

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธาลีนได้มีการศึกษาเป็นเวลานาน แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานยืนยันที่เกี่ยวข้องการย่อยสลายอะซีแนฟธาลีนอย่างสมบูรณ์ในจุลินทรีย์ รวมทั้งใน *Rhizobium* sp.

ดวงกมล ฐปมงคล (2546) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธาลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบ *acnAc acnAd acnAb* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ α -subunit β -subunit เพอร์ริดอกซิน ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดเป็นส่วนประกอบของไดออกซิจีเนส และ *acnB* ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไดไฮโดรไดออกซิไฮโดรจีเนส นอกจากนี้ยังพบ *acnF* ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ซึ่ง *acnF* ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ครบสมบูรณ์

เนื่องจากมีรายงานกล่าวว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มักเรียงตัวเป็นโอเปอรอน เช่น *nah* จาก *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนฟธาลีน หรือ *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนฟธาลีนและพีแนนทริน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น จึงคาดว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธาลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อาจเรียงตัวเป็นโอเปอรอนเช่นเดียวกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences, USA)

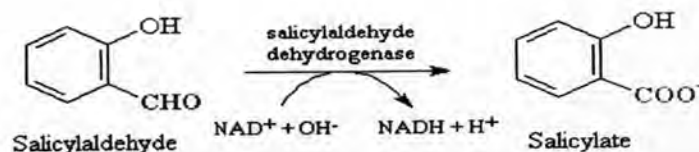
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* เริ่มจากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มาตัดด้วยเอนไซม์ *DraI EcoRV PvuII* หรือ *StuI* อย่างใดอย่างหนึ่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอเป็นปลายทู่ (blunt end) จากนั้นนำมาไลเกตกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อนี้ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอมีปลาย 5' ยื่นออกมา นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดย forward primer ออกแบบจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 3' ของ *acnB* ส่วน reverse primer ใช้จาก BD GenomeWalker™ Universal Kit ที่มีความจำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อนี้ ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 2 ครั้งโดยใช้ไพรเมอร์คู่ไกลคือ JUB2 และ AP1 และคู่ใกล้คือ JUB1 และ AP2 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.85 kb ที่ตัดด้วย *StuI* โคลนเข้าใน pGEM-T Easy vector ตั้งชื่อรีคอม

บีแนนท์พลาสมิดว่า pJ2 หารลำดับ นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอสอดแทรกโดยใช้วิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิด

จากการหารลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าส่วนสอดแทรกของพลาสมิด pJ2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 2850 bp นำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่าบริเวณด้าน 5' ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจำนวน 130 นิวคลีโอไทด์ คาบเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acnF* ที่รายงานโดย ดวงกมล ฐปมงคล (2546) ดังนั้นจึงเชื่อว่าดีเอ็นเอชิ้นแทรกสอดดังกล่าว น่าจะเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ต่อจากยีน *acnF* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้ในงานวิจัยนี้ เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานมาก่อนหน้าโดย ดวงกมล ฐปมงคล (2546) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnF* ที่สมบูรณ์โดยพบรหัสหยุด (stop codon) ที่ปลาย 3' ของยีน *acnF*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *acnF* ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 พบว่า *acnF* ประมวลรหัสโปรตีนที่มีความเหมือนกับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดยยีน *putA* ของ *Paracoccus denitrificans* สายพันธุ์ PD1222 เท่ากับ 72% (Accession No. NZ_AATT01000002) อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เติมออกซิเจนหนึ่งอะตอมให้กับซาลิไซลัลดีไฮด์เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดซาลิไซลิก ดังแสดงในรูปที่ 5.1 เช่น ในวิถีการย่อยสลายเนพธาลินของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) และทำงานลักษณะเดียวกันในการย่อยสลายพีแนนทรินของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เอนไซม์นี้ต้องการ NAD^+ จากลำดับกรดอะมิโนของ *acnF* พบบริเวณอนุรักษ์ FTGSTNVG ซึ่งคาดว่าเป็นบริเวณที่จับ NAD^+ ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งตรงกับบริเวณอนุรักษ์ (FY)(I/T)G(S/E)(T/P)XX(G/F) ที่รายงานโดย Horn และคณะ (1991) บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวอยู่ที่กรดอะมิโน 226 ถึง 233 บริเวณที่จับกับ NAD^+ ยังได้มีรายงานในเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ซึ่งบริเวณอนุรักษ์คือ FTGSTRVG (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของบริเวณเร่ง (active site) ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 249-256 ของ *acnF* ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน LELGDKSP บริเวณดังกล่าวยังพบในอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น LELGGKSP (Bosch และคณะ, 1999)



รูปที่ 5.1 การเร่งปฏิกิริยาของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในการย่อยสลายที่แนนทรินโดยแบคทีเรีย (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

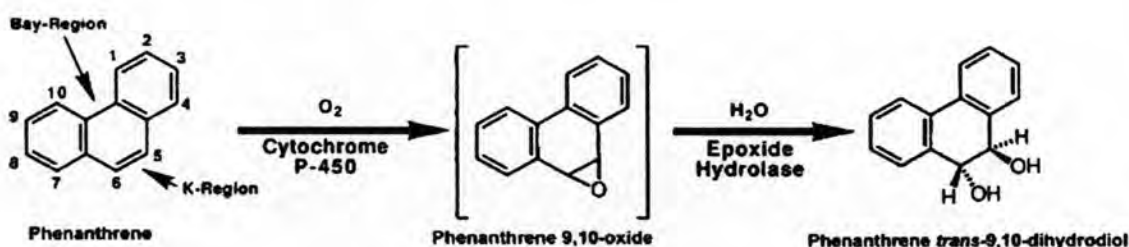
ถัดลงมาจาก *acnF* พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโครงสร้าง hairpin โดยโครงสร้าง hairpin เกิดจากการพับตัวของดีเอ็นเอเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอ (secondary structure) เป็นรูปเข็มปักผม (hairpin) ลักษณะที่สำคัญของโครงสร้าง hairpin คือ มีปริมาณ G และ C มาก และลำดับนิวคลีโอไทด์มีลักษณะเป็น inverted repeat เนื่องจากโครงสร้างดังกล่าวมีเบส G และ C ที่เข้าคู่กันอยู่บริเวณนี้มาก จึงทำให้ RNA polymerase ไม่สามารถแยกสายดีเอ็นเอออกเพื่อสังเคราะห์ mRNA ต่อไปได้ ทำให้ยุติการสร้างสาย mRNA (Lewin, 1985) โครงสร้าง hairpin นี้สามารถพบได้ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกเช่นกัน เช่น หลังยีน *hpaA* ซึ่งเป็น regulatory protein และหลังโอเปอรอน *hpaBC* ซึ่งประมวลรหัสเอ็นไซม์ไฮดรอกซีเลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย 4-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตต ที่รายงานโดย Prieto และคณะ (1996) นอกจากนี้พบโครงสร้าง hairpin หลังยีนที่ประมวลรหัสเอ็นไซม์ benzoate-CoA ligase, benzoyl-CoA oxygenase component B, benzoyl-CoA oxygenase component A และ β -ketoacyl-CoA thiolase ในวิถีการย่อยสลายเบนโซเอทของ *Azoarcus evansii* ที่รายงานโดย Gescher และคณะ (2002)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแทรกสอด pJ2 ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 ยังพบกรอบอ่านรหัสเปิดอีก 2 แห่ง คือ ORF2 และ ORF3 ซึ่งทั้งสองกรอบนี้อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกับ *acnF* และพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site) หรือ Shine-Dalgarno sequence หน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยบริเวณตำแหน่งเกาะของไรโบโซมมักจะประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีน 3-10 เบส อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นของกรอบอ่านรหัสเปิดประมาณ 10 เบส (Shine และ Dalgarno, 1974)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) มีกรดอะมิโนตัว 390 ตัว มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในตระกูลไซโทโครม P450 (cytochrome P450) ซึ่งประมวลรหัสโดยยีน *cypX* ใน *Silicibacter pomeroyi* สายพันธุ์ DSS-3 เท่ากับ 34% (Accession No. CP003911) ไซโทโครม P450 เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มโมโนออกซิจีเนสซึ่งมีฮีมเป็นองค์ประกอบ (Makovec และ Breskwar,

2000) พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Graham-Lorence และ Peterson, 1996) มีบทบาทในการสังเคราะห์สารต่างๆ เช่น สเตอรอยด์ กรดไขมัน พิโรโมน สารปฏิชีวนะ และการทำลายสารพิษรวมถึงสารประกอบ PAHs (Nelson และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในราพวกไวท์รอต เช่น *Trametes trogii* จะใช้ เอนไซม์ cytochrome P450 ร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (Levin และคณะ, 2003)

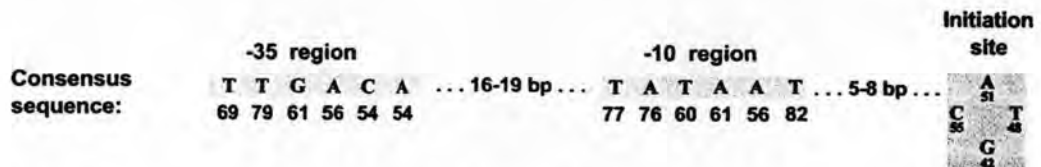
ในการทำปฏิกิริยาไซโทโครม P450 จะใช้ฮีมเพื่อออกซิไดส์สับสเตรท โดยใช้โปรตอนจาก NADH หรือ NADPH เพื่อปล่อยโมเลกุลของออกซิเจน 1 อะตอมให้สับสเตรท (Makovec และ Breskwar, 2000) บริเวณที่ใช้จับกับบริเวณ NADH อยู่บริเวณปลายด้าน C มีลำดับกรดอะมิโนเป็น GXGXXP (Correll, 1992) ซึ่งบริเวณอนุรักษ์นี้สามารถพบได้ใน *acnG* เช่นกัน ที่ลำดับกรดอะมิโน 357 ถึง 363 โดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ GFGCRNP ในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในสถานะที่มีออกซิเจน ไซโทโครม P450 ทำหน้าที่เติมออกซิเจน 1 อะตอมเข้าไปยังวงอะโรมาติกได้เป็นแอรินออกไซด์ (arene oxide) และจะถูกออกซิไดส์ต่อโดยอีพอกไซด์ไฮโดรเลส (epoxide hydrolase) ได้เป็นไดไฮโดรไดออล หรือเกิดการจัดเรียงตัวใหม่โดยไม่อาศัยเอนไซม์ได้เป็นฟีนอล (Cerniglia และคณะ, 1985) ในรา *Pleurotus ostreatus* ไซโทโครม P450 เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 1 อะตอมให้กับโมเลกุลของฟีนแอนทรีนจนได้ฟีนแอนทรีน 9,10-ออกไซด์ (Bezalel และคณะ, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 การเร่งปฏิกิริยาของไซโทโครม P450 ในการย่อยสลายฟีนแอนทรีน จาก *Pleurotus ostreatus* (Bezalel และคณะ, 1997)

นอกจากไซโทโครม P450 จะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในวิถีบน (upper pathway) ยังมีรายงานการของ Mingot และคณะ (1999) ที่กล่าวถึงการไซโทโครม P450 ในวิถีล่าง (lower pathway) โดย *Aspergillus nidulans* มียีน *phacA* ที่ประมวลรหัสไซโทโครม P450 ที่ใช้ในการย่อยสลายฟีนลอะซีเตต

เหนือขึ้นไปจากยีน *acnG* พบบริเวณคาดว่าจะเป็โปรโมเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นบริเวณที่ RNA polymerase มาจับเพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง -10 (Pribnow box) คือ CATCAT และที่ตำแหน่ง -35 คือ TTGAAC ซึ่งคล้ายกับตำแหน่ง -10 และ -35 ที่รายงานโดย Lissner และ Margalite (1993)



รูปที่ 5.3 Consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Lissner และ Margalit, 1993) ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดงเปอร์เซ็นต์การพบเบสชนิดนี้ที่ตำแหน่งนั้น

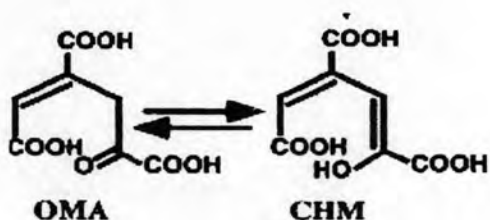
กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) มีกรดอะมิโนตัว 314 ตัว มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนเหมือน 5-คาร์บอกซีเมธิล-2-ไฮดรอกซีมิวโคเนตเดลตาไอโซเมอเรส (5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta isomerase) ซึ่งประมวลรหัสโดยยีน *MhpD* ใน *Polaromonas naphthalenivoran* สายพันธุ์ CJ2 (Accession No. NC008781) เท่ากับ 57%

5-คาร์บอกซีเมธิล-2-ไฮดรอกซีมิวโคเนตเดลตาไอโซเมอเรส เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเบนโซเอท (benzoate) (Masai และคณะ, 2000) และกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของไทโรซีน (tyrosine) (Sparmins และ Chapman, 1996)

สำหรับกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เบนโซเอทเป็นสารมัธยันตร์ที่พบได้ในหลายวิธี เช่น วิธีการย่อยสลายแนพธาลีน พีแนนทริน และแอนทราซีน โดย *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (Kim และ Zylstra, 1995; Zylstra และ Kim, 1997) และวิธีการย่อยสลายแนพธาลีน โดย *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ Humburge 2 (Annweiler และคณะ, 2000) เป็นต้น ซึ่งเบนโซเอทอาจถูกย่อยสลายผ่านทางคะทีคอล (1,2-dihydroxybenzoate) และโปรโตคาทีคูเอท (3,4-dihydroxybenzoate) (Harwood และ Parales, 1996)

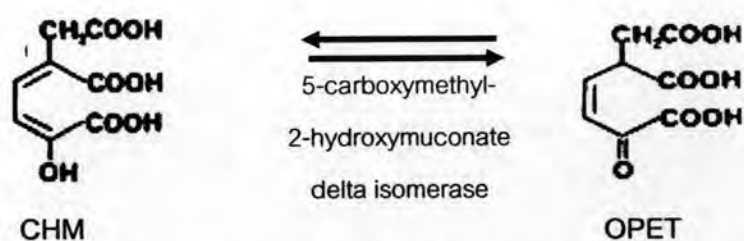
มีรายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PRS200 สามารถย่อยสลายเบนโซเอทเป็นคะทีคอล จากนั้นคะทีคอลจะถูกย่อยสลายผ่านวิถี β -คีโตแอติเพอจนได้เป็นซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) และอะซีทิลโคเอ (acetyl CoA) (Harwood และคณะ, 1994) หรือเบนโซเอทอาจจะถูกย่อยสลายเป็นโปรโตคาทีคูเอท (protocatechuate) โดย Masai และคณะ (2000)

รายงานวิธีการย่อยสลายโปรโตคาคีคูเอท ซึ่งเป็นสารมัธยันตรที่ไดจากการย่อยสลายลิกนินใน *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ SYK-6 โดยโปรโตคาคีคูเอทจะถูกย่อยสลายต่อเป็น 4-carboxy-2-hydroxymuconate semialdehyde (CHMS) 2-pyrone-4,6-dicarboxylate (PDC) และ 4-carboxy-2-hydroxymuconate (CHM) ตามลำดับ โดยไอโซเมอเรส จะทำหน้าที่เปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง 4-carboxy-2-hydroxymuconate (CHM) และ 4-oxalomesaconate (OMA) ดังแสดงในรูปที่ 5.4 จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อจนได้ออกซาโลอะซีเตต (oxaloacetate) และเข้าสู่ TCA cycle



รูปที่ 5.4 การเร่งปฏิกิริยาของไอโซเมอเรส ในการเปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง 4-carboxy-2-hydroxymuconate (CHM) และ 4-oxalomesaconate (OMA) จาก *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ SYK-6 (Masai และคณะ, 2000)

ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไทโรซีนจะเกี่ยวข้องกับกรด 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะซีติก (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) หรือกรดโฮโมโปรโตคาคีคูอิก (homoprotocatechuic acid) ซึ่งเป็นสับสเตรทในการแตกวงเบนซีน โดย *Micrococcus* sp. มีเอนไซม์ที่ใช่อย่อยสลายกรดโฮโมโปรโตคาคีคูอิก โดย 5-คาร์บอกซีเมธิล-2-ไฮดรอกซีมิวโคนเต เดลตา ไอโซเมอเรส ทำหน้าที่เปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate (CHM) และ 5-carboxy-2-oxohept-3-enedioate (OPET) ดังแสดงในรูปที่ 5.5 จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อได้ ซัคซิเนต (succinate) หรือไพรูเวท (pyruvate) และเข้าสู่ TCA cycle (Sparmins และ Chapman, 1996)



รูปที่ 5.5 การเร่งปฏิกิริยาของ 5-คาร์บอกซีเมทิล-2-ไฮดรอกซีมิวโคนेट เดลตา ไอโซเมอเรส ในการเปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate (CHM) และ 5-carboxy-2-oxohept-3-enedioate (OPET) (Sparnins และ Chapman, 1996)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็โครงสร้าง hairpin อยู่ถัดลงมาจาก ORF3 และระหว่าง ORF2 และ ORF3 ไม่พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็โปรโมเตอร์ จึงเป็นไปได้ว่า ORF2 และ ORF3 อาจถอดรหัสเป็นสาย mRNA เดียวกัน จากผลการวิเคราะห์ลำดับข้างต้น พบว่าหลังจาก ยีน *acnF* พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็โครงสร้าง hairpin และระหว่างยีน *acnAc acnAd acnAb acnB* และ *acnF* ไม่พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็โปรโมเตอร์ (ดวงกมล รูปมงคล, 2546) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ยีน *acnAc acnAd acnAb acnB* และ *acnF* มีการเรียงตัวในลักษณะเป็นโอเปอรอน และจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกัน และยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธินอาจอยู่ในบริเวณอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Romine และคณะ (1999) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอนพธาซินใน *Novosphinobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 โดยพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอนพธาซิน ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* กระจายตัวอยู่ห่างกัน และถูกค้นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น Pinyakong และคณะ (2003) รายงานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวงอะโรมาติก จาก *Sphingomonas* sp. มีการเรียงตัวที่ซับซ้อนคือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวงอะโรมาติกใน 1 วิถี จะอยู่ไม่เป็นกลุ่ม แต่จะอยู่กระจัดกระจายในหลายๆโอเปอรอน Kim และ Zylstra (1995) รายงานว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายวงอะโรมาติกแบบ 1 วง และหลายวง จาก *Sphingomonas yanoikuya* B1 ไม่เรียงตัวแยกกันเป็นโอเปอรอน แต่มีการเรียงตัวในโอเปอรอนเดียวกัน

การทำ northern hybridization จะสามารถช่วยยืนยันได้ว่ายีน *acnAcAdAbBF* ถอดรหัสเป็นสาย mRNA เดียวกัน ซึ่งเมื่อไฮบริดซ์กับตัวติดตามที่จำเพาะต่อยีนใดๆใน *acnAcAdAbBF* ควรจะเกิดสัญญาณที่ขึ้น mRNA ขนาดเท่ากับ 5.9 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับควมยาวของนิวคลีโอไทด์ *acnAcAdAbBF*

การศึกษาเบื้องต้นโดย สิริภัทร พฤษชัย (2548) ได้ติดตามการแสดงออกของยีน ประมวลรหัส α - subunit (*acnAc*) ของไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (RT-PCR) โดยจากการทดลองพบว่า *acnAc* มีการแสดงออกใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดคาร์บอน CFMM ที่มีอะซีแนพรีลิน และพบการถอดรหัสร่วมกัน ของยีนประมวลรหัส α -subunit (*acnAc*) β -subunit (*acnAd*) เฟอร์ริดอกซิน (*acnAb*) ซึ่งเป็น ส่วนประกอบของไดออกซิจีเนส และยีนประมวลรหัสไดไฮโดรไดออกตีไฮโดรจีเนส (*acnB*) เมื่อ เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพรีลิน หรือกรด 1-แนพโทอิก ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า *acnAc* ถูก ชักนำให้มีการแสดงออกได้โดยอะซีแนพรีลิน และ *acnAcAdAbB* น่าจะเรียงตัวเป็นโอเปอรอน

อย่างไรก็ตามในการที่จะสรุปแน่นอนได้ว่ายีน *acnF* ORF2 และ ORF3 เกี่ยวข้องกับการ ย่อยสลายอะซีแนพรีลินใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หรือไม่ จำเป็นต้องทำการทดลอง เพิ่มเติม เช่น การศึกษาการทำหน้าที่ของยีน ดังรายงานของ Kouzuma และคณะ (2006) ที่ ศึกษาหน้าที่ของยีน *arhA3* และ *arhA4* ที่ประมวลรหัสเป็นเฟอร์ริดอกซิน และเฟอร์ริดอกซินรีดัก เทส โดยนำยีนที่ต้องการศึกษาใส่เข้าไปใน *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4-PCM1 ที่มีความ บกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน จากการทดลองพบว่า *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4- PCM1 ที่ได้รับยีน *arhA3* และ *arhA4* สามารถเปลี่ยน indole ไปเป็น indigo ได้ดี จึงกล่าวได้ว่า *arhA3* และ *arhA4* ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส มีหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อใช้ เติมหอกซิเจนสองอะตอมเข้ายังวงอะโรมาติก