

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ดวงกมล ฐปมงคล (2546) ได้ศึกษาขึ้นที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยเทคนิคไฮบริโดเซชันติดตามทรานสโปซอน Tn5 ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์กลาย D2 ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 แล้วสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อหาขึ้นดีเอ็นเอของ สายพันธุ์ CU-A1ที่ให้ผลบวก จากนั้นโคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกในพลาสมิด pBluescript K/S(+/-) โดยตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ว่า pDE จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนขึ้นดีเอ็นเอแทรกสอด พบขึ้นที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนประกอบด้วย *acnAcAdAbBF* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น α -subunit β -subunit เฟอร์ริดอกซิน ไดไฮโดรไดออกลิไฮโดรจีเนส และอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ โดยพบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์อยู่เหนือ *acnAc*

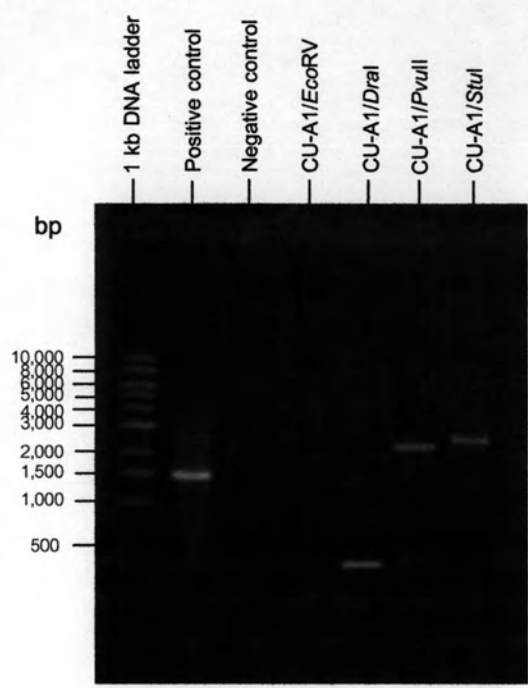
เนื่องจาก *acnF* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ และมีรายงานว่าขึ้นที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลาย PAHs มักเรียงตัวกันเป็นโอเปอรอน เช่น *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Gunsalus, 1982) *dox* จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *nah* จาก *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) *pah* จาก *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Takizawa และคณะ, 1994) *nag* จาก *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) และ *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาขึ้นที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* จาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

4.1 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

4.1.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ครั้งที่ 1

ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ถัด *acnB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ชุดโคลนนิ่ง BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA.) นำจีโนมดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* *EcoRV* *PvuII* หรือ *StuI* อย่างใดอย่างหนึ่งมาไลเกตกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.6 แล้วใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ forward primer ที่ออกแบบโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่บริเวณปลายด้าน 3' ของ *acnB* ตั้งชื่อว่า JUB2 และ reverse primer AP1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีให้ในชุดสำเร็จซึ่งสามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน ตัวควบคุมผลลบที่ใช้ Human Genomic (BD Biosciences, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII* มาไลเกตกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกันเป็นแม่แบบ และนำหลอดประจุหลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

จากการตรวจสอบผล PCR โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI* *PvuII* และ *StuI* ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วย *EcoRV* เป็นแม่แบบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการที่ถูกตัดด้วย *EcoRV* มีขนาดใหญ่กว่า 6 kb ทำให้ BD Advantage 2 polymerase ซึ่งเป็น DNA polymerase ที่มีให้ในชุดสำเร็จไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว นำผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 1 นี้เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันครั้งที่ 2

