การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับยีนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1

นางสาวโสรจยา แววศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES LOCATED DOWNSTREAM OF *acnB* IN *Rhizobium* sp. CU-A1

Miss Sorajaya Waewsak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491528

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับยีนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1
โดย	นางสาวโสรจยา แววศักดิ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ 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

(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

โสรจยา แววศักดิ์ : การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับยีนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1. (CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES LOCATED DOWNSTREAM OF *acnB* IN *Rhizobium* sp. CU-A1) อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, 92 หน้า.

โคลนยีนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยชุดโคลนยีน BD GenomeWalker™ Universal Kit ที่อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จากบริเวณปลายด้าน 3' ของ *acnB* ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขนาด 2850 bp ถูกโคลนเข้ายังพลาสมิด pGEM-T Easy ตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pJ2 จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แทรกสอด พบกรอบอ่านรหัสเปิด 3 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน *acnF* มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 72% กับอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Paracoccus denitrificans* สายพันธุ์ PD1222 ORF2 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 34% กับโปรตีนในตระกูล Cytochrome P450 จาก *Silicibacter pomeroyi* สายพันธุ์ DSS-3 และ ORF3 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 57% กับ 5-คาร์บอกซีเมธิล-2-ไฮดรอกซีมิวโตเนตเดลตาไอโซเมอเรส จาก *Polaromonas naphthalenivorans* สายพันธุ์ CJ2 นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรโมเตอร์หน้า ORF2 พบรหัสหยุดของ *acnF* และโครงสร้าง hairpin หลัง *acnF* จึงเป็นไปได้ว่า *acnF* น่าจะอยู่โอเปอรอนเดียวกับ *acnAcAdAbB* ที่เคยมีรายงานก่อนหน้า ส่วน ORF2 และ ORF3 ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์อื่นๆ ดังนั้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จึงอาจไม่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต โสรจยา แววศักดิ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2549 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4672479523 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ acenaphthylene/ degradation

SORAJAYA WAEWSAK : CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES LOCATED DOWNSTREAM OF *acnB* IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 92 pp.

Genes located downstream of *acnB* in *Rhizobium* sp. CU-A1 were cloned using BD GenomeWalker™ Universal Kit by Polymerase Chain Reaction using oligonucleotide primers derived from 3' region of *acnB*. The 2850 bp PCR product was cloned into plasmid pGEM-T Easy and designated as pJ2. Nucleotide sequence of insert revealed three Open Reading Frames (ORFs) in the same transcriptional direction. *acnF* showed 72% homology to aldehyde dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans* PD1222. ORF2 was 34% homology to cytochrome P450 family protein of *Silicibacter pomeroyi* DSS-3. ORF3 showed 57% homology to 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta isomerase of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. Stop codon and putative hairpin structure was found downstream of *acnF*. Moreover, a putative promoter region were found upstream of ORF2. These results suggested that *acnF* may located on the same operon with *acnAcAdAbB* which have been previously reported whereas ORF2 and ORF3 might be under the control of another promoter. Therefore, genes involving acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1 may not be arranged as cluster.

Department Microbiology Student's signature S. Waewsak

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

Academic year 2006 Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อชุด BD Genome - Walker™ Universal Kit และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณ คุณดวงกมล ฐปมงคล และคุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัยและความช่วยเหลือในทุกด้าน ขอบคุณ คุณปิ่นปัญญา เรียงรุ่งโรจน์ คุณปิยะวรรณ เพชราภา คุณวิมลิน ศิริพัฒนานนท์ คุณไปรมา แก้วสามศรี คุณศิรประภา ถาวรานันท์ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณตา คุณยาย และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วารสารปริทรรศน์ 4
   - 2.1 การบำบัดสารประกอบ PAHs 4
   - 2.2 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ 5
     - 2.2.1 การย่อยสลายแนพธาลีน 6
     - 2.2.2 การย่อยสลายฟลูออรีน 7
     - 2.2.3 การย่อยสลายฟีแนนทรีนและแอนทราซีน 7
     - 2.2.4 การย่อยสลายฟลูออแรนธีน 8
     - 2.2.5 การย่อยสลายไพรีน 8
   - 2.3 การศึกษาวิถีการย่อยสลาย PAHs ในระดับพันธุศาสตร์ 9
   - 2.4 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและการศึกษาวิถีการย่อยสลายในระดับพันธุศาสตร์ 11
   - 2.5 การย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และยีนที่เกี่ยวข้อง 15
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 18
   - 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 18
   - 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ 19
   - 3.3 แบคทีเรีย 21
   - 3.4 พลาสมิดและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 22

บทที่ หน้า

3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย..... 24
3.6 เตรียมชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 บริเวณที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB*..... 24
3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 24
3.6.1.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ... 25
3.6.1.2 ตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 26
3.6.1.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์..... 26
3.6.2 ไลเกชัน (ligation)ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อ (adaptor)..... 27
3.6.3 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซม *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)..... 27
3.6.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1..... 27
3.6.3.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 (Nested PCR)..... 29
3.7 โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* 31
3.7.1 สกัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน..... 31
3.7.2 ไลเกชัน (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์..... 31
3.7.3 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจาก เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ชิ้นส่วนที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* สอดแทรกอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก..... 32
3.7.3.1 เตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) 32
3.7.3.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน..... 33
3.7.3.3 คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการ..... 33

บทที่ หน้า

3.8 ยืนยันความถูกต้องของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน และระบุตำแหน่งการตัดเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆบนพลาสมิด pJ2 35
3.8.1 เตรียมไนลอนเมมเบรนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการไฮบริไดซ์ 37
3.8.1.1 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 37
3.8.1.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 38
3.8.1.3 ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ 38
3.8.1.4 ย้ายดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลไปยังไนลอนเมมเบรน (Southern blot) 38
3.8.2 ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ด้วยดีเอ็นเอติดตาม J2 40
3.9 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ถัดลงมาจาก *acnB* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 42
4. ผลการทดลอง 43
4.1 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่อยู่ถัดลงมาจาก *acnB* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 44
4.1.1 ลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 44
4.1.2 ลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 46
4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ PCR ครั้งที่ 2 47
4.3 การทำโคลนย่อย (Subcloning) พลาสมิด pJ2 50
4.4 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ 51
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 59
รายการอ้างอิง 67
ภาคผนวก 78
ภาคผนวก ก 79
ภาคผนวก ข 80

บทที่ หน้า

ภาคผนวก ค 89

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp.สายพันธุ์ CU-A1 หน้าที่และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง 17

3.1 แบคทีเรีย..... 21

3.2 พลาสมิด..... 22

3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์..... 23

3.4 วิธีเจือจางสารละลายดีเอ็นเอสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้ว..... 36

3.5 ขั้นตอนการหาปริมาณดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลาก..... 37

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 วิถีการย่อยสลายสาร PAHs ทั่วไปใน ก.) แบคทีเรีย และ ข.) รา (Cerniglia,1992).. 5

2.2 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Sphingomonas yanoikuyae* สายพันธุ์ B1 I คือ Acenaphthylene ,II คือ cis-1,2-Acenaphthenediol, III คือ 1,2-Dihydroxyacenaphthylene, IV คือ 1-Hydroxy-2-ketoacenaphthene และ V คือ Acenaphthenequinone (Schocken และ Gibson, 1984)..... 12

2.3 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996)..... 14

2.4 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยโครงสร้างที่อยู่นอกกล่องคือสารมัธยันตร์ที่ศึกษาโดย Poonthrigpun และคณะ (2006) 1 คือ Acenaphthylene, 2 คือ cis-1,2-Acenaphthenediol, 3 คือ 1-Hydroxy-2-ketoacenaphthene, 4คือ 1,2-Dihydroxyacenaphthylene, 5 คือ Maleyl pyruvate, 6 คือ Fumaryl pyruvate, I คือ Acenaphthenequininem II คือ Naphthalene-1,8-dicarboxylic acid, III คือ Gentisic acid, IV คือ 1-Naphthoic acid และ V คือ Salicylic acid 16

3.1 วิธีติดตั้งเครื่องในการทำ Vacuum Blot ประกอบด้วย Vacuum Blotter, Liquid trap, Vacuum Regulator และ Pump (Bio-Rad, USA.)..... 39

3.2 ลักษณะการผนึกถุงพลาสติกสำหรับบ่มกับสับสเตรท..... 41

4.1 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 1 เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ JUB2 และ AP1 และจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Dra*I *Eco*RV *Pvu*II หรือ *Stu*I ที่ไลเกทกับชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อเป็นแม่แบบ..... 45

4.2 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสครั้งที่ 2 เมื่อใช้คู่ไพร์เมอร์ JUB1 และ AP2 และใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.1 เป็นแม่แบบ..... 46

4.3 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJ2 เป็นแม่แบบ และใช้คู่ไพร์เมอร์ JUB1 และ AP2..... 48

ภาพประกอบ หน้า

4.4 ก.) อะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอพลาสมิด pJ2 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เดี่ยวและคู่ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในซิ้นดีเอ็นเอแทรกสอด ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม J2..... 49

4.5 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pJ2 ข.)-ค.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสับโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pJ2 เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pJ2.2 (ข.) และ pJ2.3 (ค.)..... 50

4.6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์สอดแทรกในพลาสมิด pJ2 ขนาด 2850 bp..... 57

4.7 แผนที่เรสทริกชันของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน..... 58

5.1 การเร่งปฏิกิริยาของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยแบคทีเรีย (Iwabuchi และ Harayama, 1997)..... 61

5.2 การเร่งปฏิกิริยาของไซโทโครม P450 ในการย่อยสลายฟีแนนทรีน จาก *Pleurotus ostreatus* (Bezalel และคณะ, 1997)..... 62

5.3 Consensus sequence ของโปรโมเตอร์ (Lisser และ Margalit, 1993) ตัวเลขใต้เบสแต่ละตัวแสดงเปอร์เซ็นต์การพบเบสชนิดนี้ที่ตำแหน่งนั้น..... 63

5.4 การเร่งปฏิกิริยาของไอโซเมอเรส ในการเปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง4-carboxy-2-hydroxymuconate (CHM) และ 4-oxalomesaconate (OMA) จาก *Sphingomonas paucimobilis* สายพันธุ์ SYK-6 (Masai และคณะ, 2000)..... 64

5.5 การเร่งปฏิกิริยาของ 5-คาร์บอกซีเมธิล-2-ไฮดรอกซีมิวโคเนต เดลตา ไอโซเมอเรส ในการเปลี่ยนไอโซเมอร์ระหว่าง 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate (CHM) และ 5-carboxy-2-oxohept-3-enedioate (OPET) (Sparnins และ Chapman, 1996)... 65