การแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1

นางสาวฐิติวรดา นินทนาวงศา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4470-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE UPPER PATHWAY IN *Rhizobium* sp. CU-A1

Miss Thitiworada Nintanawongsa

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-4470-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1
โดย	นางสาวฐิติวรดา นินทนาวงศา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฐิติวรดา นินทนาวงศา : การแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE UPPER PATHWAY IN *Rhizobium* sp. CU-A1). อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์; 142 หน้า. ISBN 974-17-4470-6.

ได้แยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจาก *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยใช้เทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอติดตามซึ่งสร้างขึ้นจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดของพลาสมิด pWT โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกเข้าในพลาสมิดเวกเตอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเหนือขึ้นไปจากชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดของพลาสมิด pWT ได้รวม 3535 bp ซึ่งประกอบด้วยกรอบอ่านรหัสเปิด (ORFs) จำนวน 3 แห่ง ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกันตามลำดับดังต่อไปนี้ ORF1 (*acnN*) ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซิเลสของ *Burkholderia* sp. RP007 เท่ากับ 36% ORF2 (*acnM*) ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ ซิส-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนสของ *Pseudomonas putida* เท่ากับ 45% และORF3 (*acnL*) ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* เท่ากับ 36% นอกจากนี้ยังหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณถัดลงไปจากชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดของพลาสมิด pWT จำนวน 711 bp พบกรอบอ่านรหัสเปิดจำนวน 1 แห่ง ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสทางเดียวกับ ORF1-3 คือ ORF7 (*acnO*) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain alcohol dehydrogenase ของ *Novosphingobium aromaticivorans* เท่ากับ 56% พบบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์เหนือ ORF1 และบริเวณจับเกาะของไรโบโซมหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีนที่แยกได้ทั้ง 4 ยีนน่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. CU-A1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต...
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..............................
ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........................

4372253723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ acenaphthylene/ nucleotide sequences

THITIWORADA NINTANAWONGSA : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE UPPER PATHWAY IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 142 pp. ISBN 974-17-4470-6.

Genes involving acenaphthylene degradation were isolated from *Rhizobium* sp. CU-A1 by Southern hybridization of genomicDNA with DNA-probes designed based on nucleotide sequences of the insert DNA fragment of pWT. DNA fragments with positive signals were cloned into plasmid vectors and the insert DNA sequence was determined. Total 3535 bp nucleotides upstream from 5' end of the pWT insert revealed 3 open reading frames (ORFs) with same orientation; ORF1 (*acnN*) shows 36% homology to 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase of *Burkholderia cepacia* DBO1; ORF2 (*acnM*) shows 45% homology to *cis*-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase of *Pseudomonas putida* and ORF3 (*acnL*) shows 36% homology to putative ferredoxin reductase of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Moreover, the nucleotide sequence of 711 bp downstream of 3' end of the pWT insert fragment was subsequently determined which revealed ORF7 in the same orientation with ORF1-3. ORF7 (*acnO*) shows 56% homology to short-chain alcohol dehydrogenase of *Novosphingobium aromaticivoran*. The putative promoter located upstream to ORF1 along with putative ribosome binding site of each ORF. This results suggest that this four isolated genes may involve in acenaphthylene degradation pathway of *Rhizobium* sp. CU-A1.

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

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

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

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบและให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรฤทัย ภิญญาคง ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ คุณทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัยและความช่วยเหลือทุกด้าน

ขอบคุณเพื่อนกลุ่มบดินทรทุกคน คุณวรรณรัตน์ ภูมิวงศ์พิทักษ์ คุณเรณินทร์ สุขสุชะโน คุณจิราภรณ์ โพธิ์เวชกุล คุณอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ คุณณิชาภา กลัดพิบูลย์ และคุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ ที่อยู่เคียงข้างเสมอ ขอบคุณสำหรับทุกความห่วงใย ความเข้าใจ ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ให้ตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวนินทนาวงศาทุกคนที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย......ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ......จ
กิตติกรรมประกาศ......ฉ
สารบัญ......ช
สารบัญตาราง......ฏ
สารบัญรูป......ฐ
บทที่
1. บทนำ......1
2. วารสารปริทัศน์......5
2.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยวิธีทางชีวภาพและยีนที่เกี่ยวข้อง......6
2.1.1 การย่อยสลายแนพธาลีน......6
2.1.2 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีน......17
2.2 การศึกษายีนและวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1......21
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย......23
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง......23
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ......24
3.3 แบคทีเรีย......26
3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์......26
3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย......28
3.6 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L1......29
3.6.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L1 (DNA probe)......29
3.6.1.1 สกัดพลาสมิด pWT......29
3.6.1.2 เตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอติดตาม L1......29

สารบัญ (ต่อ)

3.6.1.3 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling……………………………………………………………...31

3.6.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1สำหรับการไฮบริไดซ์..32

3.6.2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1………32

3.6.2.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....................33

3.6.2.3 ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ...33

3.6.2.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)……………………………………………….......................34

3.6.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1……………………………………………………………..35

3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1…………………………..37

3.7.1 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1………..37

3.7.2 สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน.......................38

3.7.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์.....................38

3.7.4 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์.....................39

3.7.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.4 เข้าสู่ *E. coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด..40

3.7.5.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)………………………40

3.7.5.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน..............41

3.7.5.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ...41

3.8 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4...…………...43

3.8.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)………………………………….43

สารบัญ (ต่อ)

3.8.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์......43

3.8.3 ไฮบริไดซ์เซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4......44

3.9 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4......44

3.9.1 ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α......44

3.9.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่......44

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด......45

3.11 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2......46

3.11.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)......46

3.11.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์......46

3.11.3 ไฮบริไดซ์เซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2......46

3.12 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2......47

3.12.1 ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α......47

3.12.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่......47

4. ผลการทดลอง......49

4.1 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L1......50

สารบัญ (ต่อ)

4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1…………………………..52
4.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC23……………………………………………………...56
4.4 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L2…………………………57
4.5 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2…………………………..59
4.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEC120……..……………………………………….63
4.7 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L3…………………………64
4.8 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L3…………………………..66
4.9 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pE16……………………………………………………70
4.10 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L4………..………………71
4.11 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4………..………………73
4.12 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC9……………………………………………….77
4.13 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R1………………………..78

สารบัญ (ต่อ)

4.14 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1……………………….....80

4.15 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEBR25……………………………………………...84

4.16 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R2………………………...85

4.17 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R2………………………...87

4.18 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHE54………………………………………………91

4.19 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่สร้างขึ้นของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1………………………………………92

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง……………………………………………………………103

รายการอ้างอิง………………………………………………………………………………116

ภาคผนวก...125

ภาคผนวก ก…………………………………………………………………… 126

ภาคผนวก ข…………………………………………………………………… 127

ภาคผนวก ค……………………………………………………………………137

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์…………………………………………………………………142

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หน้าที่และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545)…………22
3.1 แบคทีเรีย…………………………………………………………………………..……….26
3.2 พลาสมิด…………………………………………………………………………..……….26
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์...27
3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว…………………….31
3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก..32
4.1 ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง.....................93

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธิลีน...1

2.1 วิถีการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)……………………………5

2.2 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)…………………………………………………………6

2.3 การเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (Yen และ Serdar, 1988) ……………………7

2.4 วิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย...9

2.5 วิถีล่างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย...11

2.6 วิถีการย่อยสลายกรดเบนโซอิก (Harwood และคณะ, 1994)………………………………12

2.7 การเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในส่วนวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003).........................13

2.8 กลุ่มยีนอื่นที่มีการเรียงตัวไม่เหมือนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nag phn phd* และ *nid* ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)..15

2.9 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ ก) *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (Selifonov และคณะ, 1996) และ ข) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์, 2545)………………………………………………………………………………18

2.10 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรีย 1) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Schocken และ Gibson, 1984) 3) *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) 4) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) 5) *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 6) *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (Selifonov และคณะ, 1996) 7) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์, 2545)…………………………………………….20

3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนโดยวิธี Capillary transfer……………………………………………………….....35

3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน..35

สารบัญรูป (ต่อ)

4.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L1……………………………………………..50
4.2 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1……………………………………………………………………………………51
4.3 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตามL1……………………………..……………..53
4.4 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม C3..........54
4.5 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pC23 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก…….…………………………..55
4.6 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC23 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว……………………………………………..…….56
4.7 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC23 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L2……………………………………...57
4.8 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2……………………………………………………………………………………58
4.9 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2…….………………………………………..60
4.10 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม F1……..61
4.11 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pEC120 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก...62
4.12 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEC120 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว...63
4.13 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEC120 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L3……………………………………..64

สารบัญรูป (ต่อ)

4.14 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L3……………………………………………………………………………………………65

4.15 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L3……………..……………………..…………………67

4.16 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D3……..68

4.17 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pE16 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก.................……………………………69

4.18 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pE16 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว..............................…………………………70

4.19 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pE16 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L4………………………………………71

4.20 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4…………………………………………………………………………………..72

4.21 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4…………………...………………………74

4.22 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม B3……..75

4.23 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pC9 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก...76

4.24 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC9 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว...77

4.25 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม R1……………………………………..78

สารบัญรูป (ต่อ)

4.26 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1………………………………………………………..…………79

4.27 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1…………………………………………...81

4.28 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D5…..…82

4.29 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pEBR25 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก...83

4.30 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEBR25 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว..84

4.31 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม R1……………………………………..85

4.32 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เหมาะสม ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R2……………………………………………………………………..86

4.33 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R2…………………………………………………88

4.34 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D3……..89

4.35 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pHE54 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก...90

4.36 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pHE54 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว...…………………………………91

4.37 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC9, pE16, pEC120, pC23, pWT, pEBR25 และ pHE54 ขนาด 8820 bp………………………………………………………...101

4.38 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิดชนิดต่างๆรวมขนาด 8820 bp...102

5.1 Consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Lisser และ Margalit, 1993)…………….……104

สารบัญรูป (ต่อ)

5.2 การเร่งปฏิกิริยาของ 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซิเลสใน *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ DBO1 (Chang และ Zylstra, 1998)……………………………………………105

5.3 การเร่งปฏิกิริยาของ *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนส ใน *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992)……………………………………………………………105

5.4 การเร่งปฏิกิริยาของไซโคลเฮกซานอลดีไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน Cyclohexanol เป็น Cyclohexanone ในวิถีการย่อยสลายไซโครเฮกซานอลของ *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ SE19 (Cheng และคณะ, 2000)......................................108

5.5 ก) 1. วิถีการย่อยสลายกรดแนพโธอิกของ *Pseudomonas maltophilla* CSV89 (Phale และคณะ, 1995) 2. วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) และกรดเจนทิสิก (Zhou และคณะ, 2001) ข) ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกและยีนที่เกี่ยวข้องของ *Rhizobium* sp. CU-A1…….........110

5.6 ก.) 1. วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) 2. การย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นกรดโปรโตคาทีคูอิกของ *Pseudomonas testosteroni* (Nakasawa และ Hayashi, 1978) 3. การย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นเจนทิสิกของ *Pseudomonas alcaligenes* (Poh และ Bayly, 1980) ข.) ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องของ *Rhizobium* sp. CU-A1……..…………………….....................112

5.7 ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องของ *Rhizobium* sp. CU-A1…..…………………………………………………………………………..114

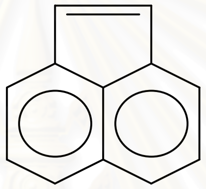
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

สารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster)

อะซีแนพธิลีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพธิลีน

อะซีแนพธิลีนเป็นสารประกอบที่พบในน้ำมันดิบ น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) และส่วนใหญ่เกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Neurath, 1972; Alexander และคณะ, 1985; Volkering และคณะ, 1992) การใช้และทิ้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม การรั่วไหลหรือน้ำทิ้งของระบบอุตสาหกรรมดังกล่าว หรือเกิดจากแหล่งธรรมชาติ เช่น การเผาไหม้ของป่าและทุ่งหญ้า (LaFlamme และ Hites, 1978) และพบในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ถนอมและรักษาเนื้อไม้ (Wilson และ Jones, 1993) ซึ่งกระจายเข้าสู่สิ่งแวดล้อมทั้งทางอากาศ พื้นดินและแหล่งน้ำ (Mattox และ Humenick, 1980) PAHs ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์เนื่องจากบางชนิดมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Keith และ Telliard, 1979) อะซีแนพธิลีนมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อสัตว์น้ำ (Lederer, 1985) ในการทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ส่วนความเป็นพิษในมนุษย์ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ แต่อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจ (Lederer, 1985) นอกจากนี้สารอนุพันธ์บางตัวของอะซีแนพธิลีนสามารถก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ได้ (LaVoie และ Rice, 1988)

การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการบำบัด PAHs โดยใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์มาย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป (Mueller และ คณะ, 1989) ในปัจจุบันมักจะใช้วิธีการบำบัดทางชีวภาพแทนวิธีการดั้งเดิม เช่น การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี หรือ การเผา (incineration) เป็นต้น (Cockson, 1995)

เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและค่าใช้จ่ายต่ำจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดตะกอนและดินที่มีการปนเปื้อน PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย (Sims และคณะ, 1990) และพบจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ PAHs เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโตทั้งสายพันธุ์เดี่ยวหรือกลุ่มประชากรจุลินทรีย์มากขึ้น โดยจากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์สามารถทำให้ความเป็นพิษของ PAHs หมดไปเนื่องจากการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ (mineralization) หรือการลดพิษลงบางส่วนเนื่องจากการเปลี่ยน PAHs ให้เป็นสารอื่น (transformation) (Gibson และ Subramanian, 1984; Cerniglia, 1992)

รายงานวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆที่พบได้แก่ วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 (Ensley และคณะ, 1982; Ensley และ Gibson, 1983; Yen และ Serdar, 1988) ซึ่งเป็นวิถีการย่อยสลายที่มีการศึกษาค่อนข้างสมบูรณ์มากที่สุดและเป็นต้นแบบในการศึกษาวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่นๆ วิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดย *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) วิถีการย่อยสลายแอนทราซีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland และคณะ, 1995) และ *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 (Kim และคณะ, 1997) วิถีการย่อยสลายฟลูออรีนโดย *Arthrobacter* sp. สายพันธุ์ F101 (Merce และคณะ, 1997) วิถีการย่อยสลายฟลูออแรนทรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 (Kelley และคณะ, 1993) วิถีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 (Khan และคณะ, 2001) เป็นต้น

การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมีการศึกษามาเป็นเวลานานแต่รายงานส่วนใหญ่มักรายงานถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชัน เช่น การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันกับอะซีแนพธีนโดยมีไบฟีนิลเป็นตัวเหนี่ยวนำของ *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 พบว่าเกิดการเร่งปฏิกิริยาของไดออกซิจีเนสได้เป็นซิส-1,2-อะซีแนพธีนไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) และอะซีแนพธีนควิโนน (acenaphthenequinone) ตามลำดับ แต่ยังไม่เกิดการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนเพื่อใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ (Schocken และ Gibson, 1984) การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานยังพบไม่มากนักมีเพียงรายงานของ Komatsu และคณะ (1993) ที่รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้และพบกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก (1,8-naphthalene dicarboxylic acid) เป็นสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อ Selifonov และคณะ (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1

(pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยไดออกซิจีเนสเหมือนกับที่เคยพบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้เป็น *ซิส*-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน และกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิกตามลำดับ จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนที่สมบูรณ์โดยจุลินทรีย์รวมทั้งยังไม่มีรายงานถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

ศรัลยา แพงไตร (2543) ได้คัดแยก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานคร นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีนด้วย เพื่อศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของสายพันธุ์นี้ ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) จึงได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* จนได้สายพันธุ์กลายต่างๆ ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ได้นำสายพันธุ์กลาย E11 มาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn*5* เป็นตัวติดตาม จากนั้นสร้างดีเอ็นเอติดตามจากยีนข้างเคียง Tn*5* เมื่อนำไปติดตามใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน คือ *acnE* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 38% และ *acnK* มีลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 46% สอดแทรกอยู่ในพลาสมิด pWT

นอกจากนี้งานวิจัยดังกล่าวยังพบว่ามี 2 ORF ที่ยังไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ คือ ORF1 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) ที่ประมวลรหัสโดย *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ (Cerniglia, 1992) และ ORF5 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดย *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover และคณะ, 2000) ซึ่ง short-chain dehydrogenase อาจเป็นเอนไซม์หนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs (Denome และคณะ, 1993) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหนือขึ้นไปจาก ORF1 หรือถัดลงมาจาก ORF5 โดยอาศัย

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทราบแล้วเป็นตัวติดตามยีนอื่นๆที่อยู่ข้างเคียงด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกและศึกษาลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อประโยชน์ในการทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์ได้ต่อไปในอนาคต

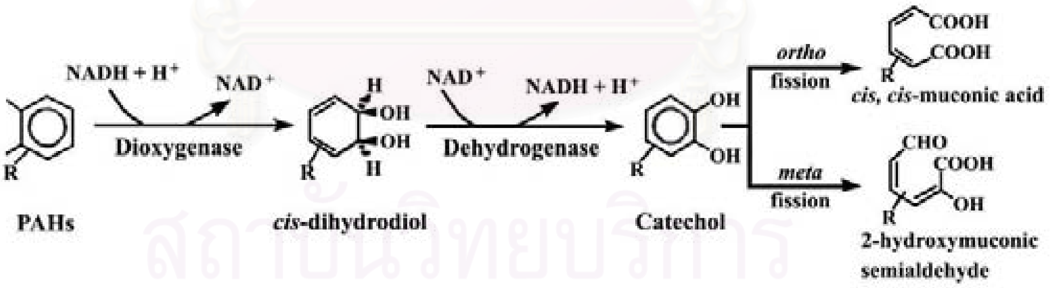
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

การบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) เป็นวิธีที่ใช้จุลินทรีย์บำบัดสารพิษให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไปจากสิ่งแวดล้อม ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวเคมีและพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย PAHs มีความจำเป็นต่อการวิจัยเพื่อให้ได้กระบวนการบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับกระบวนการย่อยสลาย PAHs นั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และไร้อากาศ (anaerobic) แต่เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายในสภาวะไร้อากาศเกิดขึ้นได้ช้า (Harayama, 1997) รายงานส่วนใหญ่จึงมุ่งศึกษากระบวนการย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศ (Cerniglia, 1992)

กระบวนการย่อยสลาย PAHs ในสภาวะที่มีอากาศของแบคทีเรียโดยทั่วไปย่อยสลายผ่านการเร่งปฏิกิริยาโดยระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multi-component dioxygenase) ซึ่งทำหน้าที่เติมออกซิเจน 2 อะตอมให้กับวงอะโรมาติกที่ตำแหน่งพันธะคู่ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล (*cis*-dihydrodiol) จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดย ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ได้เป็นสารอนุพันธ์ประเภทไดไฮดรอกซิล ซึ่งสารมัธยันต์ต่างๆจะถูกย่อยสลายต่อโดยไดออกซิจีเนสผ่านทาง *ortho*-clevage pathway หรือ *meta*-clevage pathway และเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) ต่อไป (Cerniglia,1992; Habe และ Omori, 2003)



รูปที่ 2.1 วิถีการย่อยสลาย PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)

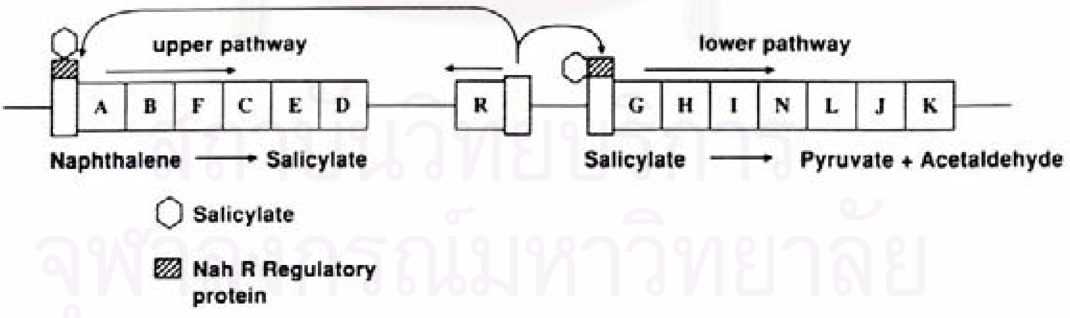
การย่อยสลาย PAHs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกิดได้ง่ายกว่ากลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Bouchez และคณะ, 1995) การศึกษากลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลาย PAHs ในระดับพันธุศาสตร์จึงมีความสำคัญต่อการนำไปใช้เป็นข้อมูลในการทำนายวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดต่างๆ รวมทั้งสามารถนำข้อมูลที่ได้มาปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการบำบัด PAHs ออกจากสิ่งแวดล้อม

2.1 กระบวนการย่อยสลาย PAHs โดยวิธีทางชีวภาพและยีนที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การย่อยสลายแนพธาลีน

แนพธาลีนเป็นสารที่มีโครงสร้างง่าย โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง มาเชื่อมต่อกัน จึงมักใช้เป็นตัวแทนหรือต้นแบบในการศึกษาวิถีการย่อยสลายรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลาย PAHs ชนิดอื่น จากรายงานเริ่มแรกของ Davies และ Evans (1964) ที่กล่าวถึงการย่อยสลายแนพธาลีนโดย Pseudomonads และรายงานของ Yen และ Serdar (1988) ที่รายงานว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีความสามารถในการย่อยสลายแนพธาลีน จึงทำให้มีการศึกษาวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas putida* (Eaton และ Chapman, 1992) เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาการย่อยสลาย PAHs ด้วยจุลินทรีย์อื่นอย่างกว้างขวาง

Yen และ Gunsalus (1982) รายงานว่า *P. putida* สายพันธุ์ G7 มีพลาสมิด NAH7 ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน การจัดเรียงตัวของยีนในพลาสมิด NAH7 นี้แบ่งออกเป็น 2 โอเปอรอน (operon) คือ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ประมวลรหัสเอนไซม์ในส่วนวิถีบน (upper pathway) ทำหน้าที่ในการย่อยแนพธาลีนไปเป็นซาลิไซเลท และโอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGHINLJK* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ในส่วนวิถีล่าง (lower pathway) ทำหน้าที่ในการย่อยซาลิไซเลทผ่านทางคะทีคอลและย่อยสลายต่อจนกระทั่งได้เป็นไพรูเวทและอะซีทัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยมีระบบยีนควบคุม (regulatory genes) คือ *nahR* ที่ควบคุมการทำงานของ 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ได้แก่ ซาลิไซเลท และผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* (Yen และ Gunsalus, 1982; Schell, 1983)

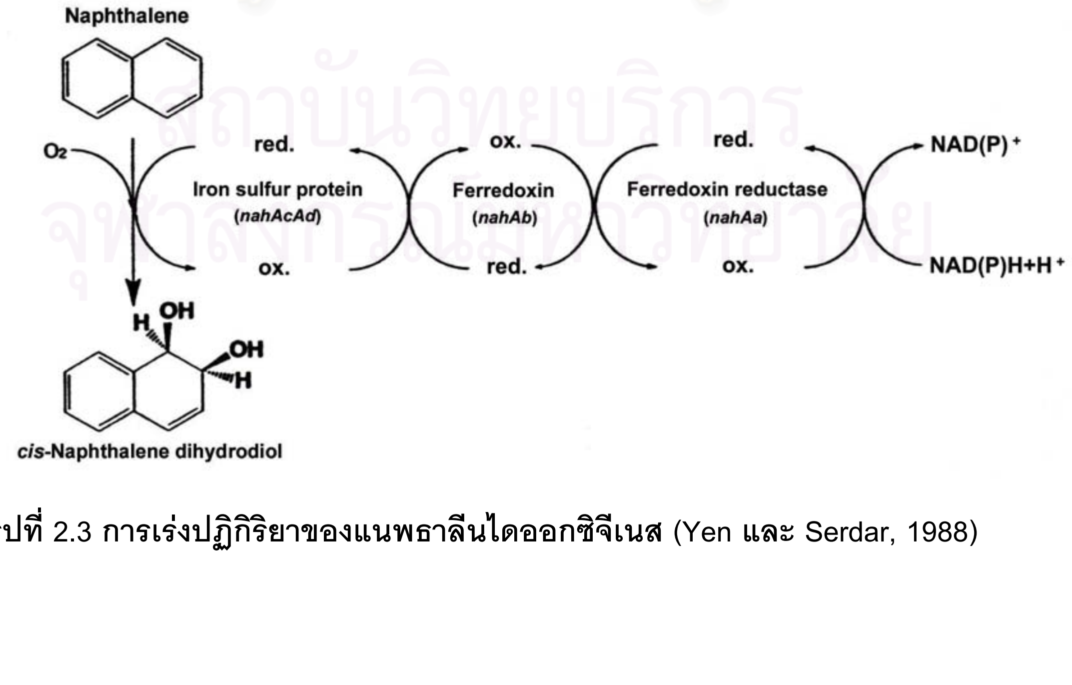


รูปที่ 2.2 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

วิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนของแบคทีเรียโดยทั่วไปมักคล้ายกับการย่อยสลายแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *P. putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Gunsalus, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 Kim และคณะ (1997) รายงานว่าวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 มีความคล้ายคลึงกับการย่อยสลายแนพธาลีนไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดย *P. putida* สายพันธุ์ G7

แนพธาลีนจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมกลายเป็น ซิส-1,2-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-naphthalene dihydrodiol) โดยแนพธาลีนไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในขั้นแรกของปฏิกิริยาการย่อยสลายแนพธาลีนและจัดเป็นเอนไซม์ต้นแบบของไดออกซิจีเนสใน PAHs ชนิดอื่นๆอีกด้วย แนพธาลีนไดออกซิจีเนสประกอบด้วยระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ได้แก่ ferredoxin reductase ferredoxin และ terminal oxidase หรือ Iron Sulfur Protein (ISP) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) โดยพบว่า *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 มียีนที่ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) ได้แก่ *nahAa nahAb nahAc* และ *nahAd* ที่ประมวลรหัส ferredoxin reductase ferredoxin ISP large subunit (α_2) และ ISP small subunit (β_2) ตามลำดับ (Yen และ Serdar, 1988)

การเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสเริ่มจากการส่งผ่านของอีเลคตรอนจาก NADH หรือ NADPH ไปยัง ferredoxin reductase จากนั้นส่งต่อไปยัง ferredoxin และ ISP ตามลำดับ สุดท้าย ISP จะเป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยาโดยตรงด้วยการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าสู่วงเบนซีนของแนพธาลีนเกิดผลิตภัณฑ์ ซิส-1,2-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออล (Ensley และคณะ , 1982; Ensley และ Gibson ,1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

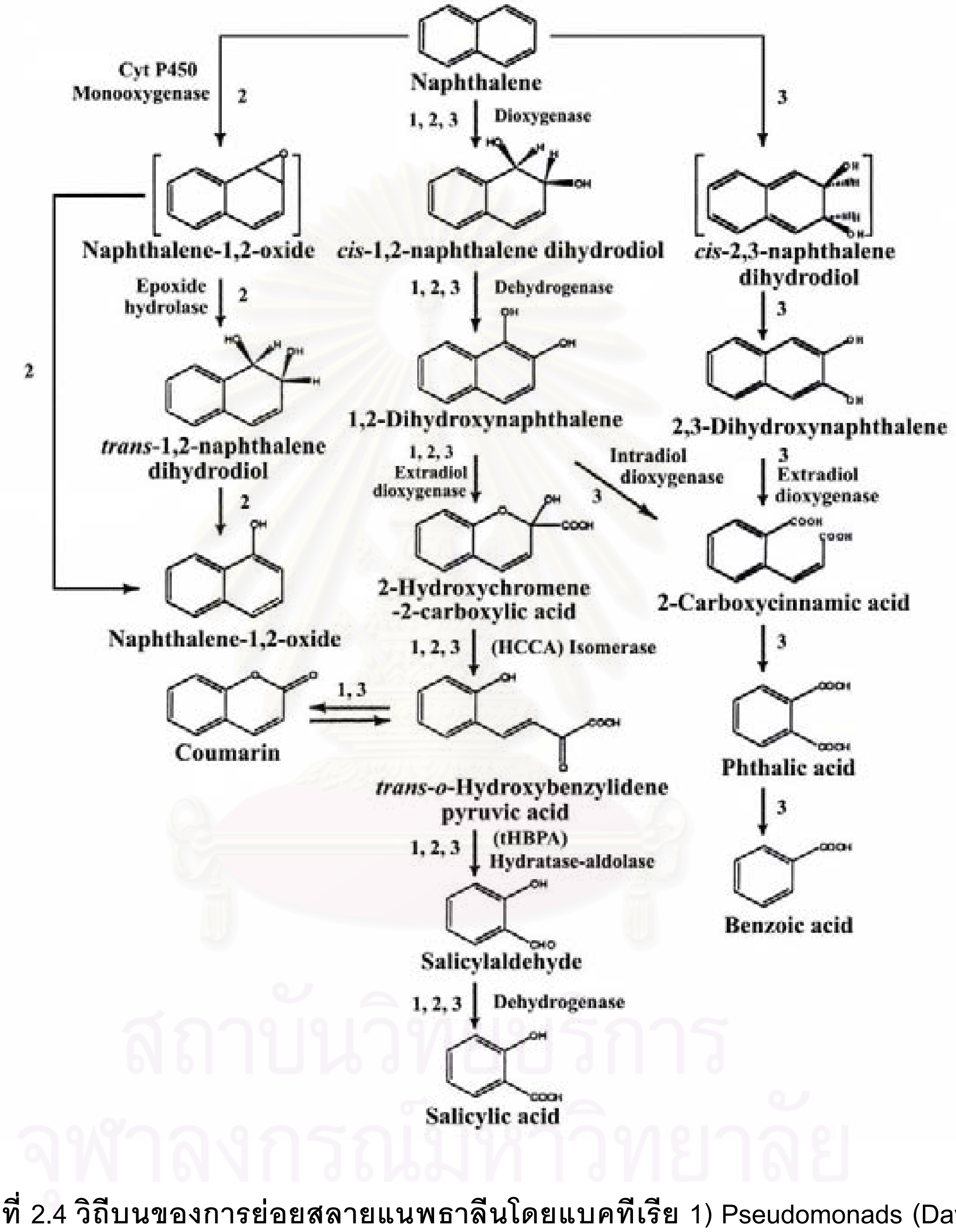


รูปที่ 2.3 **การเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส** (Yen และ Serdar, 1988)

ซิส-1,2-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออลจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยแนพธาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส (naphthalene dihydrodiol dehydrogenase) เพื่อเปลี่ยนไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene) และถูกออกซิไดซ์โดยไดไฮดรอกซีแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (dihydroxynaphthalene dioxygenase) ไปเป็นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid: HCCA) และถูกเปลี่ยนเป็น กรด *ทรานส*-*o*-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvic acid: tHBPA) จากการเร่งปฏิกิริยาโดย HCCAไอโซเมอเรส (HCCA isomerase) จากนั้นเปลี่ยนเป็นซาลิไซรัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) โดยการเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลส (tHBPA hydratase-aldolase) และซาลิไซรัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (salicylaldehyde dehydrogenase) ตามลำดับ (Eaton และ Chapman, 1992)

นอกจากนี้แนพธาลีนยังอาจย่อยสลายโดยผ่านทางวิถีอื่นที่ไม่ใช่กรดซาลิไซลิก เช่น *Mycobacterium* sp. สามารถย่อยสลายแนพธาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิจีเนชัน (mono oxygenation) และไดออกซิจีเนชัน (dioxygenation) ได้สารมัธยันต์ *ทรานส*-1,2-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออล (*trans*-1,2 naphthalene dihydrodiol) และ *ซิส*-1,2-แนพธาลีนไดไฮโดรไดออล (*cis*-1,2-naphthalene dihydrodiol) ตามลำดับ (Kelly และคณะ,1990)

Annweiler และคณะ (2000) รายงานว่า *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ Humburg 2 สามารถย่อยสลายแนพธาลีนได้ทั้งแบบโมโนออกซิจีเนชัน (monooxygenation) และไดออกซิจีเนชัน (dioxygenation) แบคทีเรียสายพันธุ์นี้นอกจากจะสามารถย่อยสลายแนพธาลีนแบบไดออกซิจีเนชัน (dioxygenation) ผ่านกรดซาลิไซลิกเช่นเดียวกับ *P. putida* สายพันธุ์ G7 แล้วยังสามารถย่อยสลายแนพธาลีนในวิถีอื่นที่ต่างออกไปได้อีกโดยรายงานพบว่า *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ Humburg 2 สามารถย่อยสลายแนพธาลีนผ่าน 2,3-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีน (2,3-dihydroxynaphthalene) กรด 2-คาร์บอกซีซินนามิก (2-carboxycinnamic acid) กรดพธาลิก (phthalic acid) และกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 2.4)

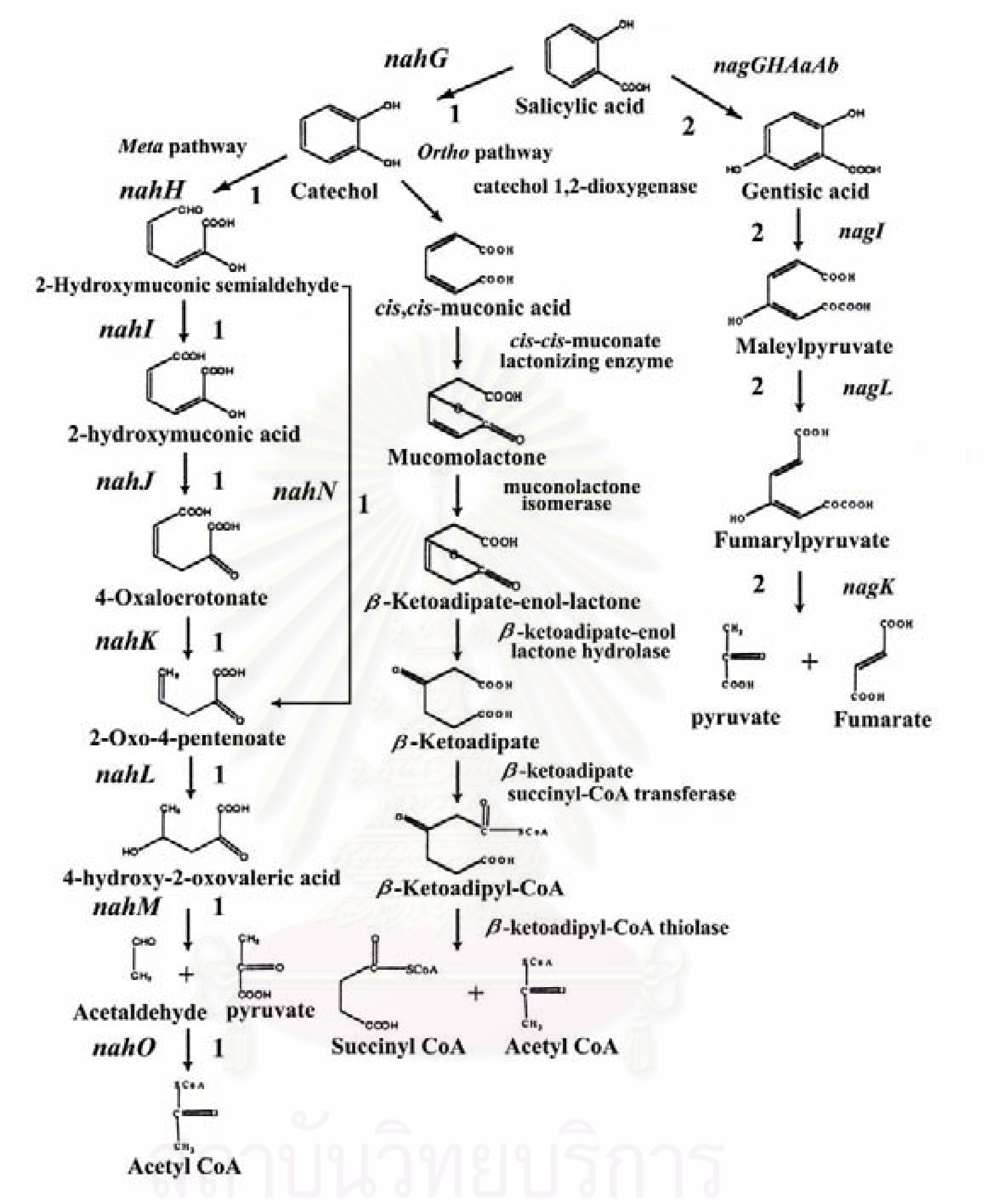


รูปที่ 2.4 **วิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย** 1) Pseudomonads (Davies **และ** Evans, 1964; Yen **และ** Gunsalus, 1982) 2) *Mycobacterium* sp. (Kelley **และคณะ**, 1990) 3) *Bacillus thermoleovorans* **สายพันธุ์** Humberg 2 (Annweiler **และคณะ**, 2000)

วิถีล่างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักจะเปลี่ยนกรดซาลิไซลิกไปเป็นคะทีคอล (catechol) โดยการเร่งปฏิกิริยาของซาลิไซเลทไฮดรอกซีเลส (salicylate hydroxylase) เพื่อแตกวงเบนซีนผ่าน *meta* cleavage pathway กรดซาลิไซลิกจะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดย คะทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส (catechol-2,3-dioxygenase) ได้เป็น 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิคเซมิอัลดีไฮด์ (2-hydroxymuconic semialdehyde) และถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดยไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase) 4-ออกซาโลโครโตเนทไอโซเมอร์เรส (4-oxalocrotonate isomerase) 4-ออกซาโลโครโตเนทดีคาร์บอกซิเลส(4-oxalocrotonate decarboxylase) ได้เป็นกรด 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิก (2-hydroxymuconic acid) กรด 4-ออกซาโลโครโตนิก (oxalocrotonic acid) และกรด 2-ออกโซ-4-เพนทีโนอิก (2-oxo-4-pentenoic acid) ตามลำดับ หรือ 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิคเซมิอัลดีไฮด์อาจจะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดยไฮดรอกซีมิวโครนิกเซมิอัลดีไฮด์ไฮโดรเลส (hydroxymuconic semialdehydehydrolase) ได้เป็น 2-ออกโซ-4-เพนทีโนเอท (2-oxo-4-pentenoate) จากนั้นถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดย 2-ออกโซเพนท์-4-อีโนเอทไฮดราเทส (2-oxopent-4-enoate hydratase) และ 2-ออกโซ-4-ไฮดรอกซีเพนทาโนเอทอัลโดเลส (2-oxo-4-hydroxypentanoate aldolase) ได้เป็นกรด 4-ไฮดรอกซี-2-ออกโซวาลีริก (4-hydroxy-2-oxovaleric acid) และอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ตามลำดับ อะซีทัลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีทิลโคเอ (acetyl CoA) โดยอะซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) และเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป (Yen และ Gunsalus, 1982)

นอกจากนี้คะทีคอลยังอาจแตกวงเบนซีนโดยผ่าน *ortho* clevage pathway และเข้าสู่วิถี β-คีโตแอดิเพธ (β-ketoadipate pathway) จนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น ซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) และอะซิทิลโคเอ (acetyl CoA) โดยใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาและเกิดสารมัธยันต์ต่างๆดังแสดงในรูปที่ 2.5 (Parke และ Ornston, 1986)

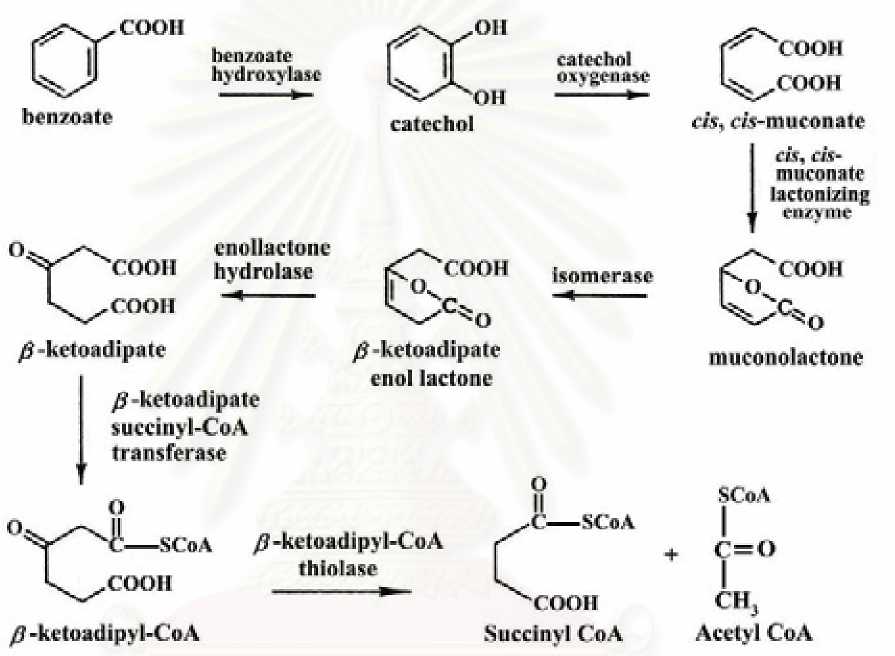
กรดซาลิไซลิกยังอาจย่อยสลายโดยผ่านทางกรดเจนทิสิก เช่น วิถีล่างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดย *Pseudomonas fluorescens* (Starovoitov, 1975) การย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ TA-2 (Ohmoto และคณะ, 1991) *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ B4 (Grund และคณะ, 1992) และ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) เป็นต้น กรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นมาเลอิลไพรูเวท (maleylpyruvate) โดยเจนทิเสท-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทและฟูมาเลท (Zhou และคณะ, 2001) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 วิถีล่างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย 1) Pseudomonads (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) *nahG*: ซาลิไซเลทไฮดรอกซีเลส *nahH*: คะทีคอล-2,3-ไดออกซีจีเนส *nahI*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส *nahJ*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคเนทดีไฮโดรจีเนส *nahK*: 4-ออกซาโลโครโตเนทดีคาร์บอกซิเลส *nahL*: 2-ออกโซเพนท์-4-อีโนเอทไฮดราเทส *nahM*: 2-ออกโซ-4-ไฮดรอกซีเพนทาโนเอทอัลโดเรส *nahN*: 2-ไฮดรอกซีมิวโคนิกเซมิอัลดีไฮด์ไฮโดรเลส *nahO*: อะซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) *nagGHAaAb*: ซาลิไซเลท 5-ไฮดรอกซิเลส *nagI*: เจนทิเสท-1,2-ไดออกซิจีเนส *nagL*: มาเลอิลไพรูเวทไอโซเมอเรส *nagK*: ฟูมาริลไพรูเวทไฮโดรเลส

แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายแนพธาลีนผ่านสารมัธยันต์อื่นที่ไม่ใช่กรดซาลิไซลิก โดยย่อยสลายแนพธาลีนผ่านกรดพธาลิกได้เป็นกรดเบนโซอิก เช่น *Bacillus thermoleovorans* สายพันธุ์ Humburge 2 (Annweiler และคณะ, 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

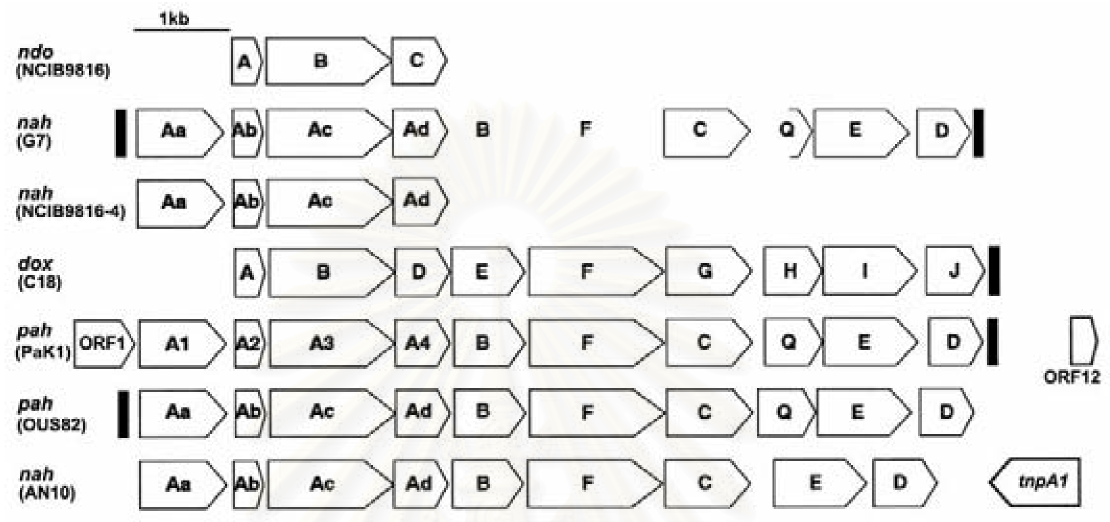
การย่อยสลายกรดเบนโซอิกซึ่งมีสมบัติเป็นสารอะโรมาติกนั้น พบว่าแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PRS200 สามารถย่อยสลายกรดเบนโซอิกเป็นคะทีคอล จากนั้นคะทีคอลถูกย่อยสลายผ่านวิถี β-คีโตแอดิเพธจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) และอะซิทิลโคเอ (acetyl CoA) (Harwood และคณะ, 1994) (แสดงดังรูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 วิถีการย่อยสลายกรดเบนโซอิก (Harwood **และคณะ**, 1994)

การศึกษาวิถีการย่อยสลาย PAHs ในระดับพันธุศาสตร์นั้น ส่วนใหญ่มักรายงานถึง *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆที่ย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น แนพธาลีนและฟีแนนทรีน การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคล้ายกับ *nah* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และคณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ายีนกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ตัวอย่างยีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ *ndo* ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988) *dox* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไดเบนโซไทโอฟีนและแนพธาลีนในวิถีบนของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *pah* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนและแนพธาลีนของ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1999) และ *P. putida* สายพันธุ์

OUS82 (Takizawa และคณะ, 1994) และ *nah* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993) และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999a) เป็นต้น ตัวอย่างการเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีน แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในส่วนวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆได้แก่ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816, *P. putida* สายพันธุ์ G7, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

Kurkela และคณะ (1988) รายงานว่าพลาสมิด pWW60-1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 มี *ndo* (*ndoABC*) ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสในส่วน เฟอร์รีดอกซิน ISP large subunit และ small subunit ตามลำดับและอยู่รวมกันเป็นกลุ่มซึ่งคล้ายกับ *nahAbAcAd* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และถึงแม้จะขาดส่วนที่ประมวลรหัสเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*nahAa*) การเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสก็ยังคงปกติแสดงว่าอาจจะมีการทดแทนการทำงานของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสส่วนที่ขาดหายไปในการส่งผ่านของอีเลคตรอนจาก NADH หรือ NADPH ไปยังเฟอร์รีดอกซินด้วยเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสที่ไม่จำเพาะภายในเซลล์เจ้าบ้าน

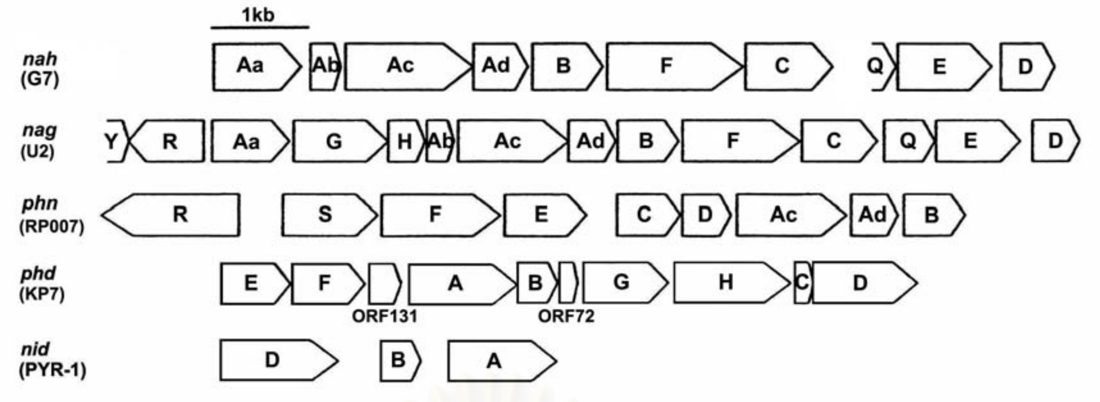
Simon และคณะ (1993) รายงานว่าพลาสมิด pDTG1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 มี *nahAaAbAcAd* ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายกับ *nahAaAbAcAd* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ *ndoABC* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 และพบว่าการเร่งปฏิกิริยาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสยังคงปกติแม้จะมีเพียง *nahAcAd* ที่ประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสในส่วน ISP large subunit และ small subunit ตามลำดับ

Denome และคณะ (1993) รายงานว่าพลาสมิดของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18 มี *dox* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไดเบนโซไทโอฟีนและแนพธาลีนในส่วนวิถีบน มีการจัดเรียงตัวของยีนเป็นกลุ่มคล้ายกับ *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 คือ *doxABDEFGHIJ* และพบว่า *doxABD* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสยังมีความคล้ายกับ *ndoABC* ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 อีกด้วย

Takizawa และคณะ (1994) รายงานว่า *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 มี *pah* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีน มีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มอยู่บนโครโมโซม คือ *pahABFCQED* ซึ่งต่างจาก *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 ที่อยู่บนพลาสมิด NAH7 แต่ *pahA* ยังคงมีความคล้ายกับ *nahA* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และสายพันธุ์ NCIB 9816-4 ค่อนข้างมาก

Bosch และคณะ (1999a, 2000) รายงานว่า *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 มี *nah* ซึ่งประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มอยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วย *nahAaAbAcAdBFCED* ในส่วนวิถีบน และ *nahGTHINLOMKJ* ในส่วนวิถีล่างซึ่งที่มีความคล้ายกับยีนบนพลาสมิด NAH7 และ pWW60-1 ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 และ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 ตามลำดับ

นอกจากการศึกษายีนในกลุ่มคล้าย *nah* แล้วปัจจุบันได้มีรายงานเกี่ยวกับยีนที่แตกต่างจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* เพิ่มขึ้น ได้แก่ *nag* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางเจนทิเสทของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001) *phn* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีนในวิถีบนของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) *phd* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทางพธาเลทของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Saito และคณะ, 2000) และ *nid* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 (Khan และคณะ, 2001) ตามลำดับ ตัวอย่างการเรียงตัวของยีนในกลุ่มนี้แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กลุ่มยีนอื่นที่มีการเรียงตัวไม่เหมือนกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nag phn phd* และ *nid* ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

Romine และคณะ (1999) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199; Takeuchi และคณะ 2001) มีพลาสมิด pNL1 ขนาด 184 กิโลเบส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิด โดยพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิล แนพธาลีน *เมตา*-ไซลีน *พารา*-ครีซอล กระจายอยู่บนพลาสมิด จากการระบุตำแหน่งของยีนต่างๆพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนในระดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 นี้กับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสจากยีนในกลุ่มที่คล้าย *nah* พบว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายแนพธาลีนเป็นซาลิไซเลทได้ แสดงว่ายีนในส่วนวิถีบนที่ขาดหายไปน่าจะเกิดจากการทดแทนการทำงานโดยยีนที่ประมวลรหัสสำหรับเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่น วิถีการย่อยสลายไบฟีนิลที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทอื่นๆที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนในวิถีล่างนั้นไม่พบ *nahG* ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางคะทีคอล แสดงว่าการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วนวิถีล่างของสายพันธุ์นี้อาจจะไม่ผ่านวิถีการย่อยสลายคะทีคอล หรืออาจจะมีการใช้เอนไซม์ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายคะทีคอล

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) รายงานว่า *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 สามารถย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีนได้ มี *phn* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในกลุ่มคล้าย *nah* โดย *phn* มีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มดังนี้ *phnFECDAcAdB* ในขณะที่ยีนในกลุ่มคล้าย *nah* มีการจัดเรียงตัวเป็น *nahAaAbAcAdBFCQED* ตามลำดับ ยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์นี้มีเพียง

phnAcAd ซึ่งประมวลรหัสสำหรับไดออกซิจีเนสในส่วน ISP large subunit และ small subunit แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า PhnB (ดีไฮโดรจีเนส) มีความคล้ายกับดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายไบฟีนิลมากกว่าวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนหรือฟีแนนทรีน ส่วน PhnC จัดอยู่ใน ClassIII extradiol dioxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มใหม่และมียีนควบคุมเป็น *phnR* และ *phnS* แทน *nahR* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7

Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มี *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทางพธาเลท โดย *phd* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายฟีแนนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธาโนเอท ไปเป็นพธาเลท (phthalate)

Khan และคณะ (2001) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน เบนโซ (*เอ*) ไพรีน มี *nid* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* ซึ่งยีนที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์นี้มีเพียง *nidBA* ที่ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสในส่วน ISP small subunit (β_2) และ ISP large subunit (α_2) ตามลำดับ แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า *nidBA* มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60%

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 มี *nag* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนผ่านทางเจนทิเสท จัดเรียงตัวเป็นกลุ่มอยู่บนพลาสมิดโดย *nag* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *nagAaGHAbAc AdBFCQED* ซึ่งคล้ายกับยีนในส่วนวิถีบนของพลาสมิด NAH7 ยกเว้น *nagGH* ที่ประมวลรหัสเป็น ซาลิไซเลท-5-ไฮดรอกซิเลส และบริเวณถัดลงมาจาก *nagD* มียีนอีก 1 กลุ่มที่ประกอบด้วย *nagJIKLMN* ซึ่งประมวลรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายเจนทิเสท โดยคาดว่ายีนทั้งสองกลุ่มจะแปลรหัสร่วมกัน (cotranscribe) เป็นโอเปอรอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

อะซีแนพธิลีนมีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนกว่าแนพธาลีนโดยประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมีรายงานการศึกษามาเป็นเวลานาน ทั้งในแบคทีเรีย รา และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งส่วนมากจะเป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลให้เป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ (transformation) รายงานการย่อยสลายสารอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานยังพบไม่มากนัก

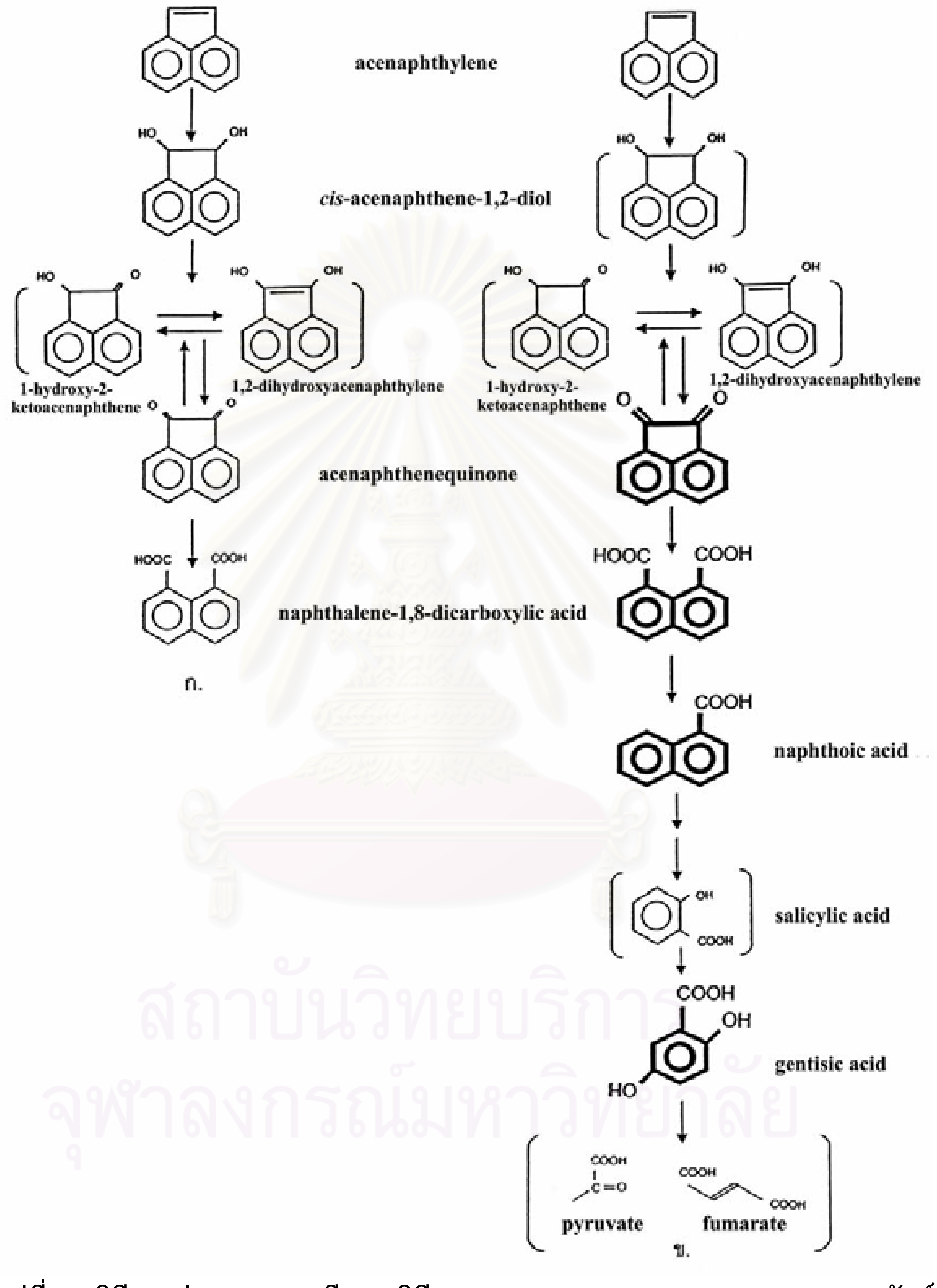
Schocken และ Gibson (1984) รายงานว่า *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไบฟีนิล (biphenyl) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลจากการติดตามการสะสมของสารมัธยันต์โดยมีไบฟีนิลเป็นสารเหนี่ยวนำพบว่ามีการเติมออกซิเจนเข้ายังวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนโดยการเร่งปฏิกิริยาของไดออกซิจีเนส ได้เป็น *ซิส*-1,2-อะซีแนพธีนไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) และอะซีแนพธีนควิโนน (acenaphthenequinone) ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงว่ายังไม่เกิดการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพธิลีนเพื่อใช้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

Komatsu และคณะ (1993) รายงานว่า *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A4 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp.สายพันธุ์ A4; Komatsu, 1994) สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้และพบกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (naphthalene-1,8-dicarboxylic acid) เป็นสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อ

Selifonov และคณะ (1996) ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพธิลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยไดออกซิจีเนสเหมือนกับที่เคยค้นพบแล้วในแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้เป็น *ซิส*-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพธิลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพธีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์ (2545) ศึกษาสารมัธยันต์จากสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่สร้างขึ้นจากการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* พบว่ามีการสะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิสิก) อะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ในสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์แสดงว่าการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนไปจนถึงกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 น่าจะเหมือนกับใน

P. aeruginosa สายพันธุ์ PAO1 โดยได้เสนอไดอะแกรมการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนไว้ดังแสดงในรูปที่ 2.9



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.9 **วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ ก)** *Pseudomonas aeruginosa* **สายพันธุ์** PAO1 (Selifonov **และคณะ**, 1996) **และ ข)** *Rhizobium* sp. **สายพันธุ์** CU-A1 (**ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์**, 2545; Poonthrigpun **และคณะ**, 2003)

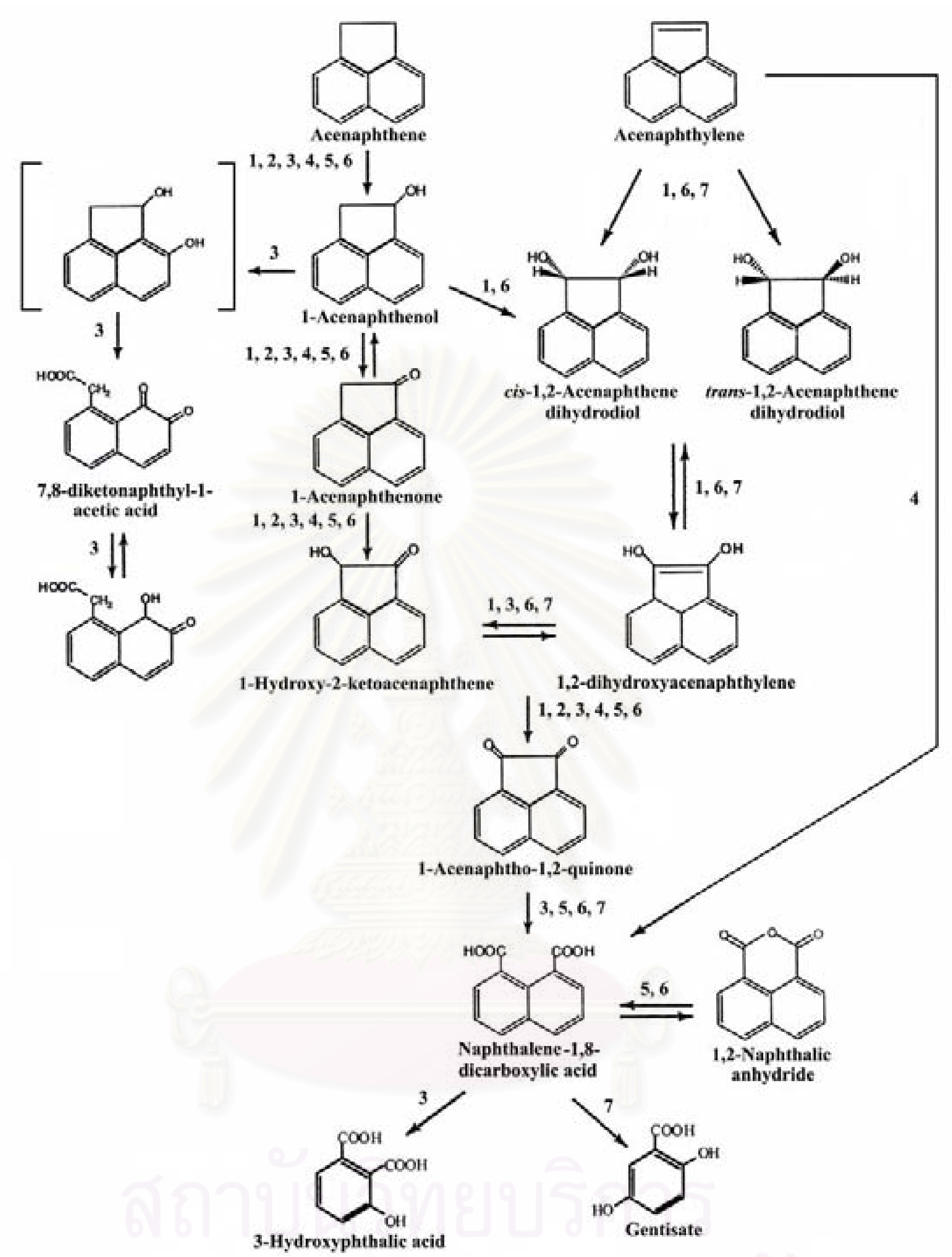
นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการย่อยสลายแบบเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลไปเป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ (Pothuluri และคณะ, 1992) ที่กล่าวว่าการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและอะซีแนพธีนอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่างกันในการย่อยสลายสารตั้งต้น แต่จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายเป็นชนิดเดียวกันคือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และมีบางรายงานที่เสนอว่าการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกของทั้งอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนน่าจะเป็นไปตามวิถีเดียวกัน

Selifonov และคณะ (1993) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ จากการศึกษาสารมัธยันต์พบว่าสามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้เป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก กรด 7,8-ไดคีโตแนพธาลิก (7,8-diketonaphthalic acid) และกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก (3-hydroxy phthalic acid) นอกจากนี้รายงานยังเสนอว่าอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน เหมือนกันโดยการใช้วิถีที่ต่างกัน จากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก ตามลำดับ

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 ที่สามารถย่อยสลายฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ สามารถย่อยอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีนแบบโคออกซิเดชันกับฟลูออรีนได้เป็น 1-อะซีแนพธีนอล (1-acenaphthenol) 1-อะซีแนพธีโนน (1-acenaphthenone) อะซีแนพโธ-1,2-ควิโนน 1,2-แนพธาลิก แอนไฮไดรด์ (1,2-naphthalic anhydride) และกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

จากรายงานที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นอาจสามารถสรุปวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ดังแสดงในรูปที่ 2.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.10 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรีย 1) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Schocken และ Gibson, 1984) 3) *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) 4) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) 5) *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 6) *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (Selifonov และคณะ, 1996) 7) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์, 2545)

2.2 การศึกษายีนและวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

เนื่องจากยังไม่พบรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนที่สมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ รวมทั้งไม่มีรายงานถึงการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) จึงได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยการติดตามทรานสโปซอน Tn*5* ที่แทรกสอดเข้าในจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 ซึ่งมาจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5* (Tn*5* probe) ในสภาวะความเข้มงวดสูง จากนั้นสร้างดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn*5* ขนาด 430 bp เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน (ดีเอ็นเอติดตาม AE หรือ AE-probe) ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ติดตามตำแหน่งของยีนดังกล่าวภายในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม AE ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนที่คล้ายกับกรดอะมิโนของไฮดราเทส-อัลโดเลส จากนั้นทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Hin*dIII ขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส ซึ่งให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม AE เข้าในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่าพลาสมิด pWT ภายหลังจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในพลาสมิด pWT แล้ว เมื่อนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบหาความเหมือนกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX และหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีนรวมถึงตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 5 กรอบ แสดงในตารางที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หน้าที่และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545)

ORF	**ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุด** และ GenBank Accession No.	**ความเหมือนกับกรดอะมิโนของยีนอ้างอิง** (%)	**ประมวลรหัสเอนไซม์**
ORF1*	*mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998): AAC31188	33%	putative ferredoxin reductase
acnE	*phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999): AAD09869	38%	hydratase-aldolase
acnK	*phdK* ของ *Nocardioides* sp. KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997): BAA31236	46%	2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase
ORF4	ORF ที่ประมวลรหัส adducin-like protein ของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko และคณะ, 2000): NP_107234	38%	adducin-like protein
ORF5*	*yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Stover และคณะ, 2000): NP_250340	43%	short-chain dehydrogenase

* ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยังไม่สมบูรณ์

จากงานวิจัยของทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนคือ *acnE* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลสที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 และ *acnK* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 สอดแทรกอยู่ในพลาสมิด pWT งานวิจัยดังกล่าวนี้พบว่ามี 2 ORF ที่ยังไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ คือ ORF1 และ ORF5 และยังไม่มีข้อมูลของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เหนือขึ้นไปจาก ORF1 หรือถัดลงมาจาก ORF5 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทราบแล้วเป็นตัวติดตามยีนอื่นๆที่อยู่ข้างเคียงด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้เพื่อทราบข้อมูลทางพันธุศาสตร์และความสัมพันธ์กับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน รวมทั้งนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany.
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ รุ่น AG285 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland.
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น SORVALL® Biofuge pico ของบริษัท Kendro laboratory Products, Germany.
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany
13. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
14. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA
15. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
16. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.

17. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan
18. ไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ของบริษัท Pall Bio Support, USA.
19. ถุงไดแอลิซิส รุ่น Cellu Sep $_{TM}$ T3 ของบริษัท Membrane Filtration Products, USA.
20. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polariod, USA.
    - แผ่นกรองแสงสีแดง
    - ฟิล์มโพลารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
21. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis equipment)
    - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
    - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
22. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70 ^{O}ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific , USA.
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20 ^{O}ซ รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUAI, Japan.
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
6. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท Merck, Germany.
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ของบริษัท BHD Limited Pool, England.
9. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 . 2H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, France
10. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
11. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.

12. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
13. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท TCI-EP, Japan.
14. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
15. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
16. น้ำตาลกลูโคส (glucrose) ของบริษัท Merck, Germany.
17. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.
18. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) ของบริษัท Fluka, Germany.
19. 1 kb DNA ladder ของบริษัท Promega, USA.หรือ ของบริษัท NewEngland Biolabs, USA.
20. ไลเกส (ligase) ของบริษัท Promega, USA.
21. อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ของบริษัท Promega, USA.
22. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
23. เรสทริกชันเอนไซม์ทุกชนิดของบริษัท Promega, USA.
24. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
25. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
26. ชุดติดฉลากและติดตามตำแหน่งดีเอ็นเอ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I ของบริษัท Roche, Germany.
27. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
28. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
29. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ของบริษัท Promega, USA.
30. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ของบริษัท Wako, Japan.

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
E. coli สายพันธุ์ DH5α	φ80d*lacZ*ΔM15, *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *relA*1, *supE*44, *deoR*, Δ(*lacZYA-rgF*)U169	Hanahan, 1983
Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีน	ศรัลยา แพงไตร, 2543

3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pBluescript KS(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-5Zf(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-11Zf(+/-)	Ap^r, ∝lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pWT	Ap^r มีชิ้นส่วน *Bam*HI-*Hin*dIII จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 4.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545
pC23	Ap^r มีชิ้นส่วน *Nco*I จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 2.3 kb ในพลาสมิด pGEM-5Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.2 พลาสมิด (ต่อ)

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
pEC120	Ap^r มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Cla*I จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 1.2 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pEBR25	Ap^r มีชิ้นส่วน *Eco*RI-*Bam*HI จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 1.2 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pHE54	Ap^r มีชิ้นส่วน *Hin*dIII-*Eco*RI จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 0.7 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pE16	Ap^r มีชิ้นส่วน *Eco*RI จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 1.6 kb ในพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-)	สร้างในการทดลองนี้
pC9	Ap^r มีชิ้นส่วน *Cla*I จากดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาดประมาณ 0.9 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในการทดลองนี้

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
T7	5’-TAATACGACTCACTATAGGG-3’ (56°ซ)	Promega, USA
SP6	5’-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3’ (50°ซ)	Promega, USA
T3	5’-ATTAACCCTCACTAAAG-3’ (48°ซ)	Stratagene, USA
C23	5’-GAGTGCGTGCATCCAGT-3’ (54°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
L1	5’-TCCAGGCCGATCAGTCC-3’ (56°ซ)	สร้างในการทดลองนี้
L2	5’-AACTCAATCGATGACAG-3’ (48°ซ)	สร้างในการทดลองนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ (ต่อ)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (T_m)	เอกสารอ้างอิง
L3	5'-AGCCTTTATGGCCGCCA-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
L4	5'-TGACGCTTCTGACCAGC-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
L5	5'-GAGCTTGGCGTGCAGGT-3' (56 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
R1	5'-GACCGCAATGTCGCTGG-3' (56 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
R2	5'-CACCATCAAGACGCCGT-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
E16_FW1	5'-TGAATGTCCCTGCGGAT-3' (52 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
PR1	5'-CGTCAGTGCCATGGGTT-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
PR2	5'-CTCGGCAGCATCTGCAT-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
REV1	5'-TCGATATGATGGGTGAG-3' (50 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
REV2	5'-ATGGCACTGACGCTGGA-3' (54 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
C9_REV1	5'-GCACTTGCGGACGCACA-3' (56 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้
C9_FW1	5'-GGAACGTGCGGGATGGA-3' (56 ^{O}ซ)	สร้างในการทดลองนี้

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Escherichia coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ข2) ใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ แอมพิซิลิน (Ap) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการทำเป็นอาหารแข็ง เติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}ซ

3.5.2 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{O}ซ ในอาหารแข็งเป็นเวลา 2-3 วันหรือในอาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

3.5.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{O}ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ –70 ^{O}ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.6 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L1

3.6.1. เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L1 (DNA probe)

3.6.1.1 สกัดพลาสมิด pWT

สกัดพลาสมิด pWT (ทิพวรรณ, 2545) ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* DH5α ที่มีพลาสมิด pWT แทรกอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดเป็นตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตรให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ

3.6.1.2 เตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอติดตาม L1

ตัดพลาสมิด pWT ประมาณ 10 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI (Promega, USA) อย่างสมบูรณ์ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

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

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง

จากนั้นทำการแยกพลาสมิดที่ตัดไว้ด้วยอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ซึ่งทำโดยเตรียมอะกาโรสเข้มข้น 0.7-1.0% ซึ่งหลอมในบัฟเฟอร์ 1XTAE เทลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ 1XTAE ให้ท่วมสูงกว่าอะกาโรสเจลเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (ภาคผนวก ข18) ให้ความเข้มข้นของสีเป็น 1 เท่า หยอดดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA ladder) ลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ดังนี้ ชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ หรือชุดทำอีเลคโทรโฟเรซิส Mupid-2 ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนสุดขอบอะกาโรสเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข25) เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

แยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 bp ออกจากอะกาโรสเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข5) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ นำชิ้นเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดีเอ็นเอจะติดอยู่ที่แผ่นกรองของคอลัมน์ ทิ้งสารละลายที่ซะผ่านแผ่นกรองท้ายคอลัมน์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงใน QIAquick spin column ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (เพื่อกำจัดอะกาโรสเจลที่ตกค้างอยู่ออกไป) ล้างแผ่นกรองด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง เพื่อให้บัฟเฟอร์ PE ถูกกำจัดออกให้หมดไป ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตรให้ตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บรักษาชิ้นดีเอ็นเอไว้ที่ -20 ^{o}ซ

3.6.1.3 ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี Random labeling

ติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม L1 โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.2 ปริมาตร 16 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอแล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย DIG High Prime (หลอดหมายเลข1) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมเบาๆให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำอุ่น 65 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอติดตามไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

ประมาณปริมาณดีเอ็นเอติดตาม L1 ที่ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ด้วยการเจือจางดีเอ็นเอติดตามใน DNA dilution buffer (หลอดหมายเลข 3) ตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว

หลอดที่ทำการเจือจาง	**ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ ต่อ DNA dilution buffer (μl)**
1. 1 : 100	1/99
2. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 3.3	15/35
3. หลอดที่ 1 เจือจาง 1 : 10	5/45
4. หลอดที่ 2 เจือจาง 1 : 10	5/45
5. หลอดที่ 3 เจือจาง 1 : 10	5/45

หยดสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วหลอด 1-5 อย่างละ 1 ไมโครลิตร ลงบนไนลอนเมมเบรนที่ตัดไว้เป็นแถบยาวเล็กๆ (strip) ทำควบคู่กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยการเจือจางแบบเดียวกับวิธีการข้างต้นแล้วหยดลงบนไนลอนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่ง ทิ้งไว้ให้แห้ง นำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตรเพื่อตรึงดีเอ็นเอให้เกาะติดบนเมมเบรน แล้วนำไปจุ่มในสารละลายแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก

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

บ่มแถบทดสอบดีเอ็นเอในหลอดที่ 5 ในที่มืดจนเกิดจุดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์สีม่วงน้ำเงิน เมื่อจุดสีบนแถบทดสอบขึ้นจนชัดเจนทุกจุดแล้วให้ทำการล้างแถบทดสอบด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง เทียบสีที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยที่ดีเอ็นเอมาตรฐานมีความเข้มข้นดังนี้ 50, 15, 5, 1.5, 0.5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

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

3.6.2.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข8) ปริมาตร 576 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติม 10% SDS (ภาคผนวก ข9) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข20) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของโปรตีเนสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl (ภาคผนวก ข16)

ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข24) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 0.7-0.8 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ (ระวังอย่าให้ติดส่วนตะกอนไปด้วย) จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข23) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโปรพานอลปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนกระทั่งตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของไอโซโปรพานอลทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยเอธานอลจนแห้ง ละลายยตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข21) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ

3.6.2.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

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

คำนวณหาความความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260}x 50 x dilution factor

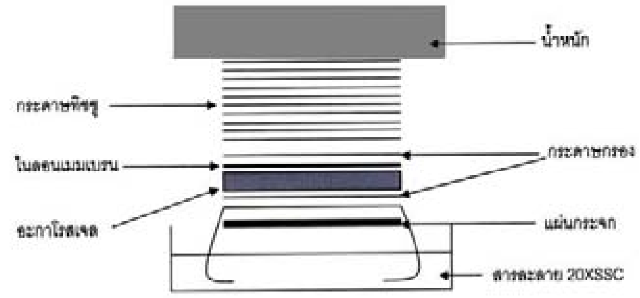
3.6.2.3 ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

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

3.6.2.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot)

นำดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆจากข้อ 3.6.2.3 มาทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิสเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder และใช้พลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Eco*RI เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) จากนั้นทำการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วถ่ายภาพเก็บไว้โดยใช้ไม้บรรทัดแนบด้านข้างอะกาโรสเจลเพื่อระบุระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ เตรียมอะกาโรสเจลเพื่อทำการถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยล้างชิ้นอะกาโรสเจลด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ในกล่องพลาสติก โดยให้สารละลายท่วมอะกาโรสเจลเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม denaturation buffer (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หรือเติมให้ท่วมอะกาโรสเจล เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเติม neutralization buffer (ภาคผนวก ข7) เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

ถ่ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยการวัดขนาดของชิ้นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ กำหนดขนาด A คือขนาดเท่ากับขนาดของแผ่นอะกาโรสเจล ขนาด B คือขนาดความกว้างเท่ากับด้านกว้างของอะกาโรสเจลแต่ความยาวจะยาวกว่าด้านยาวของอะกาโรสเจล ตัดไนลอนเมมเบรนให้มีขนาด A จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด A จำนวน 2 แผ่น และขนาด B จำนวน 1 แผ่น ตัดกระดาษทิชชูให้มีขนาด A เพื่อใช้เป็น paper towel สูงประมาณ 5 เซนติเมตร การจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนแสดงดังรูปที่ 3.1 โดยเริ่มจากการเติม 20XSSC (ภาคผนวก ข10) ซึ่งเป็น transfer buffer ลงในกล่องพลาสติกปริมาตรพอประมาณ นำกระดาษกรองขนาด B ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC วางพาดบนแผ่นกระจก โดยให้ปลายทั้งสองข้างของกระดาษกรองแช่ในบัฟเฟอร์เพื่อเป็นสะพานให้ 20XSSC เคลื่อนที่ขึ้นมา จากนั้นวางกระดาษกรองขนาด A ที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ซ้อนขึ้นด้านบน แล้วนำอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงด้านบนในลักษณะที่คว่ำหน้าเจลลงด้านล่าง วางไนลอนเมมเบรนที่อิ่มตัวด้วย 20XSSC ลงบนเจล ต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในแต่ละชั้น จากนั้นจึงวางกระดาษกรองขนาด A แล้ววางชั้นของกระดาษทิชชูและน้ำหนักกดด้านบน ตามลำดับ ทำการยึดชั้นต่างๆให้มั่นคงด้วยกระดาษกาว และระวังไม่ให้ชั้นทิชชูแตะโดนอะกาโรสเจลหรือกระดาษกรองด้านล่าง ตั้งทิ้งไว้ให้บัฟเฟอร์เคลื่อนที่ขึ้นมาเป็นเวลาข้ามคืน

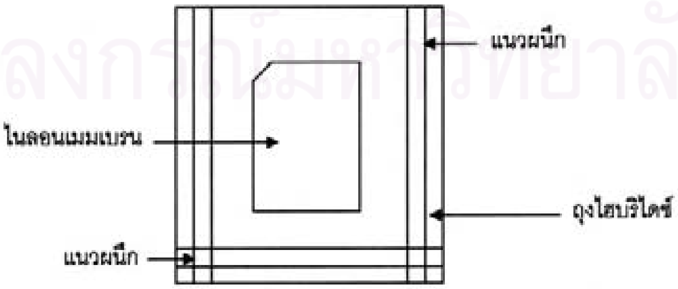


รูปที่ 3.1 **แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนโดยวิธี** Capillary transfer

ภายหลังจากการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน ยกชั้นกระดาษที่อยู่เหนือไนลอนเมมเบรนออก แล้วใช้กรรไกรที่สะอาดตัดที่มุมด้านหนึ่งเพื่อเป็นการบ่งบอกถึงด้านของไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเออยู่ นำไนลอนเมมเบรนมาใส่ในกล่องล้างด้วย 2XSSC (ภาคผนวก ข11) โดยการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปซับให้แห้งและทำการตรึงดีเอ็นเอให้ติดบนไนลอนเมมเบรนโดยการนำไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลต 3 นาที เก็บไนลอนเมมเบรนไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.6.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอมาใส่ถุงพลาสติกสำหรับไฮบริไดเซชันและผนึกด้านข้างให้สนิทด้วยเครื่องผนึกที่ใช้ความร้อนดังรูปที่ 3.2 เติมสารละลาย DIG Easy Hyb (ภาคผนวก ข4) ซึ่งทำการอุ่นไว้ที่อุณหภูมิที่จะทำไฮบริไดเซชัน (อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเซนติเมตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด จากนั้นผนึกปิดให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที



รูปที่ 3.2 **ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน**

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอติดตาม L1 สำหรับการไฮบริไดซ์ โดยเติมดีเอ็นเอติดตาม L1 ในสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร (ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อสารละลาย DIG Easy Hyb ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ที่บรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว (falcon tube) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อดีเนเจอร์สายดีเอ็นเอติดตาม ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิไฮบริไดซ์

เมื่อทำพรีไฮบริไดเซชันเสร็จแล้วตัดถุงพลาสติกออก เทสารละลาย DIG Easy Hyb ทิ้ง แล้วย้ายเมมเบรนมาที่ถุงพลาสติกใบใหม่ จากนั้นทำการผนึกด้านข้างถุงตามวิธีเดิม เทสารละลายดีเอ็นเอติดตาม L1 ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไป ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิดผนึกด้านบน 2 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ ด้วยการเขย่าเบาๆ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) สารละลายดีเอ็นเอติดตามที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้งด้วยการเก็บรักษาในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ เมื่อนำมาใช้ในครั้งต่อไปให้เติมดีเอ็นเอติดตามเพิ่มอีก 2-3 ไมโครลิตร และก่อนใช้ต้องทำการดีเนเจอร์ดีเอ็นเอติดตามที่อุณหภูมิ 68 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที (ระวังอย่าต้มจนเดือดเพราะสารละลาย DIG Easy Hyb จะเสียสภาพ)

เมื่อเสร็จสิ้นไฮบริไดเซชันแล้ว นำไนลอนเมมเบรนที่ได้มาล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกโดยการนำมาใส่ในกล่องพลาสติกแล้วล้างดีเอ็นเอติดตามที่จับกับไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย 2XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข13) ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับการเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.5XSSC/0.1%SDS (ภาคผนวก ข12) ที่อุณหภูมิ 68 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง

ตรวจหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ไฮบริไดซ์ได้กับดีเอ็นเอติดตาม L1 ด้วยวิธี Enzyme immunoassay โดยใช้ชุดติดฉลากและติดตามดีเอ็นเอ DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) (ภาคผนวก ข4) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง) เริ่มจากนำไนลอนเมมเบรนที่ล้างดีเอ็นเอติดตามส่วนเกินออกแล้วมาล้างด้วย maleic acid buffer (ภาคผนวก ข4) ในกล่องพลาสติกโดยใช้ปริมาตรท่วมไนลอนเมมเบรน เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติม blocking solution (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วเติม antibody solution (Anti-DIG-AP conjugate) ที่เตรียมโดยการเจือจาง Anti-DIG-AP conjugate (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใน blocking solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว) (เจือจาง 1 : 5,000) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้าง Anti-DIG-AP conjugate ส่วนเกินออกด้วย maleic acid buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เติม detection buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 5 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเตรียมสับสเตรท NBT/BCIP (ภาค

ผนวก ข4) โดยเจือจางสารละลายในหลอดที่ 5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวที่หุ้มให้มืด) ย้ายไนลอนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกแล้วติดผนึกด้านข้างเช่นเดียวกับขั้นไฮบริไดซ์ จากนั้นเทสับสเตรทที่เตรียมไว้ลงในถุง ไล่ฟองอากาศออกแล้วผนึกปิดถุง นำไปบ่มในที่มืด (ห้ามเขย่า) ตั้งทิ้งไว้จนกว่าจะเกิดแถบสีชัดเจน (ประมาณ 1 ชั่วโมง – 16 ชั่วโมง) เมื่อเสร็จสิ้นการบ่มกับสับสเตรทแล้วนำเมมเบรนออกจากถุงพลาสติกมาล้างในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เป็นเวลา 10 นาที ซับและตากให้แห้งจึงเก็บใส่ถุง

3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1

3.7.1 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1

ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เตรียมไว้อย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Nco*I ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 นำดีเอ็นเอที่ตัดได้ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม L1 โดยเทียบผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.6.3 จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution (Sambrook และ Russell, 2001) โดยล้างถุงไดแอลิซิสที่ได้เตรียมตามภาคผนวก ข 31 ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปิดปลายข้างหนึ่งของถุงไว้โดยใช้ตัวหนีบ (Clamp) นำอะกาโรสเจลที่ตัดไว้แล้วใส่ลงในถุงไดแอลิซิส เติมบัฟเฟอร์ 1XTAE ที่ปลอดเชื้อปริมาตรไม่เกิน 400 ไมโครลิตร ไล่ฟองอากาศออกจากถุงให้หมดแล้วปิดปลายอีกข้างที่เหลือ จากนั้นทำอีเลคโทรโฟรีซิสชิ้นเจลในบัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ 100 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกจากเจลมาอยู่ที่สารละลาย จากนั้นกลับขั้วไฟฟ้าและทำอีเลคโทรโฟรีซิสซ้ำที่ 200 โวลท์ เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับถุงไดแอลิซิสหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย นำสารละลายที่ได้มาปั่นเพื่อกำจัดเอาเศษอะกาโรสเจลออกที่ 10,000 รอบเป็นเวลา 1 นาที ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 1XTAE สู่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลโดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ

สุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ –70 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหยเอธานอลจนแห้งละลายกลับในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$ซ

3.7.2 สกัดและทำพลาสมิดเวกเตอร์ให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

สกัดพลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) (Promega, USA) จาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Nco*I จากนั้นนำพลาสมิดที่ตัดแล้วมาสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้น ผสมโดยการเขย่าจนกระทั่งสารละลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนพลาสมิดด้วยเอธานอลโดยเติมโซเดียมอะซีเตทค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข19) ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ –20 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 60 นาที หรือ ที่อุณหภูมิ –70 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ระเหยเอธานอลจนแห้ง ละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ด้วยปริมาตรที่เหมาะสม (น้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้นก่อนที่จะทำการสกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์)

3.7.3 การกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์

กำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ เพื่อป้องกันการเชื่อมกันเองของปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกตัดให้เป็นปลายเปิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แล้ว โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยเริ่มจากการเจือจาง Alkaline phosphatase จากหลอดตั้งต้นความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร จากนั้นใช้ส่วนผสมของการเจือจางดังนี้

Alkaline phosphatase 1 หน่วยต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร

10X บัฟเฟอร์ 10 ไมโครลิตร

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 89 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน

(ควรทำการเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้งหรือเก็บรักษาไว้ใช้ได้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ ไม่เกิน 1 สัปดาห์)

จากนั้นเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร) ดังนี้

พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-5Zf(+/-) ที่ตัดด้วย 40 ไมโครลิตร

เอนไซม์ *Nco*I จากข้อ 3.7.2 (ประมาณ 1-5 ไมโครกรัม)

10X บัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร

Alkaline phosphatase 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Alkaline phosphatase ที่เจือจางแล้วความเข้มข้น 0.01 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตรเท่าเดิมลงไปอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์และตกตะกอนด้วยเอธานอลตามขั้นตอนข้อ 3.7.2 ละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ปริมาตรน้อยกว่าปริมาตรเริ่มต้น)

3.7.4 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-5Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์แล้วในข้อ 3.7.3 ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.1 ประมาณ 300 นาโนกรัม 3 ไมโครลิตร

พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-5Zf(+/-) ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I 1 ไมโครลิตร

และกำจัดหมู่ฟอสเฟตตรงปลายพลาสมิดเวกเตอร์แล้ว

ประมาณ 50-200 นาโนกรัม

10X ไลเกชันบัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร

T4 DNA ligase ความเข้มข้น 3 หน่วยต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร

น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 ไมโครลิตร

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดและพลาสมิดเวกเตอร์สามารถแปรผันได้ตามความเหมาะสมของปริมาณดีเอ็นเอ)

3.7.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.4 เข้าสู่ *E. coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด

3.7.5.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT (ภาคผนวก ก3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2YT ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ จนกระทั่ง OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 เตรียมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (เตรียมก่อนใช้และทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) โดยผสมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่ปลอดเชื้อและเย็น ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกฝาเกลียว ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งให้ได้อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่ปลอดเชื้อและเย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อที่เย็นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็งจนกว่าจะใช้ เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า OD_{600} ที่ต้องการให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร ที่เย็น จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์แต่ละหลอด กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30-45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ ที่เย็นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย $MgSO_4/CaCl_2$ แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที หรือมากกว่า แล้วเติมกลีเซอรอลปลอดเชื้อปริมาตร 875 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็นปริมาตรประมาณหลอดละ 100-300 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70 ^{o}ซ

3.7.5.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.7.4 เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 ^{o}ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้จากข้อ 3.7.4 ทั้งหมดลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 ^{o}ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว 2YT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดบรรจุเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

3.7.5.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมีชิ้นยีนที่ต้องการแทรกสอดอยู่ด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russel, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* DH5α ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วจากข้อ 3.7.5.2 นำเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยบนผิวอาหารด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข27) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข28) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไว้ในที่มืด หลังจากเกลี่ยเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลาข้ามคืน

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน โดยคัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทส่วนน้ำใสทิ้งให้หมด นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข26) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข26) ที่เตรียมใหม่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข26) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด 2-3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3-5 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนมาประมาณ 400 ไมโครลิตรแล้วเติมเอธานอล 95 % ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใสกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{o}ซ หนึ่งชั่วโมงหรือที่อุณหภูมิ –70 ^{o}ซ ครึ่งชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนของเอธานอล 95 % ทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง ระเหยเอธานอลจนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{0}ซ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) โดยตีตารางลงบนไนลอนเมมเบรนและระบุตำแหน่งโคลนให้ชัดเจน แช่ไนลอนเมมเบรนในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อเพื่อไล่ฟองอากาศออก ระหว่างนั้นต้มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง นำเมมเบรนออกจากน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เมมเบรนแห้งหมาด จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาหยดลงบนแต่ละช่องที่ระบุตำแหน่งไว้ครั้งละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำจนครบ 3-5 ไมโครลิตร โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pWT เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) และพลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) เมื่อหยดตัวอย่างครบตามต้องการแล้ว นำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรน แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1 ด้วยวิธีตามข้อ 3.6.3 เมื่อได้กลุ่มโคลนที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตามแล้ว นำกลุ่มโคลนมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วนำไปตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่จดจำบริเวณที่โคลน (cloning site) เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดออกจากพลาสมิดเวกเตอร์ จากนั้นนำไปทำ Southern hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1 ตามวิธีการและขั้นตอนที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4

3.8.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L2 จากพลาสมิด pC23 โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pC23 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sph*I-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L3 จากพลาสมิด pEC120 โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pEC120 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L4 จากพลาสมิด pE16 โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pE16 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

3.8.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์

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

3.8.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4

นำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจากข้อ 3.8.2 มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4 ตามขั้นตอนและวิธีการดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3

3.9 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4

3.9.1 ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

เตรียมชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4 ตามวิธีข้อ 3.7 โดยนำดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I *Eco*RI หรือ *Cla*I (สำหรับ L2 L3 และ L4 ตามลำดับ) ไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4 โดยเทียบผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.8.3 สกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีข้อ 3.7.1

เตรียมพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (สำหรับ L2) pGEM-11Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI (สำหรับ L3) หรือ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I (สำหรับ L4) นำไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและทำการสกัดแยกพลาสมิดเวกเตอร์เฉพาะชิ้นใหญ่ออกจากอะกาโรสเจลเพื่อนำมาใช้ในการโคลน ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ที่เตรียมไว้และทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.7.5

3.9.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection ตามวิธีข้อ 3.7.5.3 คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยขั้นตอนลงเชื้อก่อนสกัดพลาสมิดจะทำการผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ตามข้อ 3.7.5.3

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) ตามข้อวิธี 3.7.5.3 โดยหลังจากหยดตัวอย่างครบตามต้องการแล้ว นำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอ

ให้ติดกับเมมเบรน จากนั้นนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4 ตามวิธีข้อ 3.6.3 เมื่อคัดเลือกกลุ่มโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้แล้ว นำมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลน แยกชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดออกจากพลาสมิดเวกเตอร์โดยตัดพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปทำ Southern hybridization กับดีเอ็นเอติดตาม L2 L3 หรือ L4 ตามวิธีข้อ 3.6.3

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่โดยสกัดจาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ หรือใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบางส่วนที่ทราบข้อมูลแล้วก่อนหน้านี้

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกครบถ้วนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาการจัดเรียงตัวของยีน กรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS หาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2

3.11.1 เตรียมดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe)

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม R1 จากพลาสมิด pWT โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pWT ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Hin*dIII อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 825 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม R2 จากพลาสมิด pEBR25 โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pEBR25 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Bam*HI อย่างสมบูรณ์ตามวิธีข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

3.11.2 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สำหรับการไฮบริไดซ์

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

3.11.3 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2

นำไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอจากข้อ 3.11.2 มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2 ตามวิธีข้อ 3.6.3

3.12 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2

3.12.1 ไลเกทชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเข้ายังพลาสมิดเวกเตอร์และทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5α

เตรียมชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2 ตามวิธีข้อ 3.7 โดยนำดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI หรือ *Hin*dIII-*Eco*RI (สำหรับ R1 และ R2 ตามลำดับ) มาทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส ตัดอะกาโรสเจลให้คลุมตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม โดยเทียบผลจากการไฮบริไดซ์ในข้อ 3.11.3 สกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยวิธี Electroelution ตามวิธีข้อ 3.7.1

เตรียมพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI (สำหรับ R1) และ *Hin*dIII-*Eco*RI (สำหรับ R2) นำไปทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและสกัดแยกพลาสมิดเวกเตอร์เฉพาะชิ้นใหญ่ออกจากอะกาโรสเจลเพื่อนำมาใช้ในการโคลน ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ที่เตรียมไว้และทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5α ที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.7.5

3.12.2 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่ด้วยวิธี Blue/White selection ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.5.3 เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยขั้นตอนลงเชื้อก่อนสกัดพลาสมิดจะทำการผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB จำนวน 10 โคลนต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ซ เป็นเวลาข้ามคืน แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และ Russell, 2001) ตามวิธีข้อ 3.7.5.3

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี Dot blot hybridization (Sambrook และ Russell, 2001) ตามวิธีข้อ 3.7.5.3 โดยหลังจากหยดตัวอย่างครบตามต้องการแล้ว นำเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอไปเผยต่อแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 3 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเมมเบรน จากนั้นนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2 ตามวิธีข้อ 3.6.3 เมื่อคัดเลือกกลุ่มโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้แล้ว นำมาสกัดแยกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของแต่ละโคลน แยกชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดออกจากพลาสมิดเวกเตอร์โดยตัดพลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปทำ Southern hybridization กับดีเอ็นเอติดตาม R1 หรือ R2 ตามวิธีข้อ 3.6.3

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกสอดอยู่โดยสกัดจาก *E. coli* DH5α ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์ หรือใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบางส่วนที่ทราบข้อมูลแล้วก่อนหน้านี้

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกครบถ้วนแล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาการจัดเรียงตัวของยีน กรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS หาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่จะเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วจึงนำข้อมูลส่วนที่เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เป็นลำดับกรดอะมิโนของยีนที่มีอยู่ใน GenBank

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

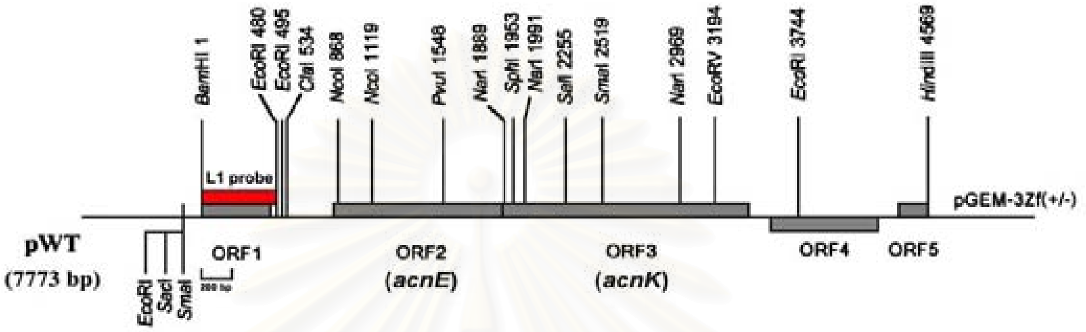
ผลการทดลอง

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน รวมทั้งสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพธีนร่วมกับอะซีแนพธิลีนเพื่อใช้ในการเจริญ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนอินโดล (indole) ไปเป็นอินดิโก (indigo) ได้ (ศรัลยา แพงไตร, 2543) ดังนั้นจึงไม่สามารถคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากสายพันธุ์นี้ด้วยการโคลนยีนโดยวิธีสร้างห้องสมุดยีนแบบ Shot-gun เนื่องจากไม่มีระบบคัดเลือกโคลนที่เหมาะสม ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) จึงได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn*5* โดยวิธีคอนจูเกชันได้สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ได้นำสายพันธุ์กลาย E11 มาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn*5* เป็นตัวติดตาม จากนั้นสร้างดีเอ็นเอติดตามขนาด 430 bp จากยีนข้างเคียง Tn5 ของสายพันธุ์กลาย E11 ตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า ดีเอ็นเอติดตาม AE (AE-probe) เมื่อนำไปติดตามใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pWT ซึ่งมีการเรียงตัวของยีนและแผนที่เรสทริกชันแสดงดังรูปที่ 4.1 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือ *acnE* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลสที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 เท่ากับ 38% และ *acnK* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 เท่ากับ 46%

จากงานวิจัยข้างต้นพบว่ามี 2 ORF ที่ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สมบูรณ์และยังไม่มีข้อมูลของยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหนือขึ้นไปจาก ORF1 หรือถัดลงมาจาก ORF5 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทราบแล้วเป็นตัวติดตามยีนอื่นๆที่อยู่ข้างเคียงด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้

4.1 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L1 ที่สร้างจากพลาสมิด pWT

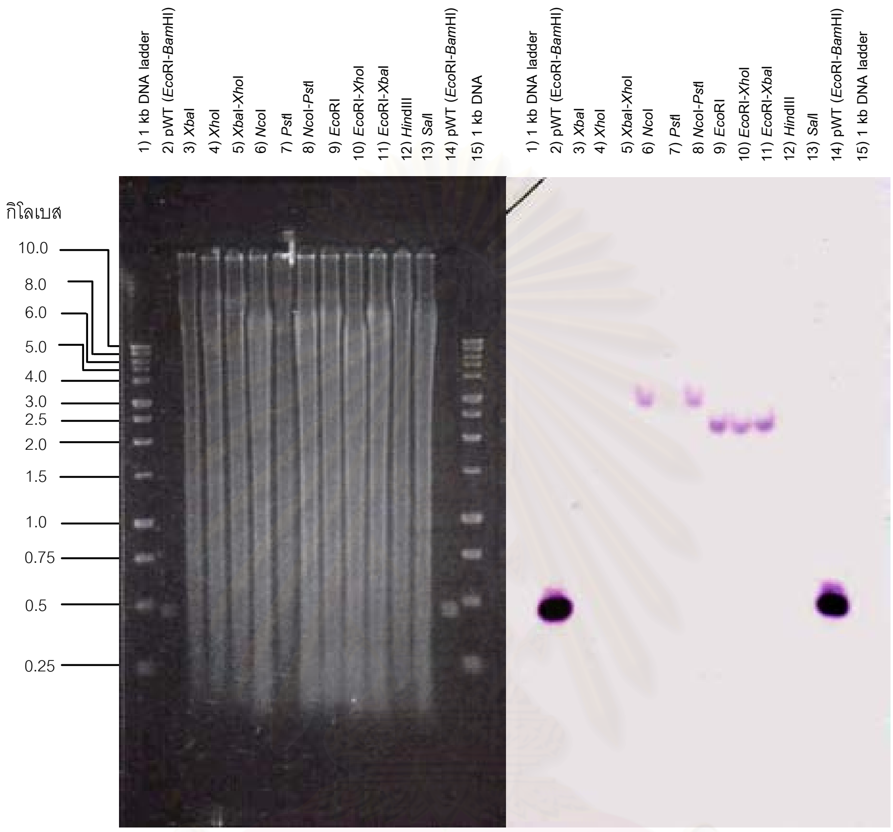
หาตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการสร้างดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนบริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545) แสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L1

เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L1 จากพลาสมิด pWT โดยสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pWT ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Eco*RI อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม L1 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์ได้แสดงในรูปที่ 4.2 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ในช่องวิ่งที่ 6, 8, 9, 10 และ 11 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2800 bp ในช่องวิ่งที่ 6 และ 8 น่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I เพียงชนิดเดียว ส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2300 bp ในช่องวิ่งที่ 9 10 และ11 น่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงชนิดเดียว สำหรับในช่องวิ่งอื่นที่ไม่เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์นั้นน่าจะเกิดจากชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์เหล่านั้นและให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม L1 อาจมีขนาดใหญ่มาก ทำให้เคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจลมาสู่เมมเบรนได้ลำบาก และพลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI-*Eco*RI (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 480 bp



ก.) ข.)

รูปที่ 4.2 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1

ช่องวิ่งที่ 1 และ15 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 และ14 พลาสมิด pWT ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)

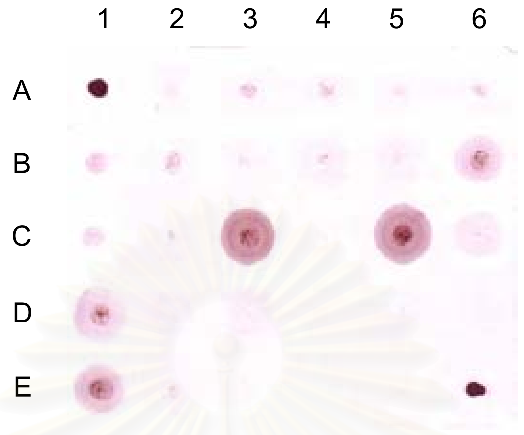
ช่องวิ่งที่ 3-13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1 ในที่นี้ได้เลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 2.3 kb เพื่อการโคลน โดยการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ายังพลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 250 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.3 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้น ดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม คือ B6, C3, C5, D1 และ E1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



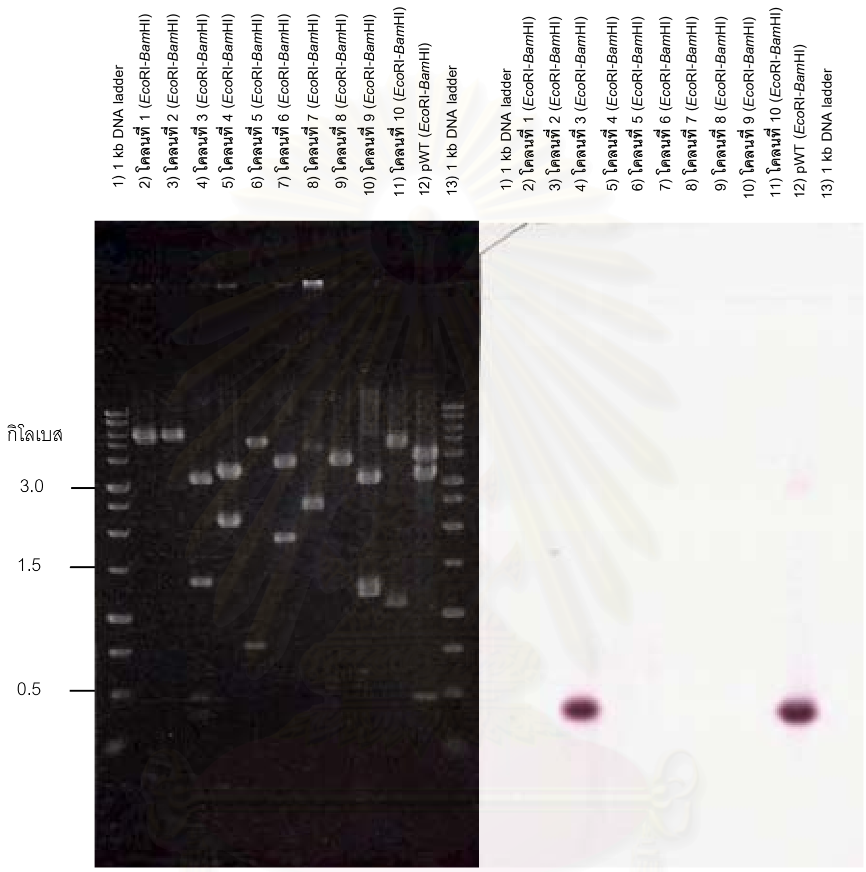
รูปที่ 4.3 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1

ช่องที่ A1 และ E6 พลาสมิด pWT (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 และ E5 พลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-E3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม C3 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม L1 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L1 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ 3 ในช่องวิ่งที่ 4 ให้ผลบวก แสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Nco*I ขนาดประมาณ 2.3 kb เชื่อมกับพลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pC23



ก.) ข.)

รูปที่ 4.4 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่าง กลุ่ม C3

ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L1

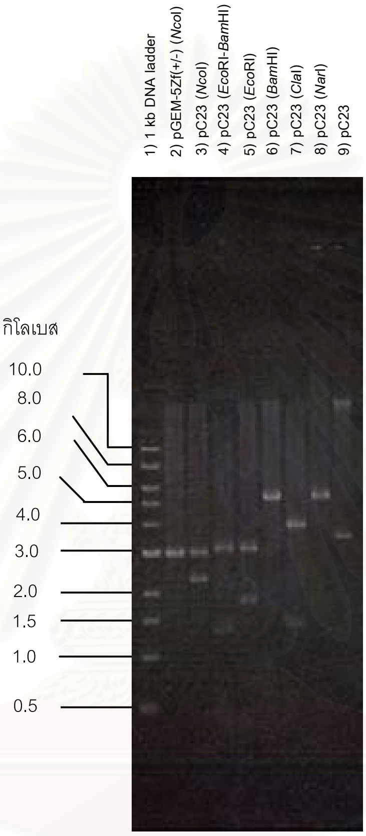
ช่องวิ่งที่ 1 และ 13 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2-11 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI

ช่องวิ่งที่ 12 พลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการตัดพลาสมิด pC23 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด (รูปที่ 4.5) เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



รูปที่ 4.5 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pC23 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

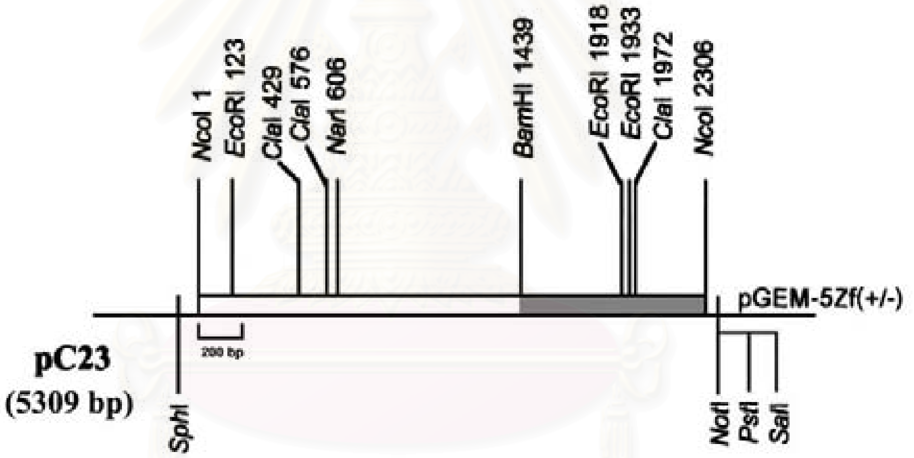
ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pGEM-5Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Nco*I

ช่องวิ่งที่ 3-8 พลาสมิด pC23 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ช่องวิ่งที่ 9 พลาสมิด pC23

4.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC23

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC23 ขนาด 2.3 kb ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2098-4408 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.6

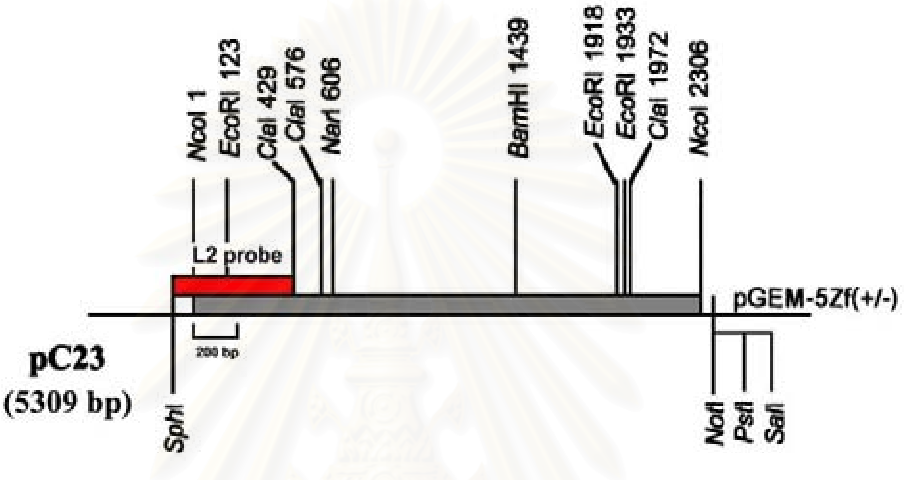


รูปที่ 4.6 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC23 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L2 ที่สร้างจากพลาสมิด pC23

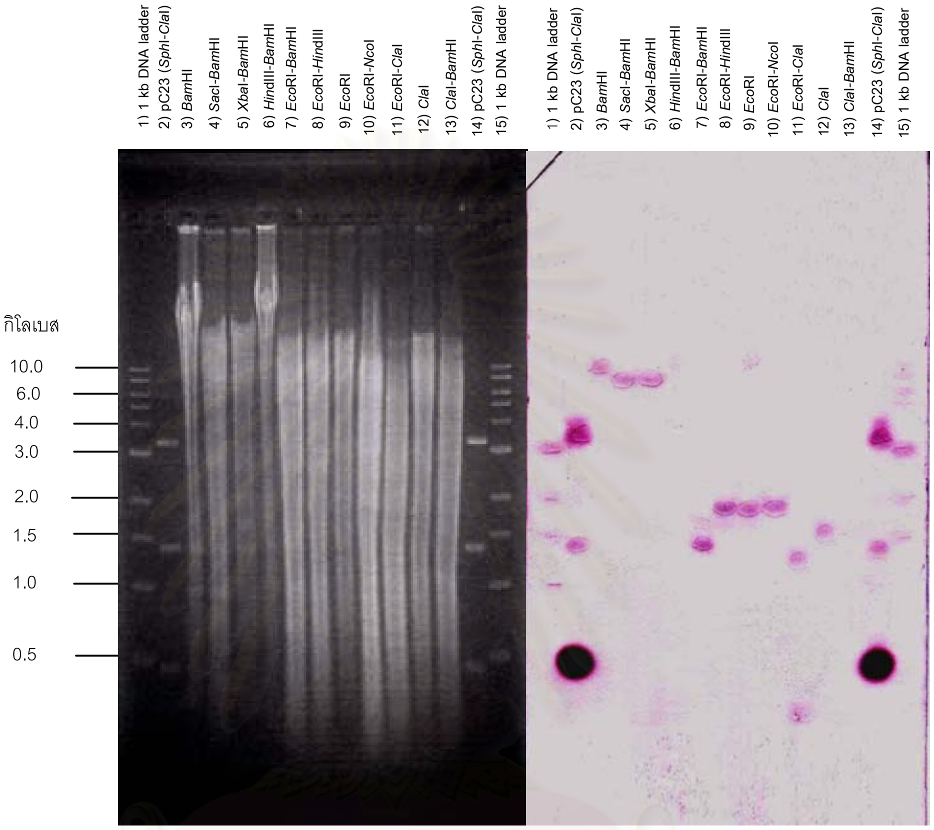
เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L2 จากพลาสมิด pC23 โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC23 แสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC23 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L2

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pC23 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sph*I-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม L2 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์ได้แสดงในรูปที่ 4.8 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ขนาดต่างๆกันในแต่ละช่องวิ่ง และ พลาสมิด pC23 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sph*I-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 430 bp



ก.) **ข.)**

รูปที่ 4.8 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2

ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 1 kb DNA ladder

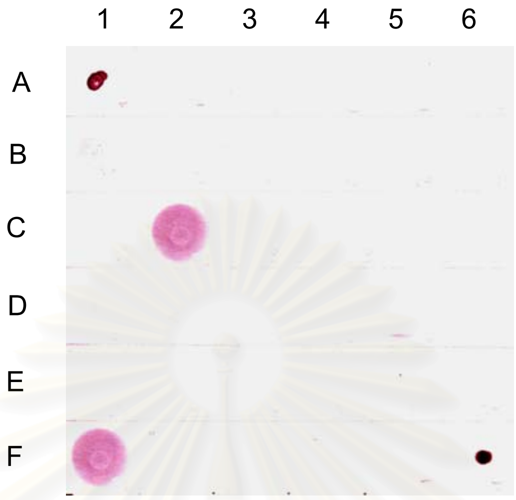
ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pC23 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sph*I-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องวิ่งที่ 3-13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

4.5 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2

จากผลการทดลองในข้อ 4.4 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2 ซึ่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้สัญญาณที่ขนาดแตกต่างกัน ในที่นี้ได้คัดเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 1200 bp เพื่อการโคลนโดยการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ายังพลาสมิด pBluescript KS(+/-) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 310 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.7 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ C2 และ F1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



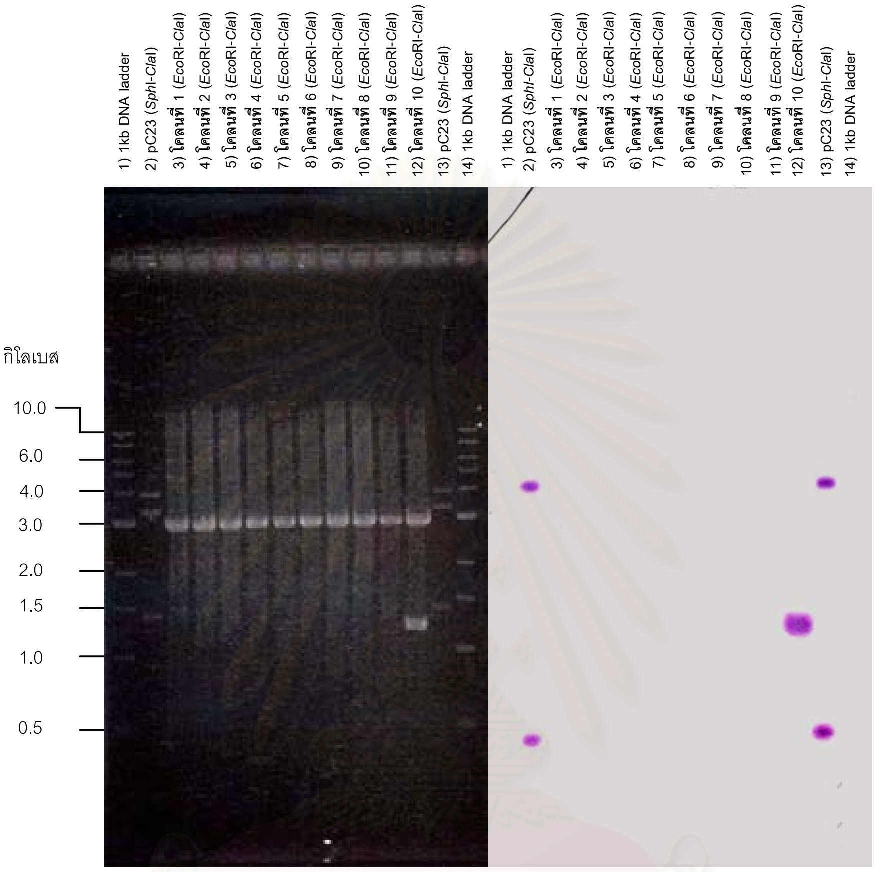
รูปที่ 4.9 **ภาพแสดงการทำ** Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์** CU-A1 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** L2

ช่องที่ A1 และ F6 พลาสมิด pC23 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 และ F5 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-F3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม F1 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกทำการเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม L2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L2 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ 10 ในช่องวิ่งที่ 12 ให้ผลบวกแสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Eco*RI-*Cla*I ขนาดประมาณ 1200 bp เชื่อมอยู่กับพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pEC120



ก.) ข.)

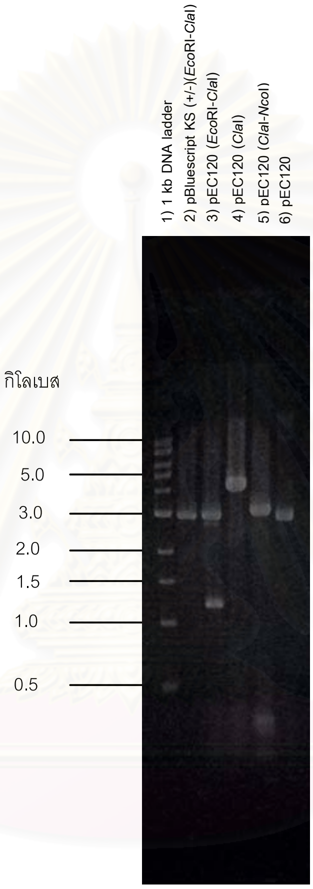
รูปที่ 4.10 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม F1

ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L2

ช่องวิ่งที่ 1 และ14	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ13	พลาสมิด pC23 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sph*I-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-12	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I

ทำการตัดพลาสมิด pEC120 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด (รูปที่ 4.11) เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



รูปที่ 4.11 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pEC120 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I

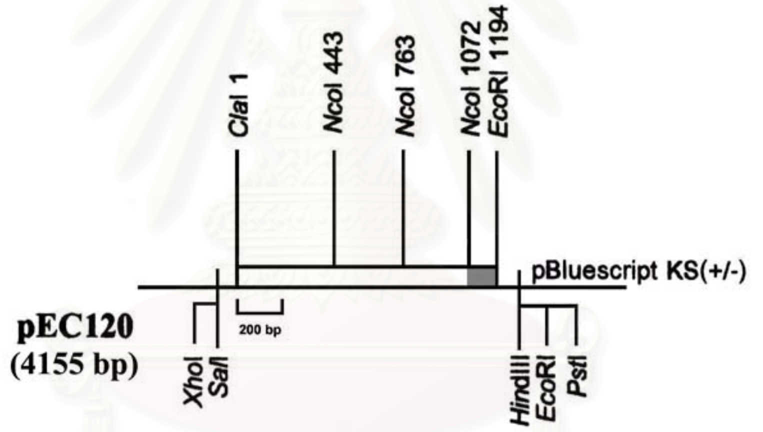
ช่องวิ่งที่ 3-5 พลาสมิด pEC120 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ

ช่องวิ่งที่ 6 พลาสมิด pEC120

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEC120

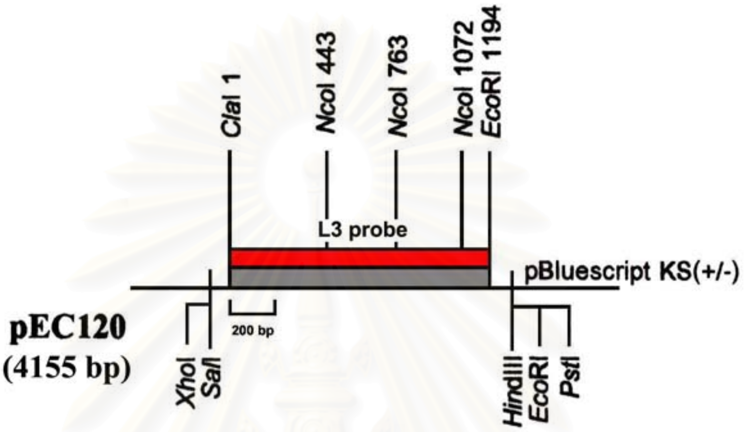
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธีprimer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEC120 ขนาด 1200 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1027-2225 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 **แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด** pEC120 **บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว**

4.7 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L3 ที่สร้างจากพลาสมิด pEC120

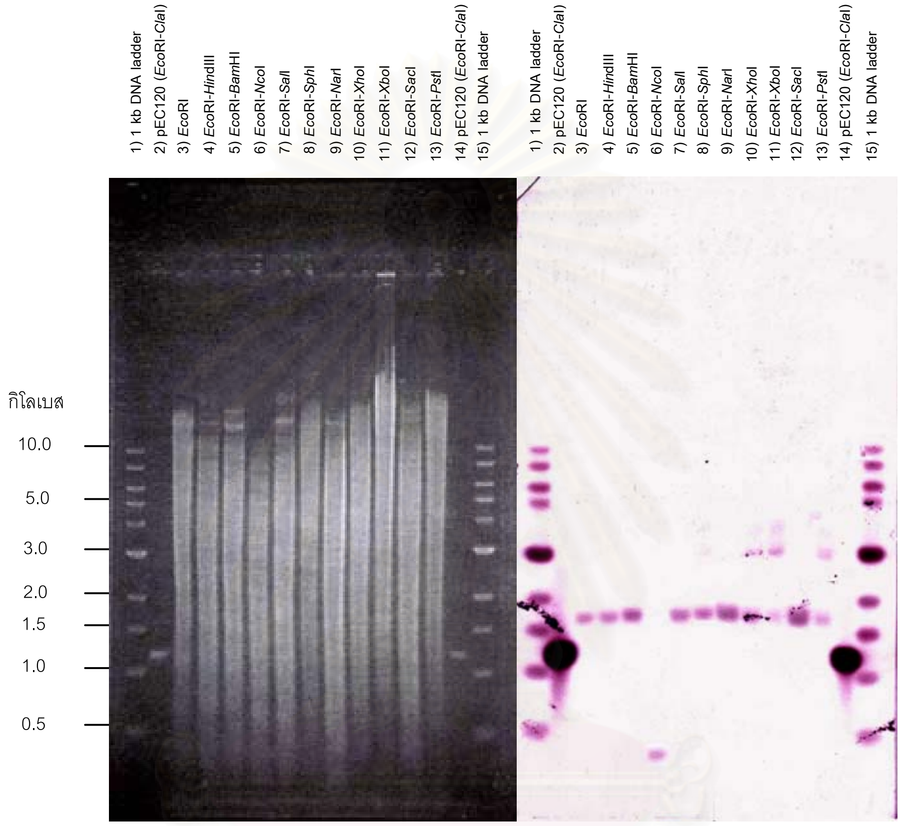
เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L3 จากพลาสมิด pEC120 โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEC120 แสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEC120 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L3

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pEC120 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม L3 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์แสดงในรูปที่ 4.14 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ขนาดประมาณ 1600 bp ในช่องวิ่งที่ 3-5 และ 7-13 ยกเว้นในช่องวิ่งที่ 6 ให้สัญญาณที่ขนาดต่างไปจากช่องวิ่งอื่นๆ และพลาสมิด pEC120 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 1200 bp



ก.) ข.)

รูปที่ 4.14 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L3

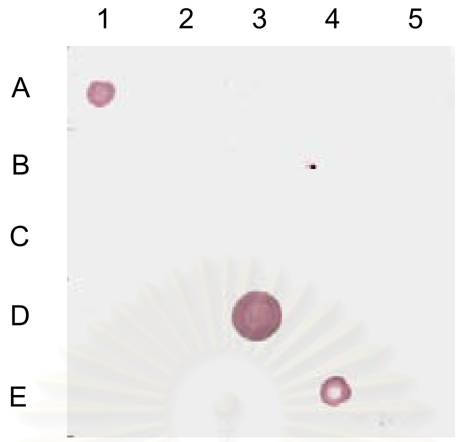
ช่องวิ่งที่ 1 และ 15	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ 14	พลาสมิด pEC120 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-13	ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L3

จากผลการทดลองในข้อ 4.7 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L3 และพบว่าเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดที่เลือกใช้ให้สัญญาณตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งน่าจะเกิดจากตำแหน่งการตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI อยู่ใกล้กับตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม L3 มากที่สุด จึงเกิดสัญญาณที่ตำแหน่งเดียวกับการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงชนิดเดียว ดังนั้นจึงเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ที่ให้สัญญาณขนาดประมาณ 1600 bp เพื่อการโคลนโดยทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ากับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 200 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L3 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.15 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม คือ D3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



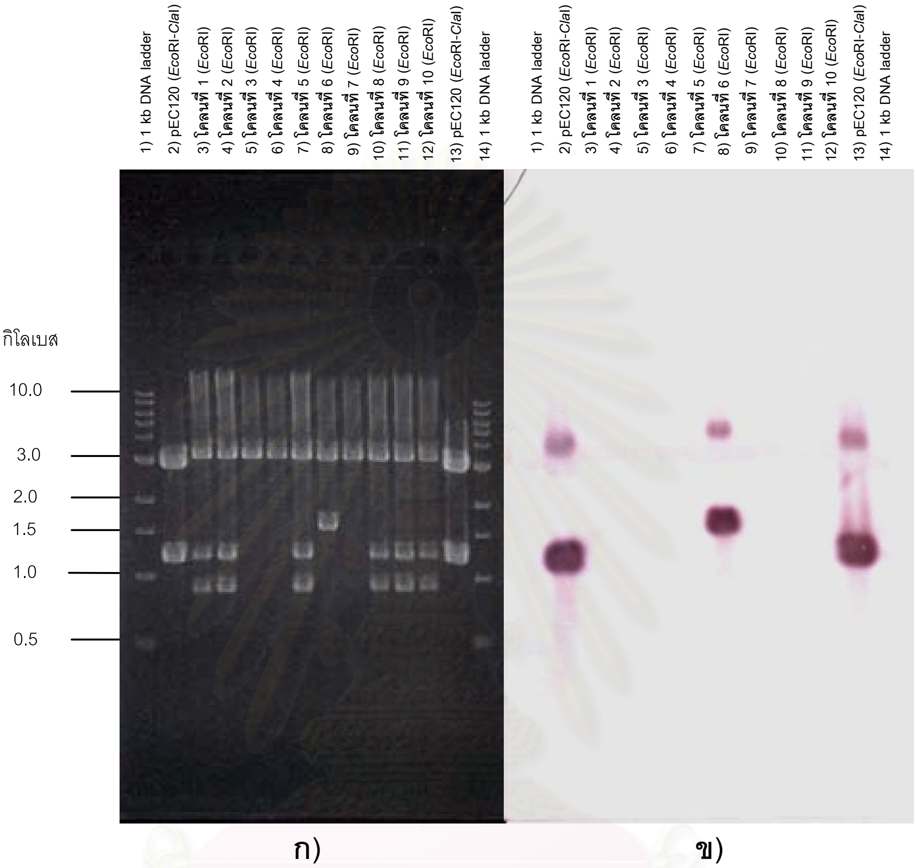
รูปที่ 4.15 **ภาพแสดงการทำ** Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์** CU-A1 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** L3

ช่องที่ A1 และ E4 พลาสมิด pEC120 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 และ E3 พลาสมิด pGEM-11Zf (+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-E2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D3 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกทำการเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม L3 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L3 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ 6 ในช่องวิ่งที่ 8 ให้ผลบวก แสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Eco*RI ขนาดประมาณ 1600 bp เชื่อมอยู่กับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pE16



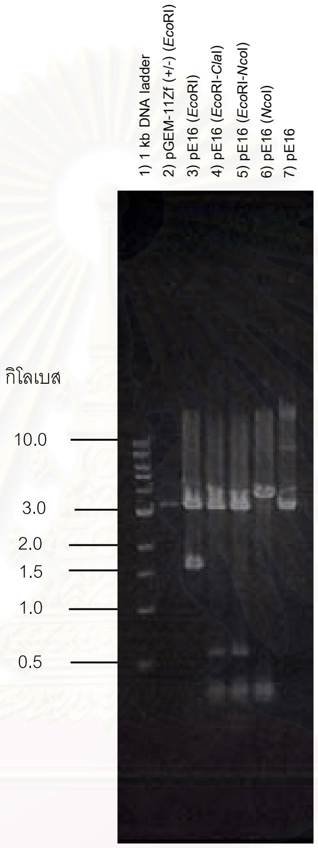
รูปที่ 4.16 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D3

ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L3

ช่องวิ่งที่ 1 และ14	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ13	พลาสมิด pEC120 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-12	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ทำการตัดพลาสมิด pE16 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด (รูปที่ 4.17) เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



รูปที่ 4.17 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pE16 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1   1 kb DNA ladder

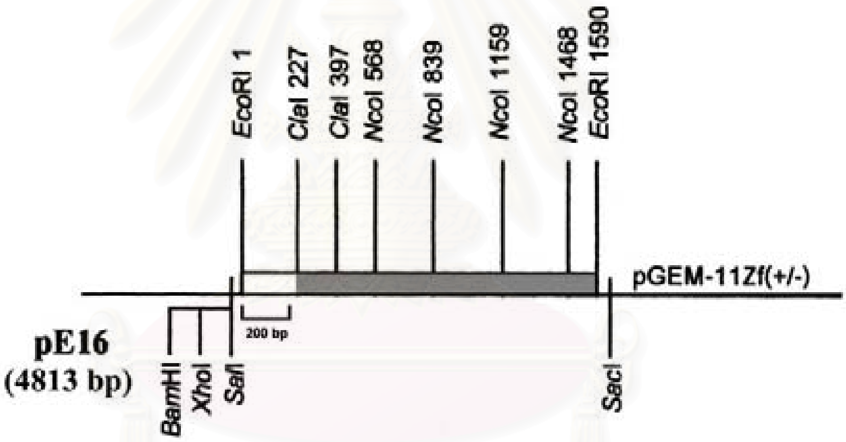
ช่องวิ่งที่ 2   พลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ช่องวิ่งที่ 3-6   พลาสมิด pE16 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ช่องวิ่งที่ 7   พลาสมิด pE16

4.9 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pE16

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธีprimer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pE16 ขนาด 1600 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 631-2225 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.18

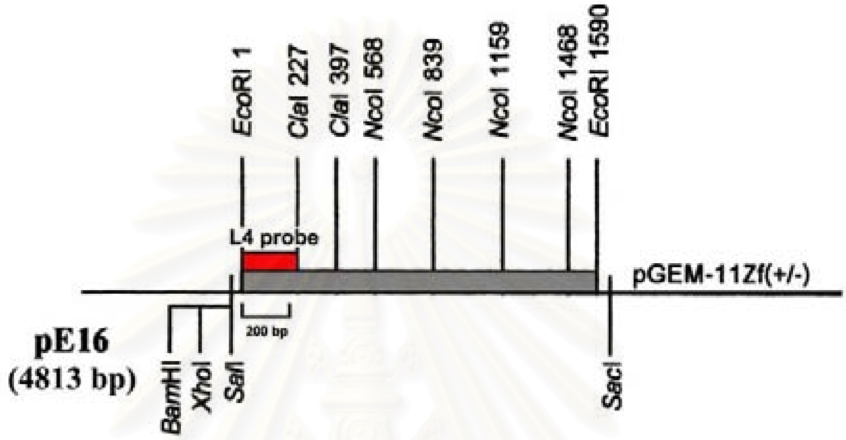


รูปที่ 4.18 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pE16 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม L4 ที่สร้างจากพลาสมิด pE16

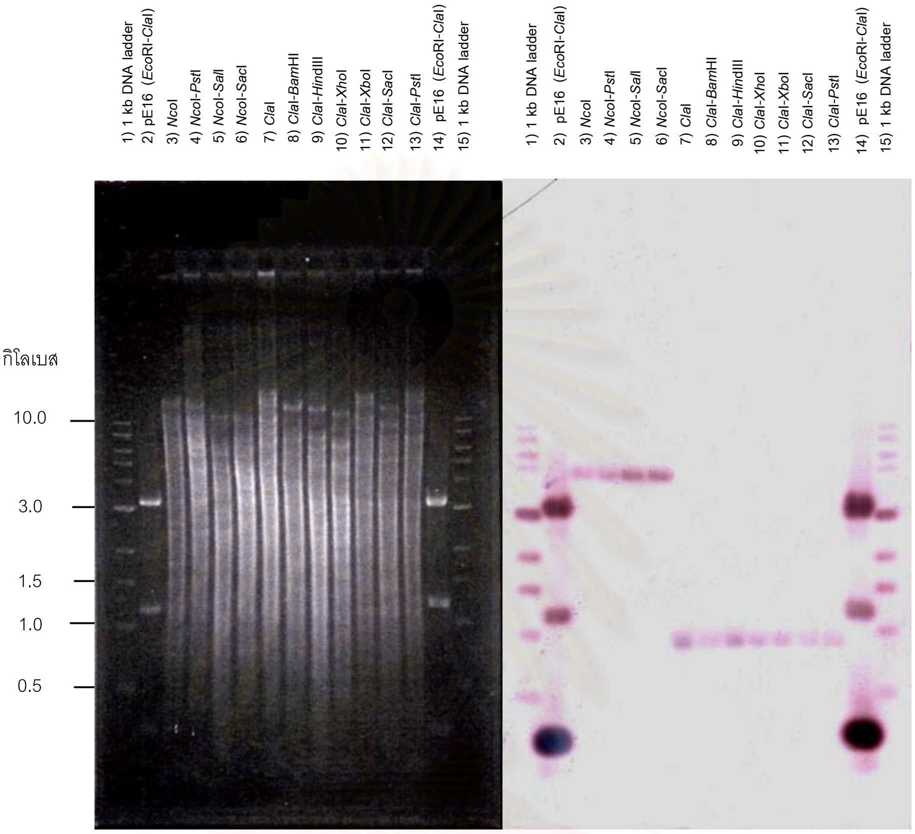
เตรียมดีเอ็นเอติดตาม L4 จากพลาสมิด pE16 โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pE16 แสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pE16 และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม L4

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pE16 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม L4 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์แสดงในรูปที่ 4.20 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ในช่องวิ่งที่ 3-13 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4000 bp ในช่องวิ่งที่ 3-6 น่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I เพียงชนิดเดียว ส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 bp ในช่องวิ่งที่ 7-13 น่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Cla*I เพียงชนิดเดียว และพลาสมิด pE16 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 250 bp



ก) ข)

รูปที่ 4.20 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4

ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pE16 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)

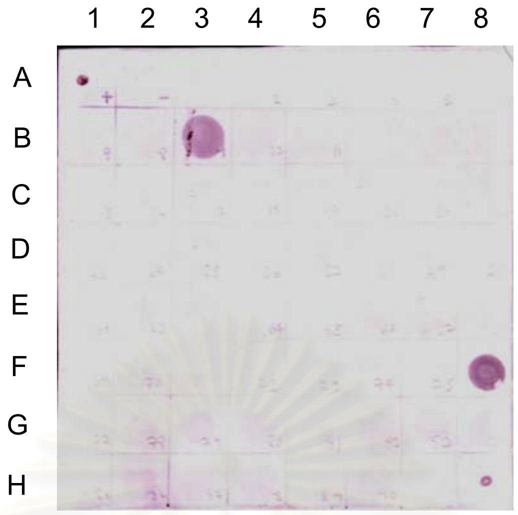
ช่องวิ่งที่ 3-13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.11 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4

จากผลการทดลองในข้อ 4.10 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4 ซึ่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์แตกต่างกันเป็น 2 กลุ่ม และแต่ละกลุ่มให้สัญญาณที่ขนาดใกล้เคียงกันซึ่งน่าจะเกิดจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Nco*I หรือ *Cla*I แต่เพียงอย่างเดียว ในที่นี้ได้คัดเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 900 bp เพื่อการโคลนโดยทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ากับพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตามวิธีการในข้อ 3.14.1 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 600 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.21 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ B3 และ F8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.21 **ภาพแสดงการทำ** Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์** CU-A1 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** L4

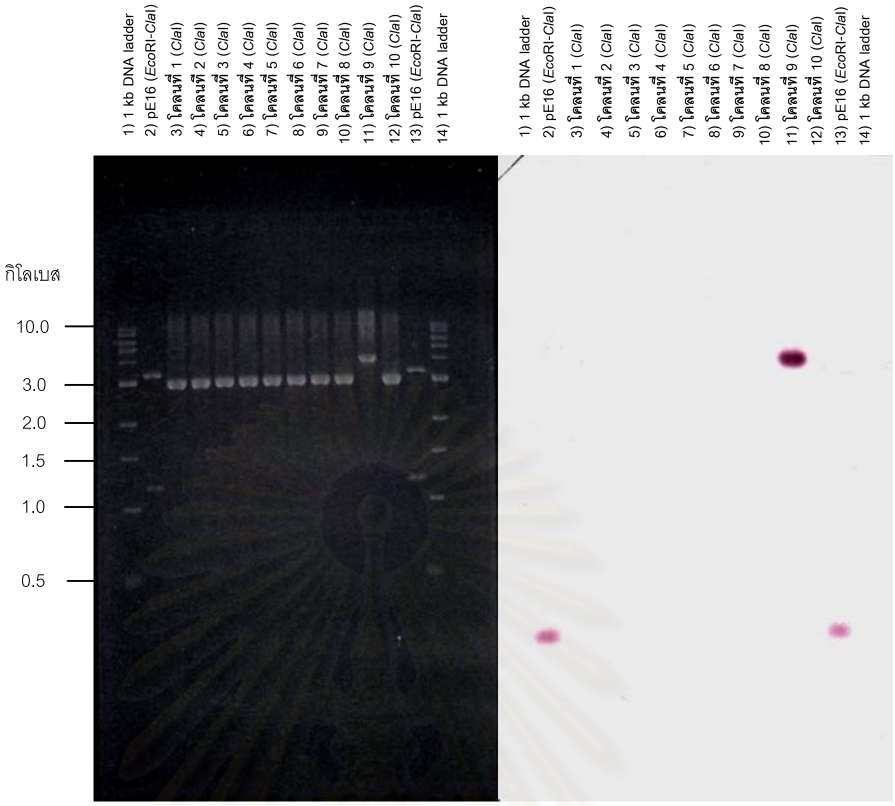
ช่องที่ A1 และ H8 พลาสมิด pE16 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 และ H7 พลาสมิด pBluescript KS(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-H2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม B3 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกทำการเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม L1 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4 อีกครั้ง ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.6.3 พบว่าโคลนที่ 9 ของกลุ่ม B3 ในช่องวิ่งที่ 11 ให้ผลบวกแสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Cla*I ขนาดประมาณ 900 bp เชื่อมอยู่กับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pC9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก) ข)

รูปที่ 4.22 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม B3

ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I

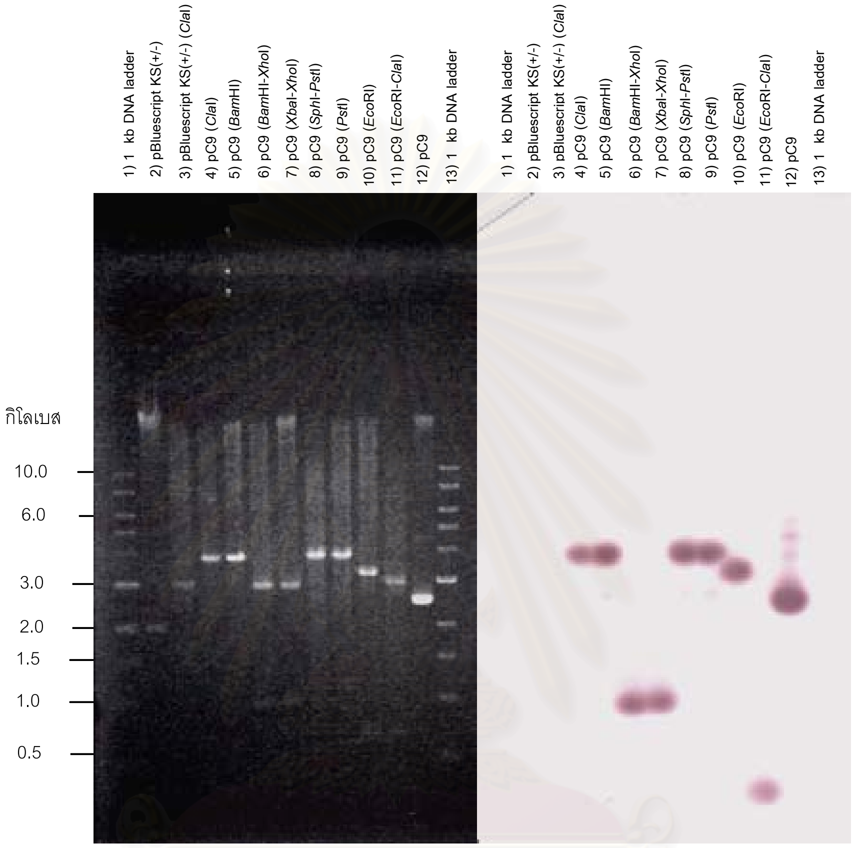
ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4

ช่องวิ่งที่ 1 และ14	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ13	พลาสมิด pE16 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Cla*I (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-12	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I

จากรูปที่ 4.22 พบว่าการตัดพลาสมิด pC9 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I จะเกิดสัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4 ที่ขนาดประมาณ 4000 bp แทนที่จะเกิดสัญญาณที่ขนาดประมาณ 900 bp ซึ่งเท่ากับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการ ในกรณีนี้คาดว่าเกิดจากคุณสมบัติของ *ClaI* ที่ง่ายต่อการเกิด overlapping *dam* methylation โดยเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ชนิดนี้หลังจากทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์แล้วทรานสฟอร์มเข้า *E. coli* เมื่อทำการสกัดพลาสมิดและตัดซ้ำด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I อีกครั้งอาจจะไม่สามารถตัดซ้ำที่ตำแหน่งเดิมได้เนื่องจากเกิดเมธิลเลชัน (Methylation) (McClelland และคณะ, 1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการตัดพลาสมิด pC9 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม L4 อีกครั้ง (รูปที่ 4.23) เพื่อยืนยันว่าพลาสมิด pC9 มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกที่ต้องการจริง และเพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



ก) ข)

รูปที่ 4.23 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pC9 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

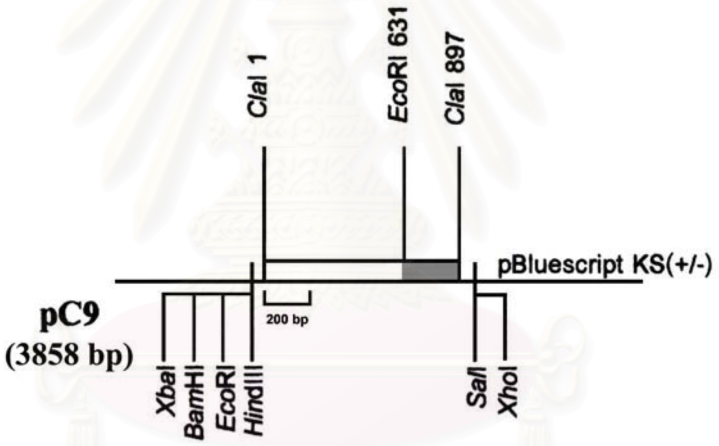
ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม L4

ช่องวิ่งที่ 1และ13	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-)
ช่องวิ่งที่ 3	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Cla*I
ช่องวิ่งที่ 4-11	พลาสมิด pC9 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ
ช่องวิ่งที่ 12	พลาสมิด pC9

4.12 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC9

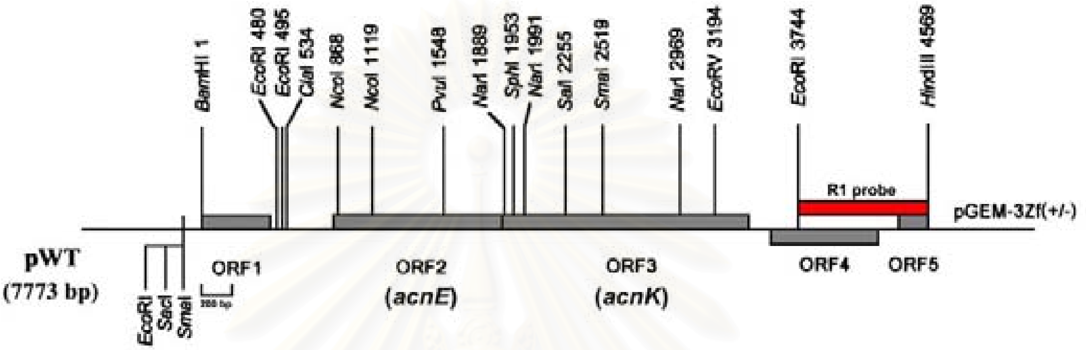
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมิด pC9 ขนาดประมาณ 900 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-902 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC9 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว

4.13 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R1 ที่สร้างจากพลาสมิด pWT

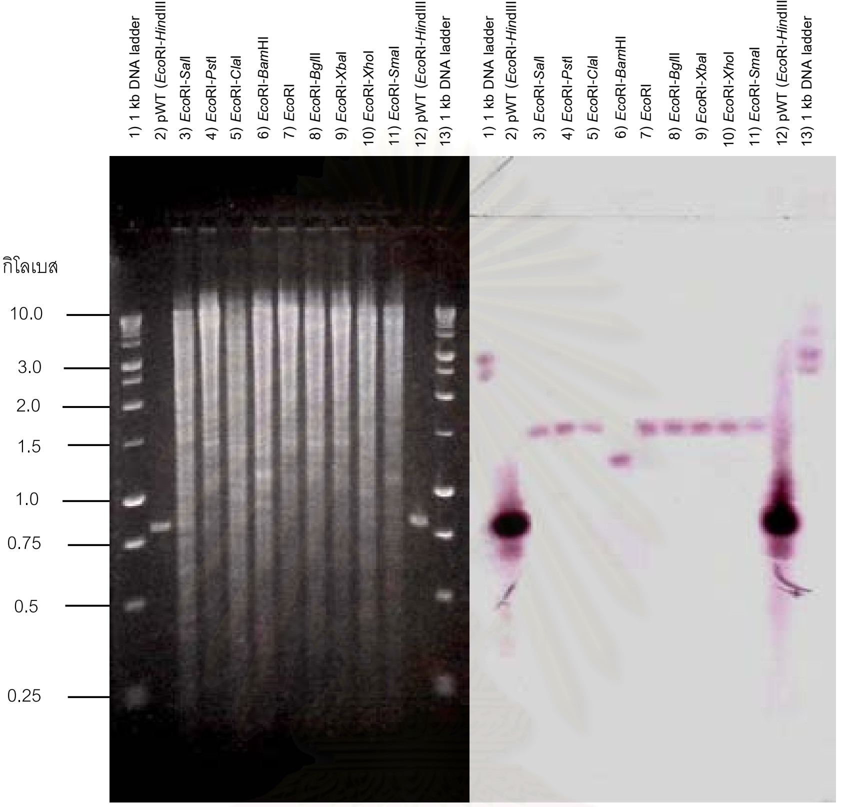
เตรียมดีเอ็นเอติดตาม R1 จากพลาสมิด pWT โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT แสดงในรูปที่ 4.25



รูปที่ 4.25 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม R1

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pWT ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Hin*dIII อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม R1 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์แสดงในรูปที่ 4.26 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ในช่องวิ่งที่ 3-5 และ 7-11 น่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI เพียงชนิดเดียว ส่วนชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp ในช่องวิ่งที่ 6 ซึ่งเกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI ให้สัญญาณที่ขนาดต่างไปจากช่องวิ่งอื่นๆ และพลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Hin*dIII (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 800 bp



ก) ข)

รูปที่ 4.26 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1

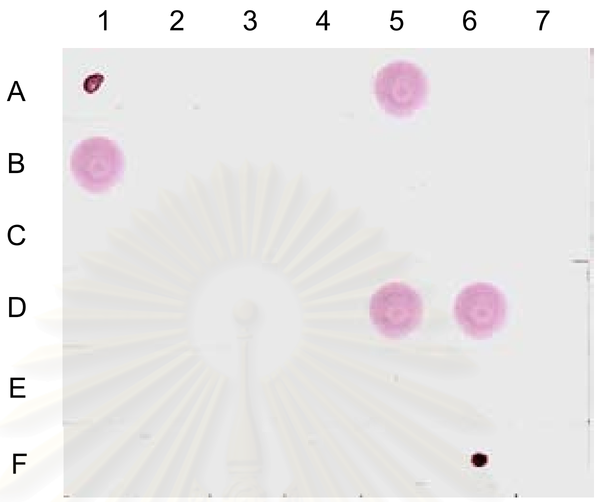
ช่องวิ่งที่ 1 และ 13	kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ 12	พลาสมิด pWT ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Hin*dIII (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-11	ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.14 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1

จากผลการทดลองในข้อ 4.13 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 พบว่าเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้สัญญาณที่ตำแหน่งใกล้เคียงกันและน่าจะเกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI แต่เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจเกิดจากตำแหน่งการตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI อยู่ใกล้กับตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม R1 มากกว่าเรสทริกชันเอนไซม์อื่นๆ ยกเว้นในช่องวิ่งที่ 6 ซึ่งเกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI ให้สัญญาณที่ขนาดต่างไปจากช่องวิ่งอื่นๆ ในที่นี้ได้เลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 1200 bp เพื่อการโคลนโดยทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ากับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 340 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.22 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่ม คือ A5, B1, D5 และ D6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



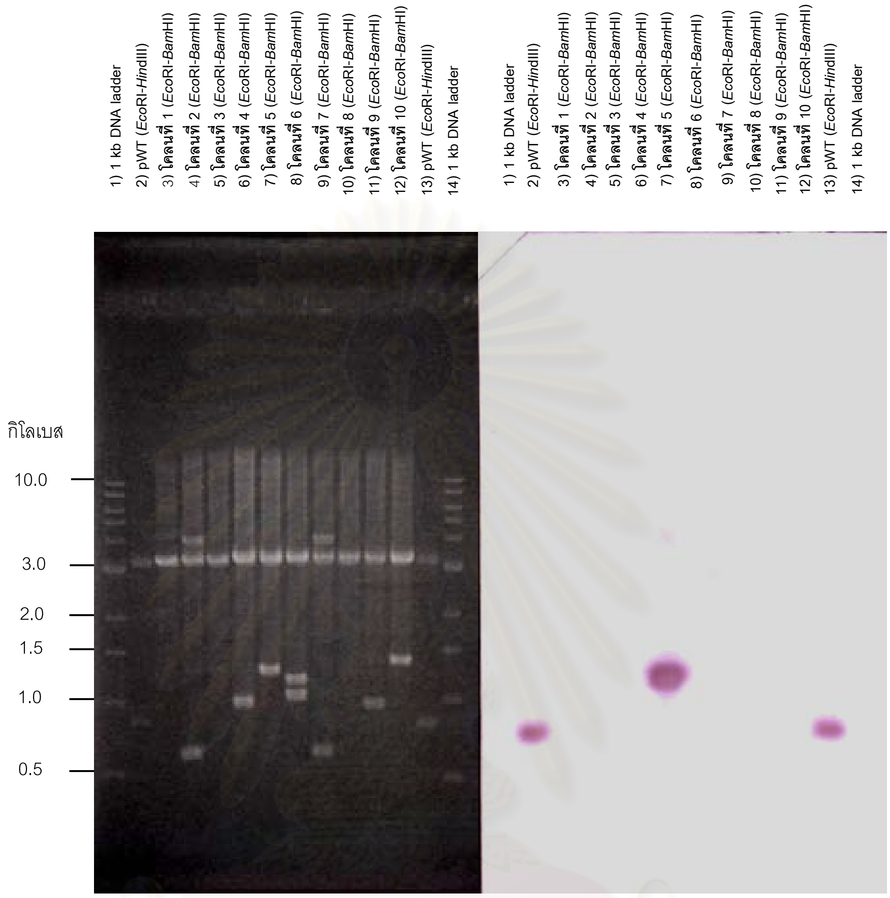
รูปที่ 4.27 **ภาพแสดงการทำ** Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์** CU-A1 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** R1

ช่องที่ A1 และ F6 พลาสมิด pWT (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A2 และ F5 พลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A3-F1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D5 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกทำการเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม R1 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R1 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ 5 ในช่องวิ่งที่ 7 ให้ผลบวกแสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Eco*RI-*Bam*HI ขนาดประมาณ 1200 bp เชื่อมอยู่กับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pEBR25



ก) ข)

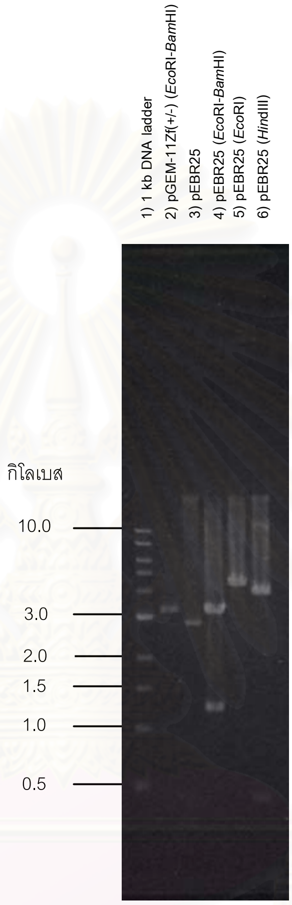
รูปที่ 4.28 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D5

ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R1

ช่องวิ่งที่ 1 และ 14	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ 13	พลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Hin*dIII (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-12	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI

ทำการตัดพลาสมิด pEBR25 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด (รูปที่ 4.29) เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



รูปที่ 4.29 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pEBR25 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

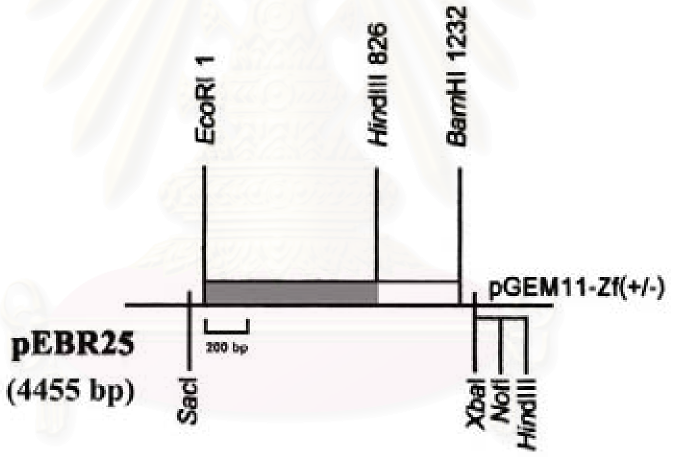
ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pGEM-11Zf (+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI-*Bam*HI

ช่องวิ่งที่ 3 พลาสมิด pEBR25

ช่องวิ่งที่ 4-6 พลาสมิด pEBR25 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ

4.15 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEBR25

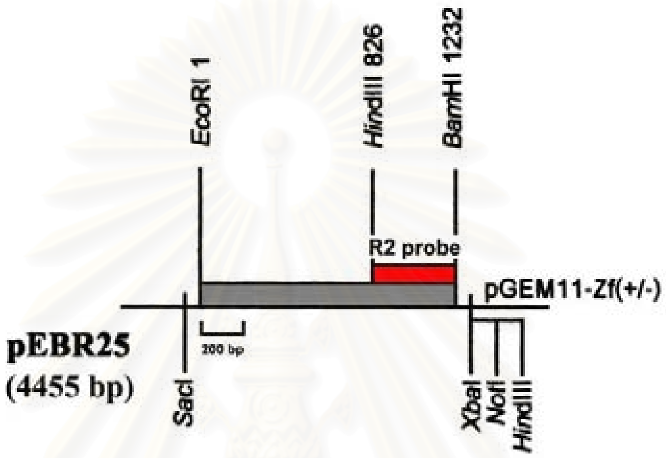
จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pEBR25 ขนาดประมาณ 1200 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 7279-8515 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.30 แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEBR25 บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว

4.16 ค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนบนจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) กับดีเอ็นเอติดตาม R2 ที่สร้างจากพลาสมิด pEBR25

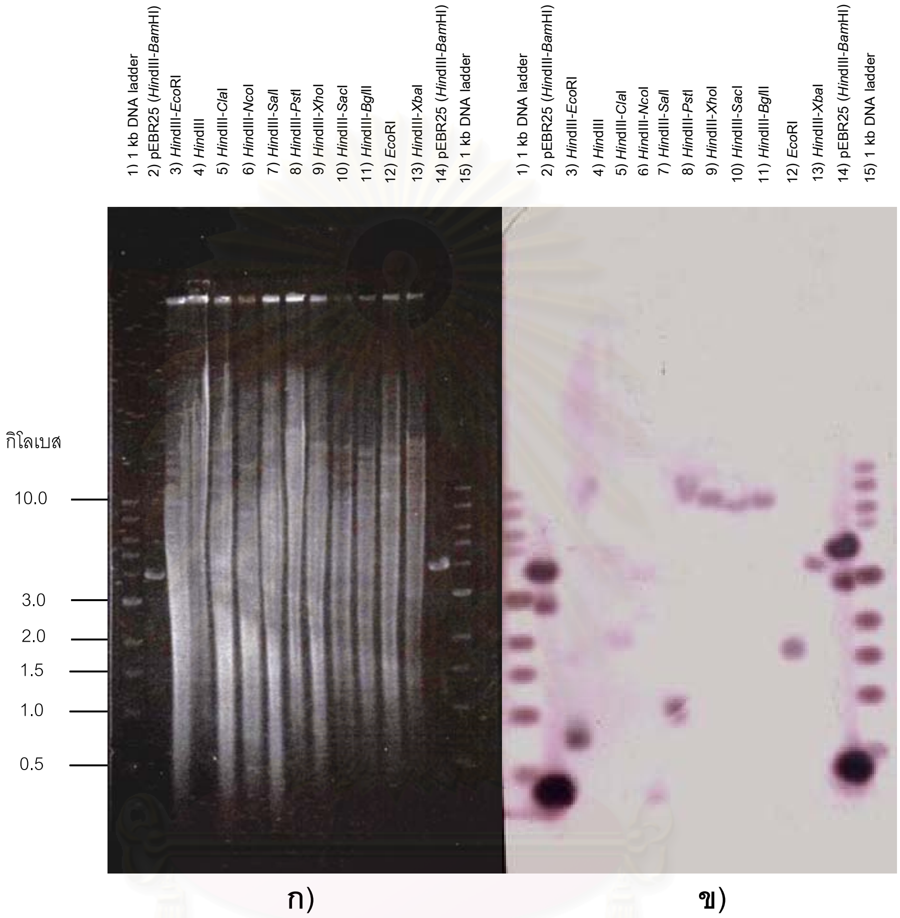
เตรียมดีเอ็นเอติดตาม R2 จากพลาสมิด pEBR25 โดยพิจารณาจากข้อมูลแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pEBR25 แสดงในรูปที่ 4.31



รูปที่ 4.31 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT และบริเวณสีแดงแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้สร้างดีเอ็นเอติดตาม R1

สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข 3) ตามวิธีข้อ 3.6.1.1 ตัดพลาสมิด pEBR25 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III-*Bam*HI อย่างสมบูรณ์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1.2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp ออกจากเจล จากนั้นทำการติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ชุดสำเร็จตามวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 3.6.1.3

นำดีเอ็นเอติดตาม R2 มาไฮบริไดซ์กับจีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์ได้แสดงในรูปที่ 4.32 จากผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆเกิดสัญญาณจากการไฮบริไดซ์ขนาดแตกต่างกัน และพลาสมิด pEBR25 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III-*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณที่ขนาดประมาณ 400 bp



รูปที่ 4.32 ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆที่เหมาะสม

ข) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R2

ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pEBR25 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)

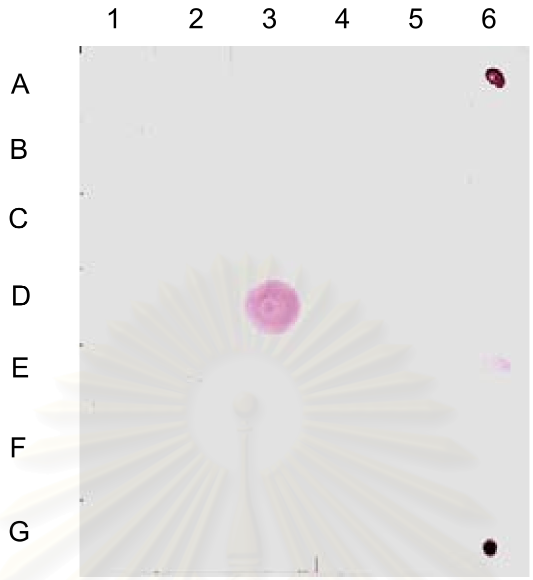
ช่องวิ่งที่ 3 และ 13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.17 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณถัดลงมาจาก *acnK* ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R2

จากผลการทดลองในข้อ 4.16 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ให้สัญญาณไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R2 ซึ่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้สัญญาณที่ขนาดแตกต่างกัน ในที่นี้ได้คัดเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Eco*RI ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 700 bp เพื่อการโคลนโดยทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ากับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5α คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในบริเวณดังกล่าวด้วยวิธี Blue/White selection โดยจะคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 380 โคลน จากนั้นเพาะเลี้ยงโคลน 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน) จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม R2 ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.5.3 ผลของสัญญาณจากการไฮบริไดซ์เป็นไปตามรูปที่ 4.33 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 1 กลุ่ม คือ D3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.33 **ภาพแสดงการทำ** Dot blot hybridization **ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์** CU-A1 **ด้วยดีเอ็นเอติดตาม** R2

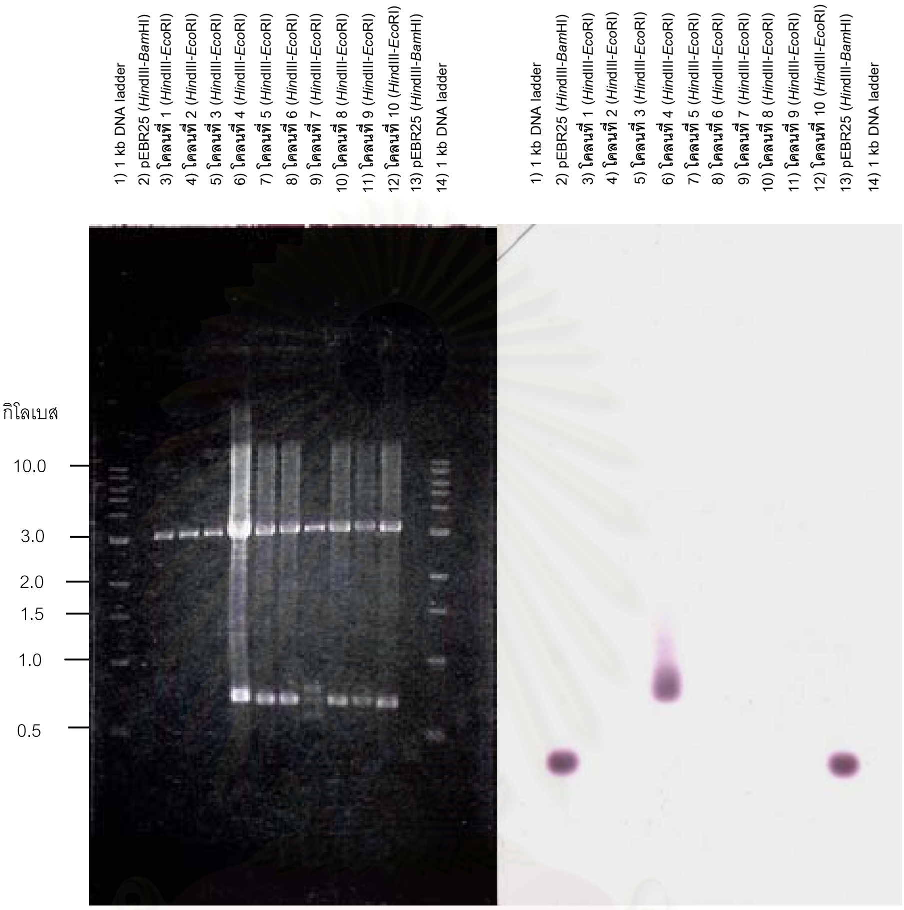
ช่องที่ A6 และ G6 พลาสมิด pEBR25 (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องที่ A5 และ G5 พลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องที่ A1-A4, B1-G4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่คัดเลือก 10 โคลนต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม D3 มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยแยกทำการเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดในบริเวณของตัวติดตาม R2 ทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม R2 อีกครั้ง พบว่าโคลนที่ 4 ในช่องวิ่งที่ 6 ให้ผลบวก แสดงว่าโคลนดังกล่าวน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Hin*dIII-*Eco*RI ขนาดประมาณ 700 bp เชื่อมอยู่กับพลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pHE54

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก) ข)

รูปที่ 4.34 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม D3

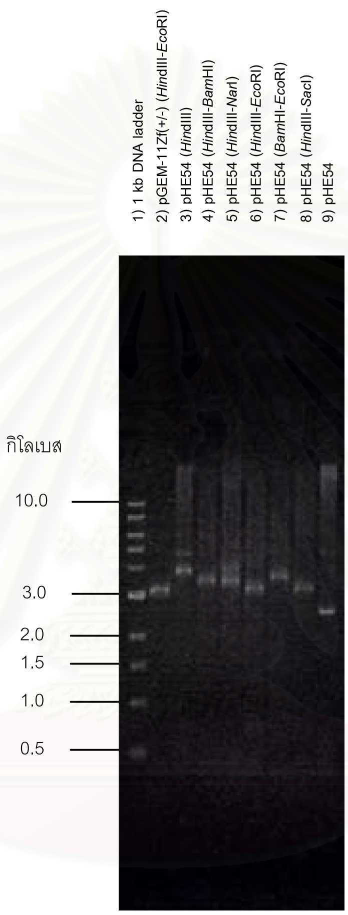
ก) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Eco*RI

ข) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม R2

ช่องวิ่งที่ 1 และ 14	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2 และ 13	พลาสมิด pEBR25 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3-12	รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 1-10 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Eco*RI

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการตัดพลาสมิด pHE54 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิด (รูปที่ 4.35) เพื่อทราบการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด



รูปที่ 4.35 ภาพอะกาโรสที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pHE54 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาตำแหน่งการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

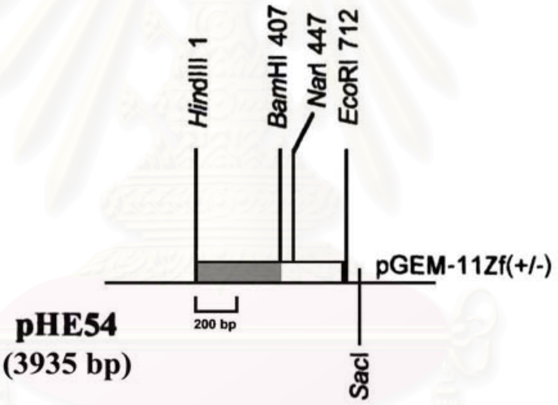
ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pGEM-11Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hin*dIII-*Eco*RI

ช่องวิ่งที่ 3-8 พลาสมิด pHE54 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ช่องวิ่งที่ 9 พลาสมิด pHE54

4.18 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHE54

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) โดยใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อจากบริเวณดังกล่าวและอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดเวกเตอร์ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pHE54 ขนาดประมาณ 700 bp ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 8104-8820 จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปหาตำแหน่งจดจำการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆด้วยโปรแกรม DNASIS สามารถเขียนแผนที่การเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกดังแสดงในรูปที่ 4.36



รูปที่ 4.36 **แผนที่แสดงลักษณะการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด** pHE54 **บริเวณสีขาวแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณสีเทาแสดงส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.19 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้งหมดที่สร้างขึ้นของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pC23 pEC120 pE16 pC9 pEBR25 และ pHE54 ที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาเชื่อมต่อกันและนำข้อมูลใหม่ที่ได้นี้ไปเชื่อมต่อกับข้อมูลเดิมจากพลาสมิด pWT (ทิพวรรณ, 2545) จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 8820 bp ตามที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.37 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนจากนั้นนำไปเทียบความคล้ายกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank (ภาคผนวก ค) พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 7 กรอบซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซนต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิงแสดงในตารางที่ 4.1

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงในรูปที่ 4.37 พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่1 และพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.38 จากรูปจะแสดงบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดต่างๆ บริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบและบริเวณที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอติดตาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลของแต่ละกรอบอ่านรหัสเปิดและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ (ORF)	ยีน	ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนกรดอะมิโน	ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุด	จำนวนกรดอะมิโนของยีนอ้างอิง	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับกรดอะมิโนอ้างอิง	เอกสารอ้างอิงและ GenBank Accession No.
1	*acnN*	487-1491 (1005 bp)	334	*ophC* ของ *Burkholderia cepacia* DBO1 ประมวลรหัส 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase	330	36%	Chang และ Zylstra, 1998 : AAD03553
2	*acnM*	1491-2681 (1191 bp)	396	*pht4* ของ *Pseudomonas putida* ประมวลรหัส *cis*-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase	410	45%	Nomura และคณะ, 1992 : Q05184
3	*acnL*	2715-3953 (1239 bp)	412	*mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ประมวลรหัส putative ferredoxin reductase	421	36%	Bahar และคณะ, 1998 : AAC31188
4	*acnE*	4383-5399 (1017 bp)	338	*phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 ประมวลรหัส hydratase-aldolase	330	38%	Laurie และ Lloyd-Jones, 1999 : AAD09869
5	*acnK*	5463-6914 (1452 bp)	483	*phdK* ของ *Nocardioides* sp. KP7 ประมวลรหัส 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase	485	46%	Iwabuchi และ Harayama, 1997 : BAA31236
6	-	7042-7824 (783 bp)	260	ORF ที่ประมวลรหัส adducin-like protein ของ *Mesorhizobium loti*	234	38%	Kaneko และคณะ, 2000 : NP_107234
7	*acnO*	7890-8696 (807 bp)	268	*Novosphingobium aromaticivorans* ประมวลรหัส short-chain alcohol dehydrogenase	296	56%	Romine และคณะ, 1999 : ZP_00093213

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 5'ATCGATCCCGCGATACGATGCGAAATAGAAGCCCTGATTGTCGAGCATTCGTGGATGCTC

61 GATCATCACAAATCCGAGAACCTCGGCGATCTCTATATCGAAACTGGAAAGCTGACCGGG

121 CTTGGTGGAGACCGGATCGGTCGCGAGGCGATCAATGCCTATGGCCGCAAGCGTGGCGCC

181 AACATAACGCGGGCCGCCCGGCATGTGAACAGCAACATCCGCCTGATCAGCGAAGGCCCC

241 GGACGGGTGCGCAGCCTCAGCTCGATCCTGCTTTTGCGCCACGATGGCGAAGATATGGGA

301 ACCGCCGACCCGGTCGCACTTGCGGACGCACAGGACGTGTTCGTGAAATGCGACGATGGC

361 CGGTGGCGCTTCGAGGAACGGCATCTAGTGCTGCGGTTCGAATCGGCTGCCCATCGCAGT

-35 -10 RBS

421 CAGGCGTAGAGACCGCTCCTTG**TTCAGG**CCGCGCCCCACAGG**TATATT**TTTGAA**AGGA**CA

(*acnN*)

ORF1 →

481 GGCTCGATGGCAAATCTTGCACTGAGCTATGCAGGACACCGCTCCGACAGGGTCGATGAC

1 M A N L A L S Y A G H R S D R V D D

541 CTCTATTTCGGCGTCGCCAAGCCGGAAGCGATCGACCTGCACTTCGTCCCGCTTCCACCG

19 L Y F G V A K P E A I D L H F V P L P P

601 TTTCAGGCGTTCAACCGCTTTCTTCGCGGCGAATTCGATTGCGGGGAGATGTCGTTTTCG

39 A Q A F N R A L R G E F D C G E M S A S

661 ACATTCGTCATCAAGACGGCGCAAAGCAGGGCAGAGGGCAAGCCATTGCCTTTCGTCGCC

59 T F V I K T A Q S R A E G K P L P F V A

721 ATTCCCGTCTTTCCATCCCGCACGTTCCGCCACGGCGCGATCTATATCAACAGGGCATCG

79 I P V A P S R T F R H G A I Y I N R A S

781 GGCATACAGCGTCCCGAAGATCTCGCGGGACGGCGGGTCGGGGTTCCCGAATATGCGATG

99 G I Q R P E D L A G R R V G V P E Y A M

841 ACGGCTGCGGTCTGGGCGCGCGGCATGTTGCAGCACCAGCATGGTGTCGATCCCGCATCG

119 T A A V W A R G M L Q H Q H G V D P A S

901 ATAGAATGGGTGACGGGAGGGCTCCAGGCTGCGGGGCGCAAGCCGCTGTCGGCTGCGGCT

139 I E W V T G G L Q A A G R K P L S A A A

961 CCGCCCGGAATTTCCATCCGAAACGAGGAAAACGCGACACTGGACGAACTGCTGGTGACA

159 P P G I S I R N E E N A T L D E L L V T

1021 GGTGGCATCGATGCGCTGATAGCGCCGCAAAAACCACCGTCCATACGGCAACGCCGTCCG

179 G G I D A L I A P Q K P P S I R Q R R P

1081 GAGGTTTGCCGCCTCTTTCATGACCTCGCGAGTGTCGAGCAGGCTTACTTCCGCGAGACG

199 E V C R L A H D L A S V E Q A Y F R E T

1141 GGCCTGTTTCCCATTATGCATACCCTCGTCATCCGCAGGGACATTCACGAACGCCACCCA

219 G L A P I M H T L V I R R D I H E R H P

1201 TGGGTCGCAGCCAGTCTCTATCAGGCATTCGAGAAAGCCAAGGACAATTGCCTGGCACGC

239 W V A A S L Y Q A F E K A K D N C L A R

1261 CTGCGCGAGGAGGAGCCGGTGCCGCTTTCCCTGCCGTGGAGTGGATCGCTGCGCGAGAGC

259 L R E E E P V P L S L P W S G S L R E S

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
1321 GTGGTCGATATGATGGGTGAGGATTTCTGGCCATACGGCCTGCAAAACAACCGCAAGGTG
279  V  V  D  M  M  G  E  D  F  W  P  Y  G  L  Q  N  N  R  K  V

1381 ATCGAGGCGCTGTGCCAGTACACCTTCGAGCAGGGGCTGGCACCGGTGAGGGCCGATGCC
299  I  E  A  L  C  Q  Y  T  F  E  Q  G  L  A  P  V  R  A  D  A
                                                      (acnM)
                                          RBS         ORF2  ---->
1441 GACGAACTGTTCGTTTCCAGCGTCACTGCCATGGCGGGAGACCGGCTGTGATGCGCAAAC
319  D  E  L  F  V  S  S  V  T  A  M  A  G  D  R  L  *
1                                                      M  R  K  P

1501 CACTGGAAAAACTGCGCTTCGGGCTAGTCGGTTTGGGCGGTGCCGCGATGCAGATGCTGC
5       L  E  K  L  R  F [G  L  V  G  L  G] G  A  A  M  Q  M  L  P
                         NAD+ binding motif
1561 CGAGTTTCATGGCCCATCCACGTGTCGAACTCGTCGCCTGCGTCGATCCCAACCAGCAGG
25      S  F  M  A  H  P  R  V  E  L  V  A  C  V  D  P  N  Q  Q  A

1621 CGCGCGACAGCTTTGCCAGAGATTTCAACGCCTCGGCTTATGACAGGATGGAAGTGCTTT
45      R  D  S  A  A  R  D  F  N  A  S  A  Y  D  R  M  E  V  L  C

1681 GCGAGGACCCGGCTGTCGATGCCGTCTATATCGGAACGCCCCACCAGTTTCATCGGCAAC
65      E  D  P  A  V  D  A  V  Y  I  G  T  P  H  Q  A [H  R  Q  Q]

1741 AGGCGATCATGGCAGCGGAAGCCGGAAAGCATATCATCGTCGAAAAACCCATGGCACTGA
85   [  A  I  M  A  A  E  A  G  K  H  I  I  V  E  K  P  M  A] L  T
     consensus sequence of dihydrodiol dehydrogenase novel family
1801 CGCTGGATGATTGCGATGCGATGAGCGCTGCGGCAGAGCGCAACGGCGTGCGGCTGGTCG
105     L  D  D  C  D  A  M  S  A  A  A  E  R  N  G  V  R  L  V  V

1861 TAGGCCACACGCACAGCTTCGACCAGCCAATCCGCAAGATGCGGGACATTATAAAATCCG
125     G  H  T  H  S  F  D  Q  P  I  R  K  M  R  D  I  I  K  S  G

1921 GCGAGGTCGGGCCTCTGGCCATGATCAATACATGGAGCTACGGCAACTTTCTCTACAGGC
145     E  V  G  P  L  A  M  I  N  T  W  S  Y  G  N  A  L  Y  R  P

1981 CCAGACGTCCCGAGGAACTGAGGACGGAGAGCGGCGGCGGCATCATTTTTAACCAGGTGC
165     R  R  P  E  E  L  R  T  E  S  G  G  G  I  I  A  N  Q  V  P

2041 CGCACCAGATGGATGTGGTGCGGCTGCTGGGCGGTGGCCTTGTGCGGAGCGTCCGCGCCA
185     H  Q  M  D  V  V  R  L  L  G  G  G  L  V  R  S  V  R  A  M

2101 TGGCATGGCAACTGGACCCCGACCGCCCGACGGAAGGCAGCCACATGACATTCGTCCAGT
205     A  W  Q  L  D  P  D  R  P  T  E  G  S  H  M  T  F  V  Q  A

2161 TTGTCGATGGCTCGACCGCCTCCATCGTCTACAGCGGATATGACTATTTCGACAGCGATG
225     V  D  G  S  T  A  S  I  V  Y  S  G  Y  D  Y  F  D  S  D  E

2221 AATTCCACGGATGGGTTGGCGAGCTTGGCGAGGACAGAACGCCGGGCGGTCATGGCGCAT
245     F  H  G  W  V  G  E  L  G  E  D  R  T  P  G  G  H  G  A  S

2281 CGCGTGCCGCACTGGCAAAGGCTGCGGGCGGATTATCCGAAGCCACGCTGAAGGGTTCAC
265     R  A  A  L  A  K  A  A  G  G  L  S  E  A  T  L  K  G  S  R

2341 GCAGCTATGCGGGCAAACCGACCCTGAAAGCCCCCACGCACCCGCCGCATTGCGGCATCA
285     S  Y  A  G  K  P  T  L  K  A  P  T  H  P  P  H  C  G  I  T

2401 CCATCGCAAGCTGCGCAGGCGGCGATCTGAGAGCGGGGGTGGATGGGGTCAGCCTTTATG
305     I  A  S  C  A  G  G  D  L  R  A  G  V  D  G  V  S  L  Y  G
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

2461 GCCGCCACGGGCTCGAACATCGCCCTGTCCCGGTCGGGCTGGCATTTCCCGACAAGGGCG

325 R H G L E H R P V P V G L A A P D K G G

2521 GCGTGATCGATGAGTTGTATGAAGCCGTCATCCGCGAGCAGGAGCCTCTGCACAATGGGC

345 V I D E L Y E A V I R E Q E P L H N G R

2581 GATGGGGCAAGGCAACGATGGAAGCGTCTCTCGCCGTTCTGGAATCGGCACGAACGGGAC

365 W G K A T M E A S L A V L E S A R T G R

2641 GCGACATCGAACTCAAACATCAGGTGCCTGTCATCGATTGAGTTTCAGGAACTCACCACG

385 D I E L K H Q V P V I D *

(*acnL*)

RBS ORF3 →

2701 GCGGCGCC**GGAA**CCATGAAGCGGAATGGTATCATGACGAACAGGAACATCATCATCATAG

1 M K R N G I M T N R N I I I I G

2761 GAGGCGGACCGGCTGGCGTTTCGGCAGCGATCGAGGCCAGAAAACTCGATCCGGCTGCAA

17 G G P A G V S A A I E A R K L D P A A N

2821 ATGTGACGCTTCTGACCAGCGAAACGCGGGAGCCCTATGAAAAGCCACCCCTGTCGAAGG

37 V T L L T S E T R E P Y E K P P L S K A

2881 CCGTGCTCGCGCACAAGGCCCTTCCGGAAGATGCGCTGATTGCAGGCACTGGAGGGCTGG

57 V L A H K A L P E D A L I A G T G G L A

2941 CGGCCCACGGTGTCGCGGTGAAGTTCGGCACGCGCTGCAAGTCGATCGACCGTGAGGCGC

77 A H G V A V K F G T R C K S I D R E A R

3001 GTCAGGTGGTGACGGACGACGGACGTCTGCCCTATGACGCGCTGGTCATCGCCAGCGGCT

97 Q V V T D D G R L P Y D A L V I A S G S

3061 CGGTGATGCGCGCCTTACCATCCCTCCCCGCCTCCATGCCGGGCGTCCATTATCTGCGCG

117 V M R A L P S L P A S M P G V H Y L R E

3121 AAGCAGCCGACGCGGAAGCGATCCGCGAGGCTCTCGGCAACTGCCGGACCCTTGCGGTGG

137 A A D A E A I R E A L G N C R T L A V V

3181 TTGGCGCGGGACTGATCGGCCTGGAGGTGGCCGCAACCGCTGCCGAGCTTGGCGTGCAGG

157 G A G L I G L E V A A T A A E L G V Q V

NAD$^+$ binding of ferredoxin reductase

3241 TGGAGATATTCGAATTTGCTCCGCGCATTCTGATGCGCGCCTGTGACGGAGAGATCGCCG

177 E I F E A A P R I L M R A C D G E I A E

3301 AGATCATCCACGCCTATCATCGACAACACGGCGTGAACATCTGGACCAGCATTGCGGTGA

197 I I H A Y H R Q H G V N I W T S I A V T

3361 CGGCTGCGACCGTGACCGGGGATGGCCGGATCAGACTGGACACGAGCGATGGCGCGCACC

217 A A T V T G D G R I R L D T S D G A H H

3421 ATGAGGCAGACCAGGTGATCGTGGGTGTCGGCGTTGGGCCGGATGACAGGCTGGCCAAGG

237 E A D Q V I V G V G V G P D D R L A K E

3481 AAGCGGGTCTCCTCGTGGATGGCGGGATCATCGTGGATCGGCACTGCCGCACATCGGATC

257 A G L L V D G G I I V D R H C R T S D P

3541 CTGCCATTTTTTCGGCGGGCGACTGCACACGATTTCCGGGTCCGACAGGTCCGGTGCGGC

277 A I A S A G D C T R A P G P T G P V R L

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
3601 TGGAAAACTGGATGCACGCACTCGACCACGGCACAGTGGCCGGGGCAAATGCAGCCGGTG
297    E  N  W  M  H  A  L  D  H  G  T  V  A  G  A  N  A  A  G  G
                                          Flavin  binding  fold
3661 GAGACATTGCCTACGAAGCAAAACCCTCCTTCTGGTCTGAACAATACGATCTTTACATTC
317    D  I  A  Y  E  A  K  P  S  F  W  S  E  Q  Y  D  L  Y  I  Q

3721 AGGGTATCGGCTGGCCGGACCCGGACGCTAGCCGGGTGACACGCCCGCTGGACGGCAACC
337    G  I  G  W  P  D  P  D  A  S  R  V  T  R  P  L  D  G  N  R

3781 GGGCACTGGTGGTCGAGATGAAGAACGGACTGATCCAGAGCGCGCTCGGCATCAATGTGT
357    A  L  V  V  E  M  K  N  G  L  I  Q  S  A  L  G  I  N  V  S

3841 CGCGTGATATTGCGGCGATACGACGGCTGATCGACCGGCGGATCGAGGTCGATCCCGTGG
377    R  D  I  A  A  I  R  R  L  I  D  R  R  I  E  V  D  P  V  A

3901 CTGTCGCAGACCCTGAACGCCCTTTCGCGGATATGCTGAAGCAGAAAGTCTGAGACAGGA
397    V  A  D  P  E  R  P  F  A  D  M  L  K  Q  K  V  *

3961 CCAACCCTATGCACGGACAGCCCTGCGCTGGGCGGACTGGATAACACGGCAATAGAATTC

4021 AGTTTTACAGAATTCATTTCTTTATTACAGAATTTATTTGCCACATACATCGATGCCGCC

4081 TATAGTGATCACGCGGTCGGAGTGCTGGAGGGGAAGAACAGGCATCCGTCATCTCGACAC

4141 GGCCTTGCGGGCATTGACGATTGTACAAGGCGGGGAGTGAAAAGCGCTTCGCTTGCAGCC

4201 GGAACTGGAGGAGACACCTGGCACTTCCTTGATGACGCAACCGCAGACACACCATTCCCG

4261 GCAATGATCACCCCTTAAAGGGCGGAGCCGAAAGCTCGATTGACGTTCTTGCAGTCCATT

                                                         RBS
4321 GCAAGCGCTCCGGACGACCTGTTGTCGTGGGCGCTTTTTATTTCGAAGAAAGGTTGAAGA
       (acnE)
      ORF4  ----->
4381 CCATGCTCACTGCTGCCGACATCCATGGGATGTACGCCATCATCGCGACCCCGGCGAAAC
1      M  L  T  A  A  D  I  H  G  M  Y  A  I  I  A  T  P  A  K  P

4441 CCCATGCCGGAAGACTGGACGCCAAGGACACCGTTGATCTTGCCGAAACCGAGCGGTTGA
21     H  A  G  R  L  D  A  K  D  T  V  D  L  A  E  T  E  R  L  I

4501 TCAACAAGCTGATCCTTGACGGTTGCGACGGCCTGATCATTACCGGTACGACGGGCGAGT
41     N  K  L  I  L  D  G  C  D  G  L  I  I  T  G  T  T  G  E  C

4561 GCGCAACGCTGTCCGAGAGCGACTACCGGGCATTCGTGGACTGCGCACTTTCCACCGTCA
61     A  T  L  S  E  S  D  Y  R  A  F  V  D  C  A  L  S  T  V  N

4621 ACCGGCGCATTCCCACCATCGTGGGTGCGACCGCCATGGGCGGCCATGAGGTCGTGCGCC
81     R  R  I  P  T  I  V  G  A  T  A  M  G  G  H  E  V  V  R  R

4681 GACTGACGTTTATTCGTGAACAGGGCGCAGACGCGACGCTGCTGGGGTTGCCGATGTGGC
101    L  T  A  I  R  E  Q  G  A  D  A  T  L  L  G  L  P  M  W  Q

4741 AGCCGGTGACGACACGGATGGCCGTCGATTATTACGCGGGAATTTCAGAACTGTTCCCCG
121    P  V  T  T  R  M  A  V  D  Y  Y  A  G  I  S  E  L  F  P  D

4801 ATCTTGCGATCATGGCTTACGCTAATGCGCGCGCCTTCCGCTTCTCCTTTCCGCTTGAGT
141    L  A  I  M  A  Y  A  N  A  R  A  F  R  F  S  A  P  L  E  F
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
4861 TCTGGTCGGCAGTGGCGCAGGCGGCTCCCACCGTGACTTCGGCGAAGTATTCCCGTACGC
161    W  S  A  V  A  Q  A  A  P  T  V  T  S  A  K  Y  S  R  T  Q

4921 AGGGACTGAAGGAACTGATCGCGGCGACGGGCGGGCGGATCAATTTCATGCCGAACGAAA
181    G  L  K  E  L  I  A  A  T  G  G  R  I  N  F  M  P  N  E  M

4981 TGGTCGTGCAGGACTTCTTCGCCATCGCGCCCAATACGACGACGGCCTGCTGGGCAACGG
201    V  V  Q  D  F  F  A  I  A  P  N  T  T  T  A  C  W  A  T  A

5041 CCTCCGGCATGAACCCTGCGCCTGCAATCGCCCTGATGAGAGCGATCGAAGCCCGGAACC
221    S  G  M  N  P  A  P  A  I  A  L  M  R  A  I  E  A  R  N  Q

5101 AGGACGCCATCCATACGCTGACGGCGGCCATCGGCTGGGCGAACGAGCCTATTCAGCCCA
241    D  A  I  H  T  L  T  A  A  I  G  W  A  N  E  P  I  Q  P  M

5161 TGCTGGCCGATGCCGATCTGTTTGCGCAATACAATATCCAGATGGAAAAGACGCGGATCA
261    L  A  D  A  D  L  A  A  Q  Y  N  I  Q  M  E  K  T  R  I  N

5221 ATGCCGCCGGTTACAGCCAGTGCGGCCCCGTGAGACCCCCCTATCAGGACTTCCCGGAAG
281    A  A  G  Y  S  Q  C  G  P  V  R  P  P  Y  Q  D  F  P  E  D

5281 ATTATGCCGCGCAGGCCCGTGAATGCGGCCAGCGCTGGCACCGCATCTGCGATGCCTATG
301    Y  A  A  Q  A  R  E  C  G  Q  R  W  H  R  I  C  D  A  Y  A

5341 CGGGGAATTTCAAGTTCAAGGACCACCCCTGGGAGACAGCGGGCGAACGGACGGCCTGAA
321    G  N  F  K  F  K  D  H  P  W  E  T  A  G  E  R  T  A  *

                                                         RBS
5401 ACGGCAGCCGCGCCACTGCGCGCGGCGCCTTTATGCACAGCCAAACTATCTGGAGTAGGT
       (acnK)
       ORF5  ------>
5461 CGATGGGATACATCACGACAGCAGACCGCATGCTGATTGGCGGCGAGCTGGTGGAAAGCA
1      M  G  Y  I  T  T  A  D  R  M  L  I  G  G  E  L  V  E  S  T

5531 CGAGCGGCGCCTGGGAAGAAACATTCAATCCAGCCGATGAAACCGCAATCGGGCGCGTTC
21     S  G  A  W  E  E  T  F  N  P  A  D  E  T  A  I  G  R  V  P

5581 CTGCCGGGACAAGGGAGGATGTGGACCGCGCCGTTGCCGCAGCCCAGGCGGCATGGCCCG
41     A  G  T  R  E  D  V  D  R  A  V  A  A  A  Q  A  A  W  P  A

5641 CATGGGCGAGCAAAACACCGAAGGAACGCGGCGAAACCATGCGCGCCTTCGGTGAGAAAA
61     W  A  S  K  T  P  K  E  R  G  E  T  M  R  A  F  G  E  K  I

5701 TCCGCGCCCGCGCCACGGAAATCCTTCATGTCGAGGTTGCCGACACCGGCAACACCATCA
81     R  A  R  A  T  E  I  L  H  V  E  V  A  D  T  G  N  T  I  T

5761 CGCCGATGCGCGGAGATGTCGGCCATGCCGTCGACAGTCTCAATTACTATGCCGGCATAG
101    P  M  R  G  D  V  G  H  A  V  D  S  L  N  Y  Y  A  G  I  A

5821 CCCACGAATTGAAGGGAGAAACGATACCGGCAACCCCGGATCATCTTCACCTGACCATTC
121    H  E  L  K  G  E  T  I  P  A  T  P  D  H  L  H  L  T  I  R

5881 GCGAGCCCTACGGCGTCGTGGCGCGGATCGTGCCGTTCAACCACCCCTTGATGTTTGCAG
141    E  P  Y  G  V  V  A  R  I  V  P  F  N  H  P  L  M  A  A  V

5941 TGGCCAGAACAGCCGCCGCCCTTGCCGCCGGCAACGCCGTCATCGTGAAGCCGCCGGAAA
161    A  R  T  A  A  A  L  A  A  G  N  A  V  I  V  K  P  P  E  T
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
6001 CCAGCCCGCTATCGGCGATGGTGCTGGCGGAAATCGCCCGCGAGGCGCTGCCGCCCGGGG
181    S  P  L  S  A  M  V  L  A  E  I  A  R  E  A  L  P  P  G  V

6061 TGTTCAACATCGTGACCGGAACAGGCCCTTCGGTTGGTGAAGCCATCGTGCGGCACCCGG
201    F  N  I  V  T  G  T  G  P  S  V  G  E  A  I  V  R  H  P  E

6121 AAATCAAGCGCATCGCGTTCATTGGATCGGCAGCCACCGGCCGCGCCATCCAGAGGACTG
221    I  K  R  I  A [F  I  G  S  A  A  T  G] R  A  I  Q  R  T  A
                      NAD+ binding fold
6181 CGGCAGAGGTGAGCGTCAAGCATGTGACACTGGAGCTTGGCGGCAAGAACCCGATGATCG
241    A  E  V  S  V  K  H  V  T [L  E  L  G  G  K  N  P] M  I  V
                       Active site of aldehyde dehydrogenase
6241 TTTTTCCCGACAATGATCCGGACGAGATTGCGCAAGCCGCGGTCAAGGGAATGAATTTCA
261    A  P  D  N  D  P  D  E  I  A  Q  A  A  V  K  G  M  N  F  T

6301 CCTGGCAGGGCCAGTCCTGCGGCTCGACAAGCCGGTTGATGGTCCACGAAGACCTTTACG
281    W  Q  G  Q  S  C  G  S  T  S  R  L  M  V  H  E  D  L  Y  D

6361 ATGCCGTGCTTGAGCGTGTGGCAAACATCGTTGCCAGCCTGCGTGTCGGCGACCCGATGC
301    A  V  L  E  R  V  A  N  I  V  A  S  L  R  V  G  D  P  M  R

6421 GCGACGACAGCGACATGGGACCGATCAACTCCGCCGGGCAGTATCGCAAGGTCATGGGCT
321    D  D  S  D  M  G  P  I  N  S  A  G  Q  Y  R  K  V  M  G  Y

6481 ATATCGAAAGCGGCAACGCCGAAGGCGCCCGGCTTGTGACAGGCGGCAACCGGCCGGATG
341    I  E  S  G  N  A  E  G  A  R  L  V  T  G  G  N  R  P  D  G

6541 GTCAAGCCTTCGCCAAGGGTTACTGGGTCAGACCCACCGTCTTTGCCGATGTCGATCCAC
361    Q  A  F  A  K  G  Y  W  V  R  P  T  V  A  A  D  V  D  P  H

6601 ATATGCGCATCTGGCGGGAAGAGATTTTTGGACCGGTTCTCTCCGTCAGCAAATGGCACT
381    M  R  I  W  R  E  E  I  A  G  P  V  L  S  V  S  K  W  H  S

6661 CCGTCGATGAGGCGATCCGGCTTGCGAACGGTGTCGAATATGGCCTGACGGCGTCGATCT
401    V  D  E  A  I  R  L  A  N  G  V  E  Y  G  L  T  A  S  I  W

6721 GGACAAAGGATATCAAGAACGCGCTCAACACGGCACGTCGCATCGACGCTGGCCATATCT
421    T  K  D  I  K  N  A  L  N  T  A  R  R  I  D  A  G  H  I  W

6781 GGATCAACGGTGTTGGCCCGCATTACCTCGGCGTGCCCTATGGCGGCATGAAGAACAGCG
441    I  N  G  V  G  P  H  Y  L  G  V  P  Y  G  G  M  K  N  S  G

6841 GCGTCGGGCGCGAAGAGGGCATCGAGGAGATGCTGAGCTACACCGAAACCAAGGTTCTCA
461    V  G  R  E  E  G  I  E  E  M  L  S  Y  T  E  T  K  V  L  N

6901 ATATCGTCCTGTGACACCTAAAGCAGTTCCATCAAAATTGGAAACCGGTTTTGCTGGAAT
481    I  V  L  *

6961 TTTGTAAAAACAAAGAGATGGAGCATATCCGGCAAGCGGGAGGCGCACCGGAAATGCTCC

                RBS          ORF6 ───►
7021 GGAATGCAGGGAGTTCATACCATGCCTGACCACATCAAACAGACCATCAGCGAGGCGGAT
1                         M  P  D  H  I  K  Q  T  I  S  E  A  D

7081 CTGAGGGCTGCGGGCTTTTCCGAACCGCTTCCCGACCCGGCCCTGATCGCTGATCTCGTC
14   L  R  A  A  G  A  S  E  P  L  P  D  P  A  L  I  A  D  L  V

7141 GCGGCCAATCATATCCTGTTCGATCAGGGCGTGGTCGATGCGTTCGGGCATGTCAGCGTC
34   A  A  N  H  I  L  F  D  Q  G  V  V  D  A  F  G  H  V  S  V
```

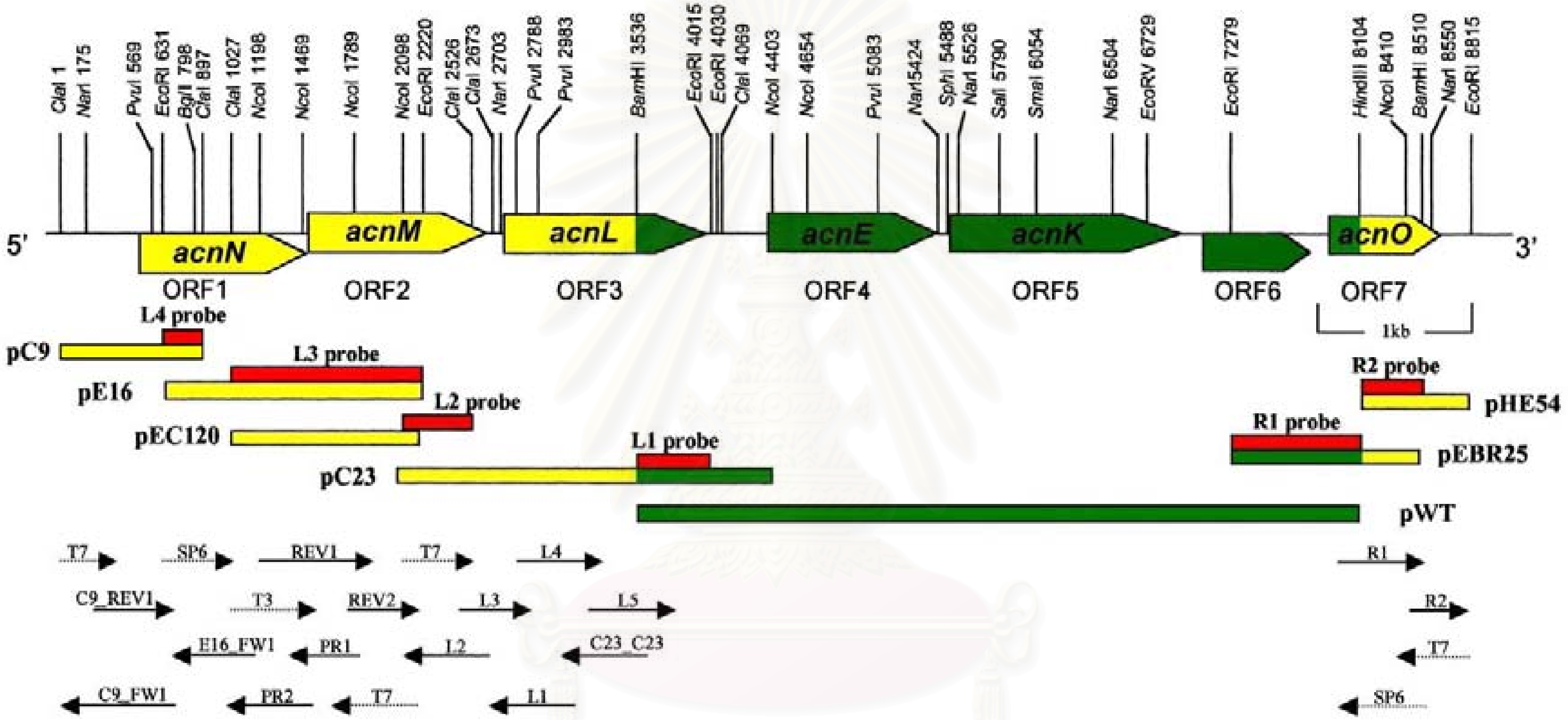
```
7201 CGTCACGACAAACAGCAGGACCGCTACCTTCTGGCGCGCAACATGGCACCGGGTCAGGTG
54   R  H  D  K  Q  Q  D  R  Y  L  L  A  R  N  M  A  P  G  Q  V

7261 AGCGCCGACGACATCATCGAATTCACCTTCGATGGCGAGGCGGTGAATGGCCGGGAGCGG
74   S  A  D  D  I  I  E  F  T  F  D  G  E  A  V  N  G  R  E  R

7321 CGCGTCTATCTCGAACGGTTCATCCATGCGGAACTCTACCGCGCAAGGCCGGATGTGATC
94   R  V  Y  L  E  R  F  I  H  A  E  L  Y  R  A  R  P  D  V  I

7381 GCTGTCGTTCACAGCCATTCGCATTCCATTCTGCCGCTGACCATCTCCAAATCGGTGCGC
114  A  V  V  H  S  H  S  H  S  I  L  P  L  T  I  S  K  S  V  R

7441 CTGCGCTCCGTTTTTCATATGGCCGGTTTCATCGGTCAGGACGCACCGCTTTTCGAGATT
134  L  R  S  V  A  H  M  A  G  F  I  G  Q  D  A  P  L  F  E  I

7501 CGCGATCATGGCGGACCGGCAACCGACCTGCTGATCAGCAACAGCGAACTGGGCCACGCG
154  R  D  H  G  G  P  A  T  D  L  L  I  S  N  S  E  L  G  H  A

7561 CTGGCCGCGTGCTGCGGAGAGCGGAACATCGTGCTGATGCGCGGACATGGTTCGACCGTC
174  L  A  A  C  C  G  E  R  N  I  V  L  M  R  G  H  G  S  T  V

7621 GTCGCCGATTCCCTGCCAAGAGCCGTTTACCGTGCCGTCTACGCGGAACTGAATGCACGC
194  V  A  D  S  L  P  R  A  V  Y  R  A  V  Y  A  E  L  N  A  R

7681 TACCAGTGTGACGCCATCGGGCTGGGCGATGTCGAATATCTGACCGAAGCCGAATGCGAA
214  Y  Q  C  D  A  I  G  L  G  D  V  E  Y  L  T  E  A  E  C  E

7741 ACCAGCGTCAGAAACGTGGAGGCGCAGTGGCACCGTCCTTGGGCGCTGTGGAAGGAGCAG
234  T  S  V  R  N  V  E  A  Q  W  H  R  P  W  A  L  W  K  E  Q

7801 GCAGCCGAACGCCGTGCCGGATAGATGGCAGCCATCATCGTGCCGCGCGCAGGCGCGCGA
254  A  A  E  R  R  A  G  *

                                   (acnO)
                        RBS        ORF7   ──►
7861 TAACAATTCAAGCAACATGAGAGGACATCATGGGTAATCGTCTGGATGAAAAAGTGTGCG
1                                  M  G  N  R  L  D  E  K  V  C  V

7921 TCATCACCGGCGCGGCGCAAGGGATAGGACAGGGCTGCGCACTCGAAATGGCGGTTCAGG
12     I  T [G  A  A  Q  G  I  G] Q  G  C  A  L  E  M  A  V  Q  G
                NAD+ binding site
7981 GCGGCAGGATCGTTGTCAGTGACCGCAATGTCGCTGGCGGCGAGGAAACCGTTCGGCAAA
32     G  R  I  V  V  S  D  R  N  V  A  G  G  E  E  T  V  R  Q  I

8041 TCGTCGAGCTGGGCGGTGAGGCAATCTTCGTTGCCTGTGACGTGCGGAACCGCGATGATC
52     V  E  L  G  G  E  A  I  F  V  A  C  D  V  R  N  R  D  D  L

8101 TCGAAGCTTTGATGAAAGCGGCAGCCAGCCACTTCGGCGGCATTGACGTCCTCTTCAACA
72     E  A  L  M  K  A  A  A  S  H  F  G  G  I  D  V  L  F  N  N

8161 ATGCGGGCACTCATGACACCGACCTCACGCCCCACACCGCTGTCCACGAATTGCCGGACG
92     A  G  T  H  D  T  D  L  T  P  H  T  A  V  H  E  L  P  D  E

8221 AGGTCTGGGATATGGTCTATGAGGTCAACCTGCGCTCCATCTGGTACGGCGTGCGCGCTG
112    V  W  D  M  V  Y  E  V  N  L  R  S  I  W  Y  G  V  R  A  A

8281 CCCTTCCCTATCTTCGCCAATCGAAAGGCGCGTCGATCATCAATACCGCATCTATCGCTT
132    L  P  Y  L  R  Q  S  K  G  A  S  I  I  N  T  A  S  I  A  S
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

```
8341 CCTATGTGGCGATGCCGGTCTCTCCCGCCTACAACGCCACCAAGGGCGCGGTGCTGATGC
152    Y  V  A  M  P  V  S  P  A [Y  N  A  T  K] G  A  V  L  M  L
                       Active site of short-chain alcohol dehydrogenase
8401 TGACAAAATCCATGGCGGTCGATCTTGCGCAGTTCAACATACGGGTGAACTGCATCAACC
172    T  K  S  M  A  V  D  L  A  Q  F  N  I  R  V  N  C  I  N  P

8461 CCGGCACCATCAAGACGCCGTTGCTGGACAAGTATTTCGACATCATCGAGGATCCCGATG
192    G  T  I  K  T  P  L  L  D  K  Y  F  D  I  I  E  D  P  D  A

8521 CGCGAGCCGCCGCCCTGCACGGCTTTCTCGGCGCCAATCTCGTTCCACGGCTGGGAACGC
212    R  A  A  A  L  H  G  A  L  G  A  N  L  V  P  R  L  G  T  P

8581 CGCAGGAAGTCGGCAAGCTGGTCTGTTTCCTTGCATCCGACGACGCCTCGTTCCTGACGG
232    Q  E  V  G  K  L  V  C  F  L  A  S  D  D  A  S  F  L  T  G

8641 GTGCGGCCTATCTCGTCGATGGCGGCATGACCGCATGGCGCGGCACCCGCACCTGACAGG
252    A  A  Y  L  V  D  G  G  M  T  A  W  R  G  T  R  T  *

8701 CTGCAACCTGCCTTGCGCATAAAGGGCCGGGCGATCCGCTCCAGAGATTGACCGGCTTTT

8761 TGCTTGCATGTGGATTGTTGCGGCCAAACGGGCAATGAGACTTGAAGGTTTCATGAATTC 3'
```

รูปที่ 4.37 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC9, pE16, pEC120, pC23, pWT, pEBR25 และ pHE54 ขนาด 8820 bp ลูกศรแสดงทิศทางการถอดรหัส ตัวอักษรสีดำแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pC9, pE16, pEC120, pC23, pEBR25 และ pHE54 ตัวอักษรสีชมพูแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545) เครื่องหมาย * แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาแสดงบริเวณที่เป็น putative ribosome binding site (RBS) ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาที่ขีดเส้นใต้แสดงบริเวณที่เป็น putative promoter กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกันแสดงด้วยตัวอักษรสีเดียวกัน (ตัวอักษรสีแดงและสีน้ำเงิน) กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.38 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิดชนิดต่าง ๆรวมขนาด 8820 bp แสดงชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิดที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ แสดงชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT ซึ่งทราบข้อมูลแล้ว (ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์, 2545) แสดงชิ้นดีเอ็นเอติดตาม ลูกศร แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) และทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ตัวต่าง ๆตามที่ระบุชื่อไว้ด้านเหนือลูกศร โดย ⟶ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ ⇢ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แม้ว่าวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจะมีการศึกษามาเป็นเวลานานแล้ว แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่พบการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนที่สมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ สารมัธยันต์ตัวสุดท้ายที่พบในรายงานของวิถีนี้คือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (Selifonov และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) จึงได้เริ่มศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนคือ *acnE* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส และ *acnK* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสแทรกสอดอยู่ในพลาสมิด pWT เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นยังพบว่ามี 2 ORF ที่ยังไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ (ดังแสดงในรูปที่ 4.1) ซึ่ง ORF1 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (ferredoxin reductase) ที่ประมวลรหัสโดย *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) และ ORF5 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดย *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover และคณะ, 2000) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เหนือขึ้นไปจาก ORF1 หรือถัดลงมาจาก ORF5 โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ทราบแล้วเป็นตัวติดตามยีนอื่นๆที่อยู่ข้างเคียงด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้เพื่อหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณเหนือขึ้นไปจาก *acnE* และถัดลงมาจาก *acnK*

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเหนือขึ้นไปจาก ORF1 เริ่มจากการสร้างดีเอ็นเอติดตาม L1 L2 L3 และ L4 ตามลำดับ จากนั้นนำไปติดตามในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ผลการทดลองได้โคลนทั้งหมด 4 ตัวคือ pC23 pEC120 pE16 และ pC9 ตามลำดับ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดทั้งชิ้นทั้งสองสาย (sense และ antisense strands) ในพลาสมิดที่โคลนได้โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของโคลนนั้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจาก pC23 pEC120 pE16 และ pC9 มาเชื่อมต่อกันและทำการตัดข้อมูลที่ซ้อนทับกันของแต่ละตัวออกไปได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เหนือขึ้นไปจาก ORF1 ทั้งหมด 3535 bp

จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ถัดลงมาจาก ORF5 โดยการสร้างดีเอ็นเอติดตาม R1 และ R2 ตามลำดับ ผลการทดลองได้โคลนทั้งหมด 2 ตัวคือ pEBR25 และ pHE54 ตามลำดับ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดทั้งชิ้นทั้งสองสาย (sense และ antisense strands) ในพลาสมิดที่โคลนได้โดยใช้ทั้งวิธี primer walking และการใช้ universal primer ที่จำเพาะกับพลาสมิดของโคลนนั้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจาก pEBR25 และ pHE54 มาเชื่อมต่อกันและทำการตัดข้อมูลที่ซ้อนทับกันของแต่ละตัวออกไปได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ถัดลงมาจาก ORF2 ทั้งหมด 711 bp

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเหนือขึ้นไปจาก ORF1 ทั้งหมด 3535 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถัดลงมาจาก ORF5 ทั้งหมด 711 bp มาเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบข้อมูลแล้วของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pWT ที่มีขนาด 4574 bp ด้วยโปรแกรม DNASIS จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งสิ้น 8820 bp (ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.37) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดไปเทียบความเหมือนในระดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.6 และหาบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ consensus sequence -35 region และ -10 region ของโปรโมเตอร์ที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993) ดังแสดงในรูปที่ 5.1

รูปที่ 5.1 Consensus sequence **ของโปรโมเตอร์** (Lisser **และ** Margalit, 1993) **ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดงเปอร์เซ็นต์การพบเบสชนิดนี้ที่ตำแหน่งนั้น**

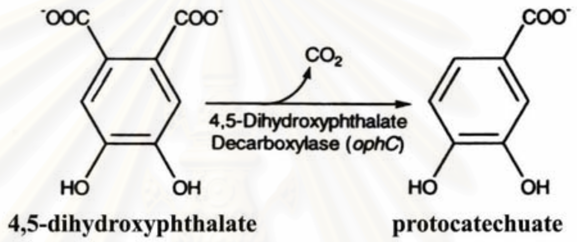
จากข้อมูลความเหมือนในระดับกรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม BlastX และการหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีนรวมถึงตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 7 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน (ดูรูปที่ 4.38 ประกอบ)

พบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นโปรโมเตอร์ (promoter) เหนือกรอบอ่านรหัสเปิดที่1 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 5’-TTCAGG-3’ และ 5’-TATAAT-3’ (ดังแสดงในรูปที่ 4.37) ซึ่งคล้ายกับ consensus sequence ของ -35 region และ consensus sequence ของ -10 region ตามลำดับที่รายงานโดย Lisser และ Margalit (1993)

นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นตำแหน่งเกาะของไรโบโซม(ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence) หน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ โดยบริเวณตำแหน่งเกาะของไรโบโซมมักจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีน 3-10 เบส อยู่ก่อนรหัสเริ่มต้นของ

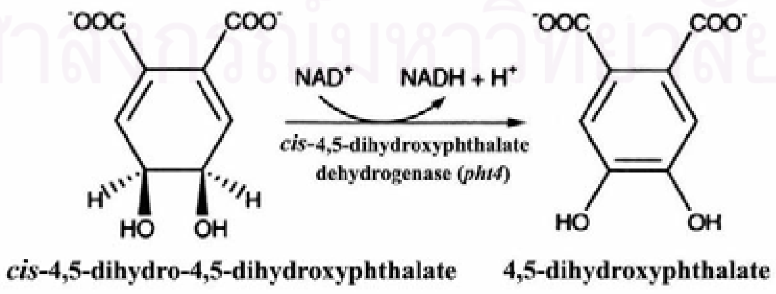
กรอบอ่านรหัสเปิดประมาณ 10 เบส เสนอโดย Shine และ Dalgarno (1974) จากผลการทดลองที่พบนี้อาจกล่าวได้ว่ากรอบอ่านรหัสเปิดทั้ง 7 แห่งน่าจะถอดรหัสเป็น mRNA สายเดียวกันดังนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) หรือ *acnN* อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกับกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 6 แต่อยู่ในกรอบอ่านรหัสที่ต่างจากกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2-5 และ7 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 334 ตัว มีความเหมือนกับ 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซีเลส (4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase) ที่ประมวลรหัสโดย *ophC* ของ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ DBO1 (Chang และ Zylstra, 1998) เท่ากับ 36% ซึ่ง 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซิเลส จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลท (4,5-dihydroxyphthalate) เป็น โปรโตคาทีคูเอท (protocatechuate) ในวิถีการย่อยสลายพธาเลท (phthalate) ของ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ DBO1 ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.2 การเร่งปฏิกิริยาของ 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซิเลสใน *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ DBO1 (Chang และ Zylstra, 1998)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือ *acnM* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 396 ตัว มีความเหมือนกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนส (*cis*-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดย *pht4* ของ *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992) เท่ากับ 45% ซึ่ง *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่ในการเปลี่ยน *ซิส*-4,5-ไดไฮโดร-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลท (*cis*-4,5-dihydro-4,5-dihydroxyphthalate) ได้เป็น 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลท (4,5-dihydroxyphthalate) ในวิถีการย่อยสลายพธาเลทของ *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992) ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.3 การเร่งปฏิกิริยาของ *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนส ใน *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992)

พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของเอนไซม์ในกลุ่ม dihydrodiol dehydrogenase novel family ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน GXXGXG (X หมายถึงกรดอะมิโนตัวใดๆ) (Nakatsu และ Wyndham, 1997; Chang และ Zylstra, 1998) โดยใน ORF นี้บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน GLVGLG

พบบริเวณ consensus sequence ของเอนไซม์ในกลุ่ม dihydrodiol dehydrogenase novel family (Nakatsu และ Wyndham, 1997; Chang และ Zylstra, 1998; Masai, และคณะ 2000) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน $HX_{11}KHVLXEKPXA$ (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) โดยใน ORF นี้บริเวณ consensus ดังกล่าวประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน HRQQAIMAAEAGKHIIV EKPMA

Dihydrodiol dehydrogenase novel family จัดเป็นดีไฮโดรจีเนสกลุ่มใหม่ที่มีความแตกต่างไปจาก dehydrogenase superfamilies Type I II และ III (Nakatsu และ Wyndham, 1997; Masai, และคณะ 2000) เนื่องจากพบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของเอนไซม์และบริเวณ consensus sequence ที่แตกต่างไปจาก dehydrogenase superfamilies Type I II และ III ตัวอย่างเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *cis*-4,5-dihydroxy phthalate dehydrogenase ของ *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992) *cis*-phthalate dihydrodiol dehydrogenase ของ *Burkholderia cepacia* DBO1 (Chang และ Zylstra, 1998) และ glucose-fructose oxidoreductase ของ *Zymomonas mobilis* (Kanagasundaram และ Scopes, 1992)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือ *acnL* ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ได้รายงานว่า ORF นี้ยังไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหนือขึ้นไปจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้ว หลังจากได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วนสามารถระบุได้ว่า ORF นี้ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 412 ตัว มีความเหมือนกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (putative ferredoxin reductase) ที่ประมวลรหัสโดย *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) เท่ากับ 36%

พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น $GXGX_2GX_3AX_6G$ (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) เสนอโดย Hanukoglu และ Gutfinger (1989) โดยใน ORF นี้บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน GAGLIG LEVAATAAELG

พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับฟลาวิน (flavin) ภายในโมเลกุลของ FAD ของกรอบอ่านรหัสเปิดนี้ โดยบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน TVAGANAAGGD คล้ายกับรายงานที่เสนอโดย Eggink และคณะ (1990) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น TX_6AXGD (X

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) เฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase system) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท inositol ที่สร้างโดย bacteroid ในรากพืช (Bahar และคณะ, 1998)

การย่อยสลาย PAHs ทั่วไปนั้นต้องการไดออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลาย สำหรับไดออกซิจีเนสนั้นประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน ISP large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) (Ensley และคณะ, 1982) ซึ่งเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำงานของไดออกซิจีเนส แต่เนื่องจากมีรายงานว่าเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่ไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยา (Kurkela และคณะ, 1988; Simon และคณะ, 1993) ดังนั้นความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของกรอบอ่านรหัสเปิดนี้ยังไม่สามารถที่จะสรุปได้แน่นอนซึ่งการสรุปจะแน่ชัดขึ้นเมื่อมีการศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญในอะซีแนพธิลีนและการแสดงออกของยีน

สำหรับกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 5 และ 6 นั้นเป็นกรอบอ่านรหัสที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์แล้วโดย ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ได้รายงานถึงกรอบอ่านรหัสทั้ง 3 ไว้โดยสรุปดังต่อไปนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) หรือ *acnE* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 338 ตัว มีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส (Hydratase-aldolase) ที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% ไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของกรด *ทรานส*-*o*-ไดไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก [*trans*-*o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA)] ได้เป็นซาลิไซรัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนและฟีแนนทรีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) หรือ *acnK* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 483 ตัว มีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase) ที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ให้เป็น กรดพธาลิก (*o*-phthalic acid) ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 6 (ORF6) อยู่ในกรอบอ่านรหัสเดียวกับ ORF1 แต่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF2-5 และ 7 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 260 ตัว มีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับแอดดูซิน (adducin) ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko

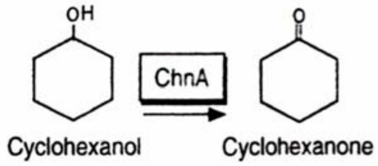
และคณะ, 2000) เท่ากับ 38% ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่การทำงานของโปรตีนที่คล้ายกับแอดดูซินที่แน่นอน

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 7 (ORF7) หรือ *acnO* ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ (2545) ได้รายงานว่า ORF นี้ยังไม่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถัดลงมาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบแล้วเมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วนสามารถระบุได้ว่า ORF นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 268 ตัว มีความเหมือนกับ short-chain alcohol dehydrogenase ของ *Novosphingobium aromaticivorans* (Romine และคณะ, 1999) เท่ากับ 56%

พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD^+ ของเอนไซม์ในกลุ่ม alcohol dehydrogenase Type II ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ GXXXGXG (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) (Reid และ Fewson, 1994) โดยใน ORF นี้บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน GAAQGIG

พบบริเวณอนุรักษ์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน YNATK ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 161-165 ของกรอบอ่านรหัสเปิดนี้ซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่ง (active site) ของ short-chain alcohol dehydrogenase ใน *Candida tropicalis* ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น YASAK (Qin และคณะ, 2000) สำหรับหน้าที่ของ short-chain alcohol dehydrogenase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ไม่มีการกล่าวถึงโดยตรง พบแต่เพียงรายงานบางส่วนที่กล่าวถึงความเกี่ยวข้องของ short-chain alcohol dehydrogenase ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Junker และคณะ, 1997) และทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ β-oxidation ใน *P. aerugunosa* สายพันธุ์ PAO1 (Stover และคณะ, 2000)

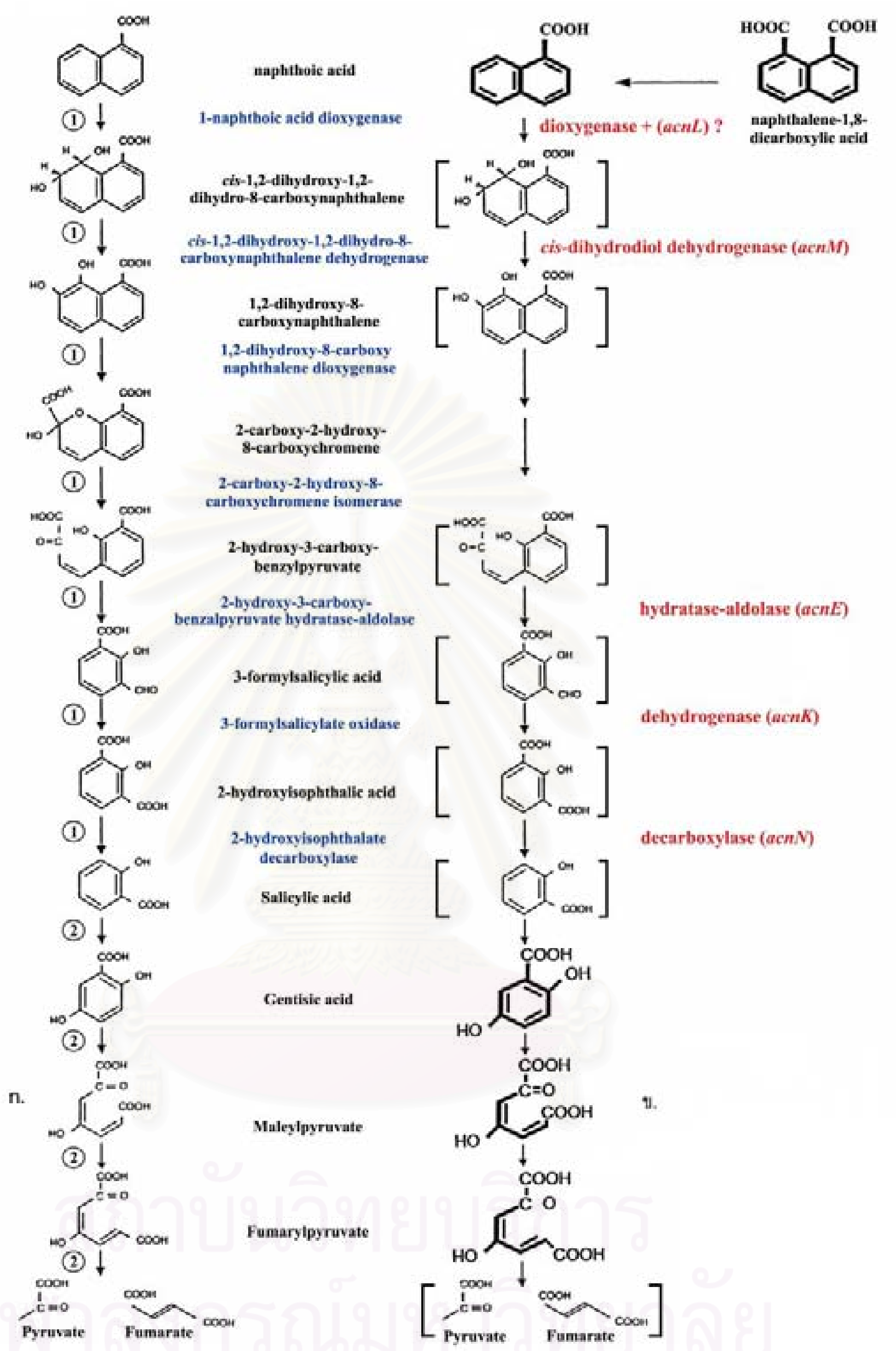
Cheng และคณะ (2000) รายงานว่า *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ SE19 มี *chnA* ประมวลรหัสไซโคลเฮกซานอล ซึ่งกรดอะมิโนของยีนชนิดนี้มีความเหมือนกับ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Short-chain zinc-independent alcohol dehydrogenase) *ของ Sphingomonas paucimobilis* (Nagata และคณะ, 1994) เท่ากับ 41% สำหรับในสายพันธุ์ SE19 นี้เอนไซม์ไซโคลเฮกซานอลดีไฮโดรจีเนส ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน ไซโครเฮกซานอล (cyclohexanol) ได้เป็นไซโครเฮกซาโนน (cyclohexanone) ดังแสดงในรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.4 การเร่งปฏิกิริยาของไซโคลเฮกซานอลดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายไซโครเฮกซานอลของ ***Acinetobacter*** **sp. สายพันธุ์ SE19 (Cheng และคณะ, 2000)**

เมื่อพิจารณาวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยอาศัยข้อมูลยีนและรายงานที่ผ่านมาสามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อาจมีวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนมาเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกับ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 เนื่องจากพบการสะสมของอะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรดแนพโธอิก (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์, 2545; Poonthrigpun และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบกรด-2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกหรือกรดเจนทิสิกสะสมในสายพันธุ์กลาย A53 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์, 2545) ซึ่งมีรายงานว่ากรดเจนทิสิกเป็นสารมัธยันต์ที่มักเกิดขึ้นจากการย่อยสลาย PAHs หลายชนิด (Starovoitov, 1975; Grifoll และคณะ, 1995) ดังนั้น ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์ (2545) จึงได้เสนอว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อาจสามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกมาเป็นกรดเจนทิสิกได้ โดยกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลิกบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ทำให้เกิดเป็นกรดแนพโธอิกและเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโธอิกเพื่อแตกวงต่อไปเกิดเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีนเหมือนเช่นวิถีการย่อยสลายกรดแนพโธอิกของ *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale และคณะ, 1995) จากนั้นกรดซาลิไซลิกจะเปลี่ยนเป็นกรดเจนทิสิก (Fuenmayer และคณะ, 1998) และเปลี่ยนเป็นมาเลอิลไพรูเวท ฟูมาริลไพรูเวท และไพรูเวทกับฟูมาเรท ตามลำดับ (Zhou และคณะ, 2001) เพื่อเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) ต่อไป ดังแสดงในรูป 5.5 ซึ่งสอดคล้องกับการพบมาเลอิลไพรูเวทและฟูมาริลไพรูเวทสะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ธัญญรัตน์ ชำนาญกิจ, ข้อมูลยังไม่ได้ตีพิมพ์)

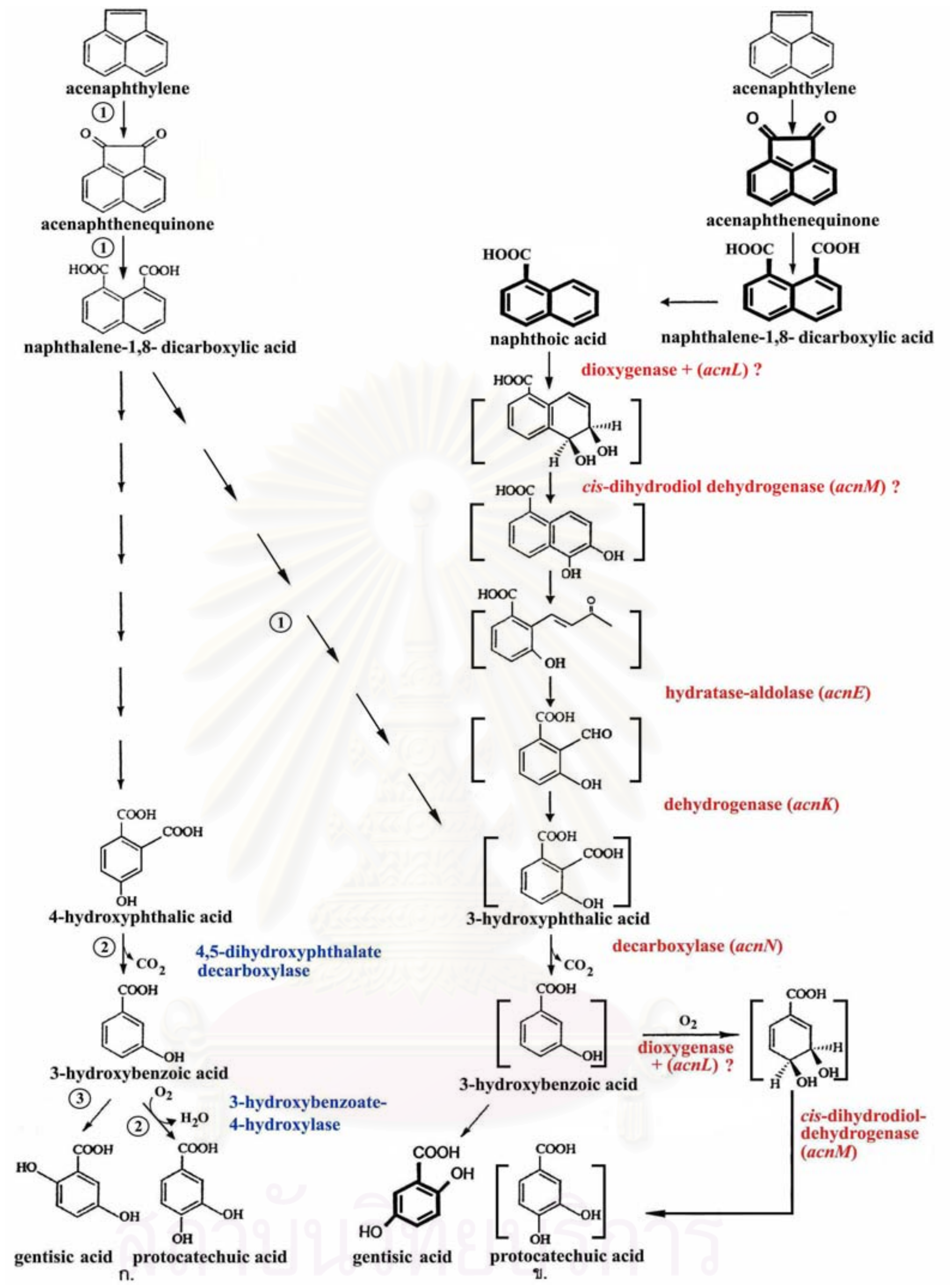
เมื่อพิจารณาฟีโนไทป์ของสายพันธุ์กลาย E11คือ สายพันธุ์กลายนี้ไม่สามารถเจริญทั้งในอะซีแนพธิลีน อะซีแนพโธควิโนนและกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544) และบริเวณที่ทรานสโปซอน Tn*5* เข้าแทรกสอดคือบริเวณ *acnE* ซึ่งมีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส (Hydratase-aldolase) เมื่อนำข้อมูลบางส่วนของยีนนี้มาสร้างดีเอ็นเอติดตามแล้วนำไปติดตามใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จะได้ข้อมูลของยีนต่างๆมาประกอบการพิจารณาร่วมกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน และคาดว่ายีนที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายตั้งแต่กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกลงมา ดังแสดงในรูปที่ 5.5



รูปที่ 5.5 ก) 1. วิถีการย่อยสลายกรดแนพโธอิกของ *Pseudomonas maltophilla* CSV89 (Phale และคณะ, 1995) 2. วิถีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Fuenmayor และคณะ, 1998) และกรดเจนทิสิก (Zhou และคณะ, 2001) ข) ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกและยีนที่เกี่ยวข้องของ *Rhizobium* sp. CU-A1 รูปเข้มคือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้แล้วของ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์, 2545; Poonthrigpun และคณะ, 2003) ตัวอักษรสีน้ำเงินคือ เอนไซม์ของวิถีอ้างอิง ตัวอักษรสีแดงคือ ยีนและเอนไซม์ที่เสนอในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ CU-A1

จากรูปที่ 5.5 *acnLMEK* และ *acnN* อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกลงมาจนกระทั่งได้เป็นกรดเจนทิสิก เนื่องจากยีนทั้ง 5 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ไฮดราเทส-อัลโดเลส ดีไฮโดรจีเนส และดีคาร์บอกซิเลส ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดยยีนทั้ง 5 อาจทำหน้าที่คล้ายกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ซิส-ไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส ไฮดราเทส-อัลโดเลส ดีไฮโดรจีเนส และดีคาร์บอกซิเลส ดังที่เสนอในรูปที่ 5.5 โดยกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลิกบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ทำให้เกิดเป็นกรดแนพโธอิกและเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 บนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโธอิกเพื่อแตกวงต่อไปเกิดเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีน โดยเอนไซม์ที่น่าเข้ามามีบทบาทในขั้นตอนนี้น่าจะเป็นเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnL* และ *acnM* ตามลำดับ จากนั้น 1,2-ไดไฮดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีน จะถูกย่อยสลายต่อจนกระทั่งได้ 2-ไฮดรอกซี-3-คาร์บอกซีเบนซิลไพรูเวท และอาจถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnE* ซึ่งอาจทำหน้าที่คล้ายกับไฮดราเทส-อัลโดเลสในการตัดกิ่งคาร์บอนของ 2-ไฮดรอกซี-3-คาร์บอกซีเบนซิลไพรูเวทได้เป็นกรด 3-ฟอร์มิลซาลิไซลิก และถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnK* ซึ่งอาจทำหน้าที่คล้ายกับดีไฮโดรจีเนสในการเปลี่ยนหมู่อัลดีไฮด์ให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลได้เป็น 2-ไฮดรอกซีไอโซพธาลิก จากนั้นเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnN* ซึ่งอาจทำหน้าที่คล้ายกับดีคาร์บอกซิเลสในการตัดหมู่คาร์บอกซิลออกจากวงเบนซีนของกรด 2-ไฮดรอกซีไอโซพธาลิกได้เป็นกรดซาลิไซลิกแล้วย่อยสลายผ่านกรดเจนทิสิกจนกระทั่งได้ไพรูเวทและฟูมาเลท

นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ที่ว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จะย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจนกระทั่งได้เป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก แล้วย่อยสลายจนได้เป็นกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก กรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดเจนทิสิกหรือกรดโปรโตคาทีคูอิก ตามลำดับดังรูปที่ 5.6 เช่นเดียวกับ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* ที่ย่อยสลายอะซีแนพธีนเป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก (3-hydroxyphthalic acid) (Selifonov และคณะ, 1993) กรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิกอาจถูกย่อยสลายต่อเป็นกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกซึ่งคล้ายกับที่เคยมีรายงานใน *Pseudomonas testosteroni* ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายกรด 4-ไฮดรอกซีพธาเลท เป็น กรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกอาจถูกย่อยสลายต่อเป็นกรดเจนทิสิกดังที่เคยมีรายงานใน *Pseudomonas alcaligenes* (Poh และ Bayly, 1980) และ *Salmonella typhimurum* (Goetz และ Harmuth, 1992) หรือเป็นกรดโปรโตคาทีคูอิกดังที่เคยมีรายงานใน *Rhizobium leguminosarum* (Dilworth และ Glenn, 1981) และ *Pseudomonas testosteroni* (Nakazawa และ Hayashi, 1978)

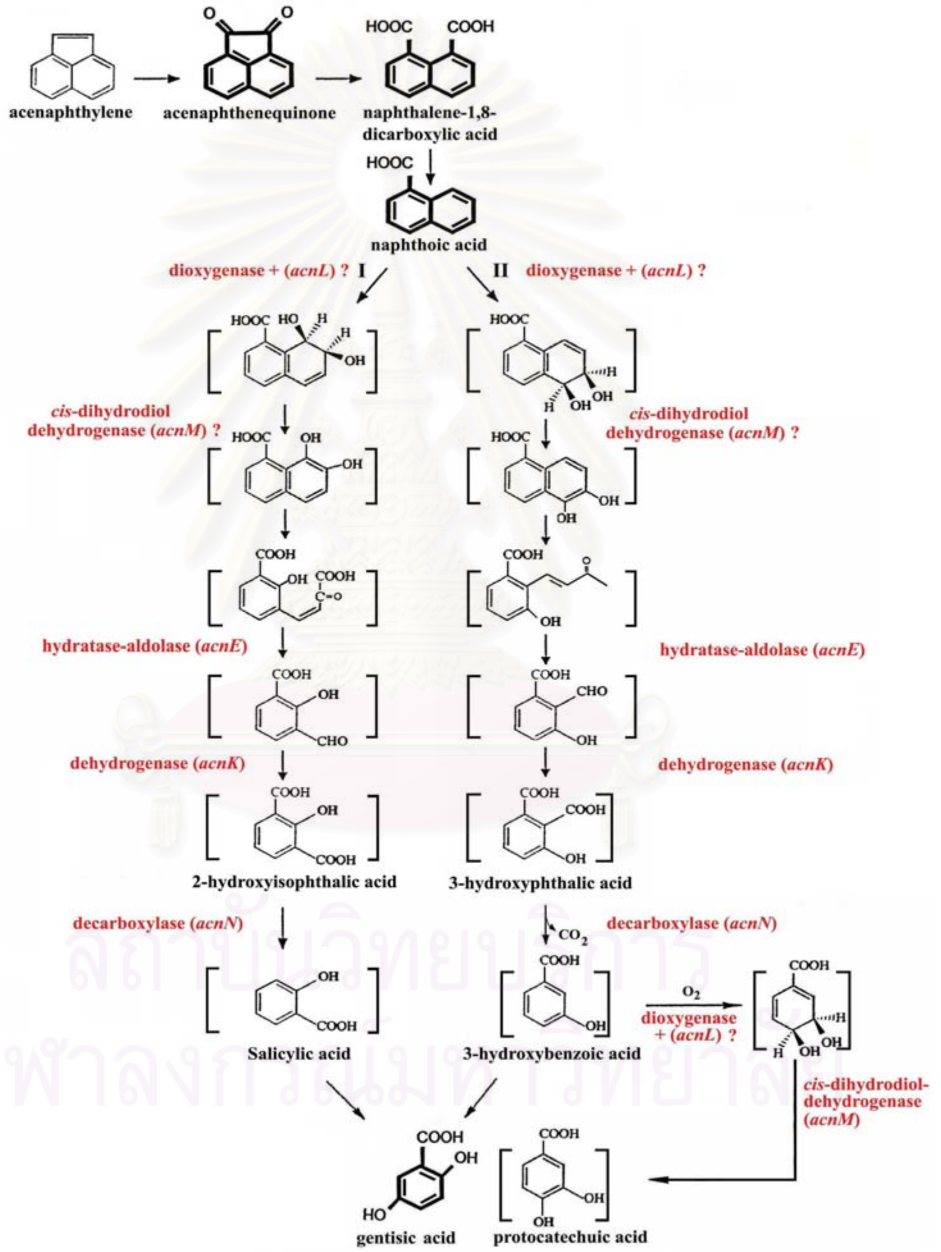


รูปที่ 5.6 ก.) 1. วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) 2. การย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นกรดโปรโตคาทีคูอิกของ *Pseudomonas testosteroni* (Nakazawa และ Hayashi, 1978) 3. การย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นเจนทิสิกของ *Pseudomonas alcaligenes* (Poh และ Bayly, 1980) ข.) ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องของ *Rhizobium* sp. CU-A1 รูปเข้มคือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้แล้วของ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์, 2545; Poonthrigpun และคณะ, 2003) ตัวอักษรสีแดงคือ ยีนและเอนไซม์ที่เสนอในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ CU-A1

จากรูปที่ 5.6 เมื่อนำสารมัธยันต์ที่พบจากสายพันธุ์กลายของสายพันธุ์ CU-A1 มาพิจารณาร่วมกับข้อมูลยีนที่พบในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นได้ว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 อาจจะย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจนกระทั่งได้เป็นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากนั้นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจจะถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลิกบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ทำให้เกิดกรดแนพโธอิกและเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 บนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโธอิกเพื่อแตกวงต่อไปผ่านสารมัธยันต์ชนิดต่างๆจนกระทั่งได้เป็นกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนนี้น่าจะประมวลรหัสโดย *acnLME* และ *acnK* จากนั้นกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิกจะถูกเร่งปฏิกิริยาต่อโดยเอนไซม์ที่มีความคล้ายกับ 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีคาร์บอกซีเลสซึ่งประมวลรหัสโดย *acnN* ได้เป็นกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสโดย *acnL* และ *acnM* กับกรดอะมิโนอ้างอิงคือ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทสและ*ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนส พบว่ามีความเหมือนต่ำคือ เท่ากับ 36% และ 45% ตามลำดับ ดังนั้นเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnL* และ *acnM* อาจจะมีบทบาทในขั้นตอนการย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิก โดยขั้นตอนดังกล่าวน่าจะเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยไดออกซีจีเนสซึ่ง *acnL* ที่พบในงานวิจัยนี้มีกรดอะมิโนคล้ายกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส สำหรับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสนั้นจัดเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญของไดออกซีจีเนส ดังนั้น *acnL* จึงอาจจะไปเกี่ยวข้องกับการทำงานของไดออกซีจีเนสในส่วนที่เปลี่ยนกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกไปเป็น *ซิส*-เบนโซเอทไดไฮโดรไดออล แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน CU-A1 จึงไม่สามารถระบุได้ว่าขั้นตอนดังกล่าวนี้เกิดจากการทำงานของไดออกซีจีเนสประเภทใด Selifonov และคณะ (1996) รายงานว่า *Pseudomonas* สายพันธุ์ PAO1 ซึ่งไม่สามารถออกซิไดซ์อะซีแนพธิลีนไปเป็น *ซิส*-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออล มีดีไฮโดรจีเนสและรีดักเทสไม่ทราบชนิดสามารถเปลี่ยน *ซิส*-อะซีแนพธีน-1,2-ไดออลเป็นอะซีแนพโธควิโนน *acnM* ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้มีความคล้ายกับ *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *pht4* ของ *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992) เท่ากับ 45% ซึ่ง *ซิส*-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่ในการเปลี่ยน *ซิส*-4,5-ไดไฮโดร-4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลท เป็น 4,5-ไดไฮดรอกซีพธาเลทในวิถีการย่อยสลายพธาเลทของ *P. putida* (Nomura และคณะ, 1992) ดังนั้น *acnM* จึงอาจประมวลรหัสเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับ *pht4* แต่แตกต่างกันตรงสับสเตรทโดย *acnM* จะเปลี่ยน *ซิส*-เบนโซเอทไดไฮโดรไดออลไปเป็นกรดโปรโตคาทีคูอิก นอกจากนี้กรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกอาจถูกย่อยสลายเป็นกรดเจนทิสิกได้เช่นเดียวกับรายงานของ Poh และ Bayly (1980) รายงานว่า *P. alcaligenes* ย่อยสลายกรด 3-ไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็นเจนทิสิกและสอดคล้องกับการพบสารมัธยันต์เจนทิสิกในสายพันธุ์กลายของ CU-A1

จากนั้นกรดเจนทิสิกจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นมาเลอิลไพรูเวท (maleylpyruvate) โดยเจนทิเสท-1,2-ไดออกซิจีเนส (gentisate-1,2-dioxygenase) และย่อยสลายผ่านฟูมาริลไพรูเวทจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไพรูเวทและฟูมาเลท (Zhou และคณะ, 2001) ส่วนกรดโปรโตคาทีคูอิกจะถูกย่อยสลายผ่านวิถีβ-คีโตแอดิเพธจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นซัคซินิลโคเอและอะซิทิลโคเอ (Park และ Ornston,1986) ไดอะแกรมวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนทั้ง 2 วิถีที่เสนอแสดงในรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 **ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องของ** *Rhizobium* sp. CU-A1 **รูปเข้มคือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้แล้วของ** CU-A1 (**ศิริวัตร ปุณฑริกพันธุ์**, 2545; Poonthrigpun **และคณะ**, 2003) **ตัวอักษรสีแดงคือ ยีนและเอนไซม์ที่เสนอในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของ** CU-A1

สำหรับ *acnO* ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain alcohol dehydro genase ของ *Novosphingobium aromaticivorans* (Romine และคณะ, 1999) เท่ากับ 56% เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มักพบเสมอในจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้และมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Junker และคณะ, 1997) โดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ β-oxidation (Stover และคณะ, 2000) ดังนั้นเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดยยีนตัวนี้จึงอาจไปทำหน้าที่ในการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่คีโตในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนแต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเกี่ยวข้องที่ขั้นตอนใดและต้องทำการศึกษาความจำเพาะกับสับสเตรทของเอนไซม์ร่วมด้วยจึงจะตอบข้อสงสัยในหน้าที่ของเอนไซม์ตัวนี้ได้

โดยสรุปจากการศึกษายีนที่คัดแยกได้จาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1ในงานวิจัยนี้ คือ *acnNML* และ *acnO* น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในส่วนวิถีที่ถัดลงมาจากกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นซึ่งความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนของกรอบอ่านรหัสเปิดทั้งหลายที่พบนี้จะสรุปได้แน่นอนขึ้นหากมีการพบการสะสมสารมัธยันต์อื่นๆเพิ่มเติมจากสายพันธุ์กลายอื่นๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และการสรุปจะแน่ชัดขึ้นเมื่อมีการตรวจคุณสมบัติของยีนเพิ่มเติมโดยการน็อกเอาท์ยีน (gene knockout) และศึกษาความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญในอะซีแนพธิลีนและการแสดงออกของยีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทิพวรรณ ล้อรัตนชัยยงค์. 2545. การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์. 2544. การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและการติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์. 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศรัลยา แพงไตร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดยแบคทีเรียที่ออกซิไดซ์อะซีแนพธิลีน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, R., Kagi, R. I., Rowland, S. J., Sheppard, P. N., and Chirila, T. V. 1985. The effects of thermal maturity on distribution of dimethylnaphthalenes and trimethylnaphthalenes in some ancient sediments and petroleums. Geochem. Cosmochim. 49: 385-395.

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.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bahar, M., de Majnik, J., Wexler, M., Fry, J., Poole, P. S., and Murphy, P. J. 1998. A model for the catabolism of rhizopine in *Rhizobium leguminosarum* involves a ferredoxin oxygenase complex and the inositol degradation pathway. Mol. Plant Microbe Interact. 11(11): 1057-1068.

Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. B. 1999a. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.

Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. B. 2000. Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 245: 65-74.

Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteels, J.-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strain and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 156-164.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegrada tion. 3: 351-368.

Chang, H-K., and Zylstra, G. J. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. J. Bacteriol. 180: 6529-6537.

Cheng, Q., Thomas, S. M., Kostichka, K., Valentine, J. R., and Nagarajan, V. 2000. Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by in vitro transposition. J. Bacteriol. 182(17): 4744-4751.

Cockson, J. T. 1995. Application of biological processes. In Bioremediation engineering design and application. pp. 9., Cockson, J. T. (ed.). McGraw-Hill, Inc. USA.

Davies, J. I., and Evans, W. C. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads: The ring-fission mechanism. Biochem. J. 91: 251-261.

Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.

Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. 1981. Control of carbon utilization by rhizobia. In: Current perspectives in nitrogen fixation. pp. 244-251. Gibson, A. H., and Newton, W. E. (eds.). Canberra, Australia: Academic of Science.

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.

Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., and Witholt, B. 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. J. Mol. Biol. 212: 135-142.

Ensley, B. D., and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.

Ensley, B. D., Gibson, D. T. and Laborde, A. L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Peudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 149: 948-954.

Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyers, 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.

Gibson, D. T., and Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Microbial Degradation of Organic Compounds. pp. 181-252. Gibson, D. T. (ed.). New York: Marcel Dekker.

Goetz, F. E., and Harmuth, L. J. 1992. Gentisate pathway in *Salmonella typhimurium*: metabolism of *m*-hydroxybenzoate and gentisate. FEMS Microbiol. Lett. 76: 45-49.

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.

Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R. 1992. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1874-1877.

Habe, H., and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(2): 225-243.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Hanukoglu, I., and Gutfinger, T. 1989. cDNA sequence of adrendoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. Eur. J. Biochem. 180: 479-484.

Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. Curr. Opin. Biotechnol. 8: 268-273.

Harwood, C. S., Nichols, N. N., Kim, M., Ditty, J. L., and Parales, R. E. 1994. Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida:* involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybezoate. J. Bacteriol. 176 (21): 6479-6488.

Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179(20): 6488-6494.

Junker, F., Kiewitz, R., and Cook, A. M. 1997. Characterization of the *p*-toluenesulfonate operon *tsaMBCD* and *tsaR* in *Comamonas testosteroni* T-2. J. Bacteriol. 179(3): 919-927

Kanagasundaram, V., and Scopes, R. K. 1992. Cloning, sequence analysis and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 174: 1439-1447.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7(6): 331-338.

Kelley, I., Freeman J. P., and Cerniglia C. E. 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by *Mycobacterium* sp. Biodegradation. 1: 283-290.

Kelley, I., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E. 1993. Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 59: 800-806.

Keith, L. H., and Telliard, W. A. 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. Environ. Sci. Technol. 13: 416-423.

Khan, A. A., Wang, R.-F., Cao, W.-W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C. E. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3577-3585.

Kim, E., Zylstra, G. J., Freeman, J. P., Heinze, T. M., Deck, J., and Cerniglia, C. E. 1997. Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. FEMS Microbiol. Lett. 153: 479-484.

Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.

Komatsu, T. 1994. Doctoral Thesis, The University of Tokyo.

Kurkela, S., Lehväslaiho, H., Palva, E. T., and Teeri, T. H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816. Gene. 73: 355-362.

LaFlamme, R. E., and Hites, R. A. 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediment. Geochim. Cosmochim. Acta. 42: 289-303.

Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.

LaVoie, E. J., and Rice, J. E. 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. In: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships. pp. 151-156. vol. 1. Yang, S. K., and Silverman, B. D. (eds.). (n.p.): CRC Press.

Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. pp.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.

Lisser, S., and Margalit, H. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. Nucleic acids Res. 21(7): 1507-1516.

Masai, E., Momose, K., Hara, H., Nishikawa, S., Katayama, Y., and Fukuda, M. 2000. Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. J. Bacteriol. 182(23): 6651-6658.

Mattox, C. F., and Humennick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In Situ. 4: 129-151.

Merce, C., Grifoll, M., and Josep, M. B. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. Strain F101. Appl. Environ. Microbiol. 63: 819-826.

McClelland, M., Nelson, M., and Raschke, E. 1994. Effect of site specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. Nucleic acids Res. 22(17): 3640

Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluorene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3085-3090.

Nagata, Y., Ohtomo, K., Miyauchi, M., Fukuda, K., Yano, and M. Takagi. 1994. Cloning and sequencing of a 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase gene involved in the degradation of γ-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol. 176: 3117-3125.

Nakatsu, C. H., Providenti, M., and Wyndham, R. C. 1997. The *cis*-diol dehydrogenase *cbaC* gene of Tn*5271* is required for growth on 3-chlorobenzoate but not 3,4-dichlorobenzoate. Gene 196: 209-218.

Nakazawa, T., and Hayashi, E. 1978. Phthalate and 4-hydroxybenzoate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: purification and properties of 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase. Appl. Environ. Microbiol. 36: 264-269.

Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In: The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97. Schmeltz, I. (ed.). New York: Plenum Publishing.

Nomura, Y., Nakagawa, M., Ogawa, N., Harayama, S., and Oshima, Y. 1992. Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. J. Ferment. Bioeng. 74: 333-344.

Ohmoto, T., Sakai, K., Hamada, N., and Ohe, T. 1991. Salicylic acid metabolism through a gentisate pathway by *Pseudomonas* sp. TA-2. Agri. Biol. Chem. 55: 1733-1737.

Parke, D. and Ornston, N. L. 1986. Enzyme of the β-ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. J. Bacteriol. 165(1): 288-292.

Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. Arch. Microbiol.163: 42-47.

Poh, C. L., and Bayly, R. C. 1980. Evidence for isofunctional enzymes used in m-cresol and 2,5-xylenol degradation via the gentisate pathway in *Pseudomonas alcaligenes*. J. Bacteriol. 143: 59-69.

Poonthrigpun, S., Petsom, A., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Juntongjin, K., and Pinphanichakarn, P. 2003. Identification of accumulated intermediates from the degradation of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1 Transposon mutants. Abstract of Biothailand 2003 " BioThailand 2003 : Technology for life". pp 304.

Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E. 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3654-3659.

Qin, Y-M., Poutanen, M. H., and Novikov, D. K. 2000. Substrate specificities of peroxisomal members of short-chain alcohol dehydrogenase superfamily: expression and characterization of dehydrogenase part of *Candida tropicalis* multifunctional enzyme. J. Lipid Res. 41: 93-98.

Reid, M. F., and Fewson, C. A. 1994. Molecular characterization of microbiol alcohol dehydrogenase. Crit. Rev. Microbiol. 20(1):13-56.

Romine, M. F., Still Well, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid form *Sphingomonas aromaticivorans* F199. J. Bacteriol. 181(5): 1585-1602.

Saito, A., Iwabuchi, T., and Harayama, S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7: expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 2134-2141.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schell, M. A. 1983. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7. J. Bacteriol. 153: 822-829.

Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48 (1): 10-16.

Selifonov, S. A., Slepenkin, A. V., Adanin, V. M., Grechkina, G. M., and Starovoitov, I. I. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus*. Microbiology 62: 85-92.

Selifonov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62(2): 507-514.

Shine, J., and Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites, Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 1342-1346.

Sims, J. L., Sims, R. C., and Matthews, J. E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. Haz. Waste Haz. Matter. 7: 117-149.

Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene. 127: 31-37.

Starovoitov, K. 1975. Properties of salicylate-5-hydroxylase from *Moraxella osloensis*. J. Bacteriol. 121: 86-91.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., and Garber, R. L. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature. 406: 959-964.

Sutherland, J. B., Rafii, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E. 1995. Mechanisms of PAHs degradation. In: Microbiol transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 269-306. Young, L. Y. and Cerniglia, C. E. (ed.). Willey-Liss, Inc., New York.

Takeuchi, M., Hamana K., and Hiraishi A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensustricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1405-1417.

Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S., and Kiyohara, H. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2444-2449.

Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y.-W., Fukuda, M., and Kiyohara, H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. J. Biosci. Bioeng. 87: 723-731.

Volkering, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van Andel, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon; effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 548-552.

Wilson, S. C., and Jones, K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.

Yen, K. M., and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 874-878.

Yen, K. M., and Serdar, C. M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*. Crit. Rev. Microbiol. 15: 247-268.

Zhou, N., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183(2): 700-708.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

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

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB แต่เพิ่มวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

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

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. **กลีเซอรอล**

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

2. **สารปฏิชีวนะ**

สารปฏิชีวนะ	**ความเข้มข้นของสารละลาย**
แอมพิซิลลิน	100 มก./น้ำ 1 มล.

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ ได้นาน 1 เดือน

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

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

Rnase A

Collection tube

QIAprep Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ และเติมเอธานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ประกอบด้วย

หลอดหมายเลข 1 DIG-High Prime, 5X conc.

หลอดหมายเลข 2 DIG-labeled control DNA 5 μg/ml

หลอดหมายเลข 3 DNA dilution buffer

หลอดหมายเลข 4 Anti-Digoxygenin-AP Conjugate 750 U/ml

หลอดหมายเลข 5 NBT/BCIP, 50X conc.

ขวดหมายเลข 6 Blocking solution, 10X conc.

ขวดหมายเลข 7 DIG Easy Hyb Granules (add 64 ml sterile double distilled water, dissolve at 37 ^{O}C)

และสารละลายที่ต้องเตรียมเพิ่มในการทดลองเป็นดังนี้

Maleic acid buffer

กรดมาเลอิก	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.15	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 7.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

Blocking solution

ละลาย 10X blocking solution ใน Maleic acid buffer ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

Detection buffer

Trismabase	0.1	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	0.1	โมลาร์

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 9.5 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

5. **ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล** QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Buffer PB

Collection tube

QIAquick Spin column

6. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	1.5	โมลาร์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จนหมดแล้วจึงละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำน้ำปลอดประจุจนครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

7. Neutralization buffer

Trismabase	0.5	โมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์

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

8. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

9. สารละลาย 10%SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 ^{O}ซ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

10. สารละลาย 20XSSC

โซเดียมคลอไรด์	3.0	โมลาร์
โซเดียมอะซีเตท (CH_3COONa)	0.3	โมลาร์

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

11. สารละลาย 2XSSC

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

12. สารละลาย 0.5XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 2.5 มล. ในน้ำปลอดประจุ 96.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

13. สารละลาย 2XSSC/0.1%SDS

ละลาย 20XSSC ปริมาตร 10 มล. ในน้ำปลอดประจุ 89 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10%SDS ปริมาตร 1 มล. ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง

14. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

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

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

15. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที

16. **สารละลาย** CTAB/NaCl (10%CTAB **ใน** 0.7 M NaCl)

CTAB	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

17. **บัฟเฟอร์** 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242.0	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

18. Loading dye

Bromphenolblue	0.025	%
ซูโครส	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19. สารละลายโซเดียมอะซีเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตทน้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

20. สารละลายโปรตีเนสเค (proteinaseK) **ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

21. สารละลาย RNase A **เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

22. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 ^{o}ซ จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ที่ผสม β-mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่นได้ประมาณ 1 เดือน

23. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

24. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

25. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

26. สารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิด

สารละลาย I

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

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย II

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

สารละลาย III

ผสมสารละลายโพแทสเซียมอะซีเตทเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มล. กับกรดอะซีติกเข้มข้นปริมาตร 11.50 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

27. สารละลาย X-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง X-gal น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลาย dimethylformamide ให้ครบปริมาตร 10 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ ในหลอดปิดสนิทและมืด

28. สารละลาย IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายผง IPTG น้ำหนัก 0.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 10 มล. กรองผ่านหัวกรองฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{o}ซ

29. สารละลาย EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	400	ไมโครลิตร

เติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 200 มล.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

30. สารละลาย 2% $NaHCO_3$ ใน EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

สารละลาย EDTA ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	400	ไมโครลิตร
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	4	กรัม

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 200 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

31. การเตรียมถุงไดแอลิซิส

ตัดถุงไดแอลิซิสยาว 6 ซม. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที ในสารละลาย 2% $NaHCO_3$ใน EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 200 มล. ล้างถุงไดแอลิซิสด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที อีกครั้งในสารละลาย EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 200 มล. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{O}ซ

(หมายเหตุ : สวมถุงมือทุกครั้งที่จับถุงไดแอลิซิส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนโดยโปรแกรม BlastX version 2.2.6

Query หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนในงานวิจัยนี้

Sbjct หมายถึง ลำดับกรดอะมิโนที่เปรียบเทียบใน GenBank

\+   หมายถึง กรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน

1. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF1

```
gi|4128216|gb|AAD03553.1| 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase
[Burkholderia cepacia] Length = 330
Score = 218 bits (556), Expect = 1e-55 Identities = 120/325 (36%),
Positives = 180/325 (55%), Gaps = 3/325 (0%)
Frame = +1

Query: 1   MANLALSYAGHRSDRVDDLYFGVAKPEAIDLHFVPLPPFQAFNR-FLRGEFDCGEMSFST 177
           M+ L LS A    DR+  L  G  + + +D  F+   P + F R F   ++D  E+S S+
Sbjct: 1   MSKLQLSIAVGNYDRMRPLIDGDVQIDGVDPVFMLQDPEEIFFRAFRHADYDICELSLSS 60

Query: 178 FVIKTAQSRAEGKPLPFVAIPVFPSRTFRHGAIYINRASGIQRPEDLAGRRVGVPEYAMT 357
           + +KTA   +     P++A+PVFPSR FRH ++Y+    GI RPEDL G+R+GVPEY +T
Sbjct: 61  YSVKTAAGTS-----PYIAVPVFPSRAFRHSSVYVRSDRGIDRPEDLKGKRIGVPEYQLT 115

Query: 358 AAVWARGMLQHQHGVDPASIEWVTGGLQAAGR-KPLSAAAPPGISIRNE-ENATLDELLV 531
           A VW R  L+ ++GV  + I WV GG +   R + +S   P G+ + N  E  T+  LL
Sbjct: 116 ANVWVRLFLEEEYGVKASDIRWVRGGYEDPTRVEKISLKLPDGVVLENAPEGQTISNLLA 175

Query: 532 TGGIDALIAPQKPPSIRQRRPEVCRLFHDLASVEQAYFRETGLFPIMHTLVIRRDIHERH 711
            G ID +I P+ P    +  P+V  LF D       ++    +FPIMHTL IR+ + ++H
Sbjct: 176 DGEIDGVIGPRAPSCFDRGHPKVKYLFDDPQKSAAEWYERRKVFPIMHTLGIRKTLADQH 235

Query: 712 PWVAASLYQAFEKAKDNCLARLREEEPVPLSLPWSGSLRESVVDMMGEDFWPYGLQNNRK 891
           PW+  ++ +AFE++K+  LARL +     ++LP+      +   +MG DFW YG  NN
Sbjct: 236 PWLPGAIAKAFEQSKEVALARLSDTSATKVTLPFIEDQLRNARRLMGHDFWSYGFANNEH 295

Query: 892 VIEALCQYTFEQGLAPVRADADELF 966
           VI+        +GL+  R    ELF
Sbjct: 296 VIDRFLAQHHAEGLSSRRLQPAELF 320
```

2. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF2

gi|3914351|sp|Q05184|PHT4_PSEPU Putative 4,5,-dihydroxyphthalate dehydrogenase(DHP dehydrogenase)
gi|295711|dbj|BAA02512.1| PHT4 [Pseudomonas putida] Length = 410
Score = 323 bits (827), Expect = 5e-87 Identities = 180/393 (45%),
Positives = 228/393 (58%), Gaps = 11/393 (2%)
Frame = +1

```
Query: 19   KLRFGLVGLGGAAMQMLPSFMAHPRVELVACVDPNQQARDSFARDFNASAYDRMEVLCED 198
            +LR G+VGLG A   MLP+F+A  RV+LV   DP +QAR  F RDF+A AY+ +E L  D
Sbjct: 11   RLRLGVVGLGRAFTLMLPTFLADRRVQLVGACDPREQARRQFERDFDAPAYETIEDLAAD 70

Query: 199  PAVDAVYIGTPHQFHRQQAIMAAEAGKHIIVEKPMALTLDDCDAMSAAAERNGVRLVVGH 378
              VDA+YI +PHQFH +   +AA   KH++VEKPMAL+LD+CD M A     GV+L+VGH
Sbjct: 71   SNVDALYIASPHQFHAEHTRIAAANRKHVLVEKPMALSLDECDRMIADCAEAGVKLIVGH 130

Query: 379  THSFDQPIRKMRDIIKSGEVGPLAMINTWSYGNFLYRPRRPEELRTESGGGIIFNQVPHQ 558
             HSFD P  + R++I SGE G + MI   +Y ++L RPRRPEEL T  GGG +F+Q  HQ
Sbjct: 131  CHSFDTPYLRTRELIGSGEFGAVKMIQALNYTDYLQRPRRPEELSTAEGGGAVFSQAAHQ 190

Query: 559  MDVVRLLGGGLVRSVRAMAWQLDPDRPTEGSHMTFVQFVDGSTASIVYSGYDYFDSDEFH 738
            +DVVRLL G     VRA     DP RPTEG++   + F +G+ ASI Y+GY +FDSDE+
Sbjct: 191  VDVVRLLAGSRATRVRAAVGNWDPARPTEGAYTATLWFENGAFASITYNGYGHFDSDEWM 250

Query: 739  GWVGELGEDRTPGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTLKGSRSYAG------KPTLKAPTHPPH 900
             WVGE+G+ + P                     LK   +Y G       PT  A T   H
Sbjct: 251  DWVGEMGKPKNPEAYGGARRLLQQVQTADEEARLKAEGTYGGTRYVSPSPTDDA-TAFQH 309

Query: 901  CGITIASCAGGDLRAGVDGVSLYGRHG-----LEHRPVPVGLAFPDKGGVIDELYEAVIR 1065
             G  I SC GGDLR   D V +Y  H      LE   VP       +  VIDELY A
Sbjct: 310  FGPIIVSCEGGDLRPMADAVMIYRPHSRDRMMLERPTVP-------RSEVIDELYLAQFY 362

Query: 1066 EQEPLHNGRWGKATMEASLAVLESARTGRDIEL 1164
               PLH+G W + T+E  LA+L S+   RDI L
Sbjct: 363  GVTPLHDGEWARDTLEICLAMLRSSEEQRDITL 395
```

3. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF3

gi|3411185|gb|AAC31188.1| putative ferredoxin reductase MocF
[Rhizobium leguminosarum bv. viciae] Length = 421
Score = 227 bits (579), Expect = 3e-58 Identities = 152/419 (36%),
Positives = 219/419 (52%), Gaps = 12/419 (2%)
Frame = +1

```
Query: 4    KRNGIMTNRNIIIIGGGPAGVSAAIEARKLDPAANVTLLTSETREPYEKPPLSKAVLAHK 183
            +R G M+   III+GGG  G  AA   R+     ++TL+ +E   PYE+PPLSK  LA
Sbjct: 7    RRGGKMSK--IIIVGGGECGARAAFALREQGFNGDITLIGAEPHLPYERPPLSKTGLASA 64

Query: 184  ALPEDALIAGTGGLAAHGVAVKFGTRCKSIDREARQVVTDDGR-LPYDALVIASGSVMRA 360
            A P+   +AG        + +  G    ++DR+++ V   DGR  PYD L++A+G+  R
Sbjct: 65   APPQ--YVAGPARYEEARITILTGVPVDTVDRQSKLVRLSDGRKFPYDQLLLATGARPRP 122

Query: 361  LPSLPASMPG---VHYLXXXXXXXXXXXXLGNCRTLAVVGAGLIGLEVAATAAELGVQVE 531
               +    PG   +  L            L   ++LAVVG G IGLE+AATA +LG +V
Sbjct: 123  FAGVSGD-PGLGRICMLRNHGDAVAIHEALAPGKSLAVVGGGFIGLEIAATARKLGAEVL 181
```

```
Query: 532  IFEFAPRILMRACDGEIAEIIHAYHRQHGVNIWTSIAVTAATVTGDGRIRLDTSDGAHHE 711
            + E +PR+L R    EIA+++   HRQ GVNI     +T+     D ++++  ++G
Sbjct: 182  LIESSPRVLSRGVPAEIAKVVTERHRQEGVNILCGEQITSIATEND-KVQILFANGTTRL 240

Query: 712  ADQVIVGVGVGPDDRLAKEAGLLVDGGIIVDRHCRTSDPAIFSAGDCTRFP---GPTGPV 882
            AD V+VG+GV P+  LA+ AGLL+D GI VD   RTSDP IF+AGDC  FP        V
Sbjct: 241  ADIVVVGIGVIPNVELAEAAGLLIDNGIAVDATLRTSDPDIFAAGDCCSFPLSHYRERRV 300

Query: 883  RLENWMHALDHGTVAGANAAGGDIAYEAKPSFWSEQYDLYIQGIGWPDPDASRVTRPLDG 1062
            RLE W +A D G +  AN  G  +A  + P FWS+QY+L +Q  G  D  A+ V R LD
Sbjct: 301  RLEAWRNAQDQGMLVAANLLGRGLAIASVPWFWSDQYELTLQIAGLSDGAATTVRRDLDQ 360

Query: 1063 NRALVVEMK-NGLIQSALGIN----VSXXXXXXXXXXXXXXEVDPVAVADPERPFADML 1224
               ++  +     + +A GI     V+               +DP A+A P+     +L
Sbjct: 361  GAFILFHLDGEDRLIAASGIGPGNAVARDIRLAEMLIAAKRRLDPEALASPKTNLKKLL 419
```

4. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF4

```
gi|3820516|gb|AAD09869.1| hydratase/aldolase PhnE [Burkholderia sp. RP007]
Length = 330
Score = 216 bits (551), Expect = 4e-55 Identities = 126/326 (38%),
Positives = 180/326 (55%), Gaps = 7/326 (2%)
Frame = +1

Query: 4   LTAADIHGMYAIIATPAKPHAGRLDAKDTVDLAETERLINKLILDGCDGLIITGTTGECA 183
           L   D++G + I+ TPAKP A    A DTVDL ET R++  LI  G +G++  GT GECA
Sbjct: 9   LGTEDVNGAWVIMPTPAKPEASDWRATDTVDLDETARIVEALIDSGVNGILSLGTFGECA 68

Query: 184 TLSESDYRAFVDCALSTVNRRIPTIVGATAMGGHEVVRRLTFIREQGADATLLGLPMWQP 363
           TL+  + +AF+   + T   R+P   G TA+   EVVR+     + G D T+LG+PMW
Sbjct: 69  TLTWEEKQAFIGAVVETTRGRVPFFCGTTALNTREVVRQTRAALDIGVDGTMLGVPMWSR 128

Query: 364 VTTRMAVDYYAGISELFPDLAIMAYANARAFRFSFPLEFWSAVAQAAPTVTSAKYSRTQG 543
           +    AV +Y  ++E  P+ AI  YANA AF+F FP  FW+ VAQ  P V +AKY    G
Sbjct: 129 MEVPAAVQFYRDVAEACPEAAIAVYANADAFKFEFPRAFWAQVAQ-IPQVVTAKYLGI-G 186

Query: 544 LKELIAATGGRINFMPNEMVVQDFFA---IAPNTTTACWATASGMNPAPAIALMRAIEAR 714
           + +L       I F+P+E    D++A   +AP   TA W++ +   PA AI L   +
Sbjct: 187 MLDLDLTLAPGIRFLPHE---DDYYAAARVAPERVTAFWSSGAMCGPATAIRLRDEVAKA 243

Query: 715 NQDA----IHTLTAAIGWANEPIQPMLADADLFAQYNIQMEKTRINAAGYSQCGPVRPPY 882
            Q         L+ A+  A+  + P   D   F++YNI +EK R+NAAG+ + GP RPPY
Sbjct: 244 KQTGDWRLAKELSDAMRRADATLFPR-GDFAEFSKYNIAIEKERMNAAGWLRAGPCRPPY 302

Query: 883 QDFPEDYAAQARECGQRWHRICDAYA 960
              PE+Y   AR+ G+ W  +   Y+
Sbjct: 303 HIAPEEYLDGARQSGRAWAELHQQYS 328
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF5

```
gi|2588986|dbj|BAA23265.1| 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase
[Nocardioides sp.]
gi|3288683|dbj|BAA31236.1|  2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase
[Nocardioides sp. KP7] Length = 485
Score = 402 bits (1032), Expect = e-110 Identities = 214/456 (46%),
Positives = 290/456 (63%), Gaps = 1/456 (0%)
Frame = +1

Query: 85   NPADETAIGRVPAGTREDVDRXXXXXXXXXXXXXSKTPKERGETMRAFGEKIRARATEIL 264
            +P+    + +VP     DVDR             +  P+ R   +R     +R    E
Sbjct: 31   DPSTGRYLTQVPDCAEADVDRAVQASRQAQAEWGALPPRARAAKLRELITLLREHREEFA 90

Query: 265  HVEVADTGNTITPMRGDVGHAVDSLNYYAGIAHELKGETIPATPDHLHLTIREPYGVVAR 444
             ++  D G  I+ MR DV  A++ ++ +A +A +L G+TIP + + LH T  EP+GVVAR
Sbjct: 91   MLDAIDGGFPISMMRNDVDAALELMDIFADMALDLGGKTIPVSTN-LHFTTHEPFGVVAR 149

Query: 445  IVPFNHPLMFXXXXXXXXXXXXXXVIVKPPETSPLSAMVLAEIAREALPPGVFNIVTGTG 624
            I  FNHP  F              VI+K P+ +PLS++ LAE+A E LP  +   ++G G
Sbjct: 150  IGAFNHPFFFAASKVAAPLMAGNSVILKAPDQTPLSSLRLAEVAAEVLPQNLLITISGRG 209

Query: 625  PSVGEAIVRHPEIKRIAFIGSAATGRAIQRTAAEVSVKHVTLELGGKNPMIVFPDNDPDE 804
               G AIVRHP+IKRI FIGS  TGR+IQR AAEV+VKH++LELGGKN  IVF D D ++
Sbjct: 210  RVAGRAIVRHPQIKRIGFIGSTDTGRSIQRDAAEVAVKHISLELGGKNAQIVFADADLEQ 269

Query: 805  IAQAAVKGMNFTW-QGQSCGSTSRLMVHEDLYDAVLERVANIVASLRVGDPMRDDSDMGP 981
             A  AV GMNFTW  GQSCGSTSRL+VHE + D V+ RV  +V+++ VG P+ +++ MGP
Sbjct: 270  AALGAVNGMNFTWTAGQSCGSTSRLLVHESVADQVIARVVELVSAIAVGPPLDENAQMGP 329

Query: 982  INSAGQYRKVMGYIESGNAEGARLVTGGNRPDGQAFAKGYWVRPTVFADVDPHMRIWREE 1161
            + S  QY K +  I  G  EGA++V GG RP+G     G+++ PTV ADV P   I + E
Sbjct: 330  LVSQAQYDKSVHAIGEGIREGAKVVAGGGRPEGVG-EGGWYLAPTVLADVRPGSFIEQNE 388

Query: 1162 IFGPVLSVSKWHSVDEAIRLANGVEYGLTASIWTKDIKNALNTARRIDAGHIWINGVGPH 1341
            IFGPVLSV  + + DEA+ +ANGVEYGLTAS+WT DI  A   ARR++AG++ +NG   H
Sbjct: 389  IFGPVLSVIIFATDDEAVAIANGVEYGLTASVWTSDITRAHLIARRVEAGYVLVNGGSRH 448

Query: 1342 YLGVPYGGMKNSGVGREEGIEEMLSYTETKVLNIVL 1449
            Y G+P+GG+K+SGVG EE +EE++SYTETK   +VL
Sbjct: 449  YWGLPFGGVKSSGVGSEESMEELISYTETKTTTVVL 484
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF6

```
gi|13475667|ref|NP_107234.1| similar to adducins [Mesorhizobium loti]
gi|14026423|dbj|BAB53020.1| similar to adducins [Mesorhizobium loti]
Length = 234
Score = 164 bits (414), Expect = 2e-39 Identities = 89/230 (38%),
Positives = 133/230 (57%)
Frame = +1

Query: 91  DLVAANHILFDQGVVDAFGHVSVRHDKQQDRYLLARNMAPGQVSADDIIEFTFDGEAVNG 270
           +LV A  IL ++G++D FGH+S R  +    + LA+ +AP  ++ DDI  F  DGE  +
Sbjct: 8   ELVTATKILLNEGIMDTFGHISARDPEDPASFFLAQKLAPSLITVDDIQRFNLDGETSDN 67

Query: 271 RERRVYLERFIHAELYRARPDVIAVVHSHSHSILPLTISKSVRLRSVFHMAGFIGQDAPL 450
           R    YLER+IH+E+Y+ RPDV  V+H+HS ++LP     +  LR V HM  FIG+  P+
Sbjct: 68  RPS--YLERYIHSEIYKTRPDVQCVLHTHSPAVLPYCFVDTP-LRPVTHMGAFIGESVPV 124

Query: 451 FEIRDHGGPATDLLISNSELGHALAACCGERNIVLMRGHGSTVVADSLPRAVYRAVYAEL 630
           +EIRD  G  TDL   + ++   +A   G + +VLM  HG   V  S+   V+RA Y E
Sbjct: 125 YEIRDKHGDETDLFGGSPDVCADIAESLGSQTVVLMARHGVVNVGKSVREVVFRAFYLEQ 184

Query: 631 NARYQCDAIGLGDVEYLTEAECETSVRNVEAQWHRPWALWKEQAAERRAG 780
            A      + +G+V+YL+  E +T+ + V AQ  R W  W ++   R+AG
Sbjct: 185 EAAALTAGLKIGNVKYLSPGEIKTAGKLVGAQIDRGWNHWSQRL--RQAG 232
```

7. ผลจากการเทียบความเหมือนของ ORF7

```
gi|23106872|ref|ZP_00093213.1| COG1028: Dehydrogenases with different
specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)
[Novosphingobium aromaticivorans] Length = 296
Score = 315 bits (807), Expect = 6e-85 Identities = 150/267 (56%),
Positives = 199/267 (74%)
Frame = +1

Query: 1   MGNRLDEKVCVITGAAQGIGQGCALEMAVQGGRIVVSDRNVAGGEETVRQIVELGGEAIF 180
           MGNRLD KVC++TG+  G+G+  A+EMA QGGR+VV+D N + GEETV  I    G+AIF
Sbjct: 31  MGNRLDGKVCIVTGSGSGMGRASAMEMARQGGRVVVTDINTSAGEETVEAIRAEKGDAIF 90

Query: 181 VACDVRNRDDLEALMKAAASHFGGIDVLFNNAGTHDTDLTPHTAVHELPDEVWDMVYEVN 360
           +AC++R   +++ LM+  A HFGGIDVL NNA  H+TDLT  T++ +LP+E+WD VYEVN
Sbjct: 91  IACNLRKAHEIKVLMQKTADHFGGIDVLHNNAAIHETDLTDKTSIEDLPEEIWDAVYEVN 150

Query: 361 LRSIWYGVRAALPYLRQSKGASIINTASIASYVAMPVSPAYNATKGAVLMLTKSMAVDLA 540
           L+++W   R A+P+L+ SKGA+I+N AS  S+V+ P + AY ATKG VL+LTK+ AVDLA
Sbjct: 151 LKALWLTTRYAVPWLKLSKGAAIVNVASTGSFVSYPQAGAYCATKGGVLLLTKATAVDLA 210

Query: 541 QFNIRVNCINPGTIKTPLLDKYFDIIEDPDARAAALHGFLGANLVPRLGTPQEVGKLVCF 720
           ++ IR NC  PG I+TP+L KY D  ED  A  + L    GA+L+PRLG P+EV KL CF
Sbjct: 211 KYGIRCNCYCPGAIETPMLQKYLDAAEDKKAIMSVL---TGAHLIPRLGKPEEVAKLACF 267

Query: 721 LASDDASFLTGAAYLVDGGMTAWRGTR 801
           LASDD+SF+ GA+Y++DGG  AWRG R
Sbjct: 268 LASDDSSFINGASYVIDGGTLAWRGQR 294
```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติวรดา นินทนาวงศา เกิดเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย