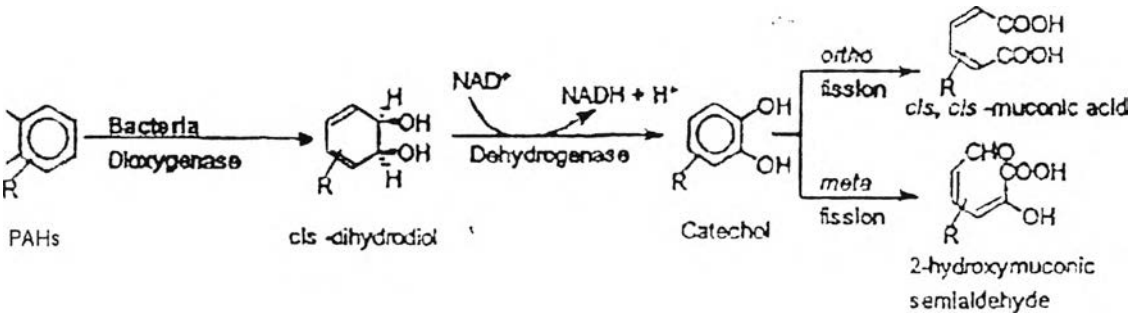
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และไร้อากาศ (anaerobic) แต่เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศเกิดขึ้นได้ช้า (Harayama, 1997) รายงานส่วนใหญ่จึงมุ่งศึกษากระบวนการย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศ

การย่อยสลาย PAHs ในแบคทีเรียเริ่มจากการนำออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติก ได้เป็น *ซิส*-ไดไฮโดรไดออล ซึ่งเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multi-component dioxygenase) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดย ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล แล้วสับสเตรทที่คล้ายกับคะทีคอลก็จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบ *ออโธ* (intradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 อะตอมอยู่ติดกันได้เป็น กรด *ซิส, ซิส*-มิวโคนิก หรืออีกวิถีหนึ่งผ่านทางการแตกวงเบนซีนแบบ *เมตา* (extradiol pathway) ที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมคาร์บอนที่มีกลุ่มไฮดรอกซิลกับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดมา (Cerniglia, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



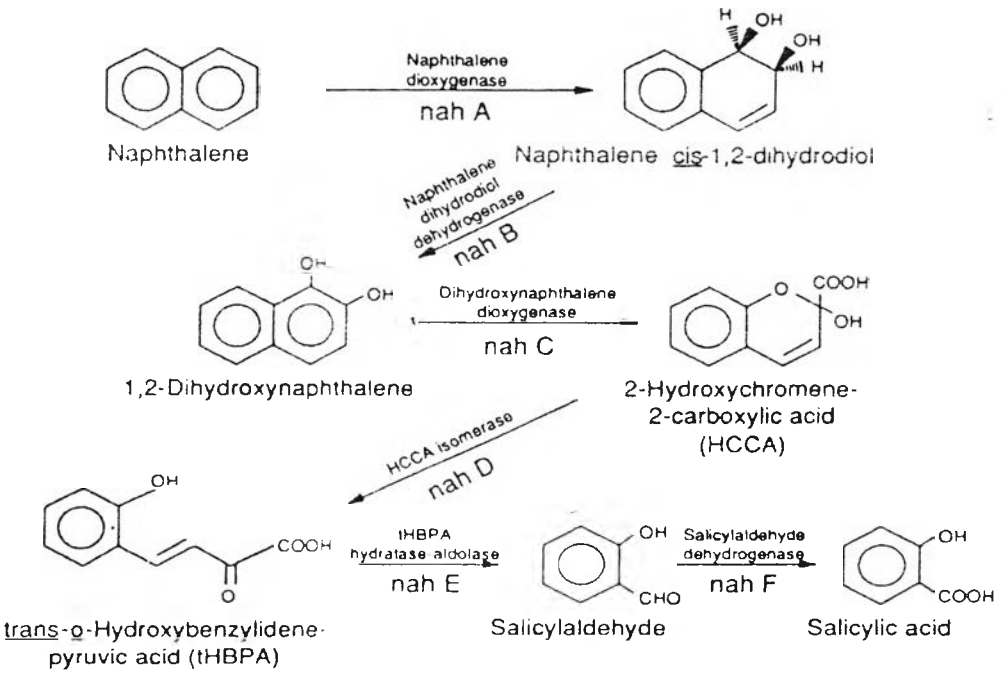
รูปที่ 2.1 วิถีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)

งานวิจัยในปัจจุบันได้มุ่งศึกษาการย่อยสลาย PAHs ในระดับพันธุศาสตร์เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสาร PAHs รวมทั้งสามารถนำข้อมูลในระดับพันธุศาสตร์มาช่วยในการทำนายวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ

ห้องสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.1 วิถีการย่อยสลายแนพธาลีน

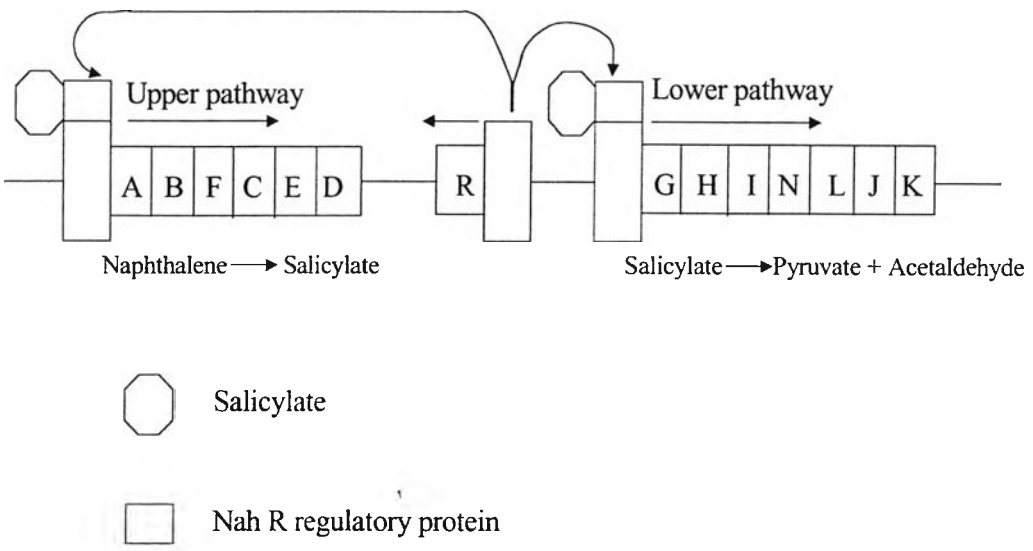
แนพธาลีนเป็นสาร PAH ชนิดแรกที่ใช้เป็นตัวแทนหรือต้นแบบในการศึกษาวิถีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายสาร PAHs ชนิดอื่น เนื่องจากเหตุผลที่แนพธาลีนเป็นสารที่มีโครงสร้างง่าย กล่าวคือประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง มาประกอบกัน จึงสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ง่ายกว่าสาร PAHs ชนิดอื่นที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ไพรีน หรือ ฟลูออรีน เป็นต้น ดังนั้นรายงานที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเน้นที่การศึกษาแง่มุมต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนเป็นหลัก จากรายงานเริ่มแรกของ Yen และ Serdar (1988) ได้รายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีน จึงทำให้มีศึกษาวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายโดยเชื้อ *Pseudomonas putida* (Davies และ Evans, 1964; Eaton และ Chapman, 1992) เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์อื่นอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาพบว่าประกอบด้วยสองวิถีการย่อยสลาย คือ upper pathway ทำหน้าที่เปลี่ยนแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิก และ lower pathway ที่ย่อยสลายกรดซาลิไซลิกจนกระทั่งได้สารมัธยันต์ที่พร้อมเข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) ได้แก่ ไพรูเวต และอะซีทัลดีไฮด์ ซึ่งในแต่ละวิถีการย่อยสลายต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิดที่ประมวลรหัสมาจากยีนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วน upper pathway และยีนที่เกี่ยวข้อง (Eaton และ Chapman, 1992)

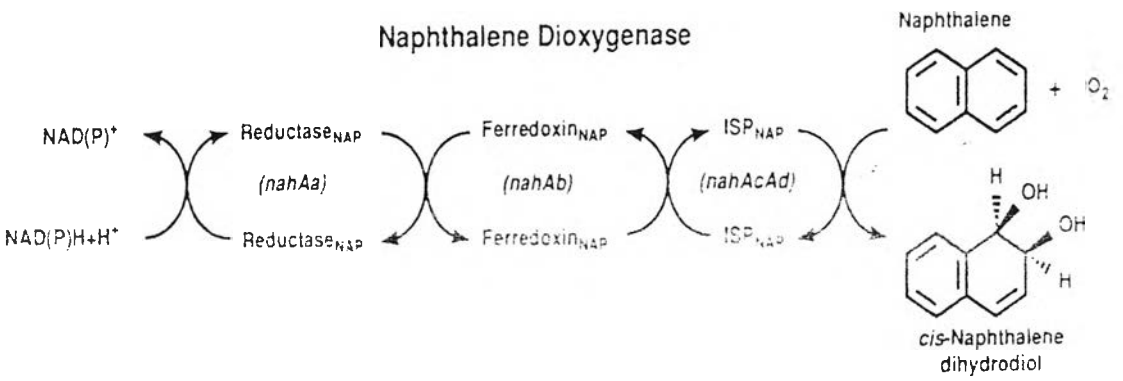
จากรายงานข้างต้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีนและยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนเพิ่มมากขึ้น

Yen และ Gunsalus (1982) ได้รายงานว่าพลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มีการจัดเรียงตัวของยีนเป็น 2 โอเปอรอน (operon) คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วยยีน *nahABFCED* ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน upper pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยแนพธาลีนไปเป็นซาลิไซเลต และ โอเปอรอน *sal* ประกอบด้วยยีน *nahGHINLJK* ที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในส่วน lower pathway โดยทำหน้าที่ในการย่อยซาลิไซเลตผ่านทางคะทีคอลและย่อยสลายต่อจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวตและอะซีทัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยมีระบบยีนควบคุม (regulatory genes) คือ *nahR* ที่ควบคุมการทำงานของ 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ได้แก่ ซาลิไซเลต และผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* (Yen และ Gunsalus, 1982; Schell, 1983)



รูปที่ 2.3 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

Ensley และคณะ (1982) และ Ensley และ Gibson (1983) ได้รายงานถึงเอนไซม์ที่สำคัญในขั้นแรกของปฏิกิริยาการย่อยสลายแนพธาลีนรวมทั้ง PAHs ชนิดอื่นๆ คือ เอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนส (dioxygenase) เป็นเอนไซม์ต้นแบบของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ประกอบด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ได้แก่ $Reductase_{NAP}$ $Ferredoxin_{NAP}$ และ Terminal oxidase หรือ ISP_{NAP} ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสเริ่มจากการส่งผ่านของอิเลคตรอนจาก NADH หรือ NADPH ไปยัง $Reductase_{NAP}$ จากนั้นส่งต่อไปยัง $Ferredoxin_{NAP}$ และ ISP_{NAP} ตามลำดับ สุดท้าย ISP_{NAP} จะเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาโดยตรงด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมยังวงเบนซีนของแนพธาลีนเกิดผลิตภัณฑ์ ซิส-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออล ตามที่แสดงในรูปที่ 2.4 โดยพบว่า *P. putida* สายพันธุ์ G7 และสายพันธุ์ NCIB 9816-4 มียีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนส ได้แก่ ยีน *nahAa* *nahAb* *nahAc* และ *nahAd* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ $Reductase_{NAP}$ $Ferredoxin_{NAP}$ ISP_{NAP} large subunit (α_2) และ ISP_{NAP} small subunit (β_2) ตามลำดับ โดยยีนดังกล่าวอยู่รวมกันเป็น cluster (Yen และ Serdar, 1988)



รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนสและยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนสใน *P. putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988)

รายงานที่ผ่านมาส่วนใหญ่เน้นที่การรายงานถึงแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PAHs ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของยีนรวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ยีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ ยีน *ndo* *dox* และ *pah* เป็นต้น

Kurkela และคณะ (1988) ศึกษายีน *ndo* (*ndoABC*) ซึ่งอยู่รวมกันเป็น cluster บนพลาสมิดของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสในส่วน Ferredoxin, ISP large subunit และ small subunit ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับยีน *nahAbAcAd* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และถึงแม้ว่าขาดส่วนที่ประมวลรหัสเป็นรีดักเทส (*nahAa*) แต่พบว่าการเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสยังคงปกติแสดงว่าอาจจะมีการทดแทนการทำงานของรีดักเทสส่วนที่ขาดหายไปด้วยรีดักเทสที่ไม่จำเพาะภายในเซลล์

Denome และคณะ (1993) ศึกษายีน *dox* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไดเบนโซไทโอฟีนและแนพธาลีนในส่วน upper pathway ซึ่งอยู่บนพลาสมิดของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 พบการจัดเรียงตัวของยีนเป็น cluster คล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 คือ *doxABDEFGHIJ* และพบว่ายีน *doxABD* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสยังมีความคล้ายกับยีน *ndoABC* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 อีกด้วย

Kiyohara และคณะ (1994) ศึกษายีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีน พบว่ายีน *pah* มีการจัดเรียงตัวเป็น cluster อยู่บนโครโมโซมซึ่งต่างจากยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ที่อยู่บนพลาสมิด NAH7 แต่ก็พบว่ายีน *pahA* ยังคงมีความคล้ายกับยีน *nahA* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และสายพันธุ์ NCIB 9816-4 ค่อนข้างมาก

Bosch และคณะ (1999) ศึกษายีน *nah* ของเชื้อ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ซึ่งประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน โดยยีนมีการจัดเรียงตัวเป็น cluster อยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วยยีนในส่วน upper และ lower pathway ที่มีความคล้ายกับยีนบนพลาสมิด NAH7 และ pWW60-1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ สายพันธุ์ NCIB 9816 ตามลำดับ

นอกจากการศึกษายีนในกลุ่มคล้าย *nah* แล้ว ปัจจุบันได้มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่มีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เพิ่มขึ้น

Romine และคณะ (1999) ศึกษาพลาสมิด pNL1 ขนาด 184 กิโลเบส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิดจาก *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 โดยยีนที่พบเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร ไบฟีนิล แนพธาลีน *เมตา*-ไซลีน *พารา*-ครีซอล กระจายอยู่ในพลาสมิด จากการระบุตำแหน่งของยีนต่างๆ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนที่พบในเชื้อสายพันธุ์นี้ ได้แก่ *nahE* *nahD* และ *nahF* โดยพบว่า 3 ยีนนี้มีการกระจายตัวอยู่ห่างๆกันและถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนในระดับกรดอะมิโนของยีนนี้กับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสจากยีนในกลุ่มที่คล้าย *nah* พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่ด้วยคุณสมบัติในการย่อยสลายแนพธาลีนในเชื้อสายพันธุ์นี้จนกระทั่ง

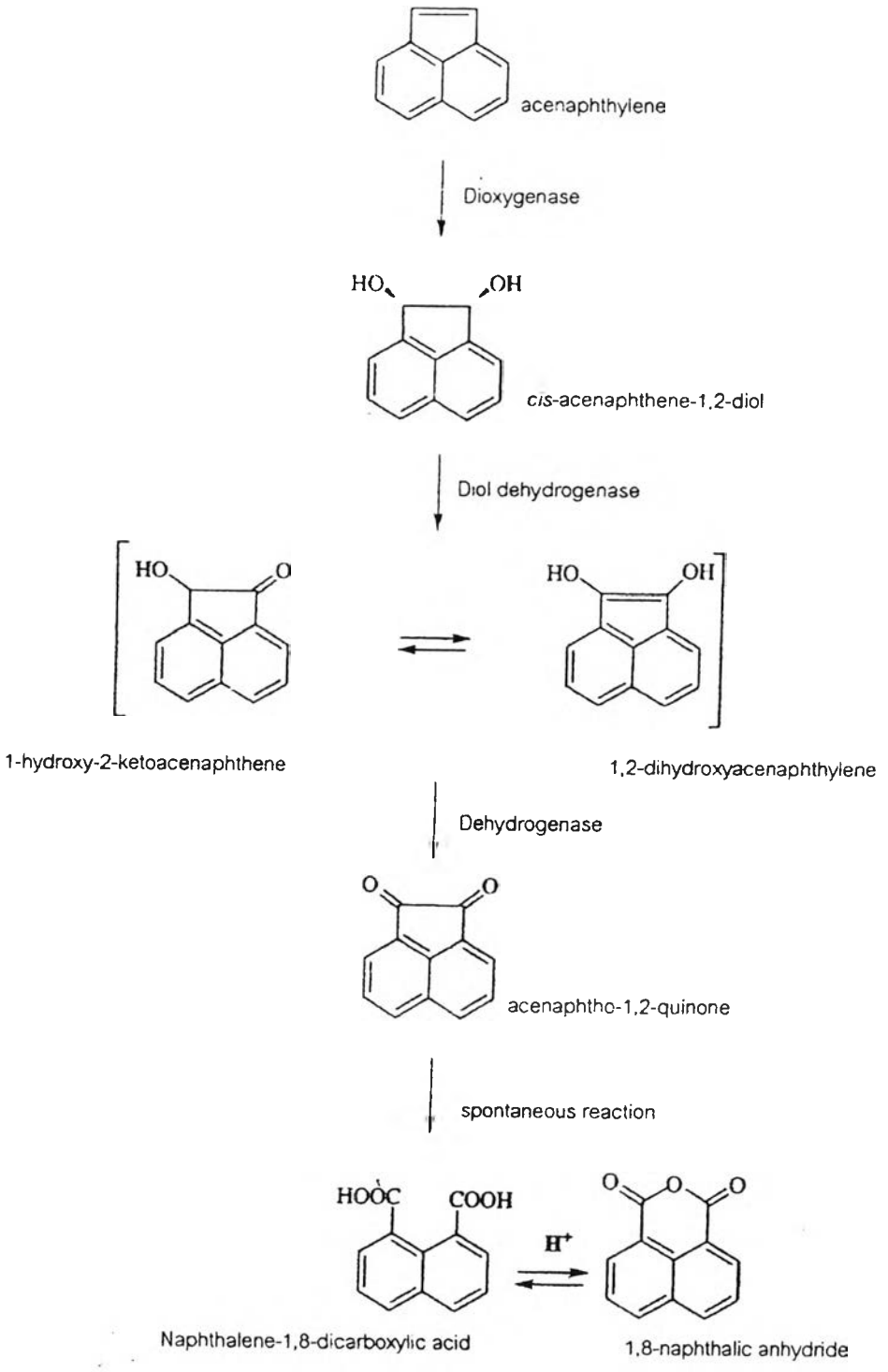
เกิดสารซาลิไซเลตขึ้น แสดงว่ายีนในส่วน upper pathway ที่ขาดหายไปน่าจะเกิดจากการทดแทนการทำงานโดยยีนที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่น วิถีการย่อยสลายไบฟีนิลที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทอื่นๆที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนใน lower pathway นั้นไม่พบยีน *nahG* ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางคะทีคอลแสดงว่าการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วน lower pathway ในเชื้อนี้อาจจะไม่ผ่านวิถีการย่อยสลายคะทีคอลหรืออาจจะมีเอนไซม์ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายคะทีคอล

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ทำการศึกษายีน *phn* ใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีนพบว่ายีน *phn* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ได้เคยมีรายงานมา โดยการจัดเรียงตัวของยีน *phn* เป็น cluster ดังนี้ *phnFECDAcAdB* ตามลำดับ ในขณะที่ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* มีการจัดเรียงตัว ดังนี้ *nahAaAbAcAdBFCQED* ตามลำดับ สิ่งที่แตกต่างอย่างชัดเจนนอกจากการจัดเรียงตัวของยีนคือพบยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสเพียง *phnAcAd* ซึ่งประมวลรหัสสำหรับ ISPαβ subunit แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า PhnB (เอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส) นั้นมีความคล้ายกับเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายไบฟีนิลมากกว่าวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนหรือฟีแนนทรีน PhnC จัดอยู่ใน Class III extradiol dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มใหม่ และมียีนควบคุมเป็น *phnR* และ *phnS* แทนยีน *nahR* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

Zhou และคณะ (2001) ศึกษายีน *nag* ซึ่งจัดเรียงตัวเป็น cluster อยู่บนพลาสมิดของเชื้อ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 โดยประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางเจนทิเสต cluster แรกประกอบด้วยยีน *nagAaGHAbAcAdBFCQED* ซึ่งคล้ายกับยีนในส่วน upper pathway ของพลาสมิด NAH7 ยกเว้นยีน *nagGH* ที่ประมวลรหัสเป็น ซาลิไซเลต-5-ไฮดรอกซิเลส และบริเวณ downstream ของยีน *nagD* มียีนอีก 1 cluster ที่ประกอบด้วยยีน *nagJIKLMN* ซึ่งประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเจนทิเสต โดยคาดว่าจะแปลรหัสร่วม (cotranscribe) เป็นโอเปอรอนกับ cluster แรก

2.1.2 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

อะซีแนพธิลีนเป็นสาร PAH อีกชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม มีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่าแนพธาลีน วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเริ่มแรกศึกษาใน *Beijerinckia* sp. ที่ย่อยสลายไบฟีนิล (Schocken และ Gibson, 1984) พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถย่อยอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันได้ การศึกษาการออกซิไดซ์ของอะซีแนพธิลีนจากการติดตามการสะสมของสารมัธยันต์โดยมีไบฟีนิลเป็นสารเหนี่ยวนำ พบว่าขั้นต้นเกิดจากปฏิกิริยาไดออกซิจีเนชันด้วยการเติมออกซิเจนเข้ายังส่วนวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนได้เป็น ซิส-1,2-อะซีแนพธีนไดออล 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน หรือ 1,2-อะซีแนพธีนไดโอน และมีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซีแนพธีนควิโนน ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่ายังไม่เกิดการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีน กล่าวอีกนัยหนึ่งคือเชื้อไม่สามารถใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ ต่อมา Komatsu และคณะ (1993) ได้รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเมื่อศึกษาสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อพบการสะสมของ กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถทำการแตกวงไซโคลเพนทีนในโครงสร้างของอะซีแนพธิลีนได้ ส่วนรายงานล่าสุดโดย Selifonov และคณะ (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสเหมือนกับที่เคยค้นพบแล้วในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ได้เป็น ซิส-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน และ กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 จากสารมัธยันต์ตัวสุดท้ายที่ค้นพบดังกล่าว จนถึงปัจจุบันยังไม่พบรายงานใดที่ศึกษาการย่อยสลายต่อจาก กรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก จึงยังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงให้เห็นว่ามีคาร์บอนตัวใดที่ถูกสลายไปเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเลย รวมทั้งยังไม่พบรายงานที่ศึกษาถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในระดับพันธุศาสตร์อีกด้วย



รูปที่ 2.5 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ลูกผสมของ** *Pseudomonas aeruginosa* **สายพันธุ์** PAO1 (pRE695) (Selifonov **และคณะ**, 1996)

2.2 วิธีการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs เช่น เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Ploymerase Chain Reaction, PCR) การโคลน (Cloning) และการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน (Transposon mutagenesis) โดยใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งหรือใช้หลายเทคนิคร่วมกัน เพื่อวัตถุประสงค์หลายด้าน เช่น เพื่อตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนที่ค้นพบใหม่กับยีนที่ค้นพบแล้ว ศึกษาการกระจายตัวของยีนในกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ตรวจหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ในเบื้องต้น และเพื่อจุดประสงค์ที่สำคัญ คือ การศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการทำนายวิถีการย่อยสลายสาร PAHs และสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้ไปทำการตัดต่อและดัดแปลงเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs เพิ่มขึ้นต่อไปในอนาคต

2.2.1 เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

เทคนิคไฮบริไดเซชันสามารถทำโดยการสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ต้องการตรวจหา โดยเฉพาะยีนจากส่วน upper pathway ซึ่งเป็นบริเวณที่ค่อนข้างอนุรักษ์ โดยมากมักจะสร้างดีเอ็นเอติดตามจากยีนของกลุ่มคล้าย *nah* จากเชื้ออื่นซึ่งทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จัดว่าดีเอ็นเอติดตามที่ใช้นี้เป็นชนิดเฮเทอโรโลกัส (heterologus probe) ซึ่งต้องทำการไฮบริไดซ์ในสภาวะเข้มงวดต่ำ (low stringency condition) มีหลายรายงานได้ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันในการตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนในเชื้อที่ย่อยสลาย PAHs ที่เพิ่งแยกได้ใหม่กับยีนกลุ่มคล้าย *nah* ข้อได้เปรียบของเทคนิคนี้คือ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูง กล่าวคือแม้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์จะมีความเหมือนกับดีเอ็นเอติดตามเพียงบางส่วนแต่ยังคงสามารถทำการติดตามความเหมือนได้ แต่วิธีการนี้มักจะใช้เป็นเพียงวิธีในการตรวจหาความเหมือนเบื้องต้นของยีนที่ต้องการศึกษาเท่านั้น

Sanseverino และคณะ (1993) ใช้ดีเอ็นเอติดตามยีน *nahA* ที่สร้างจากยีนบนพลาสมิด NAH7 ของ *P: putida* สายพันธุ์ G7 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 5R, DFC49 และ DFC50 พบว่าดีเอ็นเอจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวให้สัญญาณขนาด 15.6 กิโลเบส ในขณะที่ตัวควบคุมผลบวก (พลาสมิด NAH7) ให้สัญญาณขนาด 18.5 กิโลเบส ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองมีความคล้ายกันจึงให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์ แต่มีความแตกต่างกันในส่วน

รูปแบบการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ซึ่งเมื่อศึกษารายละเอียดของยีนพบว่ายีนในเชื้อสายพันธุ์นี้มีส่วน upper และ lower pathway คล้ายพลาสมิด NAH7

Goyal และ Zylstra (1996) ใช้ดีเอ็นเอติดตามยีน *nah* ที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ *Eco*RI ขนาด 15 กิโลเบส จากพลาสมิด pDTG112 ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนไปเป็นซาลิไซเลตมาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Comamonas testosteroni* 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GZ38A GZ39 และ GZ42 ที่ย่อยสลายฟีแนนทรีน ในสภาวะความเข้มงวดต่ำ พบว่าไม่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์แสดงว่ายีนในเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างจากยีน *nah* เมื่อศึกษารายละเอียดของยีนพบว่ามีความแตกต่างจากยีน *nah* จริง กล่าวคือมียีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนส 2 ยีนอยู่ขนาบข้างยีนที่ประมวลรหัสดีไฮโดรจีเนส

Foght และ Westlake (1996) ใช้ดีเอ็นเอติดตามยีน *nah* ที่สร้างจากพลาสมิด NAH7 และ pWW60 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ NCIB 9816 ตามลำดับ ในการไฮบริไดซ์กับพลาสมิด pLP6a ขนาด 63 กิโลเบส ของ *P. fluorescens* สายพันธุ์ LP6a ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน และ 2-เมธิลแนพธาลีน พบว่าให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์แต่ขนาดแตกต่างจากตัวควบคุมผลบวก แสดงว่ารูปแบบการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แตกต่างจากยีน *nah* ซึ่งเมื่อศึกษารายละเอียดของยีนพบว่ายีนบริเวณ lower pathway แยกออกจากบริเวณ upper pathway ประมาณ 18 กิโลเบส ซึ่งห่างกันมากกว่ายีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

Hamann และคณะ (1999) ใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีน *ndoB* ซึ่งประมวลรหัสเป็น ISP large subunit ของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสในเชื้อ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 ในการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆที่คัดแยกได้ พบว่า *Pseudomonas* ที่ย่อยสลายแนพธาลีนให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่เข้ม ส่วนเชื้ออีก 5 สายพันธุ์ของ *Gordona*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* และ *Pseudomonas* ที่ย่อยสลายสาร PAHs ที่มีมวลโมเลกุลสูงให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่อ่อน ผลจากการไฮบริไดซ์สามารถนำมาประเมินความสามารถในการย่อย PAHs ในกลุ่มประชากรได้

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ ยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มาไฮบริไดซ์กับยีน *phn* ในเชื้อ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีน พบว่ายีน *phn* มีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เนื่องจากให้ผลลบกับการทดสอบดังกล่าว เมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความเหมือนรวมทั้งหน้าที่การทำงานของยีนพบว่ายีน *phn* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ได้เคยมีรายงานมา โดยการจัดเรียงตัวของ

ยีน *phn* เป็นดังนี้ *phnFECDAcAdB* ตามลำดับ ในขณะที่ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* จัดเรียงตัวดังนี้ *nahAaAbAcAdBFCQED* ตามลำดับ และมียีน *phnR* และ *phnS* แทนยีน *nahR* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

2.2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการตรวจหายีนจากธรรมชาติ เนื่องจากสามารถใช้เทคนิคนี้ได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยหลักการสำคัญ คือ การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ให้จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ไพร์เมอร์ดังกล่าวจะจับอย่างจำเพาะกับบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นคู่สมกับไพร์เมอร์นั้น จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาสร้างสายนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยเอนไซม์พอลิเมอเรส ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอที่ต้องการมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจนสามารถนำไปศึกษาต่อได้ วิธีการนี้ให้ผลรวดเร็วและไม่ยุ่งยากดังนั้นในปัจจุบันในงานวิจัยจึงนิยมใช้เทคนิคนี้มากขึ้น แต่มีข้อเสีย คือบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์นั้นเป็นเพียงบริเวณสั้นๆ ถ้าบริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์มากไพร์เมอร์จะไม่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ต้องการศึกษาได้ จึงไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่ต้องการได้ ดังเช่น

Herrick และคณะ (1993) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแนพธาลีนจากแบคทีเรียท้องถิ่นในตะกอนด้วยการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *nahAc* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความแตกต่างของรูปแบบการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อตรวจหาความเหมือนของยีน *phn* ในเชื้อ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีนกับยีนย่อย PAHs ที่ได้เคยมีรายงานมาแล้วด้วยการใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ ยีน *pah* ของเชื้อ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 พบว่ายีน *phn* มีความแตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เนื่องจากให้ผลลบกับการทดสอบดังกล่าว

Wilson และคณะ (1999) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบ Reverse Transcriptase (RT) PCR โดยการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *nahAc* ในการตรวจหายีน โดยใช้ตัวอย่างเป็น mRNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยแนพธาลีนในบริเวณแหล่งน้ำซึ่งปนเปื้อนด้วยน้ำมันดินโดยตรงซึ่งไม่ผ่านขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลที่ได้พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ได้ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า

สามารถแบ่งยีนได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่คล้ายกับยีน *ndoB* และ *dntAc* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 และ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ DNT ตามลำดับ โดยวิธีการนี้ทำให้สามารถตรวจพบยีนที่มีความหลากหลายได้มากกว่าวิธีที่ต้องผ่านขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Laurie และ Lloyd-Jones (2000) ศึกษาการกระจายตัวของยีนที่คล้ายกับยีน *phnAc* และ *nahAc* ซึ่งประมวลรหัสเป็น ISP large unit ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 และ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ตามลำดับ ในบริเวณดินที่มีการปนเปื้อน PAHs ในเขตประเทศนิวซีแลนด์ โดยใช้เทคนิค Competitive PCR ผลของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้บ่งชี้ว่าสามารถตรวจพบยีนในกลุ่มที่คล้ายยีน *phnAc* ได้มากกว่าวิธีการศึกษาจากเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และยังพบว่าในบริเวณที่มีการปนเปื้อนใหม่ๆจะตรวจพบยีนได้มากกว่าบริเวณที่ผ่านการปนเปื้อนมานานแล้ว แต่อย่างไรก็ตามการตรวจพบยีนไม่ได้หมายความว่าจะมีการย่อยสลาย PAHs เกิดขึ้นเสมอไป

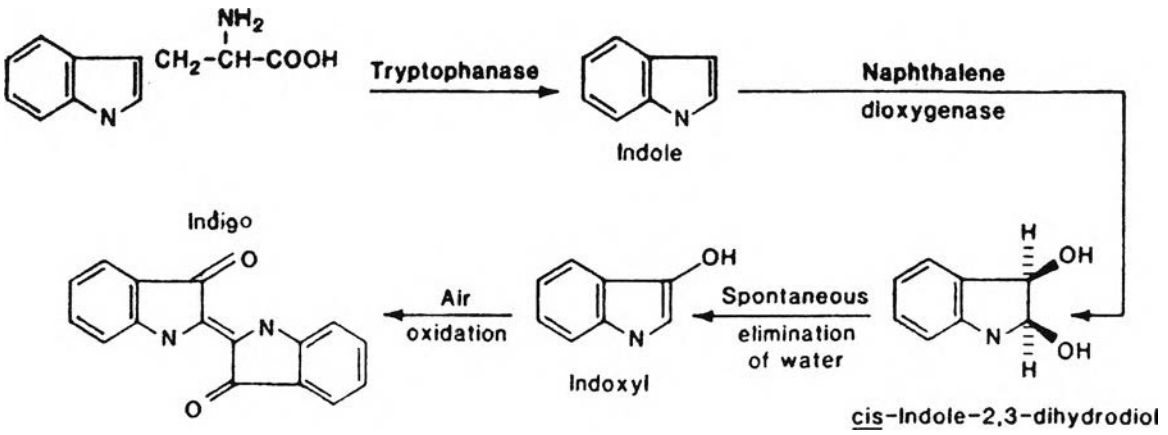
2.2.3 การโคลน (Cloning)

เทคนิคการโคลนที่นิยมทำกันมากในปัจจุบัน คือ การโคลนแบบ Shot-gun โดยอาศัยหลักการ คือ ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้โคลนเข้ายังดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับจีโนมิกดีเอ็นเอข้างต้น จากนั้นทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่ได้เข้ายังเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการออกจากห้องสมุดยีน (genomic library) โดยการแสดงลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าบ้านตามที่ต้องการ เช่น การติดตามโคลนที่มียีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นยีนสำคัญในการบ่งบอกขั้นต้นถึงความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไป โดยติดตามการเปลี่ยนสีของสารอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) เป็นต้น จากการที่วิธีนี้จะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ต้องการเก็บอยู่ในรูปแบบที่เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหรือคอสมิด หรือเก็บไว้ในเซลล์เจ้าบ้านได้นาน จึงสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมนี้มาทำการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือแม้กระทั่งนำยีนไปทำการแสดงออก (expression) หรือตัดต่อ ดัดแปลงยีนให้มีสมบัติได้ตามต้องการ แต่มีข้อเสียคือการโคลนยีนบางยีนไม่มีระบบการคัดเลือกโคลนที่เหมาะสม จึงไม่สามารถทำการคัดเลือกโคลนที่ต้องการออกจากโคลนทั้งหมดได้

Ensley และคณะ (1983) ได้ใช้การโคลนยีนในส่วน upper pathway จากพลาสมิด NAH7 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และทำการแสดงออกของยีนใน *E. coli* สายพันธุ์ HB101 จากการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วพบการสะสมของสารอินดิโกสีฟ้าน้ำเงินโดยบังเอิญ เมื่อหาสาเหตุของการปรากฏขึ้นของอินดิโกในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอินดิโกเกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันระหว่างทริปโตเฟนเนสที่พบใน *E. coli* ทั่วๆไปและ

ไดออกซิจีเนสจากส่วนของพลาสมิด NAH7 ในการเปลี่ยนทริปโตเฟนให้เป็นอินโดลและอินดิโก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 จากการทดลองยังได้ทำการยืนยันการทำงานของไดออกซิจีเนส ในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกในเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมต่างๆที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs และสายพันธุ์กลายที่เกิดการบกพร่องของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนส พบว่า การเกิดสารไดไฮโดรไดออลที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการทำงานของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสมีส่วน สัมพันธ์กับการปรากฏขึ้นของอินดิโก จากข้อสรุปดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำ ปฏิกิริยาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทดลองเพื่อหาเชื้อที่ย่อยสลายสาร PAHs รวมทั้งใช้ในการ ทดสอบโคลนซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs จากการทดลองหายีนที่ประมวลรหัส ไดออกซิจีเนสในขั้นต้น ด้วยการติดตามความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนแปลงอินโดลไปเป็น อินดิโก

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิคการโคลนยีน เช่น การโคลนยีนไดออกซิจีเนส *dox* จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denomes, 1993) และการโคลนยีน *phn* จาก *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jone, 1999) เป็นต้น



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการเกิดอินดิโกโดยปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสและไดออกซิจีเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสม (Ensley และคณะ, 1983)

Yang และคณะ (1994) ทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อย สลายแนพธาลีน ฟลูออรีน และฟีแนนทรีน จากพลาสมิด pWW60-1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 ด้วยวิธี Shot-gun cloning การคัดเลือกโคลนโดยการวิเคราะห์การทำงานของ ไดออกซิจีเนสด้วยการติดตามการเกิดโคโลนีสีน้ำเงิน (เกิดสารอินดิโก) ในขั้นต้น จากนั้นติดตามดู การเจริญใน PAHs ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ในงานวิจัยนี้สามารถ โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อย PAHs จากเชื้อสายพันธุ์นี้ได้และเมื่อนำยีนที่โคลนได้ไปไฮบริไดซ์

กับยีนของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 พบว่าสามารถให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม NAH7 ได้ในสภาวะความเข้มงวดสูง (high stringency condition) แสดงว่ายีนจากเชื้อ 2 สายพันธุ์ มีความคล้ายกันมาก

Kiyohara และคณะ (1994) ทำการโคลนยีน *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีน จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นสามารถคัดเลือกโคลนโดยการวิเคราะห์การทำงานของไดออกซิจีเนสโดยการเปลี่ยนสีของโคโลนีเป็นสีน้ำเงินเมื่อโคลนสามารถสร้างสารอินดิโกได้ จากนั้นทำการสับโคลนสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDI1 ที่มีเฉพาะยีนที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ไดออกซิจีเนสแล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDI1 มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามและนำไปไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 พบว่าสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เกิดขึ้นกับส่วนที่เป็นโครโมโซมของเชื้อสายพันธุ์นี้ แสดงว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ของเชื้อสายพันธุ์นี้อยู่บนโครโมโซม ซึ่งแตกต่างจากที่เคยพบในเชื้อสายพันธุ์อื่นที่มักจะพบยีนอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *pahA* มีความคล้ายกับ *nahA* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และสายพันธุ์ NCIB 9816-4 ค่อนข้างมาก

Goyal และ Zylstra (1996) ทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน แนพธาลีน ของ *Comamonas testosteroni* สายพันธุ์ GZ39 จากห้องสมุดยีนที่สร้างขึ้นสามารถคัดเลือกโคลนโดยการวิเคราะห์การทำงานของไดออกซิจีเนสจากการปรากฏขึ้นของสารอินดิโก จากการสับโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสและดีไฮโดรจีเนสพบว่าในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้จากเชื้อสายพันธุ์นี้น่าจะมียีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนส 2 ยีน อยู่ขนาบข้างยีนที่ประมวลรหัสดีไฮโดรจีเนส ซึ่งแตกต่างจากที่เคยพบใน *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 ที่ยีนประมวลรหัสดีไฮโดรจีเนสอยู่ถัดจากยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนส

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ทำการโคลนยีน *phn* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ในส่วน upper pathway ของวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 การคัดเลือกโคลนทำโดยการวิเคราะห์การทำงานของไดออกซิจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโก เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่คัดเลือกได้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามและนำไปไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์นี้พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อยู่บนส่วนของพลาสมิดขนาดใหญ่กว่า 100 กิโลเบส เมื่อทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความเหมือนรวมทั้งหน้าที่การทำงานของยีนพบว่ายีน *phn* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ได้เคยมีรายงานมา

นอกจากการคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยการตรวจหายีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสตามวิธีการของ Ensley และคณะ (1983) แล้ว ยังพบบางรายงานที่ใช้วิธีการคัดเลือกโคลนซึ่งมีความสามารถในการย่อย PAHs ที่แตกต่างไป เช่น คัดเลือกจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนสีของสารมัธยันต์ การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ Colony hybridization เป็นต้น

Kasuga และคณะ (1997) ทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัสเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส (extradiol dioxygenase) สำหรับ 2,3-ไดไฮดรอกซีไบฟีนิล ของ *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ DBF63 ที่ย่อยสลายไดเบนโซฟิวแรน ด้วยวิธี Shot-gun cloning ขั้นตอนการคัดเลือกโคลนทำโดยการวิเคราะห์การทำงานของเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนสด้วยการสเปรย์ส่วนผสมของ คะทีคอล 3-เมธิลคะทีคอล 4-เมธิลคะทีคอล และไดเบนโซฟูแรน ลงบนจานเลี้ยงเชื้อและติดตามโคลนที่ให้โคโลนีสีเหลือง จากการทดลองสามารถโคลนยีน *dbfBC* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์เอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส และไฮโดรเลสได้ ตามลำดับ และเมื่อทำ primer walking พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยไดเบนโซฟิวแรนไม่ได้อยู่รวมกันเป็น cluster กล่าวคือ ยีนบริเวณดังกล่าวจัดเรียงตัวดังนี้ *dbfBC*, ORFL3 และบริเวณที่คล้าย IS ตามลำดับ

Iwabuchi และ Harayama (1997) ทำการโคลนยีนที่ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟีแนนทรีน การคัดเลือกโคลนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการใช้ degenerated primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณปลายด้านอะมิโนจำนวน 29 กรดอะมิโน ของ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ทำบริสุทธิ์จากเชื้อสายพันธุ์นี้ โคลนที่ต้องการให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 71 bp ในงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการได้โดยมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกซึ่งประกอบด้วย 7 Open Reading Frames (ORFs) มีส่วนที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทาง *o*-phthalate ทั้งหมด 3 ยีน และ อีก 4 ORFs ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย การจัดเรียงตัวของ ORF ต่างๆเป็นดังนี้ คือ ยีน *phdI* ประมวลรหัส 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธเอตไดออกซิจีเนส ยีน *phdJ* ประมวลรหัส *ทรานส*-คาร์บอกซีเบนซอลไพรูเวตอัลโดเลส ORF1 ยีน *phdK* ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ORF2/ORF3 และ ORF4 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามี ORF ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแทรกอยู่ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน ยีนจึงไม่อยู่รวมกันเป็น cluster เหมือนกรณียีนในกลุ่มคล้าย *nah*

พบบางรายงานได้ทำการศึกษายีนด้วยวิธีการสร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยหลักการโคลนจะคล้ายกับการโคลนแบบ Shot-gun แตกต่างกันที่วิธีนี้จะทำการคัดเลือกเพียงบางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ซึ่งคาดว่ามียีนที่ต้องการอยู่มาทำการโคลนเท่านั้น

Werwath และคณะ (1998) ทำการโคลนยีน *gtdA* ที่ประมวลรหัส เจนทิเสต 1,2-ไดออกซิจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายเจนทิเสตจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW5 ด้วยวิธี

สร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยทำการคัดเลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์และมีขนาดในช่วง 3.5-5 กิโลเบส มาใช้ในการโคลน ทำการคัดเลือกโคลนด้วยวิธี Colony hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามขนาด 1.2 กิโลเบส ที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งใช้ degenerated primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเจนทิเสต 1,2-ไดออกซิจีเนส และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ RW5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอทำให้มีการจัด เจนทิเสต1,2-ไดออกซิจีเนส อยู่ใน Class ใหม่ของเอนไซม์ในกลุ่ม Ring-cleavage dioxygenase เนื่องมีความแตกต่างจากยีนและเอนไซม์ชนิดเดียวกันในเชื้ออื่นค่อนข้างมาก

2.2.4 การกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน (Transposon mutagenesis)

ทรานสโปซอน (transposons) คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่ง (locus) หนึ่งไปสู่ตำแหน่งอื่นแบบสุ่มและไม่ต้องอาศัยกระบวนการโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน เรียกกระบวนการนี้ว่าการทรานสโปซิชัน (transposition) หรือทรานสโลเคชัน (translocation) ทรานสโปซอน Tn*5* เป็นคอมโพสิททรานสโปซอน (composite transposon) ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น Insertion Sequence element (IS element) IS50L และ IS50R ประกบหัวท้าย และมียีนอยู่ภายในซึ่งเป็นยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซิน สเตรปโตมัยซิน และบลีโอมัยซิน (Reznikoff, 1993)

มีรายงานการใช้วิธีการก่อการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน (transposon mutagenesis) เพื่อเป็นเครื่องมือในการหายีนที่ต้องการศึกษาในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยทรานสโปซอนจะสอดแทรกเข้าภายในยีนเป้าหมายและฟีโนไทป์ของสายพันธุ์กลายที่ได้จะแตกต่างกับสายพันธุ์ดั้งเดิม จากนั้นจะสามารถหายีนที่อยู่ข้างเคียงทรานสโปซอนต่อไปได้ ได้มีการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้เพื่อหายีนต่างๆ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs และศึกษาวิถีการย่อยสลายสาร PAHs วิธีการนี้มักจะใช้ในกรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของยีนที่ต้องการศึกษามากนัก การใช้วิธีการอื่นที่กล่าวมาข้างต้นจะทำได้ค่อนข้างยาก รวมทั้งนอกจากวิธีการนี้จะสามารถทำการติดตามและคัดแยกยีนจากการที่ทราบถึงข้อมูลในส่วนของทรานสโปซอนที่สอดแทรกอยู่ยังยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษาได้แล้วในขณะเดียวกันยังสามารถนำสายพันธุ์กลายที่ได้มาทำการศึกษาถึงการสะสมของสารมัธยันต์ในวิถีการย่อยสลายเพื่อทำนายถึงวิถีการย่อยสลายควบคู่ไปกับการทำงานของเอนไซม์ที่ประมวลรหัสมาจากยีนที่ทราบได้อีกด้วย

Monticello และคณะ (1985) ได้ทำการกลายพันธุ์ *P. alcaligenes* ที่มีพลาสมิด pDBT2 ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและซาลิไซเลตด้วยทรานสโปซอน Tn*5* ได้สายพันธุ์

กลายที่ไม่สามารถเจริญในแนพธาลีนและเกิดการสะสมของ 2-ไฮดรอกซี-โครมีน และยังพบการสะสมเจนทิเสตที่เกิดจากการออกซิไดซ์ซาลิไซเลตอีกด้วย ผลที่ได้แสดงว่าทรานสโปซอนได้เข้าไปแทรกยังยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์ตัวท้ายของวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนและเอนไซม์เริ่มต้นของวิถีการย่อยสลายเจนทิเสต จากการศึกษาสายพันธุ์กลายเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมทำให้พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายซาลิไซเลตโดยผ่านทางคะทีคอลหรืออาจจะเลือกอีกวิถีหนึ่งผ่านทางเจนทิเสตก็ได้

Sanseverino และคณะ (1993) ได้ทำการกลายพันธุ์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ 5R ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและซาลิไซเลตที่คล้ายกับยีนของพลาสมิด NAH7 ด้วยทรานสโปซอน Tn*4331* ได้สายพันธุ์กลาย 5RL ที่สามารถเจริญในแนพธาลีนได้แต่ไม่สามารถเจริญในซาลิไซเลตและฟีแนนทรีนรวมทั้งแอนทราซีน และเกิดการสะสมของซาลิไซเลตเมื่อเลี้ยงเชื้อในแนพธาลีน ผลที่ได้แสดงว่าทรานสโปซอนได้เข้าไปแทรกยังยีน *nahG* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ซาลิไซเลตไฮดรอกซิเลส นอกจากนี้ยังพบการสะสม กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก จากการเลี้ยงเชื้อในฟีแนนทรีนและ กรด 2-ไฮดรอกซี-3-แนพโธอิก จากการเลี้ยงเชื้อในแอนทราซีน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายถูกยับยั้งการย่อยสลายในส่วน lower pathway อย่างสมบูรณ์และเป็นการบ่งชี้ว่ายีนบนพลาสมิด NAH เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs อื่นๆนอกจากแนพธาลีนด้วย ซึ่งต่างจากรายงานก่อนหน้าที่ว่าการย่อยสลาย PAHs แต่ละชนิดมีวิถีแยกกัน

Harwood และคณะ (1994) ทำการกลายพันธุ์ *P. putida* สายพันธุ์ PRS2000 ที่มีความสามารถในการย่อย 4-ไฮดรอกซีเบนโซเอต ผ่านทางวิถี β-ketoadipate ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* ได้สายพันธุ์กลายที่บกพร่องในการเกิด chemotaxis ของ 4-ไฮดรอกซีเบนโซเอต จากนั้นทำการโคลนยีนจากสายพันธุ์กลายดังกล่าวโดยใช้ทรานสโปซอนเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกโคลน พบว่าทรานสโปซอนเข้าแทรกยังยีน *pcaK* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด chemotaxis ของ 4-ไฮดรอกซีเบนโซเอต และค้นพบยีน cluster ใหม่ในบริเวณนี้ที่ประกอบด้วยยีน *pcaRKF* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด chemotaxis การย่อยสลาย และการขนส่ง 4-ไฮดรอกซีเบนโซเอต

Foght และ Westlake (1996) ทำการกลายพันธุ์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ LP6a ที่มีพลาสมิด pLP6a ขนาด 63 กิโลเบส ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน และ 2-เมธิลแนพธาลีน ที่คล้ายกับพลาสมิด NAH7 ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* ได้สายพันธุ์กลาย 59 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์กลายทั้งหมดสามารถนำไปสู่ข้อสรุปของการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในเชื้อสายพันธุ์นี้ สายพันธุ์กลายส่วนหนึ่งมีทรานสโปซอนเข้าไปแทรกยังยีนที่เกี่ยวข้องกับ upper pathway เป็นผลให้ไม่สามารถเจริญได้ในแนพธาลีน หรือสูญเสียการทำงานของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส แต่การเจริญในซาลิไซเลตยังคงเป็นปกติ สายพันธุ์กลายอีกส่วนหนึ่งมีทรานสโปซอนเข้าไปแทรกยังยีนที่เกี่ยวข้องกับ lower pathway โดย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยีนบริเวณ lower pathway แยกออกจากบริเวณ upper pathway ประมาณ 18 กิโลเบส ซึ่งคล้ายกับยีน *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงสายพันธุ์กลายชนิดเดียวกันในสาร PAHs ชนิดต่างๆ เช่น กรณีที่ใช้สายพันธุ์กลายที่บกพร่องในส่วนของยีน *nahB* พบว่าเกิดการสะสมของสารไดไฮโดรไดออลจากสาร PAHs ต่างชนิดกัน แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดด้วยการใช้ยีนเพียงชุดเดียว

Romine และคณะ (1999) ทำการกลายพันธุ์ *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs ได้หลายชนิดด้วยทรานสโปซอน Tn*5* โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สูญเสียการทำงานของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ซึ่งจะไม่เกิดโคโลนีสีฟ้าเมื่อมีอินโดลและไม่สามารถเจริญในแนพธาลีนและไบฟีนิลได้ จากสายพันธุ์กลายที่ได้สามารถวิเคราะห์ยีนที่มีบทบาทสำคัญในวิถีการย่อยสลายสาร PAHs ร่วมกันได้ เช่น กรณียีนที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในวิถีต้นของไบฟีนิลน่าจะทดแทนการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของแนพธาลีนที่ขาดไปได้ เป็นต้น

Iurescia และคณะ (1999) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ M1 ด้วยทรานสโปซอน mini-Tn*5* เพื่อหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเบตา-เมอซีนในเชื้อชนิดนี้ โดยการติดตามหา mini-Tn*5* ที่แทรกอยู่ภายในโครโมโซมของสายพันธุ์กลาย N22 ซึ่งไม่สามารถเจริญบนเบตา-เมอซีน ด้วยเทคนิค Southern blot analysis จากนั้นหาแผนที่การตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และหาลำดับเบสของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนของสายพันธุ์กลายด้วยการใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ I และ O ของ mini-Tn*5* จากนั้นนำบางส่วนของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนที่คาดว่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเบตา-เมอซีน ดังกล่าวมาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อหายีนที่สมบูรณ์ในสายพันธุ์ดั้งเดิม ผลการศึกษาได้พบยีน *myrA*, *myrB*, *myrC* และ *myrD* ที่ประมวลรหัสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเบตา-เมอซีน และสามารถทำนายวิถีการย่อยสลายเบตา-เมอซีนได้อีกด้วย

จากตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้น การนำสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลาย PAHs จากการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอนมีประโยชน์มากในการนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ที่ถูกสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีการเช่นเดียวกันนี้ไปใช้ในการทดลองโดยใช้ทรานสโปซอนเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกโคลนที่ต้องการ เนื่องจากได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีการอื่นตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วไม่สามารถทำการคัดแยกยีนที่ต้องการศึกษาได้