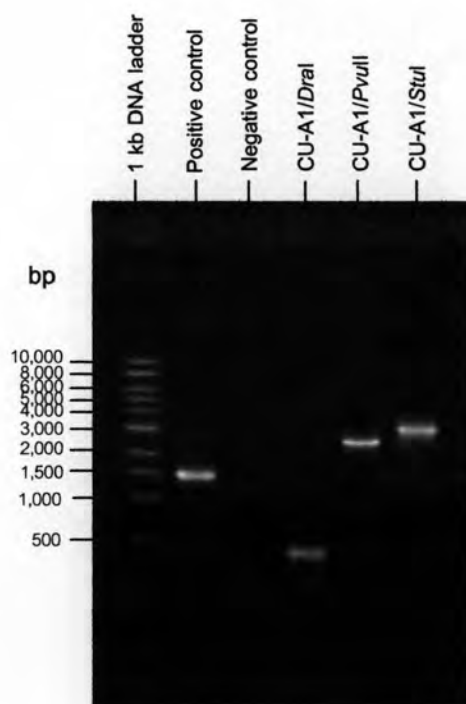


รูปที่ 4.1 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 เมื่อใช้ คู่ไพรเมอร์ JUB2 และ AP1 และจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *DraI* *EcoRV* *PvuII* หรือ *StuI* ที่ไลเกตกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อม ต่อเป็นแม่แบบ

4.1.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 2 (Nested PCR)

ทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มจำนวน (nested primer) ใช้ forward primer ที่ได้ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ถัดลงมาจาก JUB2 และใกล้บริเวณปลายด้าน 3' ของ *acnB* ตั้งชื่อว่า JUB1 และ reverse primer AP2 ที่สามารถจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อไปใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.1 เป็นแม่แบบ

ตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งแสดงให้เห็นผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DraI*, *PvuII* และ *StuI* เป็นแม่แบบ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ JUB1 และ AP2 และใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.1 เป็นแม่แบบ

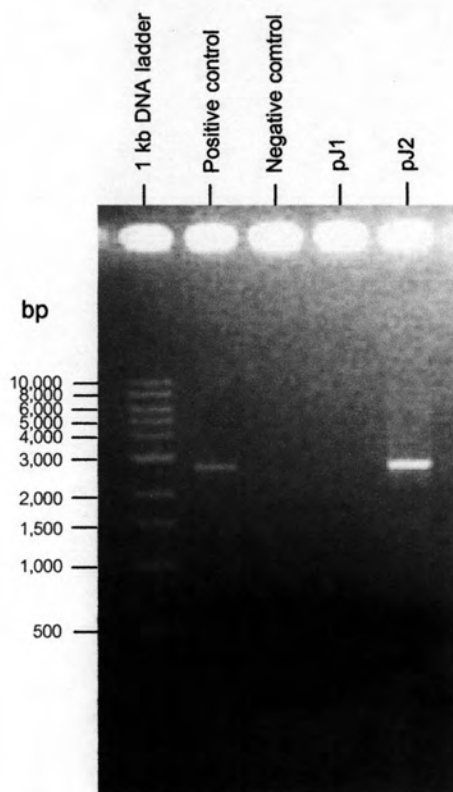


4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 2

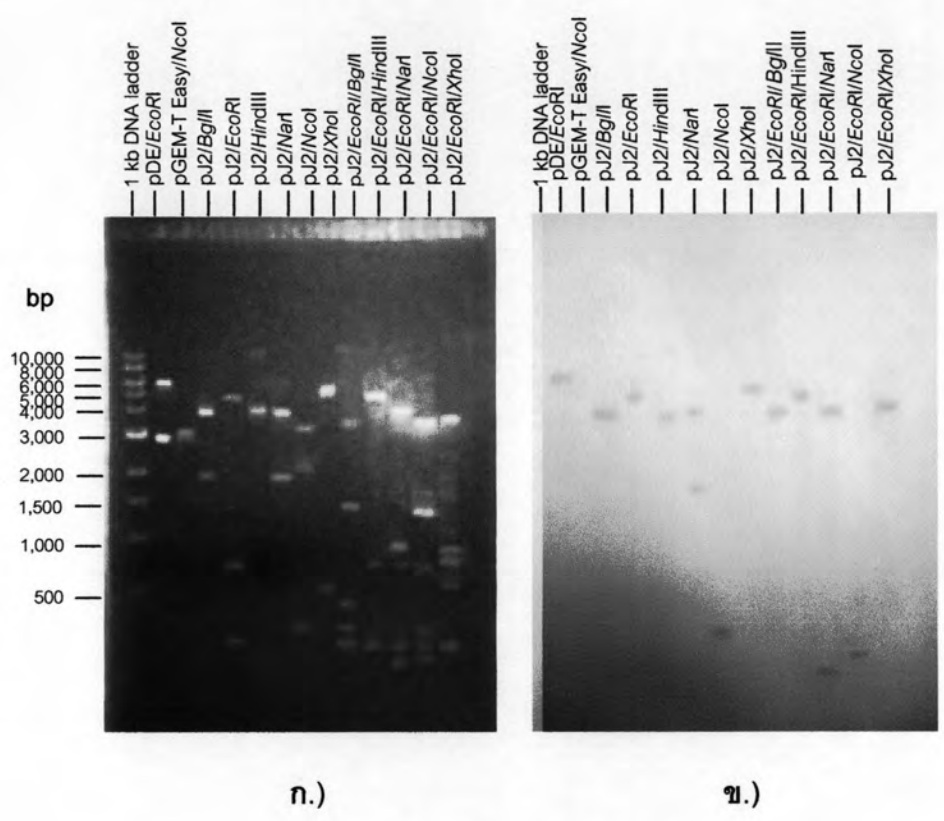
จากผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 จากข้อ 4.1.2 ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* จำนวน 3 ชิ้น คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *DraI* *PvuII* และ *StuI* มีขนาดประมาณ 400 2500 และ 2850 เบส ตามลำดับ ดังนั้นเลือกผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วย *StuI* เนื่องจากมีขนาดใหญ่ที่สุดโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega, USA) ตามวิธีในข้อ 3.7 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001)

สำหรับวิธีการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีเอ็นเอถัดลงมาจาก *acnB* ทำได้โดยวิธี Blue/White selection โดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับ พลาสมิดเวกเตอร์ ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นำโคลนมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ Forward primer คือ JUB1 และ Reverse primer คือ AP2 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 4.2 โดยตัวควบคุมผลบวกใช้แม่แบบคือ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 (*StuI*) และนำปลอดประจุปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ ผลจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แสดงในรูปที่ 4.3 จากรูปแสดงว่า ผลิตภัณฑ์ PCR จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตัวที่ 2 มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่ จึงตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pJ2

เพื่อยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดของ pJ2 มีดีเอ็นเอที่ถัดลงไปจาก *acnB* อยู่จริง จึงทำเซาท์เธิร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม J2 ที่ทำขึ้นจาก พลาสมิด pDE ที่ตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ขนาดประมาณ 486 bp มาติดฉลากผลิตภัณฑ์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.8 เพื่อระบุตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์และการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.4 จากผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า ชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดมีดีเอ็นเอที่ถัดลงไปจาก *acnB* อยู่จริง และยังสามารถทำแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pJ2 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ก.



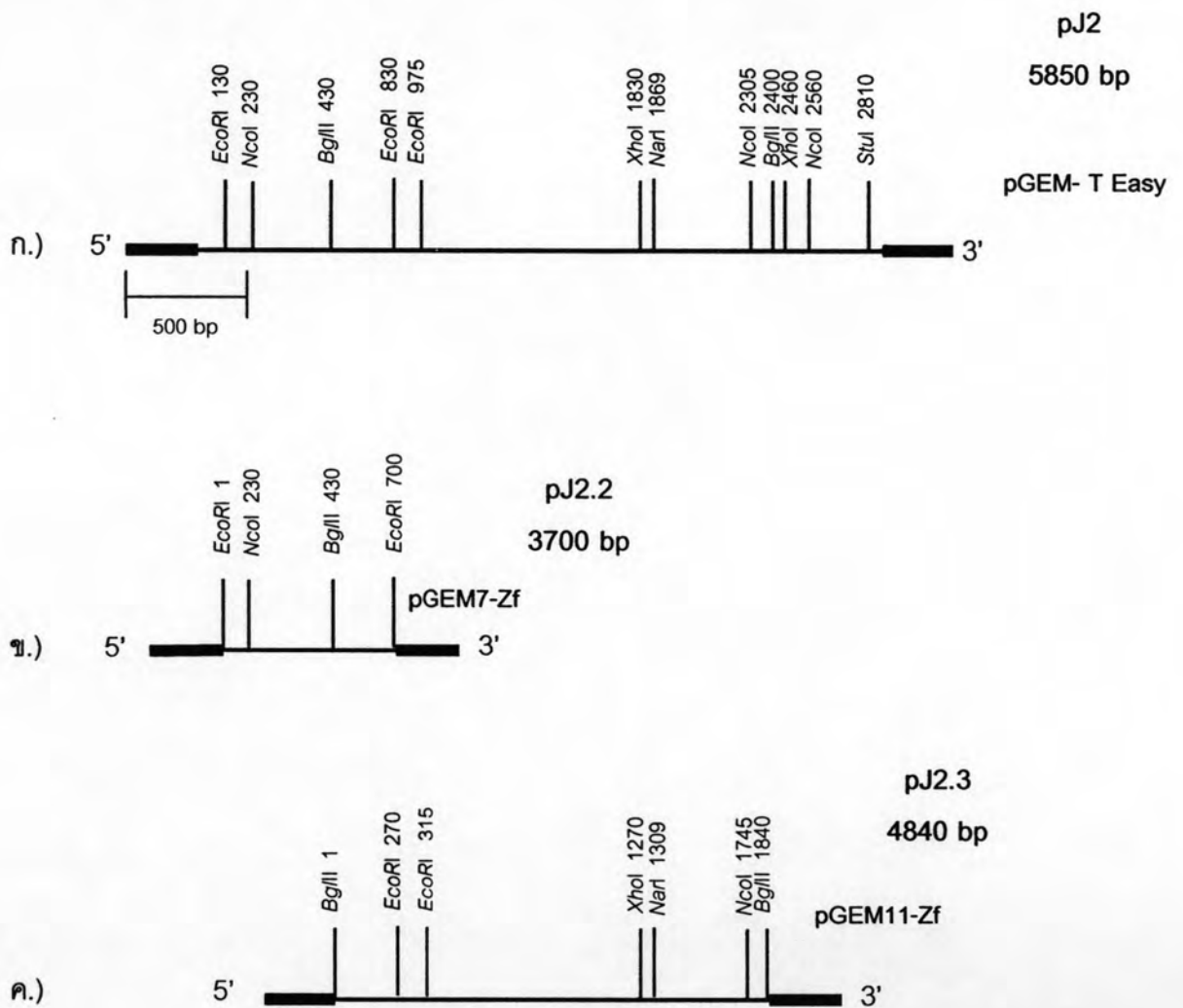
รูปที่ 4.3 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJ2 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพรเมอร์ JUB1 และ AP2



รูปที่ 4.4 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pJ2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เดี่ยว และคู่ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม J2

4.3 การทำโคลนย่อย (Subcloning) พลาสมิด pJ2

เพื่อความสะดวกในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงได้ทำโคลนย่อยของ pJ2 โดยตัดชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดด้วย *EcoRI* นำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp โคลนเข้าพลาสมิด pGEM7-Zf ตั้งชื่อสับโคลนว่า pJ2.2 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ข. และตัดชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดด้วย *BglII* นำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1840 bp โคลนเข้าพลาสมิด pGEM11-Zf ตั้งชื่อสับโคลนว่า pJ2.3 ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ค.



รูปที่ 4.5 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pJ2 ข.)-ค.)แสดงรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดที่ได้มาจากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดแทรกของพลาสมิด pJ2 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pJ2.2 (ข.) และ pJ2.3 (ค.)

4.4 หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ทราบแล้ว และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดพาหะในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของสับโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pJ2 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 2850 bp ตามที่แสดงในรูป 4.6 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank (ภาคผนวก ค) พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frames) จำนวน 3 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 130 เบส ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pJ2 ซึ่งคาบเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnF* ที่หาโดย ดวงกมล รูปมงคล (2546) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของที่ได้นี้ไปเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnF* และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครบสมบูรณ์ของ *acnF* ไปวิเคราะห์ พบว่า *acnF* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1404 เบสประมวลกรดอะมิโนทั้งสิ้น 468 ตัว ซึ่งมีความเหมือนกับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ของ *Paracoccus denitrificans* สายพันธุ์ PD1222 (Accession No. NZ_AATT01000002) เท่ากับ 72% และเหมือนกับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *phnF* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 65%
2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 390 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนในตระกูล cytochrome P450 ของ *Silicibacter pomeroyi* สายพันธุ์ DSS-3 (Accession No. CP003911) เท่ากับ 34%
3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 314 ตัว พบว่ากรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta isomerase ของ *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 (Accession No. NC008781) เท่ากับ 57%

พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งโปรโมเตอร์หน้า ORF2 และตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้โดยดวงกมล ฐปมงคล (2546) และในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปสร้างแผนที่ยีนเรสทริกชันเอนไซม์โดยรวมดังแสดงในรูปที่ 4.7

2161 GATCATATCCAAGCCATTGGTCGCAAGGTCCTGTTTCCACTGAATCCAAAGGTATCAGAA
 169 D H I Q A I G R K V L F P L N P K V S E

2221 ACAGCTATTGCGGAAGGGCACGACCCGTCACCGAATTCAAGAACTACCTGCGCCCCGTTT
 189 T A I A E G H D A V T E F K N Y L R P F

2281 TTGGACGAGATCAAGTCGCGGCCGACGATCGACCCGACCGAGAGCATCCTCTGCGCGATG
 209 L D E I K S R P T I D P T E S I L C A M

2341 GCCGCAGCCCAGCGTGAGGGTGTGAGGTCAGCGACGACGAGATCCTGCACATGTGTATC
 229 A A A Q R E G V E V S D D E I L H M C I

2401 GTGACGCTGAACGGCGGCCATGAGACCACGACGAACCTCATCTCGCAGTCGATCCACTTT
 249 V T L N G G H E T T T N L I S Q S I H F

2461 CTGATGGACGATACGGAAAGCCTGTGCAACTGCGGGGCGGCGAGGTACCGATCGCGCCC
 269 L M D D T E S L S Q L R G G E V P I A P

2521 GCGCTCGGGGAGCTGATCCGTTTCATCACGCCCTTGCAGCTTCAGGGTCGGCGCACGACG
 289 A L G E L I R F I T P L Q L Q G R R T T

2581 CAGGAGTGGTTCCTTGAAAGCGGCAACGGGACCCTCCCCGCCGAACCGAGGTGCTCCTG
 309 Q E V V L E S G N G T L P A G T E V V L

2641 TGCCAGGCTTCGGCCAACCGAGACGAACGGATCTTCGGCGACCCCCGACAAGCTGAACCTC
 329 C Q A S A N R D E R I F G D P D K L N L

2701 TCCCGCCGGCCGAACAACCATGTGCGCTTCGGATGCCGGAATCCACGGTCTGTCTGGGGC
 349 S R R P N N H V G F G C R N P R S V W G
NADH binding

2761 GGCCGCTGGCGCGGCTCGAAGCCTCGATCGCAATTCCTACTGTGCTCCGGAACTGCCGA
 369 G R W R G S K P R S Q F P L C S G N C R

2821 CGCTGA^{*}CGCGGAACGGCAAGGTGCGCTTCCAGCACAACACGCGGTTCCGGGGTTTGAAC
 389 R *

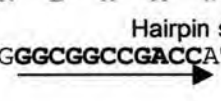

2881 TGTTTCCTGTAAAGCTCGCCTAAGCCGGCGGGCAAGCGGACGGGAAAGGATGAGGGGTC
 1 RBS ORF3
M R G P

2941 CGCCATGCCGATGTGGCGGCCGAGCATGAGAAGCCATCGCAAGTGATGTTGGGATCAC
 5 A M P M W R P E H E K P S Q V M L G S R

3001 GGATCGGGAAAACCAGGATGAAGATTTGCCGTTTTAACAAGAGCCGCGTCGGGCTTGTGCG
 25 I G K T R M K I C R F N K S R V G L V E

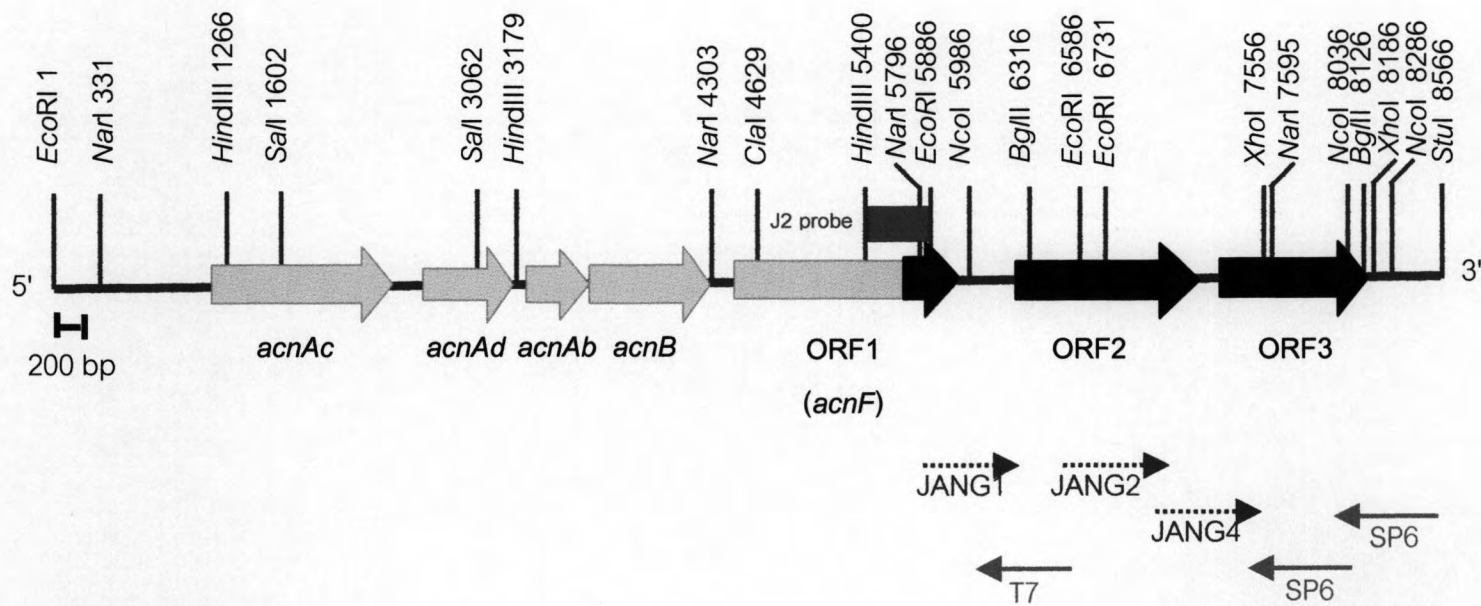
3061 AAGGAGACGAGGTCATTGATGTGACCGACGCGCTGGATCTGCTGCCGCAAGTGCCTACC
 45 G D E V I D V T D A L D L L P Q V R Y P

3121 CGCTGCCGCGGCACGACCCGATGATTGCGCTTCTCGACCGGCTGATGCCCGCATTGCGG
 65 L P R H D P M I A L L D R L M P A F A A

3181 CTGCGTCGCGCAACGGTGAGCGCAGGAAGATCACTGAAGTCTCCCTCGAGTCTCCGGTGG
 85 A S R N G E R R K I T E V S L E S P V A
 3241 CGAACCCCGGCAAGCTGGTGGCGGCGCCGGTCAATTACGTCAAGCACCTAGAGGAAGCGC
 105 N P G K L V A A P V N Y V K H L E E A R
 3301 GCGAACAGAAGGAACCTCACCAGAACAATGCCGCCAGATCCGCGTCATTCACGAGACGG
 125 E Q K E L H Q N N A A Q I R V I H E T G
 3361 GACTTTTCTCAAGGCCACGAGCAGCCTGATCGGGCCTTCGGACCCTGTAACGCTGCGCT
 145 L F L K A T S S L I G P S D P V T L R F
 3421 TCCCCGATCGTCGCTCTGACCACGAGATCGAACTTGCGGTGATCATTGGCCGCGGGGCTG
 165 P D R R S D H E I E L A V I I G R R A D
 3481 ATCGCGTGCGGCGAAAGGACGCGCTTGAACATGTCGCGGGCTACGCGATCGGCCTGGATA
 185 R V A A K D A L E H V A G Y A I G L D M
 3541 TGACGGTTCGGGGGGCCGAGGAGCGCAGCATGCGCAAGTCGGTTGACAGCTATTCGGTGT
 205 T V R G A E E R S M R K S V D S Y S V L
 3601 TGGGCCCATGGCTGGTTACTGCTGACGAGATCCCCGATCCGTCCCAGCTGGACTTCGAAC
 225 G P W L V T A D E I P D P S Q L D F E L
 3661 TCCAGGTCGATGGCGTCACCCGGCAGAAGGCCAATACGCGAGATCTGGTGCTGAGCGTGC
 245 Q V D G V T R Q K A N T R D L V L S V P
 3721 CGGAGCTGATTGAGATGGCCAGCCGTTTCTACACGCTCGAGGTCGGCGATGTCATCTTCA
 265 E L I E M A S R F Y T L E V G D V I F T
 3781 CCGGCACGCCGAGGGTGTGCGGCAAGTCCTGCCAGGAAACAGGCTTACGCTTGGATAG
 285 G T P E G V G Q V L P G N R L H A W I D
 3841 ATAAGATCGGTTCCATGGAGGTTTCAAGTCAACTGA^{Hairpin structure}CTTTTTGGCGGCCGACCATAGACC
 305 K I G S M E V Q I N * 
 3901 TGCGGTGCGGCCCGACCTCCTGACAGCAATTC AATCGCTTTCAGGACCAAGCGTTTCA

 3961 GGGATAGATGGACGCGTTTGTGTTGCCGACTTTTGAACATAATTGGCCAACCTGCATCACA
 4021 AACTGCTGTTTTTCTTGCGGATCGAGCTGTTGCAAAATCAGTGACCGTAACCGTTCGATT
 4081 CGTCCTCACCTTTGGTTACCAAGG

รูปที่ 4.6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอ
 ไทด์สอดแทรกในพลาสมิด pJ2 ขนาด 2850 bp ลูกศรแสดงทิศทาง การถอดรหัส ตัว
 อักษรสีชมพูแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันติเอ็นเอสสอดแทรกในพลาสมิด pDE (ดวง

กมล ฐปมงคล, 2546) ตัวอักษรสีดำแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pJ2 เครื่องหมาย * แสดงรหัสหยุด (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาสีแดงแสดงบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาสีดำแสดงบริเวณที่คาดว่าเป็น ribosome binding site (RBS) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาสีดำที่มีลูกศรแสดงบริเวณที่คาดว่าเป็น hairpin structure กรอบอ่านรหัสที่ต่างกันแสดงด้วยตัวอักษรสีต่างกัน (ตัวอักษรสีฟ้า สีส้ม และสีเขียว) กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม



รูปที่ 4.7 แผนที่เรสทริกชันของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง กล่องสีดำคือชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pJ2 กล่องสีเทาคือส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานโดย(ดวงกมล ฐปมงคล, 2546) กล่องสีชมพูคือดีเอ็นเอติดตาม J2 ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต่างๆ ตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย ...► เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ ◄ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer