การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0912-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20646781

ISOLATION AND SEQUENCING OF ACENAPHTHYLENE

DEGRADATIVE GENE IN *Rhizobium* sp. CU-A1

Miss Tippawan Lorrattanachaiyong

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 2002

ISBN 974-17-0912-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1
โดย	นางสาวทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

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

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

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์ : การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ISOLATION AND SEQUENCING OF ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE GENE IN *Rhizobium* sp. CU-A1). อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์; 107 หน้า. ISBN 974-17-0912-9.

ได้คัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนจากสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ E11 ที่เกิดจากการสอดแทรกโดยทรานสโปซอน Tn*5* และมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน จากการติดตามชิ้นทรานสโปซอน Tn*5* ด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยใช้ชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn*5* เป็นดีเอ็นเอติดตาม สามารถทำการคัดแยกและโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์ได้ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอนโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายของทรานสโปซอน Tn*5* เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,014 bp ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนใน GenBank พบว่าทรานสโปซอนเข้าแทรกยังยีนที่ประมวลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 จากนั้นนำบางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอนขนาด 430 bp ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการในสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 พบว่าสามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Hin*dIII ขนาด 4.5 kb ที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามเข้ายังพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pWT จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.5 kb นี้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ทั้งหมด 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังนี้ ORF1 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 33% กับ putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ORF2 (*acnE*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 38% กับไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ORF3 (*acnK*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 46% กับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮโดรจีเนส ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ORF4 อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 38% กับโปรตีนที่คล้ายกับแอดดูซิน (adducin like protein) ของ *Mesorhizobium loti* ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 43% กับ short-chain dehydrogenase ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือ ยีน *acnE* และยีน *acnK*

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยยงค์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

4272289223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ Transposon Tn*5*/ acenaphthylene/ nucleotide sequences

TIPPAWAN LORRATTANACHAIYONG : ISOLATION AND SEQUENCING OF ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE GENE IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISER : KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 107 pp. ISBN 974-17-0912-9.

Genes involving acenaphthylene degradation from a transposon Tn*5*-inserted *Rhizobium* sp. mutant strain E11 defective in acenaphthylene degradation were isolated and sequenced. Southern hybridization with transposon Tn*5* probe was performed, DNA fragment with positive signal was isolated and cloned. The nucleotide sequence adjacent to transposon was sequenced by using oligonucleotide primer specific to outside end of Tn*5*. Comparison of amino acid sequence deduced from 1,014 bp nucleotide sequence with those in GenBank revealed that Tn*5* was inserted into the gene encoding for amino acid sequence with homology to that of hydratase-aldolase from *Burkholderia* sp. RP007. The fragment of 430 bp adjacent to transposon was generated by PCR and employed as DNA-probe for detecting the positive DNA fragment from wildtype CU-A1. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hin*dIII-positive fragment was cloned into pGEM-3Zf(+/-) and designated as pWT. Nucleotide sequence thereof revealed fragment with 4.5 kb in size containing 5 Open Reading Frames (ORFs) in the same orientation. ORF1 is an incomplete ORF with 33% homology in term of the respective amino acid sequence to that of the putative ferredoxin reductase of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; ORF2 (*acnE*) shows 38% amino acid sequence homology to that of hydratase-aldolase of *Burkholderia* sp. RP007; ORF3 (*acnK*) shows 46% amino acid sequence homology to 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase of *Nocardioides* sp. KP7; ORF4 is in the different reading frame to that of ORF1-3 and 5 by showing 38% amino acid sequence homology to adducin like protein of *Mesorhizobium loti*; ORF5 is an incomplete ORF showing 43% homology of amino acid sequence to short-chain dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. The present study is the first to report genes, *acnE* and *acnK*, which involve in the degradation of acenaphthylene in *Rhizobium* sp. CU-A1.

Department......Microbiology......Student's signature....Tippawan L.........

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

Academic year...2002..........Co-advisor's signature..................................

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของอาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาและวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณป้า พี่ชาย และครอบครัวตั้งจิตพินิจการ ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..จ

กิตติกรรมประกาศ..ฉ

สารบัญ..ช

สารบัญตาราง..ซ

สารบัญรูป..ฌ

บทที่

1. บทนำ..1

2. วารสารปริทัศน์..4

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..22

4. ผลการทดลอง..52

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..78

รายการอ้างอิง..86

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..94

ภาคผนวก ข..95

ภาคผนวก ค..104

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..107

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แบคทีเรีย..........25
3.2 พลาสมิด..........26
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์..........27
3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว..........31
3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก..........32

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 วิถีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปโดยแบคทีเรีย (Cerniglia, 1992)............................4

2.2 วิถีการย่อยสลายแนพธาลีนในส่วน upper pathway และยีนที่เกี่ยวข้อง (Eaton และ Chapman, 1992)..5

2.3 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)..6

2.4 ส่วนประกอบและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนสและยีนที่ประมวลรหัสเอนไซม์แนพธาลีนไดออกซิจีเนสใน *P. putida* สายพันธุ์ G7 (Yen และ Serdar, 1988)......7

2.5 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) 11

2.6 ขั้นตอนการเกิดอินดิโกโดยปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างเอนไซม์ทริปโตเฟนเนสและไดออกซิจีเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสม (Ensley และคณะ, 1983) 16

3.1 แผนภาพแสดงการจัดวางชั้นต่างๆของการย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรนโดยวิธี Capillary transfer...35

3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับทำไฮบริไดเซชัน..36

4.1 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของทรานสโปซอน Tn*5* (ขนาด 5818 bp) และตำแหน่งที่นำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5*..................................53

4.2 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5*..........54

4.3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI หรือ *Hind*III ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn*5*..........56

4.4 ภาพอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสของพลาสมิด pTEM ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิดเพื่อระบุตำแหน่งการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..57

4.5 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pTEM.....................................58

4.6 ภาพอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสแสดงชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pTEB ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆเพื่อยืนยันพลาสมิด..59

สารบัญรูป (ต่อ)

4.7 ภาพแสดงการสับโคลนเพื่อสร้างพลาสมิด pTEB ตำแหน่งที่ทำการสับโคลนของพลาสมิด pTEM (ก.) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTEB (ข.) 60
4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5.............................62
4.9 ภาพอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม...63
4.10 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ต่างๆ ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE.............................65
4.11 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE..67
4.12 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม C3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hin*dIII ข.) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE............68
4.13 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pWT ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE...69
4.14 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pWT และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม AE ในบริเวณชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pES (ข.) pWR (ค.) และ pSW (ง.) 70
4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp..73
4.16 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม AE ตำแหน่งสอดแทรกของทรานสโปซอนในสายพันธุ์กลายและทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพร์เมอร์ต่างๆของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT...77
5.1 การเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)...81
5.2 การเร่งปฏิกิริยาของ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997).................82

สารบัญรูป (ต่อ)

5.3 การจัดเรียงตัวของ ORFs ภายในดีเอ็นเอสอดแทรกของโคลนที่มียีนเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนผ่านทาง *o*-phthalate ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) 84