาวคลื่น 395 นาโนเมตรและ Ca^{2+} กระตุ้น aequorin จะออกซิไดส์ coelentraine เป็น coelenteramide (รูปห้าเหลี่ยมสีเหลือง) ซึ่งเป็นภาวะกระตุ้น เมื่อ coelenteramide ปลดปล่อยพลังงานแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรออกมาจะกลับสู่รูป coelentraine ซึ่งเป็นภาวะปกติ (รูปห้าเหลี่ยมสีทราาย) พลังงานแสงจะถูกถ่ายทอดมายัง GFP และเรืองแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.9 กลไกในการเรืองแสงของ GFP (Cody และคณะ, 1993)

ประโยชน์ของ GFP

การเรืองแสงของ GFP ไม่ต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ดังนั้นจึงเรืองแสงได้นานและตลอดอายุของเซลล์ (Chalfie และคณะ, 1994) ในขณะที่ยีนเรืองแสงอื่นๆ เช่น luciferase (*lux*) ต้องการพลังงานในการเรืองแสง ซึ่งความเข้มของแสงจะขึ้นกับระดับพลังงานของเซลล์ (Carson, 1987) นอกจากนี้ยีน *gfp* สามารถแสดงออกได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งยูคาริโอตและโปรคาริโอต จึงมีการนำยีน *gfp* มาใช้ประโยชน์ต่างๆ มากมายเช่น ใช้ติดตามการแสดงออกของยีนในอวกาศ (Ludin และคณะ, 1996) ใช้ในการติดตามจำนวนแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (Errampalli และคณะ, 1998; Unge และคณะ, 1999) หรือติดตามการอยู่รอดในระบบนิเวศวิทยาและปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสกุล *Rhizobiaceae* กับพืช (Xi และคณะ, 1999) เป็นต้น

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศรีลยา แผงไตร, 2543) ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานคร สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนและแนฟทาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และสามารถย่อยสลาย พีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนฟทีนร่วมกับอะซีแนฟทีลีน

จนถึงปัจจุบันนี้ ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดย *Rhizobium* โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะซีแนฟทีลีน ประกอบกับสมบัติในการเจริญและย่อยสลายสาร

PAHs ได้หลายชนิดของ *Rhizobium* sp. CU-A1 จึงน่าสนใจที่จะศึกษาวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟริลีนของสายพันธุ์ CU-A1

แต่เนื่องจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ไม่สามารถเปลี่ยนสีอินโดลเป็นอินดิโก ซึ่งมีสีฟ้า และไม่สามารถออกซีไดส์คะทีคอลซึ่งพบเป็นสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งในวิธีการย่อยสลายแนฟธาดีนให้เป็น 2-ไฮดรอกซีมีมูโคนิค เซมิอัลดีไฮด์ซึ่งมีสีเหลือง จึงทำให้ไม่สามารถค้นหาเอ็นทีเกี่ยวข้องกับในการย่อยสลายอะซีแนฟริลีนโดยใช้วิธีสร้างห้องสมุด DNA การก่อกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาเอ็นทีดังกล่าว

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้วิธีคอนจูเกชันเพื่อให้ได้ทรานสคอนจูเกนต์จำนวนมาก จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟริลีนและเปรียบเทียบกับสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟริลีนโดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และนำภาวะการคอนจูเกชันที่เหมาะสมมาสร้าง *Rhizobium* ที่มีเอ็น *gfp* เป็นเครื่องหมาย โดยใช้พลาสมิด pUT mini-Tn5::gusA-gfp21

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้วิธีคอนจูเกชัน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิธีการย่อยสลายสารอะซีแนฟริลีนโดยแบคทีเรีย สายพันธุ์กลายที่ได้สามารถนำไปศึกษาในระดับยีน และเพื่อสร้าง *Rhizobium* ที่มีเอ็น *gfp* เป็นเครื่องหมายเพื่อใช้ประโยชน์ในการติดตามการอยู่รอดของ *Rhizobium* ในระบบการย่อยสลายสาร PAHs จำลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kakusan, Japan.
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
3. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.
4. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P และ A200S ของบริษัท Sartorius, USA.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
9. ตู้เขย่าเชื้อ รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA.
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.
12. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต รุ่น FOTO/PREP I ของบริษัท Fotodyne, USA.
13. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร (ultraviolet lamp) รุ่น UVGL-15 ของบริษัท UVP, USA.
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.
15. ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

- ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - คอลัมน์ (column): Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 6.4x150 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.
 - เครื่องตรวจสอป (UV-visible detector) รุ่น SPD-2A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
 - กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
 17. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°C ของบริษัท Forma Scientific, USA.
 18. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°C ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
 19. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
 - Mini gel electrophoresis system Mupid-2 ของบริษัท Advance, Japan.
 - Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
 20. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) รุ่นCHK ของบริษัท Olympus, Japan.
 21. เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) รุ่น RK100 ของบริษัท Bandelin Sonorex, Germany.
 22. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
 23. แผ่นอลูมิเนียมที่แอลซี (TLC aluminium sheet) เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ ของบริษัท E. Merck, Germany.
 24. ชุดกรองลำเจ็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
 25. ชุดกรองลำเจ็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
 26. แผ่นกรองไนโตรเซลลูโลส ขนาดความกว้างรู 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore, USA.
 27. แผ่นกรองชนิด FH ขนาดความกว้างรู 0.20 ไมโครเมตร ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
 28. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

29. ทีแอลซีแชมเบอร์ (TLC chamber) ของบริษัท Desaga Heidelberg, Germany.
30. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
31. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
32. กระดาษโครมาโตกราฟี (chromatography paper) ของบริษัท Advantec, Japan.

2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. แนพทาลีน (naphthalene) ของบริษัท Sigma, USA.
2. อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
3. อะซีแนพโทควิโนน (acenaphthoquinone) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
4. กรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซีลิก (naphthalene 1,8-dicarboxylic acid) ของบริษัท Wako pure chemical industries, Japan.
5. กรด 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (3,4-dihydroxybenzoic acid) หรือ กรดโปรโตคาทีคูอิก (protocatechuic acid *n* hydrate) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
6. กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (2,5-dihydroxybenzoic acid) หรือ กรดเจนทีสิก (genticic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
7. กรดพธาลิก (phthalic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
8. คาทีคอล (catechol) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
9. อินโดล (indole) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
10. กรดซินนามิก (cinnamic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
11. กรดเบนโซอิก (benzoic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
12. กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
13. กรดซัคซินิก (succinic acid) ของบริษัท May & Baker, England.
14. ทริปโตเนน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
15. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
16. ภู่นอง Bacto agar ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
17. ภู่นอง Noble agar ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
18. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan.
19. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
20. แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.

21. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
22. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท AJEX Chemicals, AUS.
23. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
24. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
25. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
26. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
27. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
28. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
29. ไดเมทิลซัลโฟกไซด์ (CH_3SOCH_3) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
30. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
31. เอทิลอะซิเตต ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) ของบริษัท E. Merck, Germany.
32. โทลูอีน ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
33. 1,4-ไดออกเซน ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
34. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.
35. อะซีโตน (CH_3COCH_3) ของบริษัท E Merck, Germany.
36. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous Na_2SO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.
37. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
38. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E. Merck, Germany.
39. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท E. Merck, Germany.
40. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E. Merck, Germany.
41. สีบรมมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
42. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
43. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Sigma, USA.
44. SDS (sodium lauryl sulfate), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
45. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}(\text{CH}_3)_3$]Br ของบริษัท TCI-EP, Japan.

46. สารปฏิชีวนะ กานามัยซิน (kanamycin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) พอลิมิกซิน (polymyxin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) และเตตราซัยคลิน (tetracyclin) ของบริษัท Nacalia tesque, Japan.
47. เเรศทริกซันเอนไซม์ *EcoRI*, *HindIII*, *Sall*, *BamHI*, *PstI*, และ *SacI* ของบริษัท Promega, USA.
48. Lambda DNA/*HindIII* marker ของบริษัท Promega, USA.
49. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
50. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit ของบริษัท Bio101, USA.
51. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 แบคทีเรียและพลาสมิด

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลองดังรายชื่อในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียและพลาสมิด

แบคทีเรีย	พินโทป์/จिनโทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>RecA</i> , <i>Tra</i> (IncP), (RP4-2-Tc::Mu::Km ^r ::Tn7), Sm ^r	Simon และคณะ, 1983
<i>E. coli</i> CC118 λ_{pir}	$\Delta(ara-leu)$, <i>araD</i> , $\Delta lacX74$, <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>phoA20</i> , <i>thi-1</i> , <i>rpsE</i> , <i>ropB</i> , <i>argE</i> (Am ^r), <i>recA1</i> , λ_{pir} phage lysogen	Herrero และคณะ, 1990
<i>E. coli</i> S17-1 λ_{pir}	<i>RecA</i> , <i>Thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> M ⁺ RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, λ_{pir} , Sm ^r	Herrero และคณะ, 1990
<i>Rhizobium</i> sp. CU-A1	acenaphthylene and naphthalene degrader	ศรีลยา พงษ์ไตร, 2543
พลาสมิด	พินโทป์/จिनโทป์	อ้างอิง
pSUP2021	<i>Tra</i> ⁻ , <i>Mob</i> ⁺ , Cm ^r , Tn5(Km ^r), pBR325 replicon	Simon และคณะ, 1983
pUT mini-Tn5 <i>gusA-gfp21</i>	<i>gfp</i> , Am ^r , Km ^r	Xi และคณะ, 1999

2.4 เลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

2.4.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก3) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข5) ใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ กานามัยซิน (Km) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คลอแรมฟินิคอล (Cm) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมพิซิลลิน (Am) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน (Sm) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น (bacto agar 1.5%) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C

2.4.2 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอาหาร CFMM (ภาคผนวก ก1) โดยวางผลึกอะซีแนพริลีนบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อผึ่งด้วยเทปกาวให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเติมสารละลายอะซีแนพริลีนในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข1) และเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 วัน

2.4.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข4) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 3:7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 6 เดือนหรือ -70 °C เป็นเวลา 12 เดือน

2.5 เตรียมหัวเชื้อ *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

2.5.1 เตรียมหัวเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ได้โดยเชยโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะตามสายพันธุ์และชนิดของพลาสมิด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.5.2 เตรียมหัวเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM หรือ LB ได้โดยเชยโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เหลว CFMM ที่เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 กรัมต่อลิตรหรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.6 ศึกษาสมบัติที่จำเป็นของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUS2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5

2.6.1 ทดสอบสมบัติในการต้านสารปฏิชีวนะของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUS2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เตรียมหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ตามข้อ 2.5 ใช้หัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน คลอแรมเฟนิคอล กานามัยซิน พอลิมิกซิน สเตรปโตมัยซินหรือเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 25, 50 หรือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิิตร บ่มเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเทียบกับหลอดควบคุม

2.6.2 ทดสอบการใช้สารประกอบอะโรมาติกในการเจริญเตรียมหัวเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUS2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM หรือ LB ตามข้อ 2.5 ใช้หัวเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตรปลูกลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิิตร ที่เติมสารประกอบอะโรมาติกได้แก่ กรดโปรโตคาที่คูอิก กรดเจนทิลิก กรดซาลิไซลิก กรดซินนามิก กรดพธาลิก 3-เมธิลอะซีลหรืออะซีล (ภาคผนวก ข2) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายหลอดละ 0.5 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อตามวิธีในข้อ 2.4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเทียบกับหลอดควบคุม

2.6.3 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUS2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว 2YT (ภาคผนวก ก5) เตรียมหัวเชื้อ *E. coli* และ *Rhizobium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ตามข้อ 2.5 เติมหหัวเชื้อลงในอาหารเหลว 2YT จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 สำหรับ *E. coli* จะเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C และ *Rhizobium* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ติดตามรูปแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโดยวัดค่า OD_{600} และเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที เพื่อนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี viable plate count โดยนำเชื้อมาเจือจางด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (ภาคผนวก ข3) ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB โดย *E. coli* จะเติมสารปฏิชีวนะกานา

มัชชิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *Rhizobium* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

2.7 หากภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโพซอน Tn5 โดยคอนจูเกชันกับ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUS2021

เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ตามวิธีข้อ 2.5 เติมห้วเชื้อลงในอาหารเหลว 2YT จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 สำหรับ *E. coli* จะเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C และ *Rhizobium* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนการเจริญถึงช่วงต้นของระยะทวีคูณ (early exponential phase) โดยอ้างอิงตามค่า OD_{600} ที่วัดได้จากข้อ 2.6.3 บั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียสองครั้งด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% แขนวลอยเซลล์ด้วยสารละลายเดิมให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้ให้และ *Rhizobium* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้รับมาผสมให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 1:1 1:2 หรือ 2:1 บั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกด้วยไมโครปิเปตให้เหลือส่วนน้ำใสประมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อแขวนลอยเซลล์ จากนั้นปิเปตลงบนเยื่อกรองไนโตรเซลลูโลสขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร (ภาคผนวก ข28) ซึ่งวางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ตามวิธีคอนจูเกชันของ Selvaraj และ Iyer (1983) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C แปรผันเวลาบ่มเป็น 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อหาอัตราส่วนและระยะเวลาคอนจูเกชันที่ให้ประสิทธิภาพของทรานสโพสิชัน (transposition efficiency) สูงสุดต่อเซลล์ผู้ให้ เมื่อบ่มเซลล์ครบระยะเวลาที่กำหนด ใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบเยื่อกรองที่บ่มเชื้อไว้มาบรรจุลงในหลอดไมโครพิพพ์ ฉะเซลล์ออกจากเยื่อกรองด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้เซลล์แขวนลอยเข้มข้นนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM สองชนิดได้แก่

ก. ใช้เซลล์แขวนลอยเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.1 หรือมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน เพื่อคัดแยก *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนท์

ข. เจือจางเซลล์จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% แล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่เติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.2 หรือสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.1 ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน เพื่อนับจำนวน *Rhizobium* ทั้งหมดที่ใช้ในการคอนจูเกชัน

คำนวณค่าประสิทธิภาพของการทรานสเฟสจากอัตราส่วนจำนวน *Rhizobium* ทรานสคอนจูเกนต์ ต่อจำนวน *Rhizobium* ทั้งหมดที่ใช้ในการคอนจูเกชัน

2.8 คัดแยก *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพติลิน

เก็บโคโลนีเดียวของทรานสคอนจูเกนต์ที่ขึ้นบนอาหารแข็งข้อ 2.7 ก. มาขีดบนอาหารดังต่อไปนี้

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินร่วมกับสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.1 หรือมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.2 เพื่อเป็น master plate

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและวางผลึกอะซีแนพติลินบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฝักรอบจานอาหารให้สนิทด้วยเทปกาว

ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญของเชื้อบนจานอาหารข้อ ข. และแยกโคโลนีที่ไม่เจริญหรือมีลักษณะการเจริญต่างไปจากสายพันธุ์เดิม โดยนำโคโลนีบน master plate (ข้อ ก.) ที่มีหมายเลขตรงกับโคโลนีที่ไม่เจริญหรือมีลักษณะการเจริญต่างไปจากสายพันธุ์เดิมบนจานอาหารข้อ ข. มาทำให้บริสุทธิ์โดยเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเตรียมได้แบบเดียวกันกับข้อ 2.7 ข. เลี้ยงและเก็บรักษา *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่คัดแยกได้โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันและใช้วิธีเลี้ยงและเก็บรักษาตามที่ได้อธิบายในข้อ 2.4

2.9 ตรวจยืนยันการแทรกสอดแบบสุ่มของทรานสโปซอน Tn5 บนโครโมโซมของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายโดยวิธีไฮบริดไนเซชัน (southern hybridization)

2.9.1 สกัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium*

สกัดโครโมโซมของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนท์ (โคลนที่ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินแต่สามารถย่อยสลายสารอะซีแนพริลีนได้ตามปกติ) *Rhizobium* สายพันธุ์กลายและ *Rhizobium* sp.สายพันธุ์ CU-A1 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1989) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายและทรานสคอนจูแกนท์จะเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบรรจุในหลอดไมโครพิวจ์ปั่นแยกเซลล์ออกจากด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขนงลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข18) ปริมาตร 567 ไมโครลิตร เติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10 % (ภาคผนวก ข10) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ จนเห็นสารเริ่มเหนียวและใสขึ้น เติมสารละลายโปรตีนเนสเคเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆ ทุก 10 นาที แล้วเติมสารละลายเกลียวโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด จากนั้นเติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าจนสารละลายมีสีเหลืองขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครพิวจ์อันใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าจนสารละลายมีสีขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่หลอดไมโครพิวจ์อันใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด ในขั้นนี้อาจเห็นตะกอนสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเอทานอล 70 % ที่เย็นจัด 2 ครั้ง ระบายเอทานอลให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แขนงลอยตะกอนที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลาย RNase เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.9.2 สกัดพลาสมิด pSUP2021

สกัดพลาสมิด pSUP2021 ปริมาณน้อยด้วยชุดแยกพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข7) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีสารปฏิชีวนะ กานามัยซิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครพิวจ์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แขนวลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอด จนเห็นสารแขวนลอยเริ่มเหนียวและใสขึ้นภายในเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสก้นคอลัมน์ทิ้ง เติมสารละลาย PB ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสก้นคอลัมน์ทิ้ง เติมสารละลาย PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสก้นคอลัมน์ทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิมซ้ำอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์ขึ้นในที่มีแผ่นกรองจับพลาสมิด มาสวมกับหลอดไมโครพิวจ์ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายพลาสมิด เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

2.9.3 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

โดยนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} ถ้าอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

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

2.9.4 ตัดดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ตัดดีเอ็นเอแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ (Promega, USA) โดยใช้ส่วนผสมปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอ	0.5-10 ไมโครกรัม
10X บัฟเฟอร์	1/10 ของปริมาตรทั้งหมด
เรสทริกชันเอนไซม์	3-5 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	เติมจนถึงปริมาตรที่ต้องการ

ผสมให้เข้ากัน ปั่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.9.5 แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข26) เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทปบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข25) หยดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกและช่องวิ่งสุดท้ายจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานคือ ดีเอ็นเอของไวรัสแลมดาที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII* (λ DNA/*HindIII* marker) ที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสรุ่น Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์และชุดทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสรุ่น Mini sub-cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟินอลบลู เคลื่อนที่มาเกือบถึงขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข27) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

2.9.6 เตรียมชิ้นส่วนของทรานสโปซอนTn5

ตัดพลาสมิด pSUP2021 ที่สกัดได้ในข้อ 2.9.2 ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII* ตามวิธีในข้อ 2.9.4 จากนั้นนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ตัดอะกาโรสเจลตรงตำแหน่งชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 3.4 กิโลเบสซึ่งเป็น

ชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5 ออกจากอะกาโรสเจลให้มีขนาดเล็กที่สุด ซึ่งนำหนักชิ้นอะกาโรสเจลใส่ไว้ในหลอดไมโครพิวค์

แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล Geneclean II Kit (ภาคผนวก ข8) (Bio-101, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมสารละลายโซเดียมไฮโอไดด์ปริมาตร 3 เท่าของชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 45-55 °C จนอะกาโรสเจลละลายหมด เติมสารละลาย glass milk ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที โดยเขย่าทุก 1 นาทีให้ glass milk กระจาย นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จากนั้นนำไปประเหยเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรเพื่อแขวนลอยชิ้นดีเอ็นเอ ปั่นตกตะกอน glass milk ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสซึ่งมีชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5 ละลายอยู่เก็บในหลอดไมโครพิวค์อันใหม่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

2.9.7 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ด้วย DIG-Oxygenin โดยวิธี random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I (Boehringer Mannheim, Germany) (ภาคผนวก ข15) ตามวิธีของผู้ผลิต ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.9.6 ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครพิวค์นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG-High Prime (หลอดหมายเลข 1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 โดยเจือจางดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ปริมาตร 39 ไมโครลิตร แล้วเจือจางต่อไปตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว

ครั้งที่เจือจาง	ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ต่อ DNA dilution buffer
1. 1 : 3	10 μ l/23 μ l (A)
2. 1 : 10	5 μ l/45 μ l (B)
3. A เจือจาง 1 : 10	5 μ l/45 μ l (C)
4. B เจือจาง 1 : 10	5 μ l/45 μ l (D)
5. C เจือจาง 1 : 10	5 μ l/45 μ l (E)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วในหลอด A ถึง D มาอย่างละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบน DIG quantification teststrip (หลอดหมายเลข 7) ทิ้งให้แห้ง 2 นาที แล้วนำไปจุ่มในสารละลายต่อไปนี้ตั้งชั้นตอนในตารางที่ 2.3 ควบคู่กับดีเอ็นเอมาตรฐาน DIG control teststrip (หลอดหมายเลข 8)

ตารางที่ 2.3 ขั้นตอนการทดลองสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอติดตาม

หลอดที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	Buffer 2 blocking solution	2
2	Antibody solution (1 : 20,000 ใน buffer 2)	3
1	Buffer 2 blocking solution	1
3	Buffer 1	1
4	Buffer 3	1
5	Color-substrate solution	5-30

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มีดจนเกิดจุดสีม่วงน้ำเงินแต่ไม่ควรบ่มเกิน 30 นาที เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบดีเอ็นเอเกิดขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้นำแถบทดสอบดีเอ็นเอมาล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เทียบสีที่ได้กับแถบทดสอบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยปริมาณดีเอ็นเอบนแถบดีเอ็นเอมาตรฐานมีค่าโดยประมาณดังนี้ 300, 100, 30, 10 และ 3 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

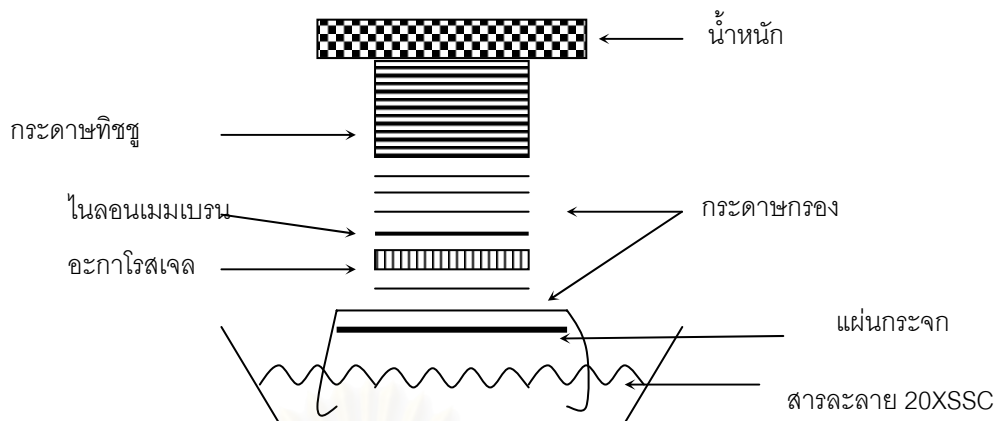
2.9.8 เตรียมอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สำหรับไฮบริดเซชัน

โดยใช้ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่สกัดได้จากข้อ 2.9.1 ปริมาณ 10 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI ตามวิธีในข้อ 2.9.4 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยชุดทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรุ่น Mini sub-cell GT ตามวิธีในข้อ 2.9.5 โดยช่องวิ่งแรกและช่องวิ่งสุดท้ายเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA/*HindIII* marker) ช่องวิ่งที่ 2 และช่องวิ่งรองสุดท้ายเป็นพลาสมิด pSUP2021 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ช่องวิ่งที่ 4 เป็นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ช่องวิ่งที่เหลือเป็นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายและทรานสคอนจูแกนท์ตามลำดับ ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปขึ้นอะกาโรสเจล

นำขึ้นอะกาโรสเจลมาดีเนเจอร์สายดีเอ็นเอโดยแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ แล้วแช่ใน denaturation buffer (ภาคผนวก ข11) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ จากนั้นแช่ใน neutralization buffer (ภาคผนวก ข12) เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเบาๆ ทำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ จะได้อะกาโรสเจลที่พร้อมสำหรับไฮบริไดเซชัน

2.9.9 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern-Transfer)

วัดขนาดของขึ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมได้จากข้อ 2.9.8 กำหนดความกว้างเท่ากับค่า A และความยาวของอะกาโรสเจลเท่ากับค่า B จากนั้นตัดไนลอนเมมเบรนขนาด AXB 4 แผ่น กระดาษกรองขนาด AX3B 1 แผ่น และขนาด AX2B 3 แผ่น ทำการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยวางกระดาษกรองขนาด AX3B ที่ชุ่มสารละลาย 20XSSC (ภาคผนวก ข9) พาดบนแผ่นกระจกที่วางขวางอยู่บนกล่องพลาสติกซึ่งบรรจุสารละลาย 20XSSC ให้ปลายกระดาษกรองทั้งสองด้านแช่ในสารละลาย วางกระดาษกรองขนาด AXB ซ้อนลงไปในแนวเดียวกัน จากนั้นวางแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมได้จากข้อ 2.9.8 ลงไปโดยคว่ำหน้าลง วางไนลอนเมมเบรนที่ชุ่มด้วย 20XSSC ซ้อนบนขึ้นอะกาโรสเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ วางกระดาษกรองขนาด AXB ทับลงไปอีก 3 ชั้น จากนั้นวางกระดาษทิชชูขนาด AXB หนาประมาณ 4-5 นิ้วลงไป เสร็จแล้วกดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 0.5 กิโลกรัม

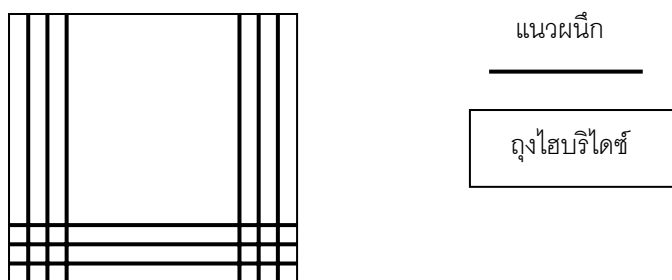


รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงวิธีย้ายดีเอ็นเอโดยหลักการ capillary transfer จากอะกาโรสเจล ไปยังแผ่นโหนดอนเมมเบรน

ควรระวังไม่ให้กระดาษทิชชูสัมผัสกับอะกาโรสเจลหรือกระดาษกรองที่รองใต้แผ่นอะกาโรสเจล และเติมสารละลาย 20XSSC ให้ท่วมปลายกระดาษกรองทั้งสองด้านเสมอ ตั้งไว้เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำโหนดอนเมมเบรนออกมาตัดมุมด้านซ้ายบน (มุมติดกับช่องวิ่งสุดท้าย) เพื่อเป็นเครื่องหมาย แล้วแช่โหนดอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ในสารละลาย 2XSSC เป็นเวลา 15 นาที ชั้บให้แห้งสนิทด้วยกระดาษกรองขนาด AX2B จากนั้นตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นกับเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตรเป็นเวลา 3 นาที เก็บรักษาโหนดอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ในถุงพลาสติก โดยห่อด้วยกระดาษกรองขนาด AX2B ไว้ในที่แห้งและเย็น

2.9.10 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium*

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำโหนดอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ในถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยความร้อนดังรูปที่ 2.2 เติม hybridization buffer (ภาคผนวก ข15) ที่มีอุณหภูมิ 68 °C ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป (สำหรับโหนดอนเมมเบรนขนาดไม่เกิน 100 ตร.ซม.) ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วผนึกปิดให้สนิทนำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °C เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง



รูปที่ 2.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 สำหรับไฮบริไดเซชัน โดยเติมดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ในสารละลาย hybridization buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ให้ความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย hybridization buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุในหลอดพลาสติกฝาเกลียว นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นลงจนได้อุณหภูมิ 68 °ซ

ย้ายไนลอนเมมเบรนที่ผ่านการพรีไฮบริไดเซชันแล้วใส่ลงในถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดซ์ใบใหม่และผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยความร้อนดังรูปที่ 2.2 จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ใส่ฟองอากาศออกให้หมดแล้วผนึกปิดให้สนิท 3 ครั้ง นำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง (สารละลายดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ใช้แล้วนำกลับมาใช้ได้อีกโดยเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้ครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 เพิ่มอีก 2 ไมโครลิตร)

เมื่อไฮบริไดเซชันสมบูรณ์แล้วนำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่จับกับดีเอ็นเอหรือไนลอนเมมเบรนอย่างไม่จำเพาะด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง โดยใส่ในกล่องพลาสติกและเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง และล้างอีก 2 ครั้งด้วยสารละลาย 0.1XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข16) ที่มีอุณหภูมิ 68 °ซ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 68 °ซ ครั้งละ 15 นาที

2.9.11 ตรวจสอบตำแหน่งของทรานสโปซอน Tn 5 โดยวิธีทำให้เกิดสีด้วยสาร NBT/BCIP

ตรวจหาตำแหน่งของทรานสโพรอน Tn 5 โดยวิธีทำให้เกิดสีด้วยสาร NBT/BCIP (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) โดยนำในลอนเมมเบรนที่ได้ในข้อ 2.9.10 มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1 (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในกล่องพลาสติกเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในบัฟเฟอร์ 2 (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ในสารละลาย Anti-DIG-AP conjugate ซึ่งเตรียมได้โดยเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ 2 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้าง Anti-DIG-AP conjugate ที่มากเกินไปออกด้วยบัฟเฟอร์ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 2 ครั้งเขย่าเบาๆ ครั้งละ 15 นาที และนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ 3 (ภาคผนวก ข17) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ 5 นาที จากนั้นนำไปใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริดซ์ที่ผนึกด้านข้างดังรูปที่ 2.2 เติสารละลาย NBT/BCIP ซึ่งเตรียมได้โดยเจือจาง NBT/BCIP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่นึกถุงให้สนิท นำไปวางบ่มในที่มืดเป็นเวลา 1-16 ชั่วโมง จะเกิดแถบสีม่วงน้ำเงินซึ่งแสดงตำแหน่งของทรานสโพรอน Tn 5 เมื่อเห็นแถบสีชัดเจนแล้วล้างในลอนเมมเบรนด้วยน้ำปลอดประจุ 10 นาที ซับให้แห้งสนิทด้วยกระดาษกรอง เก็บรักษาในถุงพลาสติก โดยห่อด้วยกระดาษกรองขนาด AX2B ไว้ในที่แห้งและเย็น

2.10 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์กลายที่คัดแยกได้กับสายพันธุ์เดิม เมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพธิลิน แนนพธาลิน และอนุพันธ์ของอะซีแนพธิลิน

เตรียมหัวเชื้อของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายโดยเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ได้จากข้อ 2.6.2 และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียสองครั้งด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เติมหหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 และ 1.0 โดยมีสาร PAHs (ภาคผนวก ข1) เข้มข้นดังนี้เป็นแหล่งคาร์บอน อะซีแนพธิลิน 0.6 กรัมต่อลิตร อะซีแนพโทควิโนน 0.5 กรัมต่อลิตร กรดแนนพธาลิน 1,8-ไดคาร์บอกซีลิก 0.5 กรัมต่อลิตรหรือแนนพธาลิน 0.5 กรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 หลอดที่ปลูกเชื้อด้วยค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 สำหรับศึกษารูปแบบการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม โดยวิธี viable plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB เก็บตัวอย่างทุก 2 วันเป็นเวลา 8 วัน ชุดที่ 2 หลอดที่ปลูกเชื้อด้วยค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 และชุดที่ 3 ชุดควบคุมเป็นหลอดที่ไม่เติมเชื้อเพื่อติดตามการ

ออกซีไดส์ของสาร PAHs ซึ่งเกิดจากปัจจัยทางกายภาพ ชุดที่ 2 และ 3 สำหรับสกัดวิเคราะห์ สารมัธยันต์ ผนังปากหลอดทดลองทุกชุดให้สนิทด้วยพาราฟิล์มเพื่อลดการระเหยของสาร PAHs เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที

2.11 สกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน แนพทาลีน และอนุพันธ์ของอะซีแนพทีลิน

2.11.1 สกัดสารมัธยันต์ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) ดังนี้

นำอาหารเหลวมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.0-3.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น ผสม ปั่นด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ จากนั้นสกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีเดิมอีก 2 ครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสเพื่อกำจัดน้ำที่ปนมาด้วย จากนั้นแยก ส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุนจนได้ตะกอนสารมัธ ยันต์ที่แห้งสนิท เติมนเมธานอลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปละลายผงสารมัธยันต์ในขวดลด ปริมาตร นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดรูกว้าง 0.2 ไมโครเมตร ใส่ใน หลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC

2.11.2 วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน แนพทาลีน และ อนุพันธ์ของอะซีแนพทีลินด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

นำสารสกัดที่ละลายในเมธานอล ปริมาตร 3 ไมโครลิตรมาจุดบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8x8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซีติกเข้มข้น ใน อัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสง อัลตราไวโอเล็ตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

2.12 สร้าง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ pir ที่มีพลาสมิด pUT-mTn5 *gusA-pgfp21* ด้วยวิธี อิเล็กโทรทรานสเฟอร์เมชัน

2.12.1 สกัดพลาสมิด pUT-mTn5 *gusA-pgfp21* จาก *E. coli* สายพันธุ์ CC118 λ_{pir} โดยวิธี alkaline lysis with SDS ของ Sambrook และคณะ (2001) โดยเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ด้วยหลอดไมโครพิพิจ์หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำละลาย I (ภาคผนวก ข22) ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร แขนงลอยเซลล์ให้กระจายแล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง ใส่สารละลาย II (ภาคผนวก ข23) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดจนเห็นสารละลายเริ่มใสและเหนียวขึ้น จากนั้นเติมน้ำละลาย III (ภาคผนวก ข24) ที่เย็นจัดปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด แช่ในอ่างน้ำแข็ง 3-5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดมา เติมน้ำละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสหลอดไมโครพิพิจ์ใหม่ เติมน้ำเย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส นำไปแช่ในตู้เย็น -20 °C เป็นเวลา 60 นาทีหรือ -70 °C เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนพลาสมิดโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด 2 ครั้งและระเหยเอทานอลให้แห้ง ละลายพลาสมิดด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำพลาสมิดให้เข้มข้นขึ้นโดยรวมพลาสมิดที่สกัดได้จากทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำบัฟเฟอร์ TE ให้ได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นให้แยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใสหลอดไมโครพิพิจ์อันใหม่ เติมน้ำละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนน้ำใสผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำเย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง -20 °C เป็นเวลา 60 นาทีหรือ -70 °C เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนพลาสมิดโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด 2 ครั้งและระเหยเอทานอลให้แห้ง ละลายพลาสมิดด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่ -20 °C

2.12.2 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ_{pir} โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ_{pir} ตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อในข้อ 2.5.1 เติมหักเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB

ปริมาตร 30 มิลลิลิตรให้ได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 เช่ยาบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C จนการเจริญถึงช่วงกลางของระยะทวีคูณ (mid log phase) โดยอ้างอิงตามค่า OD₆₀₀ ที่วัดได้จากข้อ 2.6.3 ถ่ายเซลล์ลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แขนวลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล ปลอดเชื้อเข้มข้น 10 % และปั่นตกตะกอนเซลล์ที่สภาวะเดิมอีกครั้งจากนั้นแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลายเดิมอีกครั้งให้มีเซลล์เข้มข้นประมาณ 3×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรแบ่งเก็บในหลอดไมโครฟิวซ์หลอดละ 40 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 °C ได้ 1 เดือน

2.12.3 ทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pUT-mTn5 *gusA-pgfp21* สู่ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1λ*pir* โดยวิธีอิเล็กโตรทรานส์ฟอร์มเมชัน โดยเติมพลาสมิด pUT-mTn5 *gusA-pgfp21* ที่เตรียมได้จากข้อ 2.12.1 ประมาณ 400 นาโนกรัม ลงในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1λ*pir* เย็นจัด ปริมาตร 40 ไมโครลิตรที่เตรียมได้จากข้อ 2.12.2 ผสมเบาๆ แล้วแช่น้ำแข็งไว้ 1 นาที จากนั้นบรรจุเซลล์ลงใน electroporation cuvet ขนาดช่องว่างระหว่างอิเล็กโทรด 2 มม. ที่เย็นจัด แล้วแช่น้ำแข็งไว้ 1 นาที เช็ดด้านนอกของ cuvet ให้แห้ง นำไปทรานส์ฟอร์มโดยวิธีอิเล็กโตรพอเรชัน (electroporation) ด้วยเครื่อง Gene Pulser Apparatus (BioRad, USA) โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2.5 กิโลโวลต์ Capacitance 25 μF, Field Strength 12.5 kV/cm, Resistance 200 Ω จากนั้นเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก6) ที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปทันที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 100, 50 และ 25 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดแยกโคโลนีที่เรืองแสงสีเขียวอมเหลืองมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกัน เก็บรักษาเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.4

2.13 สร้าง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP ที่มียีนเครื่องหมายเรืองแสง (*gfp*-gene marker) บนโครโมโซม

2.13.1 ติดยีนเครื่องหมายเรืองแสง (*gfp*-gene marker) บนโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยวิธีคอนจูกันดังที่ได้บรรยายในข้อ 2.7 โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ*pir* ที่มีพลาสมิด pUT-mTn5 *gusA-pgfp21* เป็นเซลล์ผู้ให้และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเซลล์ผู้รับ โดยใช้อัตราส่วนเซลล์และระยะเวลาบ่มที่ให้ประสิทธิภาพของการทรานส์โพสสูงที่สุด เมื่อบ่มเซลล์ครบระยะเวลาที่กำหนดใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นเมมเบรนที่บ่มเชื้อไว้มา

บรรจุลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เซลล์ออกจากเยื่อกรองด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้เซลล์แขวนลอยเข้มข้น ใช้เซลล์แขวนลอยเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามข้อ 2.6.2 และมีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นคัดแยกโคโลนี ทรานส์คอนจูแกนท์ที่เรืองแสงสีเขียวอมเหลืองภายใต้หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตให้บริสุทธิ์ โดยเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน เลี้ยงและเก็บรักษาทรานส์คอนจูแกนท์ที่คัดแยกได้ตามวิธีใน ข้อ 2.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในการคัดแยก

2.13.2 ตรวจสอบการย่อยสลายสารอะซีแนพทีลินและการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP เทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 โดยเตรียมหัวเชื้อสายพันธุ์ CU-A1 และทรานส์คอนจูแกนท์สายพันธุ์ CU-GFP ในอาหารเหลว CFMM สูตรเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในการคัดแยกทรานส์คอนจูแกนท์ สำหรับสายพันธุ์ CU-A1 ไม่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียสองครั้งด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85% เติมหหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอะซีแนพทีลินเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร ในหลอดทดลองขนาด 22 มิลลิลิตร ให้ได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ฝึนกปากหลอดทดลองให้สนิทด้วยพาราฟิล์มเพื่อลดการระเหิดของอะซีแนพทีลิน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยที่แต่ละเวลาจะมีชุดควบคุม 2 ชุดคือ ชุดควบคุมการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่ไม่เติมอะซีแนพทีลิน และชุดควบคุมการลดลงของอะซีแนพทีลินเนื่องจากการระเหิด ทุกชุดการทดลองจะทำ 2 ซ้ำ ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยใช้วิธี viable plate count ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น และวัดปริมาณอะซีแนพทีลินที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC โดยการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1992) เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 2.11.1

2.14 วิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทีลินที่เหลือโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography

ระบบของ HPLC ที่ใช้ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี รุ่น LC-3A (Shimadzu, Japan) ที่ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร

ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 °ซ ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สารละลายตัวพายเป็นสารละลายเมทานอล 80% (ภาคผนวก ข6) และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตรด้วยกระบอกฉีดขนาดเล็ก รุ่น MS-10 นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไปเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงของอะซีแนพริลินเทียบกับชุดควบคุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ศึกษาสมบัติที่จำเป็นของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน

การกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชันจะประกอบด้วยเซลล์ผู้ให้พลาสมิดและเซลล์ผู้รับซึ่งในการทดลองนี้คือ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตามลำดับ พลาสมิด pSUP2021 ทำหน้าที่เป็นเวกเตอร์พาหะนำ ทรานสโปซอน Tn5 เข้าสู่เซลล์ของ *Rhizobium* ด้วยกระบวนการคอนจูเกชัน เมื่อพลาสมิด pSUP2021 เข้าสู่เซลล์ของ *Rhizobium* แล้ว ทรานสโปซอน Tn5 จะแยกตัวออกจากพลาสมิดแล้วแทรกสอด ณ ตำแหน่งใดๆ บนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* แบบสุ่ม (Simon และคณะ, 1983) ส่วนพลาสมิด pSUP2021 มีจุดกำเนิดของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนใน *Rhizobium* จะถูกกำจัดไปในที่สุด ดังนั้น *Rhizobium* ที่จะทำการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชันจะต้องมีสมบัติที่จำเป็น 3 ประการคือ 1) สามารถคอนจูเกตกับ *E. coli* 2) ไม่ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งเป็นเครื่องหมายของทรานสโปซอน Tn5 และ 3) ทรานสโปซอน Tn5 สามารถแทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium*

3.1.1 สารปฏิชีวนะและอาหารที่เหมาะสมสำหรับคัดแยกทรานสคอนจูแกนส์

ในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน *Rhizobium* จะต้องไม่ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งเป็นเครื่องหมายหนึ่งของทรานสโปซอน Tn5 และควรติดต่อสารปฏิชีวนะใดๆ ที่สามารถทำลาย *E. coli* เพื่อคัดเลือกทรานสคอนจูแกนส์ออกจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1

การทดลองนี้จึงทดสอบสมบัติดังกล่าวข้างต้นโดยเลี้ยงเชื้อทั้งสองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้วสังเกตการเจริญ จากการทดสอบการติดต่อสารปฏิชีวนะของเชื้อทั้งสองที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2

ตารางที่ 3.1 การต้านสารปฏิชีวนะของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB

สารปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	5	10	20	25	50	100
แอมพิซิลลิน	+	-	-	-	-	-	-
คลอแรมฟินิโคล	+	+	-	-	-	-	-
กานามัยซิน	+	+	+/-	-	-	-	ND
พอลิมิกซิน	+	-	-	-	-	ND	ND
สเตรปโตมัยซิน	+	+	+/-	-	-	-	-
เตตราซัยคลิน	+	-	-	-	-	ND	ND

ตารางที่ 3.2 การต้านสารปฏิชีวนะของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB

สารปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	0	5	10	20	25	50	100
แอมพิซิลลิน	+	ND	ND	ND	+	+	+
คลอแรมฟินิโคล	+	ND	ND	ND	+	+	+
กานามัยซิน	+	ND	ND	ND	+	+	+
พอลิมิกซิน	+	-	-	-	-	ND	ND
สเตรปโตมัยซิน	+	+	+	+	+	ND	ND
เตตราซัยคลิน	+	-	-	-	-	ND	ND

หมายเหตุ + หมายถึงเจริญเท่ากับหลอดควบคุม

- หมายถึงไม่เจริญ

ND หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

+/- หมายถึงเจริญได้เล็กน้อย

ผลการทดลองจากตารางที่ 3.1 ปรากฏว่า *Rhizobium* ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จนถึงความเข้มข้นเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถใช้ทรานสโพอซอน Tn5 ในการ กลายพันธุ์ *Rhizobium* โดยใช้ยีนติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก ทรานสคอนจูแกนต์ แต่จากผลการทดลองในตารางที่ 3.1 และ 3.2 แสดงให้เห็นว่า *Rhizobium* ไม่ติดต่อสารปฏิชีวนะชนิดใดที่สามารถทำลาย *E. coli* ได้ ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกทรานสคอนจู แกนต์บนอาหารแข็ง LB จึงทำการทดลองใช้อาหารคัดเลือกชนิดอื่นที่ *Rhizobium* สามารถเจริญ ได้แต่ *E. coli* ไม่สามารถเจริญได้

สำหรับการคัดแยกทรานสคอนจูแกนต์ออกจาก *E. coli* ได้ทำการทดลองเลี้ยง *E. coli* บน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมกรดซัลฟูริกและสารปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่า *E. coli* สามารถเจริญได้เล็กน้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดนี้ จึงคัดเลือกสารประกอบอะโรมาติกชนิด อื่นๆ ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs หรือเคยมีรายงานว่า *Rhizobium* สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แทนกรดซัลฟูริก

ผลการทดลองดังตารางที่ 3.3 แสดงให้เห็นว่า *Rhizobium* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กรดโปรโตคาที่คูอิก กรดเจนทิสิกและกรดซาลิไซลิก โดยเฉพาะในกรดโปรโตคาที่คูอิกจะสังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อใสสีม่วงน้ำเงินจางลงจนไม่มีสี ควบคู่กับเชื้อมีการเจริญจนอาหารเหลวเป็นสีขาวขุ่นดังรูปที่ 3.1 ส่วน *E. coli* ไม่สามารถเจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารประกอบอะโรมาติกชนิดใดได้

ตารางที่ 3.3 ความสามารถในการใช้สารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *E. coli* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

สารประกอบอะโรมาติก (0.2 กรัม/ลิตร)	การเจริญ	
	สายพันธุ์ CU-A1	<i>E. coli</i>
กรดซินนามิก	-	-
กรดโปรโตคาทีคูอิก	+	-
กรดพธาลิก	-	-
กรดเจนทีลิก	+	-
กรดซาลิไซลิก	+	-
3-เมธิลอะซีโตน	-	-
กรดเบนโซอิก	-	-
อะซีโตน	-	-
กรดซัคซินิก	+	+

หมายเหตุ + หมายถึงเจริญ

- หมายถึงไม่เจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 3.1 ลักษณะการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่เติมสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ

หลอดที่ 1 กรดโปรโตคาทีคูอิก ชุดควบคุม

หลอดที่ 2 กรดโปรโตคาทีคูอิก มีแบคทีเรีย

หลอดที่ 3 กรดซาลิไซลิก ชุดควบคุม

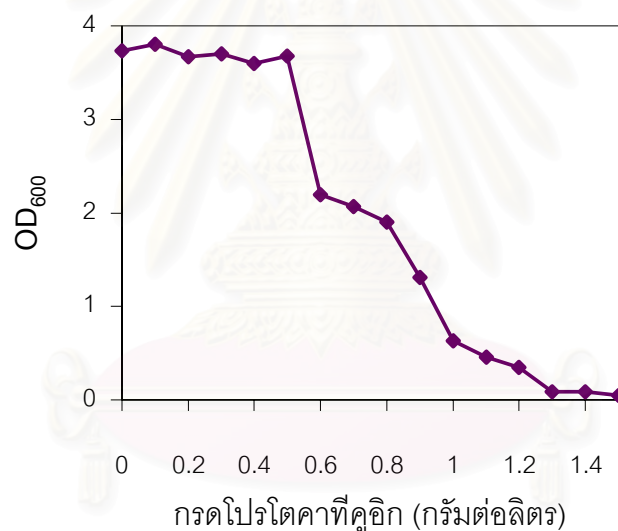
หลอดที่ 4 กรดซาลิไซลิก มีแบคทีเรีย

หลอดที่ 5 กรดเจนทิลิก ชุดควบคุม

หลอดที่ 6 กรดเจนทิลิก มีแบคทีเรีย

Hartnett และคณะ (1990) รายงานว่า *Acinetobacter calcoaceticus* สายพันธุ์กลายซึ่งสะสมกรดคาร์บอกซีมิโคนิกจากการย่อยสลายกรดโปรโตคาทีคูอิก ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดซัลฟอนิกเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ร่วมกับกรดโปรโตคาทีคูอิกเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่สายพันธุ์ปกติเจริญได้ Paker และคณะ (2000) รายงานว่า กรดโปรโตคาทีคูอิกและกรดคาร์บอกซีมิโคนิกซึ่งเป็นสารมัธยันต์ตัวหนึ่งในกระบวนการย่อยสลายกรดโปรโตคาทีคูอิกเป็นพิษต่อแบคทีเรีย

จึงทำการทดลองหาความเข้มข้นของกรดโปรโตคาทีคูอิกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* แต่ไม่เป็นอันตรายต่อ *Rhizobium* โดยวัดการเจริญของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่เติมกรดโปรโตคาทีคูอิกความเข้มข้นต่างๆ จากผลการทดลองในรูปที่ 3.2 กรดโปรโตคาทีคูอิกเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ลงครึ่งหนึ่ง



รูปที่ 3.2 ผลของกรดโปรโตคาทีคูอิก ต่อการเจริญของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ในอาหารเหลว LB

ส่วน *Rhizobium* เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีกรดโปรโตคาทีคูอิกความเข้มข้นสูงถึง 1.5 กรัมต่อลิตร ดังแสดงผลในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเหลว CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาทีคูอิกความเข้มข้นต่างๆ

กรดโปรโตคาทีคูอิก (กรัม/ลิตร)	การเจริญ
0	-
0.2	+
0.4	+
0.6	+
0.8	++
1.0	++
1.2	++
1.3	+++
1.5	+++

- หมายถึงไม่เจริญ + หมายถึงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเกิดจากการเจริญ

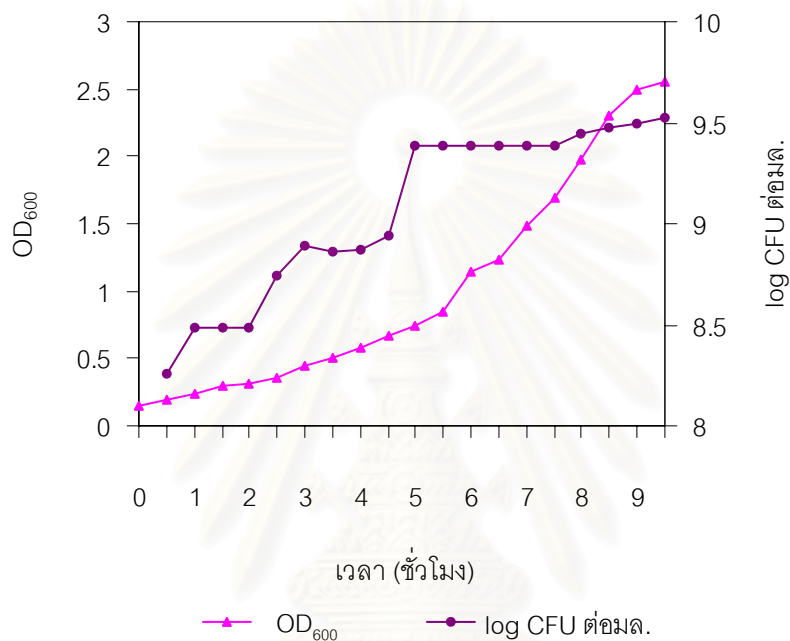
จากการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ทำให้แข็งด้วย Noble Agar ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงกว่า Bacto agar พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาทีคูอิก 1.0 กรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญของ *E. coli* ในขณะที่ *Rhizobium* เจริญได้

ดังนั้นในการคัดแยก *Rhizobium* ทราบสคอนจุณกานต์จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ทำให้แข็งด้วย Nobel Agar มีกรดโปรโตคาทีคูอิก 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

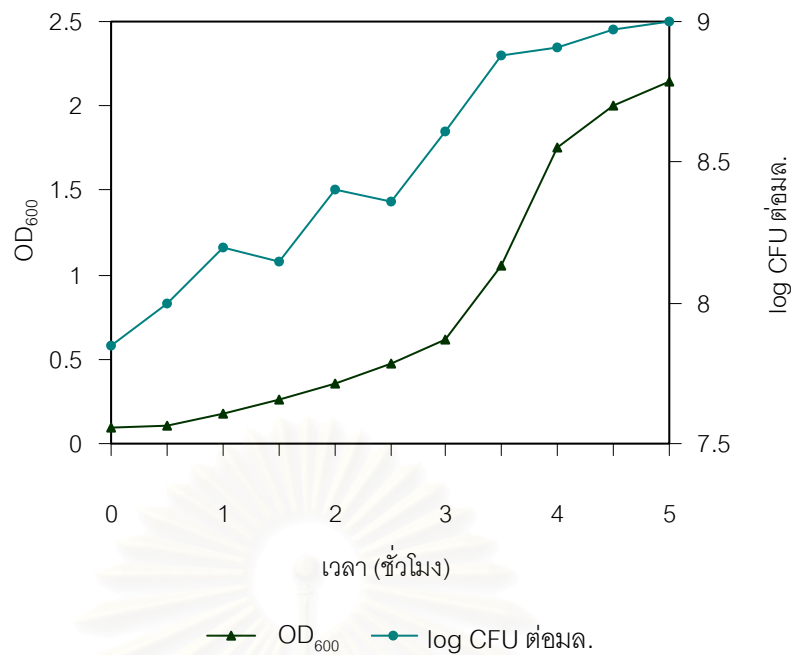
3.1.2 รูปแบบการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเหลว 2YT

การคอนจุณกานต์จะใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะทวีคูณ (early log phase) จึงทำการทดลองหาค่า OD₆₀₀ ที่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อทั้งสองเพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงในการทดลองขั้นต่อไป จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองในอาหารเหลว 2YT พบว่ามีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 3.3 และ 3.4 *Rhizobium* เจริญจนถึงช่วงต้นของระยะ

ที่อุณหภูมิมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.45-0.6 และ log CFU ต่อมิลลิลิตร = 8.8 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ บนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีประมาณ 4 ชั่วโมง ส่วนการเจริญจนถึงช่วงต้นของ ระยะทวีคูณของ *E. coli* จะใช้เวลาเลี้ยงเชื้อสั้นกว่า *Rhizobium* คือมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.47 และ log CFU ต่อมิลลิลิตร = 8.36 ใช้เวลาบ่มประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °ซ บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 3.3 รูปแบบการเพิ่มจำนวนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT



รูปที่ 3.4 รูปแบบการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT

3.2 อัตราส่วนและระยะเวลาคอนจูเกชันที่เหมาะสมของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากรายงานของ Simon และคณะ (1983) เมื่อทำการคอนจูเกชัน *E. coli* สายพันธุ์ SM10 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ *Rhizobium meliloti* ในอัตราส่วน 1 : 5 แล้วคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และเติมสารปฏิชีวนะนีโอมัยซิน พบว่าประสิทธิภาพของทรานสโพลีซันมีค่าประมาณ 10^{-5} ต่อเซลล์ผู้รับ แสดงว่าถ้าต้องการทรานสคอนจูแกนต์ 1 ตัวต้องใช้ *E. coli* จำนวน 2×10^4 เซลล์ผสมกับ *Rhizobium* 10^5 เซลล์ ดังนั้นอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์ควรสามารถคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์ 100 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับรวมจำนวน 10^8 เซลล์ได้ เมื่อใช้เซลล์ผสมของ *E. coli* และ *Rhizobium* เกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่ทำให้แข็งด้วย Noble agar ที่เติมกรดโปรโตคาที่คูอิก 1.0 กรัมต่อลิตร ปรากฏว่า *Rhizobium* เจริญได้และไม่เห็นโคโลนีของ *E. coli*

จากการทดลองในเบื้องต้นเมื่อนำเซลล์ผสมของ *E. coli* และ *Rhizobium* ที่ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 5 และใช้ระยะเวลาบ่ม 5 ชั่วโมงตามการทดลองของ Simon และคณะ (1983) พบว่าประสิทธิภาพของทรานสโพลีซันมีค่าน้อยมากคือประมาณ 10^{-8} - 10^{-9} จึงทำการทดลองแปร

ผันระยะเวลาคอนจูเกชันและอัตราส่วนระหว่างเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับเพื่อหาสภาวะที่ให้จำนวนทรานสคอนจูกันต์มากที่สุดซึ่งแสดงด้วยประสิทธิภาพของทรานโพลีชัน ได้ผลดังตารางที่ 3.5 และ 3.6 พบว่าระยะเวลาบ่มที่ให้ประสิทธิภาพของทรานโพลีชันสูงคือช่วง 18-24 ชั่วโมงทุกอัตราส่วน และจากการแปรอัตราส่วนระหว่างเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับพบว่าอัตราส่วน 1:1 ให้ประสิทธิภาพของ ทรานโพลีชันสูงสุดคือ 4.75×10^{-5} เมื่อใช้ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3.6 ดังนั้นการคอนจูเกชันครั้งต่อไปจะใช้เซลล์ในอัตราส่วน 1:1 และใช้ระยะเวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 °C และสังเกตได้ว่าการทดลองครั้งแรก (ตารางที่ 3.5) ซึ่งแขวนลอยเซลล์ผสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อเซลล์ผสม 1 จุดบนเยื่อกรองไนโตรเซลลูโลส ในเซลล์ผสมทุกอัตราส่วนจะมีประสิทธิภาพของทรานโพลีชันต่ำกว่าการทดลองในตารางที่ 3.6 ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองในตารางที่ 3.6 ลดปริมาตรสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เหลือ 15 ไมโครลิตรซึ่งจะได้เซลล์แขวนลอยที่เข้มข้นกว่าการทดลองครั้งแรกซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้เซลล์ผู้ให้และผู้รับมีโอกาสใกล้เคียงกันมากขึ้นจึงทำให้ประสิทธิภาพของทรานโพลีชันสูงขึ้นในทุกอัตราส่วน

ตารางที่ 3.5 ประสิทธิภาพของทรานโพลีชันเมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์และระยะเวลาต่างๆ ในการคอนจูเกตของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อแขวนลอยเซลล์ผสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

อัตราส่วน <i>E. coli</i> : <i>Rhizobium</i>	ครั้งที่	เวลาคอนจูเกชัน (ชั่วโมง)			
		6	12	18	24
1 : 1	1	1.84×10^{-6}	8.50×10^{-6}	1.63×10^{-5}	1.64×10^{-5}
	2	1.33×10^{-6}	9.09×10^{-6}	1.46×10^{-5}	1.66×10^{-5}
2 : 1	1	-	3.26×10^{-6}	4.11×10^{-6}	3.92×10^{-6}
	2	2.85×10^{-6}	6.24×10^{-6}	8.60×10^{-6}	6.39×10^{-6}
1 : 2	1	7.84×10^{-7}	1.18×10^{-6}	3.08×10^{-6}	3.61×10^{-6}
	2	-	7.91×10^{-6}	1.73×10^{-5}	2.04×10^{-5}

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

ตารางที่ 3.6 ประสิทธิภาพของทรานโปสิซอนเมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์และระยะเวลาต่างๆ ในการคอนจูเกชันของ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 กับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อแขวนลอยเซลล์ผสมด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

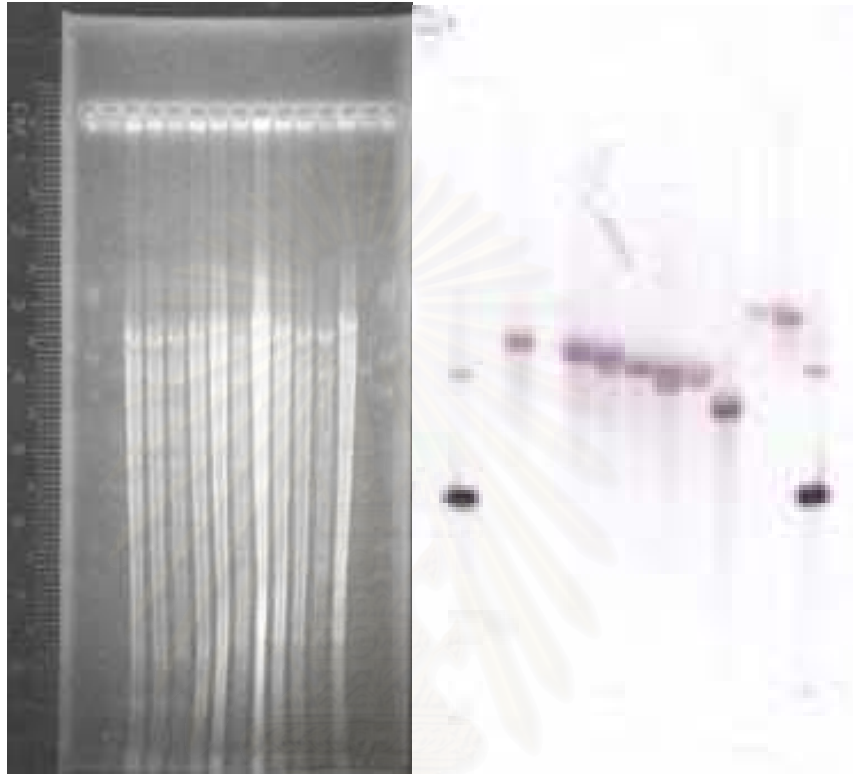
อัตราส่วน <i>E. coli</i> : <i>Rhizobium</i>	ครั้งที่	เวลาคอนจูเกชัน (ชั่วโมง)			
		6	12	18	24
1 : 1	3	-	2.78×10^{-5}	3.43×10^{-5}	4.75×10^{-5}
2 : 1	3	-	1.27×10^{-5}	1.80×10^{-5}	1.90×10^{-5}
1 : 2	3	1.88×10^{-6}	1.64×10^{-5}	2.26×10^{-5}	2.09×10^{-5}

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ได้ทำการทดลอง

3.3 ตรวจยืนยันการแทรกสอดแบบสุ่มของทรานสโปซอน Tn5 บนโครโมโซมของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนส์โดยวิธีซาท์เทอร์นไฮบริไดเซชัน (southern hybridization)

มีการนำทรานสโปซอน Tn5 มาใช้ศึกษาพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียม (Beringer และคณะ, 1978; Simon และคณะ, 1983; Sevaraj และ Iyer, 1983) อย่างไรก็ตาม Meade และคณะ (1982) และ Forrai และคณะ (1983) รายงานว่าทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบจำเพาะบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* นอกจากนี้ Kunte และ Galinski (1995) พบว่าทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดอย่างจำเพาะบนดีเอ็นเอของเชื้อ *Halomonas elongata* จึงทดสอบการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 บนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ด้วยวิธีซาท์เทอร์นไฮบริไดเซชัน โดยตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนส์ด้วยเอนไซม์ EcoRI เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ได้ดี และเอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะบนทรานสโปซอน Tn5 จากนั้นทำไฮบริไดเซชันกับชิ้นส่วน HindIII ของทรานสโปซอน Tn5 ขนาด 4.3 กิโลเบสที่ติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG-11-dUTP) (Boehringer Mannheim, Germany) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.5 ซึ่งปรากฏสัญญาณแสดงตำแหน่งแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 บนชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนส์ที่ตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ EcoRI ในขณะที่ดีเอ็น

เลขของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ไม่ปรากฏสัญญาณของทรานสโปซอน Tn5 แสดงให้เห็นว่าทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* และ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนต์สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินเนื่องจากได้รับทรานสโปซอน Tn5



รูปที่ 3.5 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดซ์เซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1) และช่องวิ่งที่ 15) lambda *HindIII* marker

ช่องวิ่งที่ 2) และช่องวิ่งที่ 14) พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII* (ผลบวกควบคุม)

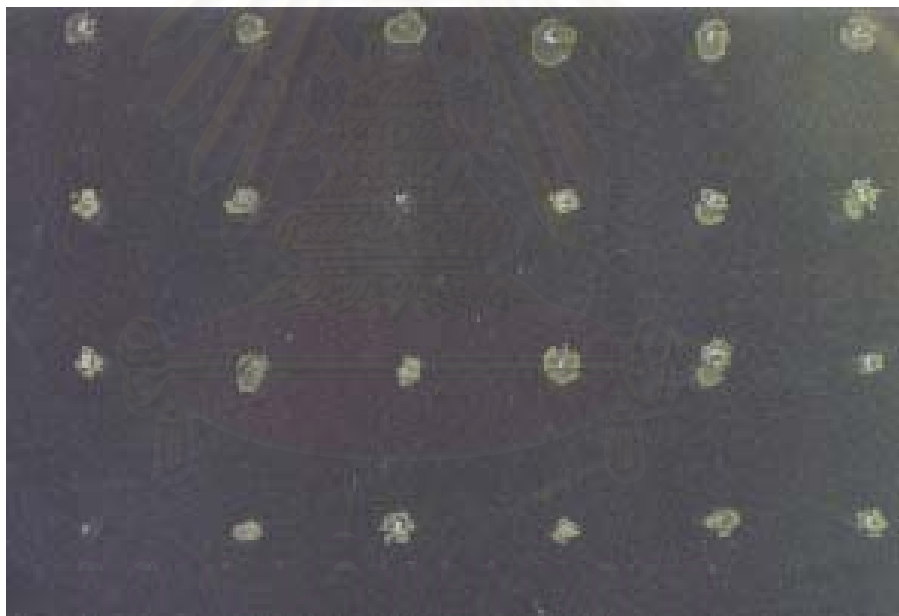
ช่องวิ่งที่ 3) ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp.สายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* (ผลลบควบคุม)

ช่องวิ่งที่ 5) ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ S-17-1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* (ผลลบควบคุม)

ช่องวิ่งที่ 4 และ 6) - 13) ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนต์ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*

3.4 การคัดแยก *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการใช้สารอะซีแนพทิลีน แนนพาทิลีนและอนุพันธ์ของอะซีแนพทิลีนในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM

จากการทดลองในเบื้องต้นพบว่า *Rhizobium* สามารถเจริญได้เล็กน้อยบนอาหารแข็ง CFMM ที่เตรียมจาก Noble Agar หรือ Bacto agar ทำให้ไม่สามารถคัดแยกสายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนซึ่งสายพันธุ์กลายในกลุ่มนี้จะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนวางบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเปลี่ยนมาใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ทำให้แข็งด้วย อะกาโรสเจด 7.0 กรัมต่อลิตรและเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ทรานสคอนจูแกนตที่นำมาคัดเลือกจะเป็นโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาที่คูอิกและสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ภายใน 4 วัน จากนั้นเก็บโคโลนีเดี่ยวมาจุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ดังกล่าวข้างต้น จำนวน 150 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดแยกสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนซึ่งไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.6



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.6 *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย (วงกลม) ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและให้อะซีแนพทิลีนในรูปไอระเหย

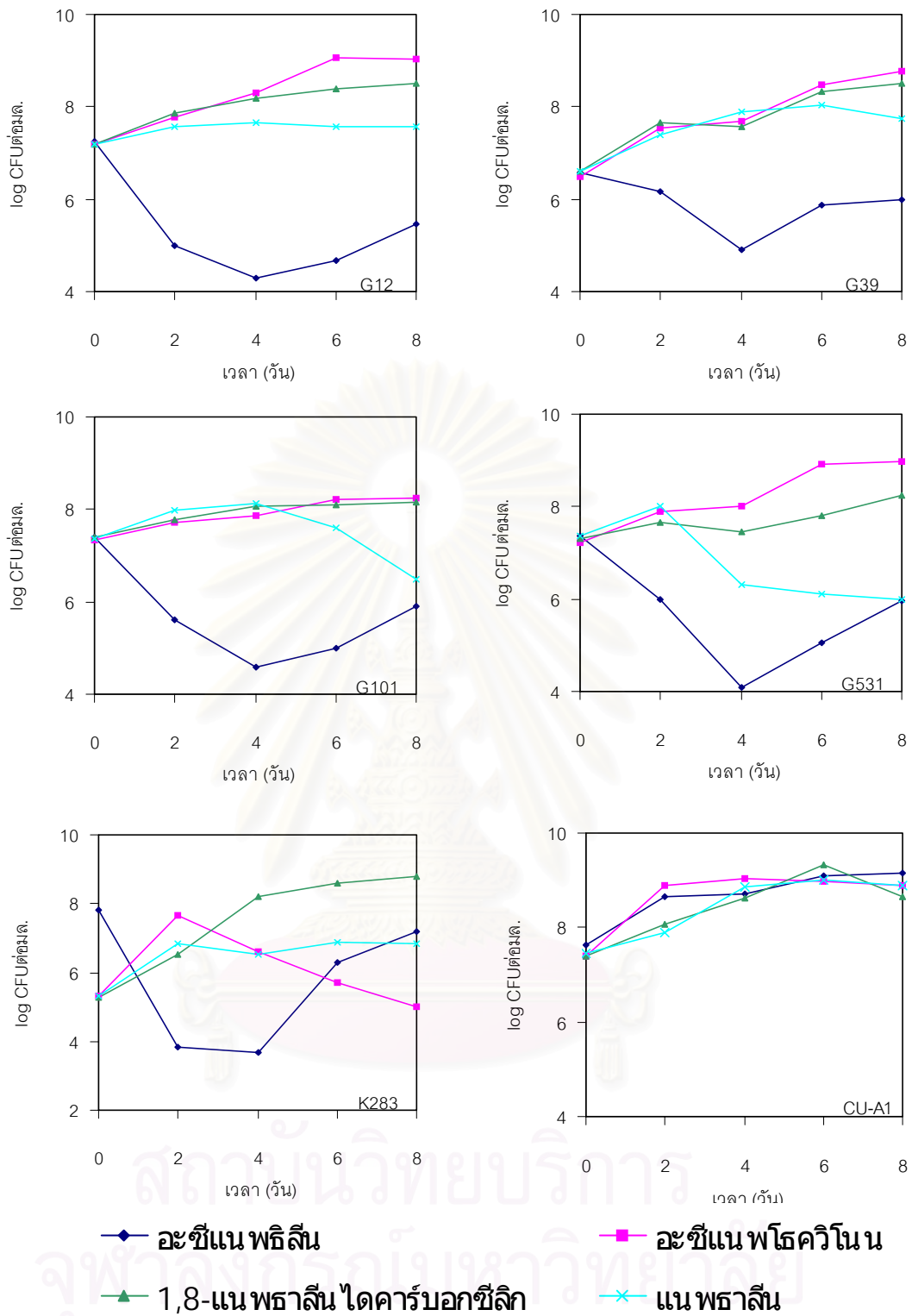
จากทรานสคอนจูแกนต์ทั้งหมด 15,370 โคลน สามารถคัดแยก *Rhizobium* สายพันธุ์ กลายที่ไม่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพธิดีนหรือเปลี่ยนสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแตกต่างไปจากสายพันธุ์ CU-A1 ได้ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ได้แก่ A8 A18 A35 A49 A53 B1 B5 D1 D2 E11 E32 G12 G39 G62 G101 G531 H1 H2 J1 J2 และ K283 เมื่อนำ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่ได้มาขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกและเติมสารปฏิชีวนะ คลอแรมฟินิโคลซึ่งเป็นเครื่องหมายอีกชนิดบนพลาสมิด pSUP2021 ปรากฏว่าไม่พบการเจริญ แสดงว่า *Rhizobium* สายพันธุ์กลายทุกตัวเกิดจากการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 เข้าที่ เอ็นเอชของ *Rhizobium*

จากรายงานของศรีลยา แพงไตร (2543) ซึ่งคัดแยกและศึกษา *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 พบว่าสามารถเจริญได้ในอะซีแนพธิดีนและแนพธาดีน Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า เชื้อ *Pseudomonas cepacia* สายพันธุ์ F297 สามารถออกซิไดส์อะซีแนพธิดีนเป็น อะซีแนพโทควิโนนและกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ซึ่งเจริญในอะซีแนพธิดีน มีกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เป็นสารมัธยันต์ จึงได้ทำการทดสอบการเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ในอะซีแนพโทควิโนนและกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ปรากฏว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 เจริญได้ในสารมัธยันต์ทั้งสองชนิด จึงได้ทำการศึกษาการเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่คัดแยกได้บางสายพันธุ์โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมสาร PAHs และอนุพันธ์ของสาร PAHs เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 จากผลการทดลองพบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์กลายหลายสายพันธุ์นอกจากไม่สามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังมีความบกพร่องในการย่อยสลายหรือไม่สามารถเจริญได้ในแนพธาดีน อะซีแนพโทควิโนนหรือกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งจำแนกสายพันธุ์กลายได้เป็น 4 กลุ่มดังตารางที่ 3.7 และมีรูปแบบการเจริญดังแสดงในรูปที่ 3.7 ก.-ง.

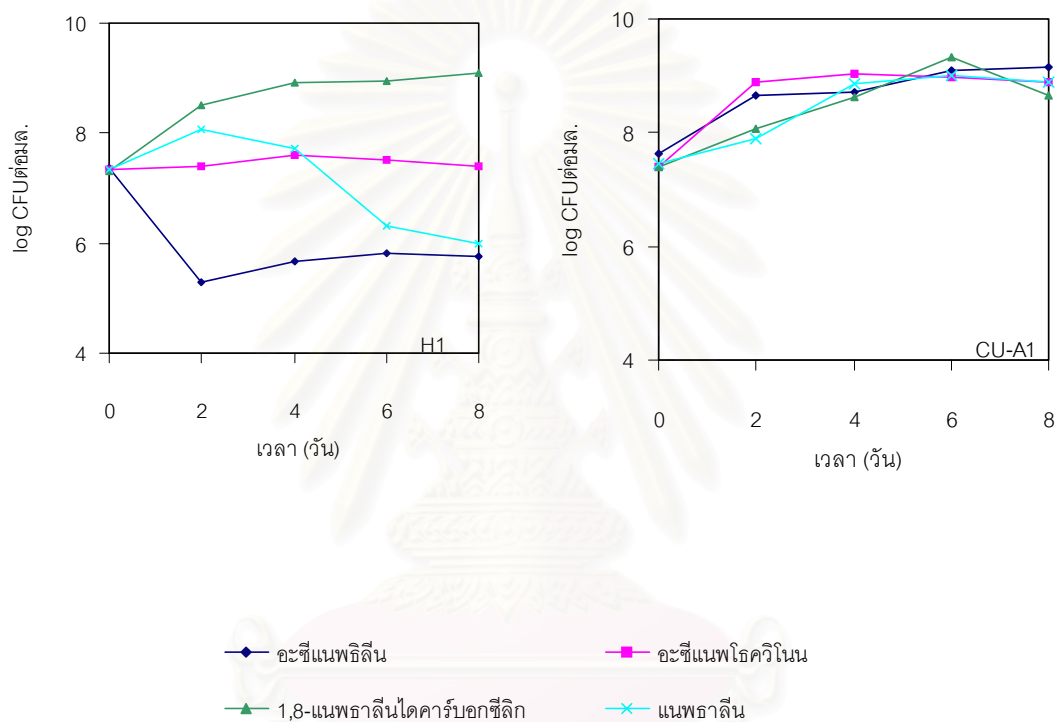
ตารางที่ 3.7 ความบกพร่องของ *Rhizobium* สายพันธุ์ที่กลายในการเจริญในอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

กลุ่มที่	สายพันธุ์ของ <i>Rhizobium</i>	การเจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ			
		อะซีแนพติลิน	อะซีแนพโท ควิโนน	แนพธาลิน- 1,8-ได คาร์บอกซิลิก	แนพธาลิน
	CU-A1	+	+	+	+
1	G12 G39 G101 G531 K283	-	+	+	+
2	H1	-	-	+	+
3	B1 B5 E11	-	-	-	+
4	A35 A53 D1 D2 E32 G62 J1	-	+	+	-

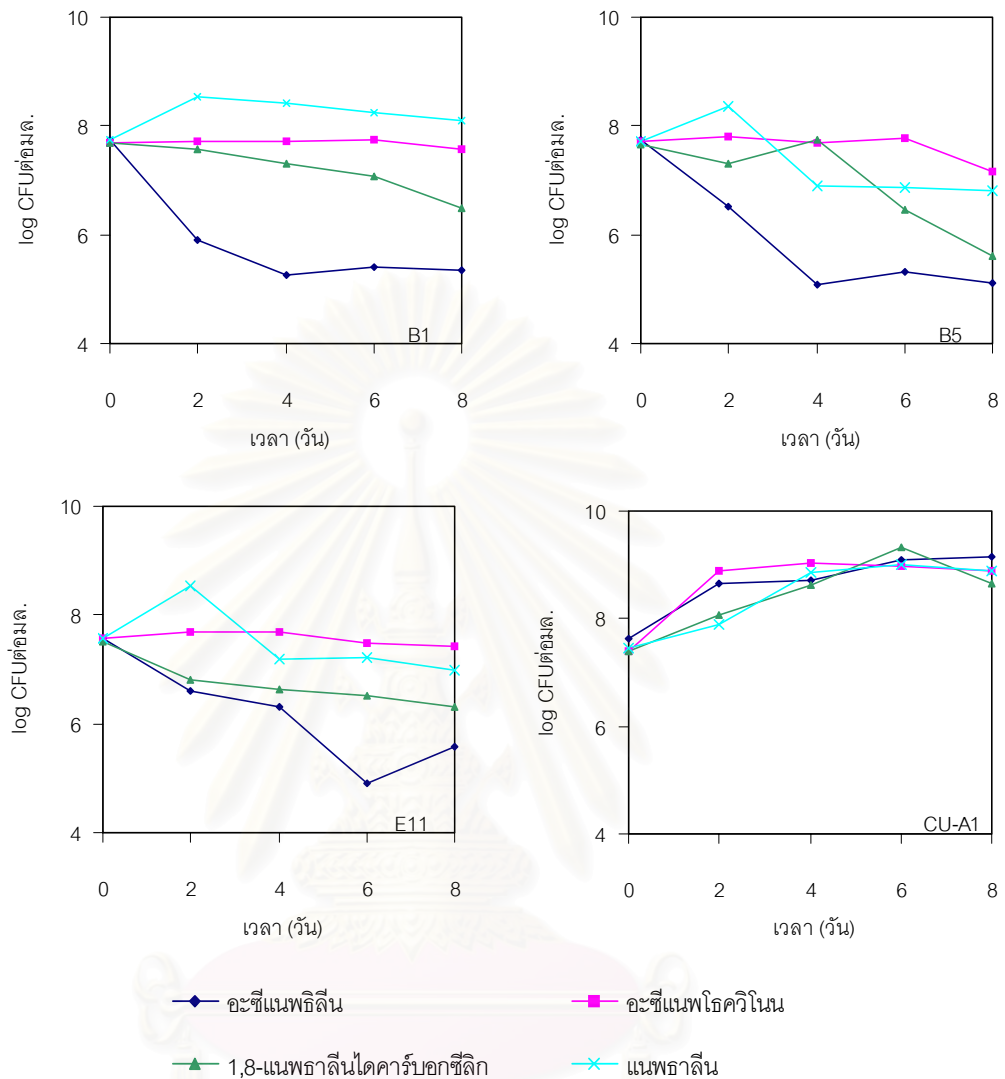
หมายเหตุ + หมายถึงเจริญมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น - หมายถึงไม่เจริญ



รูปที่ 3.7 ก. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลุ่มที่ 1 ได้แก่ G12 G39 G101 G531 และ K283 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

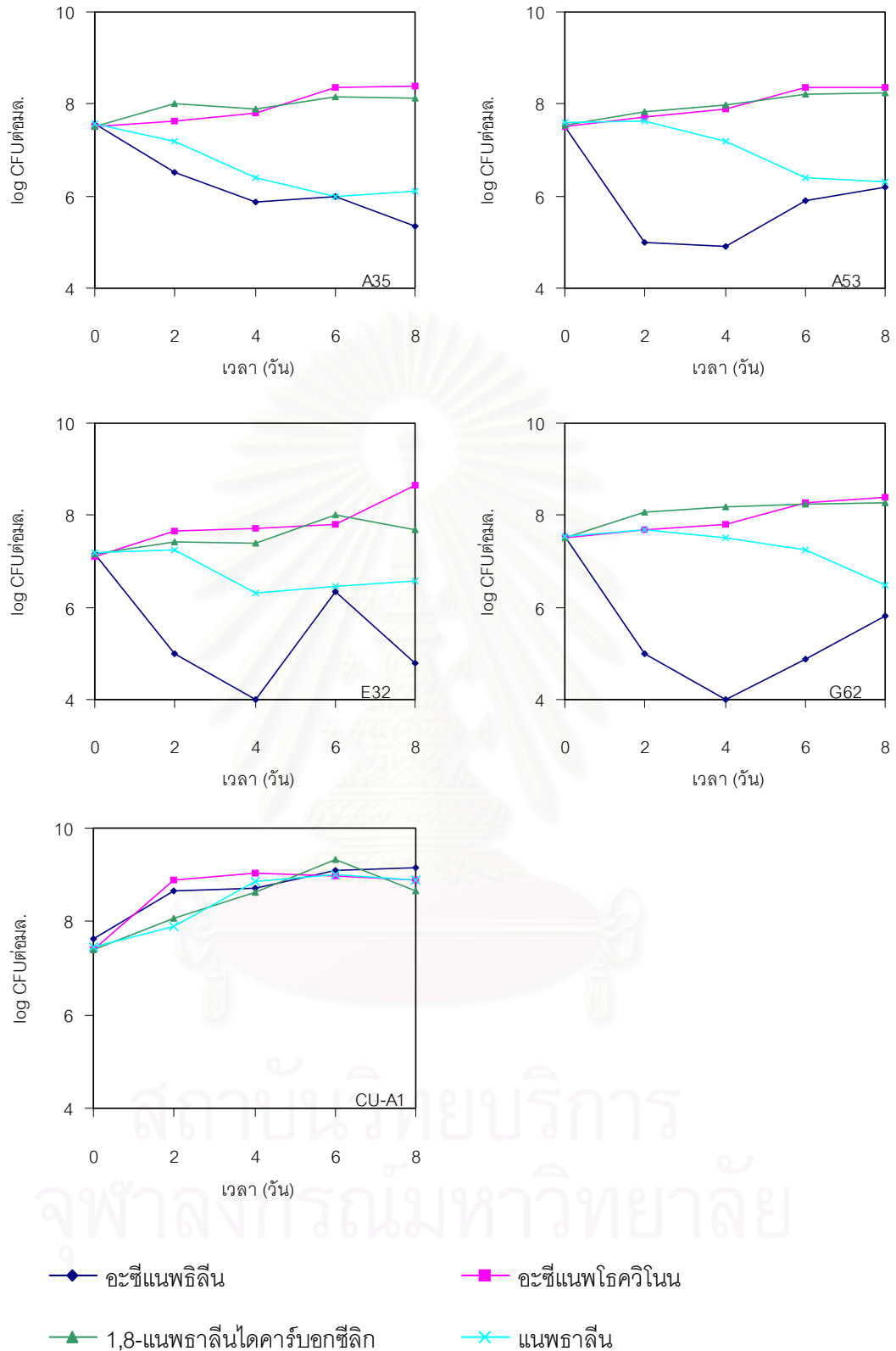


รูปที่ 3.7 ข. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลุ่มที่ 2 ได้แก่ H1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

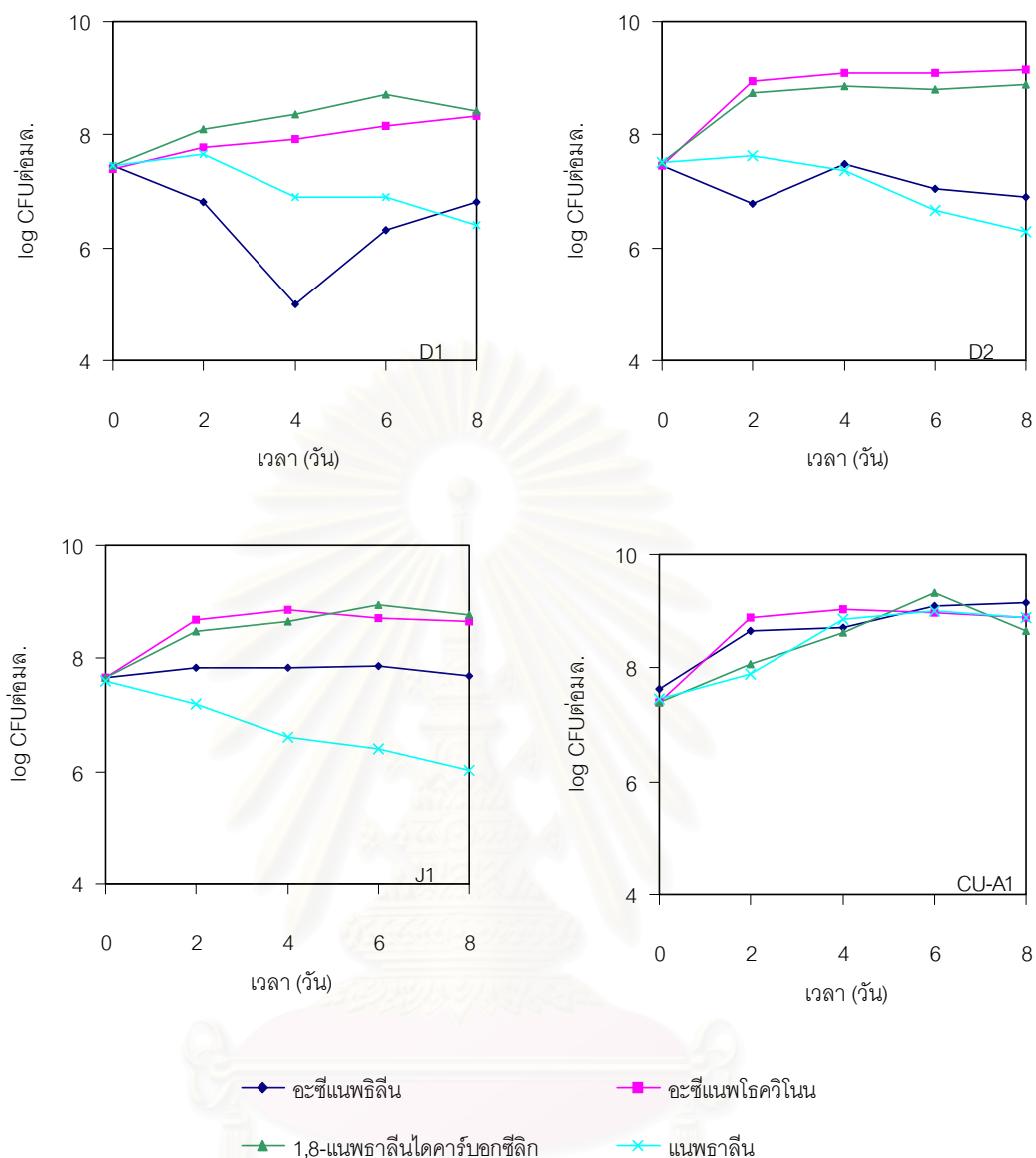


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.7 ค. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 3 ได้แก่ B1 B5 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1



รูปที่ 3.7 ง. การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลุ่มที่ 4 ได้แก่ A35 A53 E32 และ G62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1



รูปที่ 3.7 ง.(ต่อ) การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 4 ได้แก่ D1 D2 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

นอกจากจำนวนแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 8 วันแล้ว ยังได้สังเกตเห็นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงซึ่งอาจแสดงถึงสารมัธยันต์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย พบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์กลายบางสายพันธุ์เปลี่ยนสีของอาหารเหลว CFMM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ แตกต่างไปจากรูปแบบการเปลี่ยนสีอาหารเหลวของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ถึง 3.11

1 2 3 4 5 6 7



รูปที่ 3.8 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพติลิน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1

- หลอดที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- หลอดที่ 2 สายพันธุ์ CU-A1
- หลอดที่ 3 สายพันธุ์กลาย G12 (ไม่เจริญ)
- หลอดที่ 4 สายพันธุ์กลาย B1 (ไม่เจริญ)
- หลอดที่ 5 สายพันธุ์กลาย A35 (ไม่เจริญ)
- หลอดที่ 6 สายพันธุ์กลาย E32 (ไม่เจริญ)
- หลอดที่ 7 สายพันธุ์กลาย J1 (เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเทาอมเขียว)

เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายด้วยอะซีแนพติลินสายพันธุ์กลายทั้งหมดไม่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพติลินและไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวดังตัวอย่างที่แสดงในหลอดที่ 3-6 แต่สายพันธุ์กลาย J1 เปลี่ยนสีอาหารเหลวเป็นสีเทาอมเขียวดังแสดงในหลอดที่ 7

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 3.9 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพโทควิโนน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1

- หลอดที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
 หลอดที่ 2 สายพันธุ์ CU-A1
 หลอดที่ 3 สายพันธุ์กลายเป็น B5 (ไม่เจริญ)
 หลอดที่ 4 สายพันธุ์กลายเป็น G39 (เจริญแต่ไม่เปลี่ยนสีของอาหาร)
 หลอดที่ 5 สายพันธุ์กลายเป็น K283 (เจริญแต่ไม่เปลี่ยนสีของอาหาร)
 หลอดที่ 6 สายพันธุ์กลายเป็น G531(เจริญ)

เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายเป็นด้วยอะซีแนพโทควิโนน สายพันธุ์กลายเป็นในกลุ่มที่ 2 และ 3 ซึ่งได้แก่ H1 B1 B5 และ E11 ไม่สามารถเจริญได้และอาหารเหลวไม่การเปลี่ยนแปลงดังตัวอย่างที่แสดงในหลอดที่ 3 สายพันธุ์กลายเป็นที่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพโทควิโนนคือกลุ่มที่ 1 และ 4 ซึ่งเปลี่ยนสีอาหารเหลวเช่นเดียวกับสายพันธุ์ CU-A1 ดังตัวอย่างที่แสดงในหลอดที่ 6 ในขณะที่สายพันธุ์กลายเป็น G39 และ K283 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 1 แม้ว่าจะเจริญได้ในอะซีแนพโทควิโนนแต่ไม่สามารถเปลี่ยนสีอาหารเหลวดังแสดงในหลอดที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

1 2 3 4 5 6



รูปที่ 3.10 สีของอาหารเหลว CFMM ที่มีแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1

- หลอดที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- หลอดที่ 2 สายพันธุ์ CU-A1
- หลอดที่ 3 สายพันธุ์กลาย B5 (ไม่เจริญ)
- หลอดที่ 4 สายพันธุ์กลาย G39 (เจริญ)
- หลอดที่ 5 สายพันธุ์กลาย G62 (เจริญ)
- หลอดที่ 6 สายพันธุ์กลาย A35 (เจริญ)

เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายในกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก สายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 3 ได้แก่ B1 B5 และ E11 ไม่สามารถเจริญได้และไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวดังแสดง ตัวอย่างในหลอดที่ 3 ส่วนสายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 1 2 และ 4 สามารถเจริญได้และเปลี่ยนสีของอาหารเหลวดังแสดงตัวอย่างในหลอดที่ 4 และ 5

1 2 3 4 5 6 7



รูปที่ 3.11 ลักษณะอาหารเหลว CFMM ที่มีแนพธาลีน หลังการเลี้ยง *Rhizobium* สายพันธุ์ กลายเป็นเวลา 8 วันเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ CU-A1

- หลอดที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
 หลอดที่ 2 สายพันธุ์ CU-A1
 หลอดที่ 3 สายพันธุ์กลาย B5 (เจริญ)
 หลอดที่ 4 สายพันธุ์กลาย E11 (เจริญ)
 หลอดที่ 5 สายพันธุ์กลาย G101 (เจริญ)
 หลอดที่ 6 สายพันธุ์กลาย G12 (เจริญ)
 หลอดที่ 7 สายพันธุ์กลาย J1 (ไม่เจริญ)

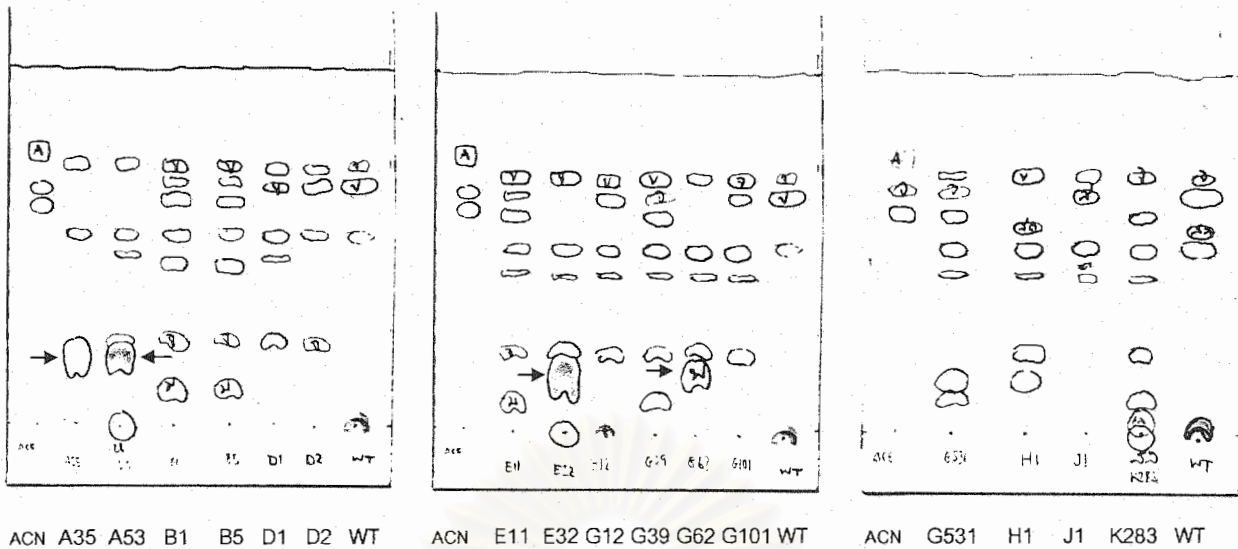
เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายในแนพธาลีนสายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 4 ซึ่งได้แก่ A35 A53 D1 D2 E32 G62 และ J1 ไม่สามารถเจริญได้และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวดังแสดง ตัวอย่างในหลอดที่ 7 ส่วนสายพันธุ์ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เจริญได้ในแนพธาลีนดังแสดงตัวอย่าง ในหลอดที่ 5 ซึ่งมีการเจริญของเซลล์จนเห็นเป็นสีขาวขุ่นเช่นเดียวกับสายพันธุ์ CU-A1 ยกเว้น สายพันธุ์กลาย B5 E11 G12 และ G39 ถึงแม้จะพบการเจริญในแนพธาลีนแต่สายพันธุ์กลาย ทั้ง 4 สายพันธุ์ เปลี่ยนสีอาหารเหลวเป็นสีส้มน้ำตาลดังแสดงตัวอย่างในหลอดที่ 3 4 และ 6

3.5 ตรวจสอบสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายสาร PAHs และอนุพันธ์ของสาร PAHs โดย *Rhizobium* สายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1

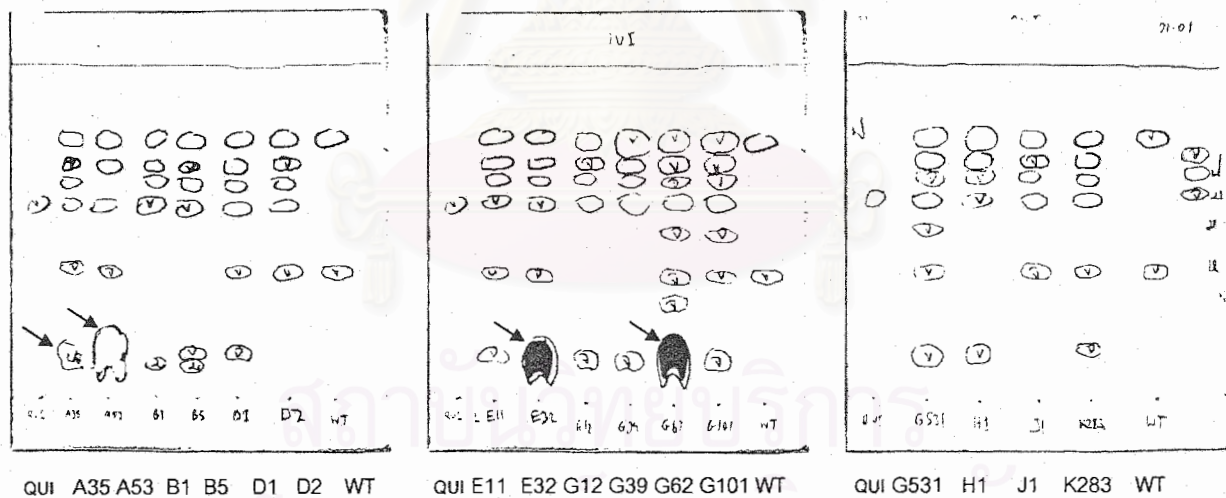
จากผลการทดลองในข้อ 3.4 แม้ว่าจะจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์กลายเป็น 4 กลุ่ม ยังพบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มยังมีรูปแบบการเจริญและเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM แตกต่างกัน จึงศึกษารูปแบบของสารมัธยันต์ที่สะสมในสายพันธุ์กลายแต่ละสายพันธุ์โดยการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตท ตามวิธีของ Grifoll และคณะ (1995) เมื่อนำสารมัธยันต์ที่สกัดได้มาแยกจากกันด้วยวิธี TLC ที่มีตัวชะประกอบด้วย โทลูอีน ไดออกเซนและกรดอะซีติกเข้มข้น และตรวจสอบสารมัธยันต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร พบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์กลายมีรูปแบบการสะสมสารมัธยันต์แตกต่างกันและมีสารมัธยันต์หลายชนิดที่ไม่พบการสะสมโดย *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.12 ถึง 3.15

จากโครมาโตแกรมพบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งซึ่งไม่พบการสะสมโดยสายพันธุ์ CU-A1 สารมัธยันต์ชนิดนี้เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ลักษณะการเคลื่อนที่เป็นหาง (tailing) บนแผ่น TLC และเรืองแสงให้ความเข้มแสงสูงกว่าสารมัธยันต์อื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.12 - 3.15 แสดงว่าสายพันธุ์กลายเหล่านี้สะสมสารมัธยันต์ชนิดนี้ในปริมาณมากและจะพบการสะสมของสารมัธยันต์ลักษณะนี้เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A35 A53 E32 และ G62 ในอะซีแนพธิดีน อะซีแนพโทควิโนนและกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จึงให้ชื่อว่าสารมัธยันต์ a และเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย B5 E11 และ E32 ในแนพธาไลน์ จึงให้ชื่อว่าสารมัธยันต์ b ดังตำแหน่งลูกศรชี้ในรูป

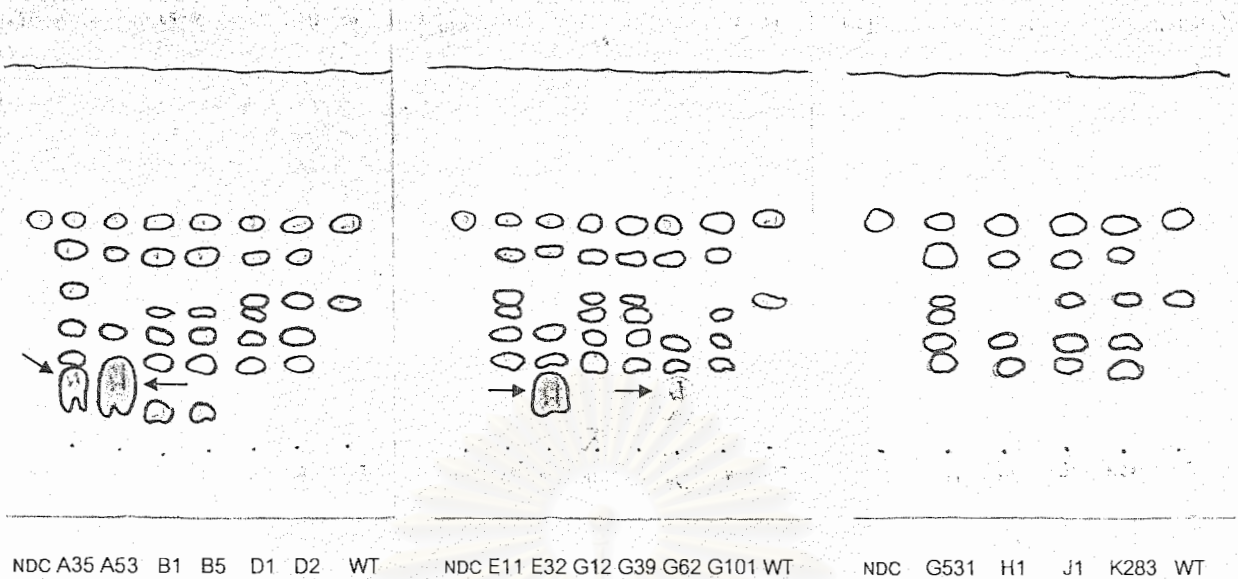
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



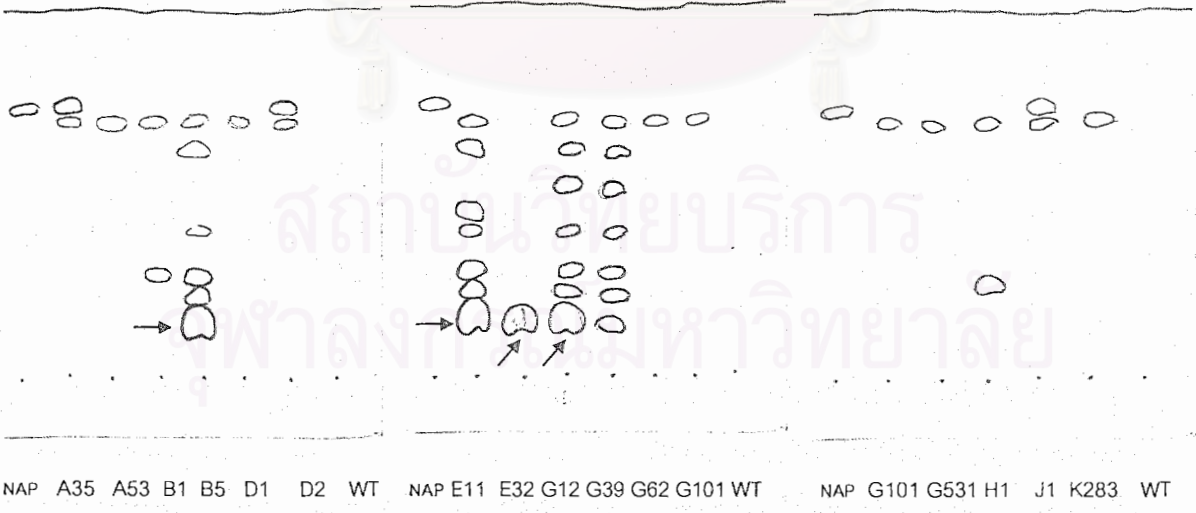
รูปที่ 4.13 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัยยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลิน โดย *Rhizobium* สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) ACN หมายถึงอะซีแนพธิลิน ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัยยันต์ a



รูปที่ 4.14 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัยยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพโทควิโนน โดย *Rhizobium* สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) QUI หมายถึงอะซีแนพโทควิโนน ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัยยันต์ a



รูปที่ 3.14 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก โดย *Rhizobium* สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) NDC หมายถึงกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ a



รูปที่ 3.15 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายแนพธาไลน์ โดย *Rhizobium* สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 (WT) NAP หมายถึงแนพธาไลน์ ลูกศรแสดงตำแหน่งของสารมัธยันต์ b

ในระบบ TLC สารตัวชะประกอบด้วยโทลูอีน ไดออกเซนและกรดอะซีติกเข้มข้น ซึ่งสารตัวชะนี้มีค่า dielectric constant ต่ำประกอบกับแผ่น TLC มี adsorptivity สูง ทำให้สารที่มีขั้วถูกชะได้ไม่ดีจึงเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC ได้น้อย และลักษณะเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นลักษณะจำเพาะหนึ่งของสารประกอบอะโรมาติก สารมัยยันต์ a และ b มีค่า R_f ต่ำและเคลื่อนที่ได้น้อยบนแผ่น TLC ดังแสดงในรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 สารมัยยันต์ a ซึ่งสะสมจากการย่อยสลายกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

1. กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก
2. *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1
3. *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย A35
4. *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย A53
5. *Rhizobium* สายพันธุ์กลาย D1

Monticello และคณะ (1985) รายงานสารมัยยันต์บางชนิดซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการย่อยสลายแนพทาลีน โดยการตรวจสอบลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของสารมัยยันต์เปรียบเทียบกับไอโซเมอร์ของสารมัยยันต์เช่น กรดออกโท-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดซาลิซิลิก) เรืองแสงสีฟ้าอ่อน กรดเมตา-ไฮดรอกซีเบนโซอิก เรืองแสงสีฟ้าอ่อน กรดพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิก เรืองแสงสีฟ้าอ่อน และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) เรืองแสงสีฟ้า กรด 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดโปรโตคาทีคูอิก) เรืองแสงสีม่วง

วิธี TLC เป็นวิธีตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นวิธีหนึ่งที่อาศัยค่า R_f ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารในการพิสูจน์ชนิดของสารที่ต้องการศึกษาโดยการเปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง จึงทำการทดลองเปรียบเทียบสารมัยยันต์ a และ b กับกรดซาลิไซลิก กรดเจเนทิลิก และกรดโปรโตคาทีคูอิก ด้วยวิธี TLC อย่างไรก็ตามสารบางชนิดอาจมีค่า R_f เท่ากันในตัวชะบางระบบจึงใช้สารตัวชะ 2 ระบบเพื่อเปรียบเทียบคือ ระบบที่ 1. ประกอบด้วย โทลูอีน ไดออกเซนและกรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:24:4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และระบบที่ 2. ประกอบด้วย โทลูอีน เมธานอลและกรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10:2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยตัวชะในระบบที่ 2 มีสภาพขั้วสูงกว่าตัวชะในระบบที่ 1 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.17 และตารางที่ 3.8 ซึ่งแสดงว่าสารมัยยันต์ a และ b เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเหมือนกรดเจเนทิลิกและมีค่า R_f เท่ากับ 0.21 และ 0.31 ในตัวชะระบบที่ 1 และ 2 เท่ากับกรดเจเนทิลิก แม้ว่ากรดเจเนทิลิกและกรดโปรโตคาทีคูอิกซึ่งเป็นไอโซเมอร์กันจะมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมากแต่ลักษณะการเรืองแสงของสารทั้งสองชนิดต่างกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.17 โคโรมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัยยันต์ a ที่สะสมในสายพันธุ์กล้วย A53 และสารมัยยันต์ b ที่สะสมในสายพันธุ์กล้วย E11 เปรียบเทียบกับกรดเจเนทิลิก (1) กรดซาลิไซลิก (2) และกรดโปรโตคาทีคูอิก (3) ในระบบตัวชะ ก.) ตัวชะระบบที่ 1 ข.) ตัวชะระบบที่ 2

ตารางที่ 3.8 ค่า R_f และลักษณะการเรียงแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของสารมัธยันต์ a และ b เปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง

สาร	R_f		การเรียงแสง
	ตัวระบบที่ 1	ตัวระบบที่ 2	
กรดเจนนิก	0.2	0.31	ฟ้า
กรดซาลิไซลิก	0.48	0.52	ม่วง
กรดโปรโตคาทีคูอิก	0.18	0.32	ม่วง
สารมัธยันต์ a	0.21	0.31	ฟ้า
สารมัธยันต์ b	0.21	0.31	ฟ้า

Fuenmayor และคณะ (1998) รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ U2 ย่อยสลายเนพธาลินเป็นกรดซาลิไซลิกและกรดเจนนิกตามลำดับ และ *Rhizobium* สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนสามชนิดดังกล่าว จึงทดสอบการเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์ที่กลายในกรดซาลิไซลิกและกรดเจนนิก พบว่าสายพันธุ์ที่กลาย A35 A53 E32 และ G62 ซึ่งสะสมกรดเจนนิกเมื่อเลี้ยงในอะซีแนพริลีน อะซีแนพโรควิโนนและกรดเนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ไม่สามารถเจริญได้ในกรดซาลิไซลิกและกรดเจนนิก ในขณะที่สายพันธุ์ที่กลายกลุ่มที่ 1 2 และ 3 เจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิด ดังแสดงผลในตารางที่ 3.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

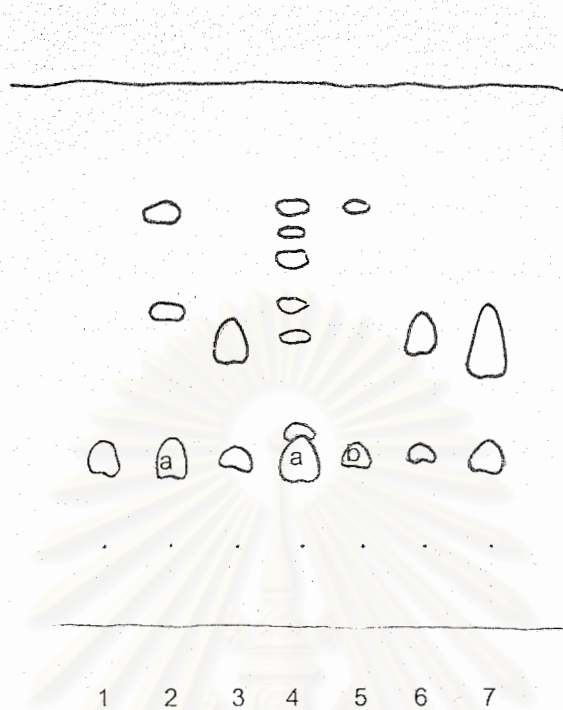
ตารางที่ 3.9 การเจริญของ *Rhizobium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีแนพธาลีน กรดซาลิไซลิกและกรดเจนนทิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน

กลุ่มที่	สายพันธุ์ของ Rhizobium	การเจริญในแหล่งคาร์บอน		
		แนพธาลีน	กรดซาลิไซลิก	กรดเจนนทิลิก
	CU-A1	+	+	+
1	G12 G39 G101 G531 K283	+	+	+
2	H1	+	+	+
3	B1 B5 E11	+	+	+
4	A35 A53 E32 G62	-	-	-
	D2 J1	-	-	+

หมายเหตุ + หมายถึงเจริญ - หมายถึงไม่เจริญ

เมื่อนำสายพันธุ์สาย A53 และ E32 ซึ่งไม่สามารถเจริญในกรดซาลิไซลิกและกรดเจนนทิลิกมาเลี้ยงด้วยกรดซาลิไซลิก แล้วสกัดสารมัธยันต์ด้วยเอธิลอะซีเตท จากนั้นนำมาแยกจากกันด้วยวิธี TLC และตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบสารมัธยันต์ที่มีค่า R_f เท่ากับกรดเจนนทิลิกและเรืองแสงสีฟ้าอ่อนภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเหมือนกรดเจนนทิลิก ดังแสดงในรูปที่ 3.18

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า *Rhizobium* อาจย่อยสลายอะซีแนพธาลีนและแนพธาลีนเป็นกรดเจนนทิลิก (กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก)



รูปที่ 3.18 โคโรมาโตแกรมของการวิเคราะห์ TLC ของสารมัธยันต์ a และ b ที่เกิดจากการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับกรดเจนนิก

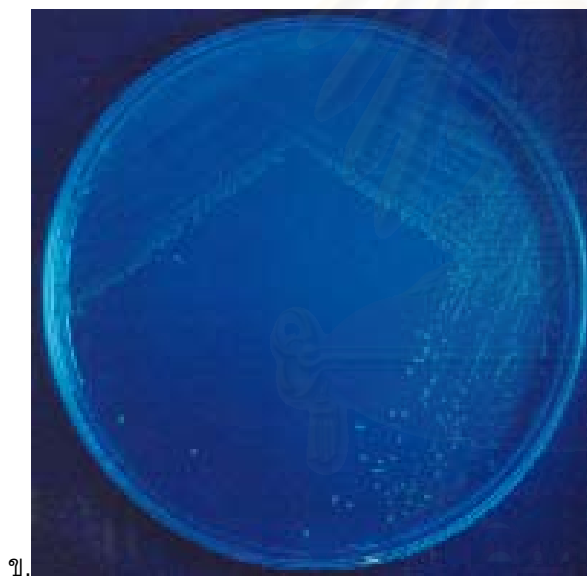
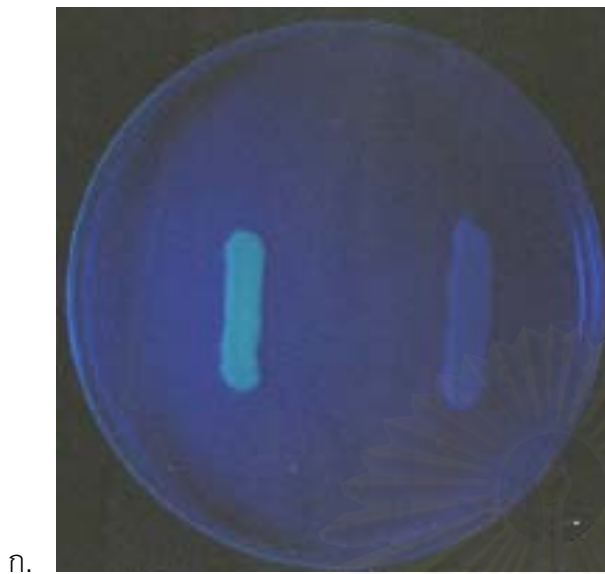
- 1.) กรดเจนนิก
- 2.) สายพันธุ์กลาย A35 เลี้ยงด้วยอะซีแนพธิน
- 3.) สายพันธุ์กลาย A35 เลี้ยงด้วยกรดซาลิไซลิก
- 4.) สายพันธุ์กลาย E32 เลี้ยงด้วยอะซีแนพธิน
- 5.) สายพันธุ์กลาย E32 เลี้ยงด้วยแนพธาลีน
- 6.) สายพันธุ์กลาย E32 เลี้ยงด้วยกรดซาลิไซลิก
- 7.) กรดเจนนิกและกรดซาลิไซลิก

3.5 สร้าง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีน *gfp* เป็นเครื่องหมาย

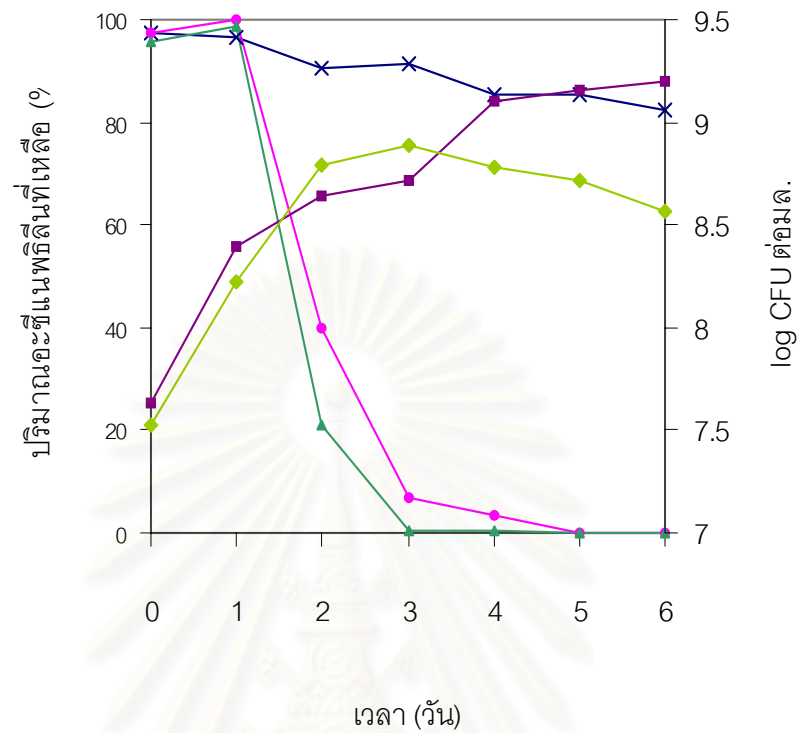
ก่อนที่จะมีการนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ไปใช้ในกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ ต้องมีการศึกษาถึงสภาพสิ่งแวดล้อมของระบบที่ใช้บำบัดทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพเพื่อปรับปรุงระบบบำบัดให้เอื้อต่อการย่อยสลายสาร PAHs และการอยู่รอดในระบบบำบัดของแบคทีเรียที่เติมลงไปโดยทำการศึกษาในระบบนิเวศวิทยาจำลอง (microcosms) ดังนั้นเครื่องหมายที่ใช้ในการติดตามเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่เติมลงไปในระบบบำบัดออกจากแบคทีเรียประจำถิ่นจึงเป็นสิ่งจำเป็น (Prosser, 1994) การทดลองนี้จึงสร้าง *Rhizobium* ที่มียีน *gfp* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ green fluorescent protein โดยนำยีน *gfp* รีคอมบิแนนท์ที่อยู่ใน miniTn5 แทรกสอดบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* โดยวิธีคอนจูเกชัน เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายติดตามแบคทีเรียชนิดนี้

จากการคอนจูเกต *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ pir ที่มีพลาสมิด pUT-mTn5::*gusA-pgfp21* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้ให้กับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นเซลล์ผู้รับ โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ 1:1 และระยะเวลาบ่มที่ให้ประสิทธิภาพของทรานสโฟสิชันสูงสุด 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีคอนจูเกชันดังที่ได้บรรยายในข้อ 2.7 พบ 9 โคลินที่สามารถเจริญและเรืองแสงสีเขียวอมเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิกและเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้นนำ 1 โคลินมาทดสอบการเจริญและการเรืองแสงได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีอะซีแนพธาลินหรือแนพธาลินเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าโคลินนี้สามารถเรืองแสงและย่อยสลายอะซีแนพธาลินได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.19 และมีรูปแบบการเจริญและการย่อยสลายอะซีแนพธาลินดังแสดงในรูปที่ 3.20 จากนั้นทดสอบความเสถียรของยีนเครื่องหมายโดยถ่ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 9 รุ่น เมื่อนำเชื้อในแต่ละรุ่นมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมและเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB พบว่าทุกโคลินเรืองแสงและเชื้อในรุ่นสุดท้ายยังสามารถเจริญและย่อยสลาย อะซีแนพธาลินได้เป็นปกติจึงให้ชื่อว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.19 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของ ก.) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บนอาหารแข็ง LB ข.) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและให้อะซีแนพทิลีนในรูปไอระเหย



- x— ปริมาณอะซีแนพติลินในชุดทดลองที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพติลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ CU-A1
- ▲— ปริมาณอะซีแนพติลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ CU-GFP2
- จำนวนเชื้อ CU-A1
- ◆— จำนวนเชื้อ CU-GFP2

รูปที่ 3.20 การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-GFP2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพติลิน เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ สร้าง *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดยการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 จึงทำการทดลองกลายพันธุ์ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 โดยทำการคอนจูเกชันกับ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 ให้ได้ทรานสคอนจูแกนต์จำนวนมากเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลีน จากนั้นเปรียบเทียบสารมัธยันต์ที่สะสมโดยสายพันธุ์กลายต่างๆ กับสายพันธุ์ CU-A1 และสร้าง *Rhizobium* ที่มี green fluorescent protein เป็นเครื่องหมาย โดยใช้วิธีคอนจูเกชัน

การก่อกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน

ปัจจัยสำคัญในการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชันเพื่อให้ได้ทรานสคอนจูแกนต์จำนวนมาก ประกอบด้วยหลายปัจจัยได้แก่ 1) ความไวรับของ *Rhizobium* ต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินซึ่งเป็นเครื่องหมายของทรานสโปซอน Tn5 2) พลาสมิดพาหะของทรานสโปซอน Tn5 3) อายุของเซลล์ที่ใช้ในการคอนจูเกชัน 4) ระยะเวลาที่ใช้ในการคอนจูเกชัน และ 5) อัตราส่วนระหว่างเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับ

จากการทดสอบความไวรับต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ไวต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคล้ายกับที่ Cole และ Elkan (1979) รายงานว่า *Rhizobium japonicum* จำนวน 24 สายพันธุ์จาก 48 สายพันธุ์คือต่อสารปฏิชีวนะนีโอมัยซินซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับกานามัยซินที่มีความเข้มข้นต่ำไม่เกิน 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 ซึ่งมีทรานสโปซอน Tn5 มีความสามารถคือต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จึงสามารถใช้สารปฏิชีวนะกานามัยซินในการคัดแยกทรานสคอนจูแกนต์ออกจากสายพันธุ์ CU-A1 เมื่อทดสอบการคือต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนต์ที่คัดแยกได้พบว่าสามารถคือต่อสารปฏิชีวนะได้สูงถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว LB

มีการสร้างพลาสมิดหลายชนิดเพื่อเป็นพาหะในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* ด้วยทรานสโปซอน Tn5 (Beringer และคณะ, 1978; Selvaraj และ Iyer, 1983; Simon และคณะ, 1983; Simon, 1984) ในการทดลองนี้เลือกใช้พลาสมิด pSUP2021 สร้างโดย Simon และคณะ (1983) ซึ่งมีขนาดเล็กประมาณ 11 กิโลเบสและมีประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันสูงใน *Rhizobium* spp. (Simon และคณะ, 1983; Hom และคณะ, 1984)

โดยปกติเมื่อมีการนำพลาสมิดที่สร้างขึ้นมาใช้ในการกลายพันธุ์แบคทีเรียมักใช้ภาวะเดียวกันกับที่ผู้สร้างพลาสมิดได้อธิบายไว้ (Lagares และคณะ, 1992; Foght และ Westlake, 1996) จึงทดลองใช้ภาวะในการคอนจูเกชันที่รายงานไว้โดย Simon และคณะ (1983) ซึ่งเป็นผู้สร้าง พลาสมิด pSUP2021 กล่าวคือ ใช้เซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับที่มีการเจริญอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) มาผสมกันในอัตราส่วนเซลล์ผู้ให้ต่อเซลล์ผู้รับเท่ากับ 1 : 5 และทำการคอนจูเกชันเป็นเวลา 5 ชั่วโมง มาใช้ในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบว่าประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันคือประมาณ 10^{-8} - 10^{-9} ซึ่งต่ำกว่าที่ได้รายงานไว้โดย Simon และคณะ (1983) คือ 10^{-4} จึงต้องทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากการทดลองหาอายุเซลล์ที่เหมาะสมในการคอนจูเกชัน ได้ทดลองใช้เซลล์ผู้ให้คือ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 และเซลล์ผู้รับคือ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอัตราส่วน 1 : 1 และใช้เวลาในการคอนจูเกชัน 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาคอนจูเกชันที่นานที่สุดสำหรับ *Rhizobium* กลุ่มที่มีการเจริญเร็ว (Selvaraj และ Iyer, 1983) โดยการแปรอายุเซลล์ที่ใช้เป็น 3 ช่วงคือ เซลล์ที่เจริญเต็มที่ (stationary phase) (Parke, 1993) เซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) (Simon และคณะ, 1983) และเซลล์ที่เจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะทวีคูณ (early log phase) (Yen และ Gunsalus, 1982) ในการคอนจูเกชันพบว่าได้ประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันประมาณ 1.5×10^{-7} - 1.2×10^{-6} 5×10^{-6} และ 6.4×10^{-6} ต่อเซลล์ผู้รับตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้เซลล์ที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะทวีคูณ เนื่องจากใช้ระยะเวลาเลี้ยงเซลล์สั้นกว่าและประสิทธิภาพของทรานสโพสิชันดีกว่า

จากการทดลองแปรระยะเวลาในการคอนจูเกชันพบว่าระยะเวลาในการคอนจูเกชันที่ดีที่สุดคือ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ทรานสคอนจูเกนต์มากที่สุด แต่ไม่ควรใช้ระยะเวลาคอนจูเกชันนานมากกว่านี้เพราะ Hom และคณะ (1984) รายงานว่าเมื่อใช้ระยะเวลาในการคอนจูเกชันนานขึ้นจะได้จำนวนทรานสคอนจูเกนต์เพิ่มขึ้น แต่การคอนจูเกชันนานเกินไปแบคทีเรียอาจมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน

Rhizobium สายพันธุ์ CU-A1 ไม่ติดต่อสารปฏิชีวนะชนิดใดที่ทำลาย *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 ดังนั้นไม่สามารถแปรจำนวนเซลล์ผู้ให้หรือเซลล์ผู้รับได้มากนัก เนื่องจากการใช้เซลล์ที่มากเกินไปเช่น อัตราส่วน 1 : 5 หรือ 5 : 1 ตามวิธีการเดิมของ Simon และคณะ (1983) จะมีโคโลนีขนาดเล็กของ *E. coli* เจริญบนผิวอาหารแข็งซึ่งรบกวนการคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์ การใช้อัตราส่วน *E. coli* ต่อ *Rhizobium* เท่ากับ 1 : 1 ให้จำนวนทรานสคอนจูแกนต์สูงกว่าหรือใกล้เคียงอัตราส่วน 1 : 2 หรือ 2 : 1 และมีโคโลนีขนาดเล็กของ *E. coli* รบกวนน้อยกว่า

การคัดเลือก *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนต์

จากการทดสอบการติดต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ พบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ไม่ติดต่อสารปฏิชีวนะชนิดใดที่ทำลาย *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 จึงต้องหาวิธีการคัดเลือกอื่นเพื่อคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์

ได้ทดลองเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 และ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ในสารประกอบอะโรมาติกต่างๆ ที่เป็นสารมัธยันต์จากการย่อยสลายสาร PAHs เช่น ซาไลไซลิกและคะทีคอล (Yen และ Gunsalus, 1982) กรดเจนทิลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) กรดพาลิกและกรดโปรโตคาที่คูอิก (Kiyohara และ Nagao, 1978) และ กรดเบนโซอิก (Annweiler และคณะ, 2000) พบว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเจริญได้ในกรดโปรโตคาที่คูอิก กรดซาลิไซลิก และ กรดเจนทิลิก ตรงกับที่ Muthukumar และคณะ (1982) รายงานว่าแบคทีเรียในกลุ่มไรโซเบียม สามารถเจริญในสารประกอบอะโรมาติกซึ่งหลั่งจากรากพืช (roots exude substances) เช่น กรดโปรโตคาที่คูอิก กรดซาลิไซลิก กรดเจนทิลิก และ คะทีคอล ส่วน *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 ไม่สามารถเจริญได้ในสารประกอบอะโรมาติกใดๆ ดังนั้นในการคัดเลือกทรานสคอนจูแกนต์จึงใช้กรดโปรโตคาที่คูอิกเช่นเดียวกับที่ Muthukumar และคณะ (1982) ได้เคยรายงานไว้ เนื่องจาก *Rhizobium* สามารถใช้กรดโปรโตคาที่คูอิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและมีการเปลี่ยนสีอาหารที่ชัดเจนเมื่อมีการเจริญอีกด้วย โดยจะผสมกรดโปรโตคาที่คูอิก 1.0 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารแข็ง CFMM ที่ทำให้แข็งด้วย Noble agar (1.5 กรัมต่อลิตร) และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ภาวะที่เหมาะสมในการคอนจูเกชัน

จากการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการคอนจูเกชันคือ ใช้เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ซึ่งมีพลาสมิด pSUP2021 และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะทวีคูณอย่างละ 10^9 เซลล์ผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 จากนั้นแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % ปริมาตร 15 ไมโครลิตรมาหยดบนเยื่อกรองที่วางอยู่บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันสูงสุดเท่ากับ 4.75×10^{-5} ต่อเซลล์ผู้รับ ซึ่งน้อยกว่าประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันที่ Simon และคณะ (1983) ได้รายงานไว้คือ 10^{-4} ต่อเซลล์ผู้รับ (*Rhizobium meliloti*)

นอกจากพลาสมิด pSUP2021 แล้วยังทดลองใช้พลาสมิด pSUP1011 (Simon และคณะ, 1983) และพลาสมิด pSUP5011 (Simon, 1984) ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะของทรานสโปซอน Tn5 เช่นกัน โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นพบว่าได้ประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันใกล้เคียงกับพลาสมิด pSUP2021 (ไม่แสดงข้อมูล)

การแทรกสอดในตำแหน่งจำเพาะ (hot spot)

เนื่องจากได้เคยมีรายงานการเกิดการแทรกสอดในตำแหน่งจำเพาะ (hot spot) ของทรานสโปซอน Tn5 บนดีเอ็นเอของ *Halomonas elongata* (Kunte และ Galinski, 1995) หรือ *Rhizobium meliloti* (Meade และคณะ, 1982; Forrai และคณะ, 1983) กลไกการเกิดการแทรกสอดในตำแหน่งจำเพาะยังไม่ทราบแน่ชัด อาจขึ้นกับแบคทีเรียซึ่งเป็นผู้รับและพลาสมิดพาหะเนื่องจากมีเอนไซม์และโปรตีนหลายชนิดในเซลล์ผู้รับเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการทรานสโพลีชันเช่น DnaA (Yin และ Reznikoff, 1987) *dam*-methylation (Yin และคณะ, 1988) โปรตีน Fis (Weinreich และ Reznikoff, 1992) และ Integration host factor (Makris และคณะ, 1990) เป็นต้น จึงทดลองสุ่มเลือกทรานสคอนจูเกนต์จากการคอนจูเกชันในแต่ละครั้งมาติดตามตำแหน่งการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ด้วยวิธีซาเธอร์นไฮบริไดเซชันกับชิ้นส่วนทรานสโปซอน Tn5 พบว่าทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 และเกิดสายพันธุ์กลายที่หลากหลาย เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ *Rhizobium meliloti* ซึ่งทำโดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 (Simon และคณะ, 1983)

โดยสรุปการกลายพันธุ์ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในการคอนจูเกชันกับ *Rhizobium* สายพันธุ์

CU-A1 ด้วยภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมเนื่องจาก

- 1) ไม่พบการคงอยู่ของพลาสมิด pSUP2021 ใน *Rhizobium* เนื่องจากไม่พบทรานสคอนจูแกนส์ที่ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินและคลอแรมฟินิโคลบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก
- 2) ทรานสคอนจูแกนส์ที่ติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินมีความถี่ประมาณ 4.75×10^{-5} ซึ่งสูงกว่าความถี่ในการติดต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้เองของ *Rhizobium* (Hom และคณะ, 1984)
- 3) ทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มบนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ทรานสคอนจูแกนส์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีซาเธอร์นไฮบริดเซชัน

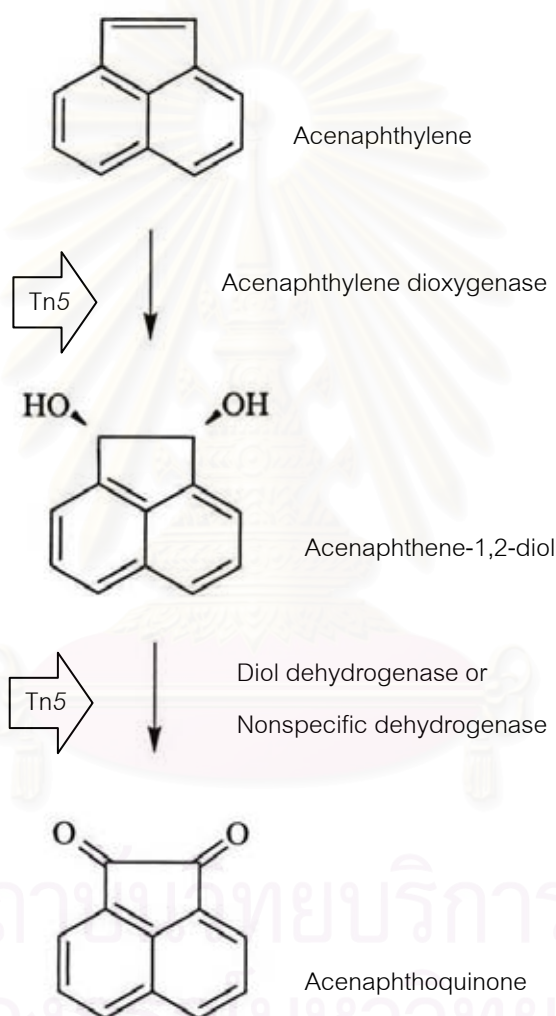
การติดฉลาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (green fluorescent protein)

การสร้าง *Rhizobium* ที่มียีนเรืองแสงสีเขียว (*gfp*) เป็นเครื่องหมาย โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการคอนจูแกนส์ดังกล่าวข้างต้นในการคอนจูเกต *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 λ pir ที่มีพลาสมิด pUT/mini-Tn5::*gusA-pgfp21* กับ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบ *Rhizobium-gfp* ทรานสคอนจูแกนส์ที่เรืองแสงชัดเจนภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และสามารถย่อยสลายอะซีแนพติลินและแนพธาลิน (ไม่แสดงข้อมูล) ได้เป็นปกติ จึงให้ชื่อว่า CU-GFP2 จากนั้นได้ทดสอบความเสถียรของยีน *gfp* ในสายพันธุ์กลาย CU-GFP2 โดยเลี้ยงสายพันธุ์ CU-GFP2 ในอาหารเหลว LB ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินจำนวน 9 รุ่น และตรวจสอบการเรืองแสงพบว่าทุกโคโลนีในแต่ละรุ่นเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสดงว่ายีน *gfp* มีความเสถียรใน *Rhizobium* ซึ่งต่างจาก Bloemberg และคณะ (1997) รายงานว่ายีน *gfp* ที่แทรกสอดบนพลาสมิดของ *Pseudomonas* spp. สูญหายไปภายใน 9 วันหลังจากปลูกลงในระบบนิเวศวิทยาจำลองเนื่องจากการสูญเสียพลาสมิด Barry (1986) ได้เคยรายงานว่า การแทรกสอดยีนแปลกปลอมลงบนโครโมโซมของแบคทีเรียมีความเสถียรที่สุด ดังนั้นควรตรวจสอบตำแหน่งแทรกสอดของ mini-Tn5::*gusA-pgfp21* ในสายพันธุ์ CU-GFP2 ก่อนนำสายพันธุ์ CU-GFP2 ไปใช้งาน

***Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพติลิน**

จากการตรวจสอบพีไทม์ของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายโดยพิจารณาจากความบกพร่องในการย่อยสลายหรือไม่เจริญในอะซีแนพติลิน อะซีแนพโทควิโนน กรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และแนพธาลิน สามารถแบ่งสายพันธุ์กลายเป็น 4 กลุ่มใหญ่

สายพันธุ์ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ G12 G39 G101 G531 และ K283 ซึ่งมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีน แต่เจริญในอะซีแนฟโทควิโนน และกรดแนฟธาซีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าทรานสโปซอน Tn5 อาจแทรกสอดในยีนใดยีนหนึ่งซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซีจีเนสซึ่งออกซิไดส์อะซีแนฟทีลีนเป็น ซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดออล หรือไดออลดีไฮโดรจีเนสซึ่งออกซิไดส์ ซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดออลเป็นอะซีแนฟโทควิโนน ดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ตำแหน่งการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ที่เป็นไปได้ในสายพันธุ์ในกลุ่มที่ 1

ดังนั้นเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายกลุ่มนี้ด้วยอะซีแนพทีลินจึงไม่ควรพบการสะสมสารมัธยันต์ชนิดใดๆ หรือพบการสะสมซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออก แต่จากผลโครมาโตแกรม TLC พบว่าเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายในกลุ่มนี้ด้วยอะซีแนพทีลินยังคงสะสมสารมัธยันต์หลายชนิดที่มีค่า R_f และลักษณะการเรืองแสงเหมือนสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพโทควิโนนและกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และส่วนใหญ่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 3.7 ก.) ซึ่งลักษณะนี้อาจอธิบายได้ใน 3 กรณีคือ

กรณีที่ 1) *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 มียีนซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซีจีเนสเพียง 1 ชุด แต่ทรานสโปซอน Tn5 อาจแทรกสอดในยีนซึ่งประมวลรหัสสำหรับ ferredoxin reductase หรือ ferredoxin ทำให้เอนไซม์มีการทำงานช้าลง Haigler และ Gibson (1990) รายงานว่า ferredoxin ของแนพทาลีน-1,2-ไดออกซีจีเนส จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่ ferredoxin reductase อาจมีเอนไซม์ที่คล้ายคลึงทำหน้าที่ทดแทนได้ Kiyohara และคณะ (1994) รายงานว่าเมื่อโคลนยีน *pahAbAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ ferredoxin (*pahAb*) และไดออกซีจีเนสซึ่งประกอบด้วย α - subunit (*pahAc*) และ β -subunit(*pahAd*) ลงบนพลาสมิด และตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ใน *E. coli* พบว่าสามารถออกซีไดส์แนพทาลีนเป็นแนพทาลีน-1,2-ไดไฮโดรไดออกอลแต่ปฏิกิริยาดำเนินไปได้ช้า ในขณะที่ Laurie และ Lloyd-Jones (1999) รายงานว่าพีแนนทริน-3,4-ไดออกซีจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ซึ่งประกอบด้วยยีน *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ α -subunit และ β -subunit ของไดออกซีจีเนส สามารถออกซีไดส์แนพทาลีน พีแนนทรินและแอนทราซีนเป็นสารประกอบไดไฮโดรไดออกอล โดยอาศัย ferredoxin reductase และ ferredoxin จากแหล่งอื่นในเซลล์

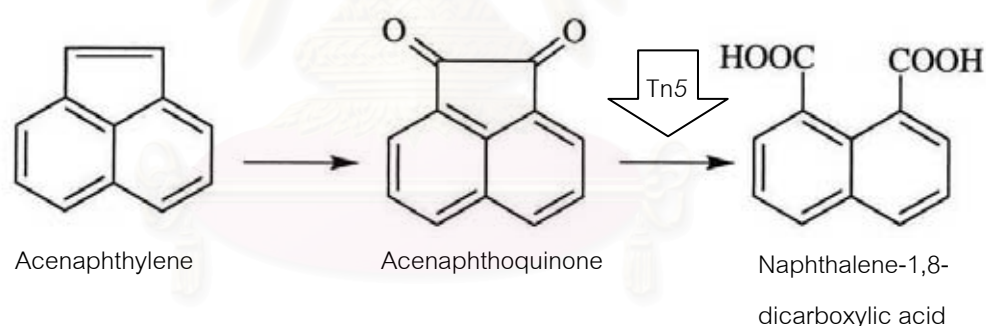
กรณีที่ 2) *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 มียีนซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซีจีเนส (α -subunit และ β -subunit) หลายชุด Romine และคณะ (1999) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivoran* สายพันธุ์ F199 ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิด มียีนซึ่งมีลำดับเบสคล้ายคลึงกับยีนที่ประมวลรหัสสำหรับ α -subunit และ β -subunit ถึงชนิดละ 6 ชุด คือ *bphA1a-f* ประมวลรหัสสำหรับ α -subunit และ *bphA2a-f* ประมวลรหัสสำหรับ β -subunit ในขณะที่มียีน *bphA3* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ ferredoxin reductase และยีน *bphA4* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ ferredoxin เพียงชนิดละ 1 ชุด

กรณีที่ 3) สายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 1 อาจถูกทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดในยีนที่ประมวลรหัสสำหรับ ซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกดีไฮโดรจีเนส แต่แบคทีเรียมีเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งไม่ทราบชนิดสามารถออกซีไดส์ซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกอล Schocken และ Gibson (1984) รายงานว่า *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องของไดออกดีไฮโดรจีเนสจะสะสมซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกอล เมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพทีลิน แต่ Selifonov และคณะ (1996)

รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ซึ่งไม่สามารถออกซิไดส์อะซีแนพทีลิน เป็น ซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกอล มีดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทสไม่ทราบชนิดสามารถเปลี่ยน ซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกอลเป็นอะซีแนพโทควิโนน

Rhizobium สายพันธุ์ CU-A1 อาจมีเอนไซม์ซึ่งประมวลผลสำหรับไดออกซีจีเนส มากกว่า 1 ชุด เพราะจากผลการทดลองสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 1 ไม่เจริญในอะซีแนพทีลินแต่เจริญได้เป็นปกติในแนพธาไลน์ ซึ่งแนพธาไลน์ไดออกซีจีเนสอาจจะย่อยสลายอะซีแนพทีลินได้อย่างช้าๆ จึงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังจากเลี้ยงสายพันธุ์กลายเป็นเวลา 4 วันดังแสดงในรูปที่ 4.7 ก ซึ่งคล้ายกับที่ Selifonov และคณะ (1996) รายงานไว้ว่าแนพธาไลน์ไดออกซีจีเนสสามารถออกซิไดส์อะซีแนพทีลินเป็น ซิส-อะซีแนพทีน-1,2-ไดออกอล

สายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 2 ได้แก่ H1 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน และอะซีแนพโทควิโนน แต่เจริญได้เป็นปกติในกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าทรานสโปซอน Tn5 อาจแทรกสอดในยีนที่ประมวลผลสำหรับเอนไซม์ที่ย่อยสลายอะซีแนพโทควิโนนเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ตำแหน่งการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ที่เป็นไปได้ในสายพันธุ์กลายกลุ่มที่ 2

Selifonov และคณะ (1996) รายงานว่า อะซีแนพโทควิโนนเกิดการแตกตัวเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เองโดยไม่ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงว่าขั้นตอนนี้แม้เกิดได้เองแต่อาจต้องการเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาให้ดำเนินไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Eaton และ Chapman (1992) ซึ่งศึกษาวิถีการย่อยสลายแนพธาไลน์และพบว่าสายพันธุ์

คอมพิแนนต์ที่ไม่มี 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase (HCCA isomerase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน HCCA เป็น *ทรานส-ออโท-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูเวท* (*trans*-o-hydroxybenzylidenepyruvate, *t*HBPA) จะสะสม *ซิส-ออโท-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูเวท* (*cis*-o-hydroxybenzylidenepyruvate, *t*HBPA) และ HCCA และเจริญได้เล็กน้อยในแนพธาลีน แต่อัตราการเปลี่ยนอะซีแนพโทควิโนนเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก อาจเกิดช้ากว่าการไอโซเมอไรเซชันของ HCCA เป็น *t*HBPA ดังนั้นสายพันธุ์กลาย H1 จึงไม่เจริญในอะซีแนพโทควิโนน

สายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความบกพร่องในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิดีน กล่าวคือสายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ H1 ไม่สามารถเจริญได้ในอะซีแนพธิดีน และอะซีแนพโทควิโนน และสายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 3 ได้แก่ B1 B5 และ E11 ไม่สามารถเจริญในในอะซีแนพธิดีน อะซีแนพโทควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก แต่ทั้งสายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 2 และ 3 เจริญได้ในแนพธาลีน กรดซาลิไซลิกและกรดเจนทิลิก จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 มีเอนไซม์เฉพาะในการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนแยกต่างหากจากเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน ซึ่งคล้ายกับ Allen และคณะ (1997) รายงานว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 ย่อยสลายแนพธาลีนและ 1-แนพธอลด้วยเอนไซม์ต่างวิถีกันกล่าวคือ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายแนพธาลีนต้องการสารชักนำการแสดงออกของยีน (inducible) แต่เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลาย 1-แนพธอลถูกสังเคราะห์ตลอดเวลา (constitutive) และแบคทีเรียชนิดนี้ย่อยสลายแนพธาลีนและ 1-แนพธอลเป็นกรดซาลิไซลิกและกรดเจนทิลิกเหมือนกัน

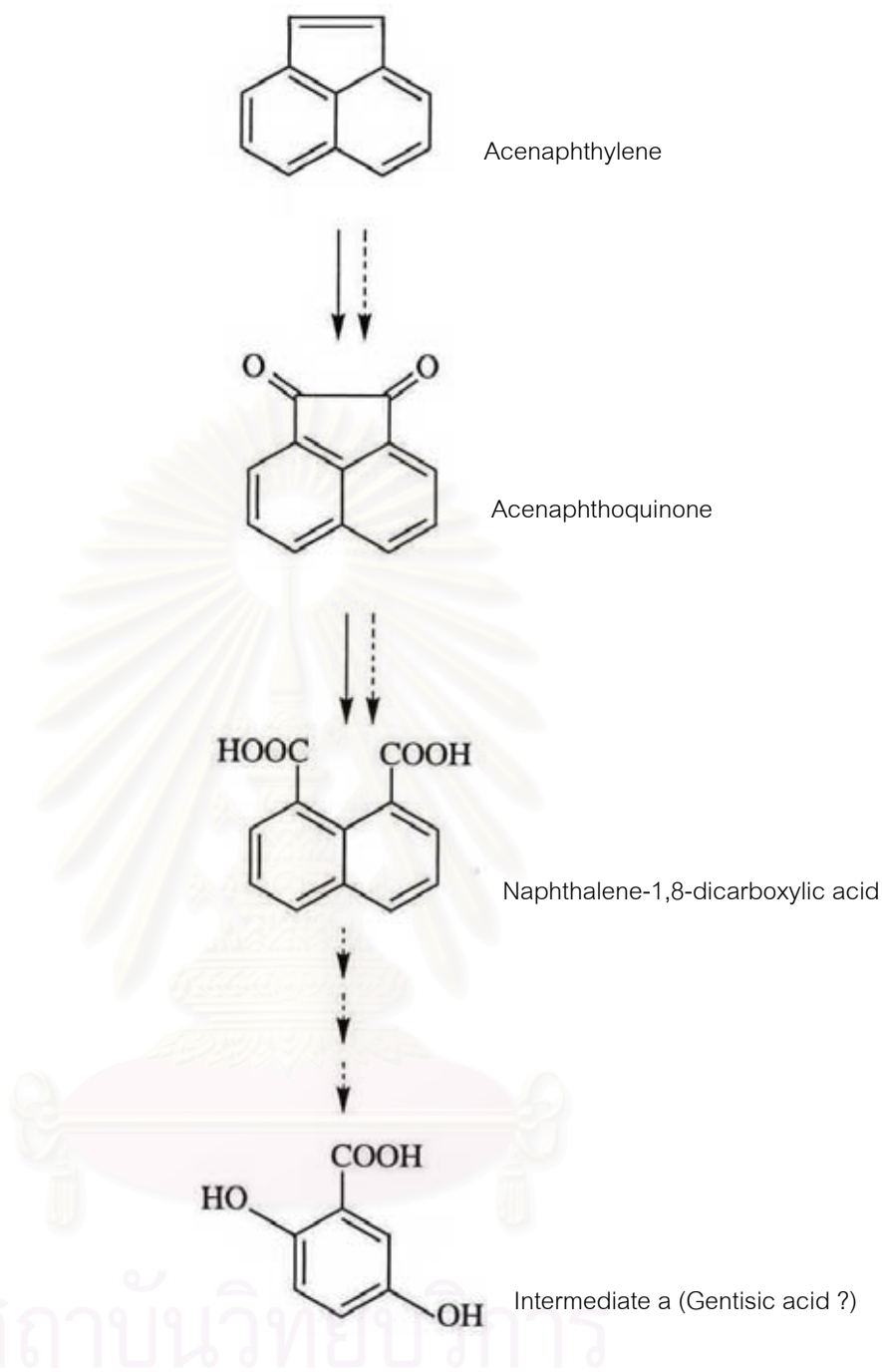
สายพันธุ์กลายในกลุ่มที่ 4 แสดงให้เห็นถึงความซับซ้อนในการควบคุมการย่อยสลายและกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกของ *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 กล่าวคือสายพันธุ์กลาย D2 และ J1 ไม่เจริญในกรดซาลิไซลิกแต่เจริญในกรดเจนทิลิก แสดงว่าทรานสโปซอน Tn5 อาจแทรกสอดในยีนที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ย่อยสลายกรดซาลิไซลิกเป็นกรดเจนทิลิก ถ้า *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 ย่อยสลายอะซีแนพธิดีนเป็นกรดเจนทิลิกเช่นเดียวกับการย่อยสลายแนพธาลีนเป็นกรดเจนทิลิกแล้ว เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย D2 และ J1 ด้วยอะซีแนพธิดีนหรือแนพธาลีน สายพันธุ์กลายทั้งสองจะต้องสะสมกรดซาลิไซลิก แต่จากผลการทดลองปรากฏว่าเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลายทั้งสองด้วยอะซีแนพธิดีน อะซีแนพโทควิโนนหรือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และตรวจสอบด้วยวิธี TLC ไม่พบสารมัธยันต์ชนิดใดที่มีลักษณะการเรืองแสงหรือมี

ค่า R_f ใกล้เคียงกับกรดซาลิไซลิก นอกจากนี้สายพันธุ์กลายทั้งสองไม่สามารถเจริญหรือย่อยสลายแนพธาดีน

จากรูปที่ 4.7 ซึ่งแสดงจำนวนเซลล์ของสายพันธุ์กลายที่เลี้ยงด้วยอะซีแนพริลีน พบว่าจำนวนเซลล์ของสายพันธุ์กลายส่วนใหญ่จะลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนในอะซีแนพริลีนโดยไม่มีระยะพัก แต่สายพันธุ์กลาย J1 มีจำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่เมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพริลีนเป็นเวลา 8 วัน แสดงว่าสายพันธุ์กลาย J1 น่าจะสามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้บางส่วน และสารมัธยันต์สีเทาอมเขียวที่สะสมโดยสายพันธุ์กลาย J1 มีความเป็นพิษต่ำหรือไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จึงไม่พบการลดจำนวนเซลล์ของสายพันธุ์กลาย J1 ในอะซีแนพริลีนเมื่อเทียบกับสายพันธุ์กลายอื่น ๆ พจนีย์ จันทมาลี (2543) และ Sikkema และคณะ (1995) รายงานว่าสาร PAHs และสารมัธยันต์จากการย่อยสลายสาร PAHs บางชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายสาร PAHs หรือย่อยสลายสาร PAHs ได้ไม่ดี สายพันธุ์กลาย J1 จะสะสมสารมัธยันต์สีเทาอมเขียวเมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพริลีนแต่ไม่สะสมสารมัธยันต์ชนิดนี้เมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพโรควิโนนหรือกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าสารที่มีสีเทาอมเขียวอาจเกิดจากการออกซิเดชันของสารมัธยันต์บางชนิด ก่อนที่สารมัธยันต์ชนิดนี้จะถูก *Rhizobium* ย่อยสลายเป็นอะซีแนพโรควิโนน

สายพันธุ์กลาย A35 A53 E32 และ G62 สะสมสารมัธยันต์ a ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นสีฟ้าและมีค่า R_f เท่ากับกรดเจนนีลิก จากการย่อยสลายอะซีแนพริลีน อะซีแนพโรควิโนน และกรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

โดยสรุปพบว่าการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนเป็นอะซีแนพโรควิโนน กรดแนพธาดีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และสารมัธยันต์ a ซึ่งมีลักษณะการเรืองแสงและค่า R_f เหมือนกับกรดเจนนีลิกตามลำดับ คล้ายกับที่ได้รายงานไว้ใน *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 การย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (เส้นประ) เทียบกับ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) (เส้นทึบ)

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งได้สายพันธุ์กลายต่างๆ ที่สะสมสารมัธยันต์จาก

การย่อยสลายอะซีแนพติลีนที่ต่างกัน เมื่อนำสารมัธยันต์ที่สะสมในสายพันธุ์กลายต่างๆ ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีจะทำให้สามารถอธิบายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพติลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ได้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลาย CU-GFP2 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน สายพันธุ์กลาย CU-GFP2 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายอะซีแนพติลีนได้ตามปกติ และยังมียีน *gfp* ซึ่งเป็นรหัสของ green fluorescent protein จึงส่งผลให้มีการเรืองแสงสีเขียวขึ้นอย่างชัดเจน จึงเป็นประโยชน์ในการติดตามสายพันธุ์กลาย CU-GFP2 ในการทดลองบ่งชี้ในระดับห้องปฏิบัติการ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. การเก็บรักษา *Rhizobium* สายพันธุ์ที่กลายในอาหารเหลว CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาที่คูอิกและสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ควรใช้เซลล์ที่มีการเจริญเต็มที่และอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีม่วงอมน้ำเงินเป็นสีขาวขุ่น เนื่องจากกรดโปรโตคาที่คูอิกและคาร์บอกซีมิโคเนตซึ่งเป็นสารมัธยันต์จากการย่อยสลายมีความเป็นพิษจะทำให้เซลล์ตาย
2. อาหาร CFMM ที่เติมกรดโปรโตคาที่คูอิกควรเป็นอาหารที่เตรียมใหม่ๆ เนื่องจากกรดโปรโตคาที่คูอิกอาจเกิดออกซิเดชัน ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (D'Argenio และคณะ, 1999)
3. การผสมเซลล์เพื่อคอนจูเกชัน ควรล้าง *E. coli* ด้วยสารละลายเกลือ 0.85 % สองครั้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อกำจัดสารปฏิชีวนะที่อาจเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำ *Rhizobium* ที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน ทุกขั้นตอนต้องทำอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องและห้ามนำเซลล์ที่จะคอนจูเกชันแช่ในตู้เย็นหรือปั่นเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ จะทำให้ประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันลดลงอย่างมาก
4. *E. coli* สายพันธุ์ S17-1 และ S17-1 λ pir มียีน *tra* จากพลาสมิด RP4 ซึ่งสร้าง sex pilus ที่มีลักษณะสั้นและแข็ง การคอนจูเกชันจึงควรให้เซลล์อยู่ติดกันให้มากที่สุดเพื่อเพิ่มโอกาสการถ่ายทอดพลาสมิด ดังนั้นควรใช้อาหารแข็ง LB ที่มีผิวหน้าอาหารแห้ง อาหารแข็งที่เท่าใหม่ๆ จะมีความชื้นสูงและมีหยดน้ำบนผิวอาหาร เมื่อหยดเซลล์ผสมลงไปจะทำให้เซลล์เกิดการเจริญซึ่งเป็นผลให้ประสิทธิภาพของทรานสโพลีชันลดลงและได้ทรานสคอนจูเกนต์จำนวนน้อย การหยดเซลล์ผสมควรให้แผ่ไปบนแผ่นเยื่อกรองเพื่อให้เซลล์ได้รับออกซิเจนทั่วถึง
5. กรดเจนิสิกซึ่งพบสะสมโดยสายพันธุ์ที่กลายเมื่อเลี้ยงด้วยอะซีแนพติลินหรือแนพธาดีน อาจมาจากสารมัธยันต์คนละชนิด กล่าวคืออาจเกิดจากการย่อยสลาย 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก Poh และ Bayly (1980) หรือจากการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Yen และ Sedar, 1988) ดังนั้นควรตรวจสอบรูปแบบการสะสมของสารมัธยันต์โดยสายพันธุ์ที่กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพติลินเปรียบเทียบกับ 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก
6. สายพันธุ์ที่กลายในแต่ละกลุ่มที่แสดงฟีโนไทป์เหมือนกัน อาจเกิดจากการแทรกสอดของ ทรานสโปซอน Tn5 บนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต่างกันดังอธิบายไว้ในบทที่ 5 การตรวจสอบตำแหน่งแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn 5 และการวิเคราะห์ลำดับเบสข้างเคียงตำแหน่งแทรก

สอดคล้องของทราโนสไปซอน Tn 5 จะช่วยให้ทราบถึงยีนที่เกี่ยวข้องรวมถึงปฏิสัมพันธ์ของยีนนั้นในวิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพทาลีน

7. ผลการตรวจสอบการสะสมสารมัธยันต์ของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ด้วยวิธี TLC จะพบการสะสมสารมัธยันต์หลายชนิด ทำให้จำแนกได้ยากกว่าสารมัธยันต์ชนิดใดเป็นสารมัธยันต์ชนิดสุดท้ายและทำให้การสกัดสารมัธยันต์ที่ต้องการศึกษาให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนมากขึ้น แบบคที่เรียต้องใช้พลังงานในการย่อยสลายสาร PAHs ดังนั้นอาจหาแหล่งคาร์บอนอื่นเช่น กรดซัคซินิก (Hartnett และคณะ, 1990) มาเป็นแหล่งพลังงานทดแทนให้แก่สายพันธุ์กลาย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พจนีย์ จันทมาลี. 2543. ความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการย่อยสลายแอนทราซีนและพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พระราชบัญญัติวิวัฒพันธุ์ พ.ศ. 2535

ศรัลยา แพงไตร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดส์อะซีแนพริลีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Allen, C. C. E., Boyd, D. R., Larkin, M. J., Reid, K. A., Sharma, N. D., and Wilson, K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene and indole by *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038. Appl. Environ. Microbiol. 63: 151-155.

Annweiler, E., Richnow, H. H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., and Michaelis, W. 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 518-523.

Artiguenave, F., Vilagines, R., and Danglot, C. 1997. High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. FEMS Microbiol. Lett. 153: 363-369.

Ausubel, F. M., Brent, T., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current protocols in molecular biology* (4th ed). New York: John Wiley & Son.

Barry, G. F. 1986. Permanent insertion of foreign genes into the chromosomes of soil bacteria. Bio/Technol. 4: 446-448.

- Beringer, J. E., Beynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., and Johnston, A. W. B. 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. Nature 276: 633-634.
- Bloemberg, G. V., O'Toole, G. A., Lugtengerg, B. J. J., and Kolter, R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4543-4551.
- Bosch, R., Moore, E. R. B., Garcia-Valdes, E., and Pieper, D. H. 1999. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. J. Bacteriol. 181: 3215-2322.
- Botero, L. M., Al-Niemi, T. S., and McDermott, T. R. 2000. Characterization of two inducible phosphate transport systems in *Rhizobium tropici*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 15-22.
- Carson, M. 1987. Ribbon models of macromolecules. J. Mol. Graphics. 5: 103-106.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradaton 3: 351-368.
- Chapman, P. J. 1979. Degradation mechanism. In Bourquin, A. W., and Pritchard, P. H. (eds.) Proceedings of the workshop: microbial degradation of pollutants in marine environments.: 28-66. U.S. Environmental protection agency. Gulf Breeze, Fla.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.
- Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, G. S. and Ward, W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. Biochemistry. 32: 1212-1218.
- Cole, M., and Elkan, G. H. 1979. Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 37: 867-870.
- Cookson, J. T. 1995. Application of biological process. In Cookson, J., T. (ed.) Bioremediation engineering design and application.:9-25. USA: McGraw-Hill.
- Cullen, D. W., Nicholson, P. S., Mendum, T. A., and Hirsch, P. R. 1998. Monitoring genetically modified rhizobia in field soils using the polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. 84: 1025-34.

- Dehio, C., and Meyer., M. 1997. Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal transfer from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179: 538-540.
- DE Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., and Timmis, K. N. 1990. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram negative eubacteria. J. Bacteriol. 172: 6568-6572.
- Dennis, J. J., and Zylstra, G. J. 1998. Plasposons: modular self-cloning intransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2710-2715.
- Errampalli, D., Okamura, H., Lee, H., Trevors, J. T., and van Elsas, J. D. 1998. Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas* sp. UG14Gr in creosote-contaminated soil. FEMS Microbiol. Ecol. 26: 181-191.
- 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.
- Foght, J. M., and Westlake, D. W. 1996. Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. Biodegradation 7: 353-366.
- Forrai, T., Vienze, C., Banfalvi, Z., Kiss, G. B., Randhawa, G. S., and Kondorosi, A. 1983. Localization of symbiotic mutations in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 153: 635-643.
- Fuenmayor, S. L., Mark, W., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.
- Grifoll, M., Casellas, M., Vayona, M. J., and Solanas, A. M. 1992. Isolation and characterization of fluorene-degrading bacteria: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2910-2917.
- Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Action of a versatile fluorene-degrading bacteria isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.

- Haigler, B. E., and Gibson, D. T. 1990. Purification and properties of ferredoxin_{NAP}, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 172: 465-468.
- Hammel, K. E., Kalyanaraman, B., and Kirk, K. T. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 261: 16948-16952.
- Hartnett, G. B., Averhoff, B., and Prnston, L. N. 1990. Selection of *Acinetobacter calcoaceticus* mutants deficient in the *p*-hydroxybenzoate hydroxylase gene (*pobA*), a member of a supraoperonic cluster. J. Bacteriol. 172: 6160-6161.
- Harwood, C. R. 1993. Plasmids, transposons and gene flux. In Goodfellow M. and O'Donnell, A., G. (eds.) Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London. :115-150.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection marker for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172: 6557-6567.
- Hom, S. S., M., Uratsu, S. L., and Hong, F. 1984. Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants. J. Bacteriol. 159: 335-340.
- Hopkins, R. P., Brooks, C. J. W., and Young, L. 1962. Biochemical studies of toxic agents. 13. The metabolism of acenaphthylene. Biochem. J. 82: 457-466.
- Hu, N. T., Hung, M. N., Chiou, S. J., Tang, F., Chiang, D.C., Huang, H.Y., and Wu, C. Y. 1992. Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. J. Bacteriol. 174: 2679-2687.
- Jansson, J. K., and Prosser, J. 1997. Quantification of the presence and activity of specific microorganisms in nature. Mol. Biotechnol. 7: 103-109.
- Jaoua, S., Neff, S., and Schupp, T. 1992. Transfer of mobilizable plasmids to *Sorangium cellulosum* and evidence for their integration into the chromosome. Plasmid 28: 157-65.
- Jilk, R. A., York, D., and Reznikoff, W. S. 1996. The organization of the outside end of transposon Tn5. J. Bacteriol. 178: 1671-1679.

- Johannes, C., Majcherczyk, A., and Huttermann, A. 1998. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. J. Biotechnol. 61: 151-156.
- Kiyohara, H., and Nagao, K. 1978. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. J. Gen. Microbiol. 105: 69-75.
- 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: 2439-2443.
- Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 864-865.
- Kotterman, M., J., J., Heessels, E., Jong, E., and Field, J., A. 1994. The physiology of anthracene biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Environ. Microbiol. 42: 179-186.
- Kunte, H. J., and Galinski, E. A. 1995. Transposon mutagenesis in halophilic eubacteria: conjugal transfer and insertion of transposon Tn5 and Tn1732 in *Halomonas elongata*. FEMS Microbiol. Lett. 128: 293-299.
- Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H. D., Puhler, A., and Faveludes, G. 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. J. Bacteriol. 174: 5941-5952.
- Larry, S., and Wendy, C. 1997. Transposition and nonhomologous recombination. In *Molecular genetic of bacteria*: 195-214. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- 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. 181:531-540.
- Lloret, J., Wulff, B. B., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I., and Rivilla, R. 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1024-1028.

- Lopez-Lara, I., M., Orgambide, G., Dazzo, F., B., Olivares, J., and Toro, N. 1995. Surface polysaccharide mutants of *Rhizobium* sp. (Acacia) strain GRH2: major requirement of lipopolysaccharide for successful invasion of Acacia nodules and host range determination. *Microbiology*. 141 (Pt 3): 573-581.
- Ludin, B., Koll, T., Meill, R., Kaech, S., and Matus, A. 1996. Application of novel vectors for GFP-tagging of protein to study microtubule-associated proteins. *Gene* 173: 107-111.
- Makris, J. C., Nordmann, P. L., and Reznikoff, W. S. 1990. Integration host factor plays a role in IS50 and Tn5 transposition. *J. Bacteriol.* 172: 1368-1373.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., and Ausubel, F. M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.
- Monticello, D. J., Bakker, D., Schell, M., and Finnerty, W. R. 1985. Plasmid-borne Tn5 insertion mutation resulting in accumulation of gentisate from salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 761-764.
- Muthukumar, G., Arunakumari, A. and Mahadevan, A. 1982. Degradation of aromatic compounds by *Rhizobium* spp. *Plant and Soil* 69: 163-169.
- Parke, D. 1990. Construction of mobilizable vectors derived from plasmids RP4, pUC18 and pUC19. *Gene* 93:135-137.
- Parke, D. 1993. Positive regulation of phenolic catabolism in *Agrobacterium tumefaciens* by the *pacQ* gene in response to β -carboxy-*cis,cis*-muconate. *J. Bacteriol.* 175: 3529-3535.
- Parke, D. 1995. Supraoperonic clustering of *pac* genes for catabolism of the phenolic compound protocatechuate in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 177: 3808-3817.
- Parke, D., D'Arhenio, D. A., and Ornston, L. N. 2000. Bacteria are not what they eat: that is why they are so diverse. *J. Bacteriol.* 182: 257-263.
- Prosser, J., I. 1994. Molecular marker systems for detection of genetically engineered microorganisms in the environment. *Microbiology* 140: 5-17.

- Reid, C. J., and Poole, P. S. 1998. Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 180: 2660-2609.
- Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T. J., and Collmer, A. 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. J. Bacteriol. 173: 6547-6552.
- Romine, M. F., Stillwell, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, A. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete Sequence of 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181: 1585-1602.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: miniprep. In *Molecular cloning a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48: 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: 507-514.
- Sevaraj, G., and Iyer, V. N. 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. J. Bacteriol. 156: 1292-1300.
- Shindo, T., Ueda, H., Suzuku, E., and Nishimura, H. 1995. A catechol 2,3 dioxygenase gene as a report. Bioscience Biotech. Biochim. 59: 314-315.
- Sikkema, J., DE Bont, J. A. M., and Pollman, B. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59: 201-222.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-mob transposon. Mol. Gen. Genet. 196: 413-420.
- 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.

- Tate, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. 1997. A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. J. Bacteriol. 179: 7343-7350.
- Unge, A., Tombolini, R., Mølbak L., and Jansson, J., K. 1999. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. Appl. Environ. Microbiol. 65: 813-812.
- Vinuesa, P., Reuhs, B. L., Breton, C., and Werner, D. 1999. Identification of a plasmid-borne locus in *Rhizobium etli* KIM5s involved in lipopolysaccharide O-chain biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. J. Bacteriol. 181: 5606-5614.
- Watson, R. J., and Rastogi, V. K. 1993. Cloning and nucleotide sequencing of *Rhizobium meliloti* aminotransferase genes: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. J. Bacteriol. 175: 1919-28.
- Weinreich, M. D., and Reznikoff, W. S. 1992. *Fis* plays a role in Tn5 and IS50 transposition. J. Bacteriol. 174: 4530-4537.
- Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ. Pollut. 81: 229-249.
- Xi, C., Lambrecht, M., Vanderleyden, J., and Michiels, J. 1999. Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. J. Microbiol. Met. 35: 85-92.
- Xu, P. L., Leong, S., Sequeira, L. 1988. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 170: 617-22.
- Yen, K.-M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 847-878.
- Yen, K.-M., and Gunsalus, I. C. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. J. Bacteriol. 162: 1008-1013.
- Yin, J. C. P., Krebs, M. P., and Reznikoff, W. S. 1988. Effect of *dam* methylation on Tn5 transposition. J. Mol. Biol. 199: 35-45.
- Yin, J. C. P., and reznikoff, W. S. 1987. *dnaA*, an essential host gene, and on Tn5 transposition. J. Bacteriol. 169: 4637-4645.

Zumft, W. G., Dohler, K., and Korner, H. 1985. Isolation and characterization of transposon Tn5-induced mutants of *Pseudomonas perfectomarina* defective in nitrous oxide respiration. J. Bacteriol. 163 :918-924.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral salt Medium (CFMM)

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเดคะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	กรัม
เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.005	กรัม

ละลายสารสามชนิดแรกในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารละลายสามชนิดหลังทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงเติมลงไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (CFMM agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเหลว CFMM แต่ละลายวุ้นเพิ่มลงไปนึ่งฆ่าเชื้ออย่างแรกก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ วุ้นที่ใช้ในการเตรียมอาหารมี 3 ชนิดคือ

โนเบลอะกา 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ใช้เตรียมอาหารสำหรับการทดลองข้อ 3.7 ก.

อะกาโรสเจล 7.0 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ใช้เตรียมอาหารสำหรับการทดลองข้อ 3.8 ข.

แบคโตอะกา 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ใช้เตรียมอาหารสำหรับการทดลองทั่วไป

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
--------------------	------	------

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
--------------------------------	-----	------

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
-----------------------	-----	------

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. 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-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SOC (SOC medium)

ทริปโตเนน (tryptone)	20	กรัม
----------------------	----	------

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
---------------------------------	---	------

โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
----------------	-----	------

MgSO ₄	20	มิลลิโมลาร์
-------------------	----	-------------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย PAHs และอนุพันธ์ของสาร PAHs ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)

อะซีแนฟทีน	0.6	กรัม
อะซีแนฟโทควิโนน	0.5	กรัม
กรดแนฟธาไลน์ 1,8-ไดคาร์บอกซีลิก	0.5	กรัม
แนฟธาไลน์	0.5	กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดฝาเกลียวสีขาวที่อุณหภูมิ -20°C เติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว

2. สารละลายสารประกอบอะโรมาติกในเอทานอล

ซึ่งสารต่อไปนี้ กรด 3,4-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก กรดพธาลิก คาทีคอล 3-เมธิลคาทีคอล กรดซินนามิก กรดเบนโซอิกและกรดซาลิไซลิก ชนิดละ 1.0 กรัม ละลายสารแต่ละชนิดในเอทานอลปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องปั่นผสมจนสารละลายหมด ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดฝาเกลียวสีขาวที่อุณหภูมิ -20°C

สำหรับเติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วหรือเติมน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเย็นลงที่อุณหภูมิ 50°C

3. สารละลายไซเตียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85%

ซังโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

4. กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีก 1 ครั้ง

5. สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ	สารละลายเข้มข้น
กานามัยซิน	50 มก./น้ำ 1 มิลลิลิตร
แอมพิซิลลิน	100 มก./น้ำ 1 มิลลิลิตร
สเตรปโตมัยซิน	25 มก./น้ำ 1 มิลลิลิตร
พอลิมิกซิน	50 มก./น้ำ 1 มิลลิลิตร
คลอแรมเฟนิคอล	50 มก./เมธานอล 1 มิลลิลิตร
เตตราซัยคลิน	50 มก./ 50% เมธานอล 1 มิลลิลิตร

กานามัยซิน แอมพิซิลลิน สเตรปโตมัยซินและพอลิมิกซินทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร ส่วนคลอแรมเฟนิคอลและเตตราซัยคลินทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกว้าง 0.20 ไมโครเมตร เก็บรักษาในขวดฝาเกลียวสีขาวที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 1 เดือน

6. สารละลายเมธานอลเข้มข้น 80 % ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กรองเมธานอลผ่านเยื่อกรองชนิด FH ขนาดรูกว้าง 0.5 ไมโครเมตร กำจัดอากาศออกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง จากนั้นผสมเมธานอลปริมาตร 80 มิลลิลิตรกับน้ำกรองที่กำจัด

อากาศแล้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปกำจัดอากาศด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูงอีกครั้งจนไม่เห็นฟองอากาศ

7. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit

ประกอบด้วย

Buffer P1
 Buffer P2
 Buffer N3
 Buffer PB
 Buffer PE
 RNase A
 Collection tube
 QIAprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตรลงใน Buffer PE

8. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล GeneClean II Kit

ประกอบด้วย

NaI solution
 Glassmilk
 NEW Wash

ทำการสกัดพลาสมิดตามวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

9. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์
โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)	0.3 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

10. สารละลาย 10%SDS

ชั่ง sodium lauryl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

11. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตรจนหมดแล้วจึงละลายผลึกโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

12. Neutralization buffer

Trismabase	0.5 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0 โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

13. สารละลาย 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

14. สารละลาย 0.1XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

15. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit I

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1. Dig-High Prime

หลอดหมายเลข 2. Unlabeled control DNA, 20 μ g/ml, linearized with *Bam*

HI

หลอดหมายเลข 3. DNA dilution buffer

หลอดหมายเลข 4. Anti-Digoxigenin-AP Conjugate

หลอดหมายเลข 5. NBT/BCIP concentrated stock solution

ขวดหมายเลข 6. Blocking solution, 10X conc.

หลอดหมายเลข 7. DIG Quantification Teststrips

หลอดหมายเลข 5. DIG Control Teststrips

และสารละลายที่ใช้ในการทดลองดังนี้

Standard hybridization buffer

20XSSC	50 มิลลิลิตร
10Xblocking solution	20 มิลลิลิตร
N-laurylsarcosine	0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร)
SDS	0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ควรผสมใหม่ทุกครั้งที่ทำาทดลอง

Buffer 1 Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15 โมลาร์

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

Buffer 2 Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution กับบัฟเฟอร์ 1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำาทดลอง

Buffer 3 Detection buffer

Tris-HCl	0.1 โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1 โมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	0.05 โมลาร์

ผสมสารสองอย่างแรกในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาทีเมื่อเย็นลงแล้ว จึงเติมแมกนีเซียมคลอไรด์

16. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์

Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$)	121.14 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trizma base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

17. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

18. บัฟเฟอร์ TE

Tris-HCl	10.0 มิลลิโมลาร์
EDTA	0.1 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

19. CTAB/NaCl solution

โซเดียมคลอไรด์	0.7 โมลาร์
----------------	------------

CTAB

10 กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุอุณหภูมิ 60 °C ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

20. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

เตรียมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยละลายฟีนอลในอ่างน้ำอุณหภูมิ 68 °C จากนั้นเติมผง hydroxyquinoline ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เติมสารละลาย Tris-HCl เป็น 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก เติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่า คนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำส่วนบนออก ทำขั้นนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้งด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรด-ด่างของฟีนอลมากกว่า 7.8 สุดท้ายเติมสารละลาย Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ผสม β -mercaptoethanol เข้มข้น 0.2 % ปริมาตร 0.1 เท่าของฟีนอลที่เตรียมได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

ผสมฟีนอลที่เตรียมได้กับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

21. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

22. Solution I

กลูโคส	50 มิลลิโมลาร์
Tris-HCl (pH 8.0)	25 มิลลิโมลาร์
EDTA (pH 8.0)	10 มิลลิโมลาร์

ละลายส่วนผสมทั้งหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมง
ด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

23. Solution II

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับน้ำ
ปลอดประจุปริมาตร 880 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ปริมาตร 100
ไมโครลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่สกัดพลาสมิด

24. Solution III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตตเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตรกับกรดอะ
ซีติกเข้มข้นปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ
121 °C เป็นเวลา 20 นาที

25. Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
Sucrose	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

26. บัฟเฟอร์ 50XTAE

Tris-HCl	202 กรัม
สารละลาย EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	100 มิลลิลิตร
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุ
ให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ
121 °C เป็นเวลา 20 นาที

27. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะปิดสนิทในที่มืด

28. เยื่อกรองไนโตรเซลลูโลส

ใช้ปากคีบเรียงเยื่อกรองบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่าให้ซ้อนกัน หยดน้ำกลั่นบนเยื่อกรองจนชุ่ม ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ห่อด้วยกระดาษหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรืออบที่อุณหภูมิ 50 °C 18 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวธัญนุช เกரியงไกรพิพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 22 ตุลาคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย