

การแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1



นางสาวสิริภัทร พฤษไพฑูริย์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2744-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF GENES INVOLVING ACENAPHTHYLENE DEGRADATION  
IN *Rhizobium* sp. CU-A1



Miss Siripat Prukpaiboon

สถาบันวิทยบริการ

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 2005

ISBN 974-53-2744-1



สิริภัทร พุกกะโพบลย์ : การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน  
ใน *Rhizobium* sp. CU-A1. (EXPRESSION OF GENES INVOLVING  
ACENAPHTHYLENE DEGRADATION IN *Rhizobium* sp. CU-A1) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.  
ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร. อรุณทัย ภิญญาคง 104 หน้า. ISBN  
974-53-2744-1.

ได้ติดตามการแสดงออกของยีนประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit (*acnAc*) ของไดออกซิจีเนสที่  
เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ  
เรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (RT-PCR) พบว่า *acnAc* มีการแสดงออกใน *Rhizobium* sp. CU-A1  
เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดคาร์บอน CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนที่เวลาในการบ่ม 1 3 8 และ  
12 ชั่วโมง โดยสัมพันธ์กับการลดลงของอะซีแนพทิลีน ไม่พบการแสดงออกของ *acnAc* ในสาย  
พันธุ์กลาย D2 อะซีแนพทิลีน แนพทาลีน กรดโปรโตคาทิกูอิก กรดซัคซินิก และกลูโคส ไม่สามารถ  
ชักนำการแสดงออกของ *acnAc* นอกจากอะซีแนพทิลีน เมื่อใช้กรด 1-แนพโทอิกซึ่งเป็นสารมัต  
ยัณฑ์ที่พบในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในเชื้อสายพันธุ์นี้เป็นแหล่งคาร์บอน *acnAc* สามารถ  
แสดงออกได้เช่นกัน พบการถอดรหัสร่วมกันของยีนประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit (*acnAc*)  $\beta$ -  
subunit (*acnAd*) เฟอริดอกซิน (*acnAb*) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไดออกซิจีเนส และยีน  
ประมวลรหัสไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*acnB*) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพ  
ทิลีน หรือกรด 1-แนพโทอิก นอกจากนี้ยังพบว่า *acnK* ซึ่งประมวลรหัส 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ดี  
ไฮโดรจีเนสมีการแสดงออกในชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อในอะซีแนพทิลีน จึงอาจกล่าวได้ว่า  
*acnAc* และ *acnK* สามารถถูกชักนำให้มีการแสดงออกได้โดยอะซีแนพทิลีน และ *acnAcAdAbB*  
น่าจะมีการเรียงตัวกันเป็นโอเปอรอน

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....สิริภัทร พุกกะโพบลย์  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ponar khumri  
ปีการศึกษา 2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อรุณทัย ภิญญาคง



## 4572535923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ ACENAPHTHYLENE/ GENE EXPRESSION

SIRIPAT PRUKPAIBOON : EXPRESSION OF GENES INVOLVING ACENAPHTHYLENE DEGRADATION IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., THESIS COADVISOR : ONRUTHAI PINYAKONG, Dr. 104 pp. ISBN 974-53-2744-1.

Expression of gene encoding  $\alpha$ -subunit (*acnAc*) of dioxygenase for acenaphthylene degradation was investigated in *Rhizobium* sp. CU-A1 by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *acnAc* was expressed in *Rhizobium* sp. CU-A1 in the presence of acenaphthylene in carbon-free mineral medium (CFMM) at 1, 3, 8 and 12 hours of culturing in accordance with the gene expression the depletion of acenaphthylene. No expression of *acnAc* in the mutant strain D2 was observed. Acenaphthene, naphthalene, protocatechuic acid, succinic acid and glucose could not induce the expression of *acnAc*. Besides acenaphthylene, 1-naphthoic acid, an intermediate in acenaphthylene degrading pathway of this strain, was able to induce *acnAc* expression as well. Coexpression of genes encoding subunit of dioxygenase;  $\alpha$ -subunit (*acnAc*),  $\beta$ -subunit (*acnAd*), ferredoxin (*acnAb*); and dihydrodiol dehydrogenase (*acnB*) were observed when this strain was cultured in acenaphthylene or 1-naphthoic acid containing medium. In addition, gene encoding 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase (*acnK*) was found to be expressed in *Rhizobium* sp. CU-A1 cultured in acenaphthylene at 8 hours of cultivation. These results suggested that the expression of *acnAc* and *acnK* could be induced by acenaphthylene, and it may also be possible that *acnAcAdAdB* was oriented as an operon.

Department..... Microbiology..... Student's signature..... *Sirijat*  
 Field of study..... Industrial Microbiology..... Advisor's signature..... *K. Pattaragulwanit*  
 Academic year..... 2005..... Co-advisor's signature..... *Onruthai Pinyakong*

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรรถชัย ภิณฑูมาศ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิควิธีทางอาร์เอ็นเอ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบพระคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆทางอาร์เอ็นเอ

ขอบคุณ คุณธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ คุณทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยรงค์ คุณจิตติวรดา นินทนาวงศา และคุณดวงกมล ฐปมมงคลสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย กำลังใจและความช่วยเหลือทุกด้าน ขอขอบคุณ คุณวัชรวิฑูรย์ และคุณจันทรนาถ พลขำนิ ที่อยู่เคียงข้างเสมอ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ และครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฎ
สารบัญรูป .....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรียและยีส่ที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1.1 วิธีการย่อยสลายเนพทาลีน.....	5
2.1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน.....	10
2.2 ยีส่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs.....	15
2.3 วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีส่โดยเทคนิคทางอาร์เอ็นเอ.....	21
2.3.1 นอร์ทเทอ์นไฮบริไดเซชัน (Northern hybridization).....	21
2.3.2 ดอท และสล็อตบรอตไฮบริไดเซชัน (Dot and slot blot hybridization).....	23
2.3.3 Nuclease protection assay.....	24
2.3.4 Ribonuclease protection assay (RPA).....	25
2.3.5 Primer extension.....	26
2.3.6 ปฏิกริยาทรานสคริปชันพอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	28
2.3.7 Microarrays หรือ DNA microchips.....	31
2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีส่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1.....	33

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง .....	37
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	37
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	39
3.3 แบคทีเรีย.....	41
3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	42
3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	43
3.6 ตรวจสอบยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์ กลาย D2 และ E11.....	43
3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 สาย พันธุ์กลาย D2 และ E11.....	43
3.6.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	44
3.6.3 ตรวจสอบการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 โดยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	45
3.7 ติดตามการแสดงออกของยีน <i>acnAc acnK</i> และ 16S rDNA ใน <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 หรือสายพันธุ์ กลาย E11 ในอะซีแนพติลิน โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบถอด รหัสย้อนกลับ (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR).....	46
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์.....	46
3.7.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอ.....	47
3.7.2.1 สกัดอาร์เอ็นเอ.....	47
3.7.2.2 การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ.....	48
3.7.2.3 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอ.....	48
3.7.3 สังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทราน สคริปเทส.....	49
3.7.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อยีน <i>acnAc</i> หรือ <i>acnK</i> และไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับส่วนของ 16S rDNA (house-keeping gene).....	50



3.8	ติดตามการแสดงออกของยีน <i>acnAc</i> และ 16S rDNA ใน <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ในชั้นสเตรทชนิดต่างๆโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse transcription- polymerase chain reaction, RT-PCR).....	51
3.9	ติดตามการแสดงออกของยีน <i>acnAc</i> และ 16S rDNA ใน <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 ในกรด 1-แนฟโธอิก โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR).....	51
3.10	ตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของยีน <i>pruA</i> และ <i>pruB</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ <i>pruA</i> และ <i>pruB</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์กลาย D2 ในกรด 1-แนฟโธอิก โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเฉพาะ (acnAcAdAbB).....	52
3.11	ติดตามการเจริญของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอะซีแนฟติลินและกรด 1-แนฟโธอิก.....	53
4.	ผลการทดลอง .....	54
4.1	ตรวจสอบยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในโครโมโซมของ D2 และ E11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1... ..	55
4.2	การแสดงออกของยีน <i>acnAc</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 เมื่อใช้อะซีแนฟติลินเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ RT-PCR.....	58
4.3	การแสดงออกของยีน <i>acnAc</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 เมื่อใช้สารประกอบ PAHs และสารมัธยันต์ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ RT-PCR.....	61
4.4	การแสดงออกของยีน <i>acnAc</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 เมื่อใช้กรด 1-แนฟโธอิกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ RT-PCR.....	62
4.5	การแสดงออกของยีน <i>acnK</i> ของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ RT-PCR.....	64

4.6 การถอดรหัสร่วมกันของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสและไดไฮโดรได ออลดีไฮโดรจีเนสของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ( <i>acnAcAdAbB</i> ) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอะซีแนพริลีน.....	65
4.7 การถอดรหัสร่วมกันของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสและไดไฮโดรได ออลดีไฮโดรจีเนสของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ( <i>acnAcAdAbB</i> ) เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรด 1-แนพโทอิก.....	68
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	70
รายการอ้างอิง .....	82
ภาคผนวก .....	93
ภาคผนวก ก .....	94
ภาคผนวก ข .....	97
ภาคผนวก ค .....	103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	104

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีดีนใน <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 หน้าที่ และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง.....	35
3.1	แบคทีเรีย.....	41
3.2	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์.....	42
3.3	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการตรวจสอบการ แทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5.....	45
3.4	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอโดยรี เวอร์สทรานสคริปเทส.....	49
4.1	คู่อลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ยีนเป้าหมายและขนาดผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังสำหรับ ตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของกลุ่ม <i>acnAcAdAbB</i> .....	66

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพทิลีน.....	1
2.1 การเร่งปฏิกิริยาของแนพทาลีนไดออกซิจีเนส (Yen และ Serdar, 1988).....	6
2.2 วิธีบนของการย่อยสลายแนพทาลีนโดยแบคทีเรีย <i>Pseudomonads</i> (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982).....	7
2.3 วิธีล่างของการย่อยสลายแนพทาลีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) <i>Pseudomonas</i> sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) <i>Ralstonia</i> sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001).....	9
2.4 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนของ 1) <i>Beijerinckia</i> sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) 3) <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) และ 4) <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์, 2545; Poonthrigpun และคณะ, 2003).....	12
2.5 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนและอะซีแนพทิลีนโดยแบคทีเรีย 1) <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816 (Schocken และ Gibson, 1984) 3) <i>Alcaligenes eutrophus</i> และ <i>Alcaligenes paradoxus</i> (Selifonov และคณะ, 1993) 4) <i>Sphingomonas</i> sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) 5) <i>Burkholderia cepacia</i> สายพันธุ์ F297 6) <i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) 7) <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์, 2545).....	14
2.6 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982).....	15
2.7 การเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย <i>nah</i> ในส่วนวิธีบนของการย่อยสลายแนพทาลีน ของ <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816, <i>P. putida</i> สายพันธุ์ G7, <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816-4, <i>Pseudomonas</i> sp. สายพันธุ์ C18, <i>P. aeruginosa</i> สายพันธุ์ PaK1, <i>P. putida</i> สายพันธุ์ OUS82 และ <i>P. stutzeri</i> สายพันธุ์ AN10 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003).....	16

รูปที่	หน้า
2.8	19
2.9	32
2.10	36
2.11	36
3.1	50
3.2	50
3.3	52
4.1	55
4.2	57
4.3	59
4.4	60



รูปที่	หน้า
4.5	61
4.6	62
4.7	63
4.8	65
4.9	67
4.10	69
5.1	73

4.5 อีอาร์เอสแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีน (Acn) แนพธาลีน (Nap) อะซีแนพธีน (Act) กรด 1-แนพโธอิก (1-Nap) กรดโปรโตคาทิวอิก (Pca) กรดซัคซินิก (Suc) และกลูโคส (Glu) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ผลลัพท์คือ ปฏิกริยาที่ไม่เต็มรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnAc*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส.....

4.6 อีอาร์เอสแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ก.) และสายพันธุ์กลาย D2 (ข.) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีกรด 1-แนพโธอิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง ผลลัพท์คือ ปฏิกริยาที่ไม่เต็มรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnAc*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส.....

4.7 การเจริญของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนพโธอิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และการย่อยสลายกรด 1-แนพโธอิก.....

4.8 อีอาร์เอสแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnK* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ก.) และสายพันธุ์กลาย E11 (ข.) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง ผลลัพท์คือ ปฏิกริยาที่ไม่เต็มรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnK*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส....

4.9 อีอาร์เอสแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAdAbB* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอะซีแนพธิดีน.....

4.10 อีอาร์เอสแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของยีน *acnAcAdAbB* เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรด 1-แนพโธอิก.....

5.1 วิธีเบต้า-ดีโตะดิเพธ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายและสารชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ใน *Pseudomonas putida* (Ornston, 1971).....

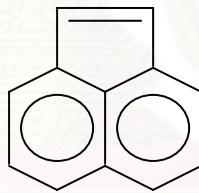
รูปที่	หน้า
5.2 ไดอะแกรมเสนอความเกี่ยวข้องของยีนของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 กับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีลีน ตัวอักษรสีแดงคือ ยีนและเอนไซม์ที่เสนอในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนของ CU-A1.....	80
5.3 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ $\alpha$ -subunit ของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ประมวลรหัสโดย <i>acnAc</i> กับลำดับกรดอะมิโนของ $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสชนิดต่างๆ ได้แก่ ไดเบนโซไทโอพีน ไดออกซิจีเนส (DbdCa) ของ <i>X. polyaromaticivorans</i> สายพันธุ์ 127W, โทลูอิน ไดออกซิจีเนส (TodC1) ของ <i>P. putida</i> สายพันธุ์ F1, คลอโรเบนซีน ไดออกซิจีเนส (TcbAa) ของ <i>P. putida</i> สายพันธุ์ P51, ไบฟีนิล ไดออกซิจีเนส (BphA1) ของ <i>P. pseudoalcaligenes</i> สายพันธุ์ KF707 และ แนพธาดีน ไดออกซิจีเนส (NahAc) ของ <i>P. putida</i> สายพันธุ์ NCIB9816-4 ตามลำดับ หมายเลข 206 216 219 และ 226 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลง (ดัดแปลงจาก Hirano และคณะ, 2006).....	81

# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญที่มีผู้ให้ความสนใจและเริ่มมีการศึกษาถึงวิธีการอนุรักษ์ ป้องกันและแก้ไขปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากผลกระทบของการละเลยในการอนุรักษ์และขาดการจัดการด้านมลภาวะในสิ่งแวดล้อมที่ดี ได้ทวีความรุนแรงและก่อให้เกิดปัญหาที่ใกล้ตัวเรามากขึ้น มลภาวะและสารพิษตกค้างต่างๆในสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ และยังเป็นสาเหตุของปัญหาสุขภาพในมนุษย์อีกด้วย

อะซีแนพทีลินเป็นสารประกอบในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพทีลิน

อะซีแนพทีลินและสารประกอบ PAHs พบเป็นสารปนเปื้อนตามแหล่งอุตสาหกรรมต่างๆทั่วโลก เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันปิโตรเลียมและถ่านหิน น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และเขม่าควันจากเครื่องยนต์ พบในน้ำมันดิบ น้ำมันดำจากถ่านหิน (coal tar) ครีโอโซท (creosote) และยังพบในควันบุหรี่ เขม่าควันจากไฟฟ้า และภูเขาไฟระเบิด (Faust, 1994) สารประกอบ PAHs พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งในอากาศโดยจับกับอนุภาคของฝุ่นละออง ในดินและตะกอน และถูกดูดซับไว้กับอินทรีย์วัตถุในดิน (Cerniglia, 1992) สารประกอบ PAHs มีสมบัติละลายน้ำได้น้อย จึงพบการสะสมในดิน ตะกอนในแหล่งน้ำ หรือกระจายจากบรรยากาศไปสู่พืชและต้นไม้ และสามารถสะสมในสัตว์น้ำได้ นอกจากนี้ยังอาจพบสารประกอบ PAHs ปนเปื้อนในอาหารได้อีกด้วย สารประกอบ PAHs มีอันตรายต่อมนุษย์เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารก่อ

มะเร็ง (carcinogen) และสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) (Patnaik, 1992) จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารประกอบ PAHs เป็นสารพิษที่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมมนุษย์และสิ่งมีชีวิตมีโอกาสที่จะได้รับสารกลุ่มนี้ได้ จึงมีความจำเป็นจะต้องมีการบำบัดสารประกอบ PAHs ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันการบำบัดสารประกอบ PAHs โดยวิธีทางชีวภาพเริ่มมีบทบาทสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถกำจัดสารประกอบ PAHs ได้ค่อนข้างสมบูรณ์ จุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย รา และยีสต์ บางชนิดที่อยู่ในระบบนิเวศน์ มีกระบวนการที่อิสระต่อกันหรือร่วมกันเพื่อย่อยสลายสารประกอบ PAHs (Heitkamp และคณะ, 1987) โปรคาริโอตหลายชนิดสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีน 2 หรือ 3 วงได้อย่างสมบูรณ์จนได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต (Hedlund และคณะ, 1999) ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น *Pseudomonas* sp. *Sphingomonas* sp. *Comamonas* sp. *Acinetobacter* sp. (Hedlund และคณะ, 1999 และ Dagher และคณะ, 1996) *Pseudomonas putida* G7 (Ahn และคณะ, 1998) *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในสภาวะมีออกซิเจน ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่จะเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบ PAHs (transformation) ซึ่งทำให้ความเป็นพิษของสารประกอบ PAHs ลดลง เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มออกซิจีเนส (oxygenase) และดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งจะทำให้โครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกของสารประกอบ PAHs แตกออกเป็นสารมัธยันตร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้นโดยเอนไซม์อื่นในลำดับต่อไป จนได้สารมัธยันตร์ที่ผ่านเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่กล่าวถึงการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยจุลินทรีย์ยังไม่มีรายงานมากนัก รายงานส่วนใหญ่มักกล่าวถึงการย่อยสลายอะซีแนพริลีนแบบโคออกซิเดชัน แต่ยังไม่เกิดการแตกวงไซโคลเพนทีนของอะซีแนพริลีนเพื่อใช้อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ วิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 (Grifoll และคณะ, 1995) *Pseudomonas*

*aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) มีการสะสมสารมัธยันตร์กรดแนพธาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (naphthalene-1,8-dicarboxylic acid) และไม่สามารถย่อยสลายต่อไปได้ (Komatsu และคณะ, 1993 และ Selifonov และคณะ, 1996) มีเพียง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 เท่านั้นที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญได้ (Pinyakong และคณะ, 2004) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงวิธีการย่อยสลายโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้

*Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนได้ คัดแยกจากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในเขตกรุงเทพมหานครโดย ศรัลยา แพงไตร (2543) เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายพีแนนทรีน ฟลูออรีน และอะซีแนพทิลีนร่วมกับอะซีแนพทิลีนด้วย เพื่อศึกษาวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน รัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 จนได้สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ดวงกมล ฐูปมงคล (2546) ได้นำสายพันธุ์กลาย D2 ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ที่เกิดจากการสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn5 มาศึกษาหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ด้วยเทคนิคเซฟเฟอร์ไฮบริไดเซชัน โดยมีทรานสโปซอน Tn5 เป็นตัวติดตาม จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียง Tn5 เพื่อนำไปสร้างดีเอ็นเอติดตามในสายพันธุ์ปกติ สามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ขนาด 5.9 กิโลเบส และสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิดได้ 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน โดยกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1-3 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ  $\alpha$ -subunit  $\beta$ -subunit และเฟอร์รีดอกซิน ของไดออกซีจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Hirano และคณะ, 2006) เท่ากับ 76% 60% และ 71% ตามลำดับ และกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 67% กับไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Hirano และคณะ, 2006) ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้หลายชนิด ได้แก่ ไดเบนไซโทไอพิน ไบฟีนิล แนพธาลิน แอนทราซีน และพีแนนทรีน และกรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 ซึ่งเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 65% กับอัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ที่ย่อยสลายแนพธาลินและพีแนนทรีน นอกจากนี้ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์ (2545) และฐิติวรดา นินทนางศา (2546) พบว่ายีนที่ถูกสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย E11 และยีนข้างเคียงคือยีนประมวลรหัสเหมือน 38% กับไฮดรอกซี-อัลโดเลสของ



*Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ยีนประมวลรหัสเหมือน 46% กับ 2-คาร์บอกซิเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ K7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) และยีนประมวลรหัสเหมือน 36% กับเฟอริดอกซินรีดักเตสของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) ซึ่งยีนที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เนื่องจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนแตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นตามที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโนและการจัดเรียงตัวของยีน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรสึแบบถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR) ข้อมูลที่ได้นอกจากจะแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนจริงแล้ว ยังชี้ให้เห็นว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกตลอดเวลาหรือถูกเหนี่ยวนำได้

## วัตถุประสงค์

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบการแสดงออกของยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อทราบว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกตลอดเวลาหรือถูกเหนี่ยวนำได้ เพื่อประโยชน์ในการทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์ในอนาคตต่อไป

## บทที่ 2

### ปรีทรรศน์วรรณกรรม

#### 2.1 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยแบคทีเรียและยีนที่เกี่ยวข้อง

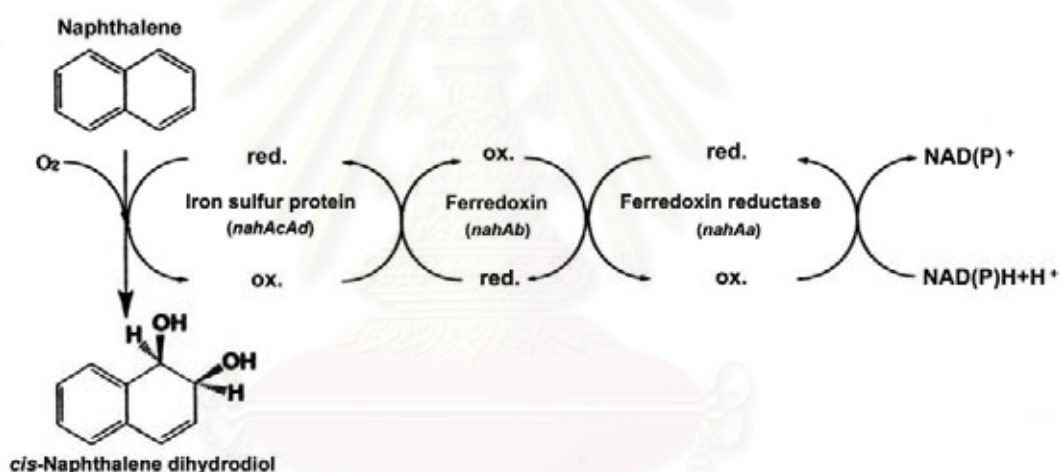
ปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในสถานะที่มีออกซิเจนโดยแบคทีเรีย โดยทั่วไปจะเริ่มต้นจากการนำออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกที่ตำแหน่งพันธะคู่ของโมเลกุลของสารประกอบ PAHs โดยการเร่งปฏิกิริยาของระบบเอนไซม์ไดออกซิจีเนส (multicomponent dioxygenase) ซึ่งประกอบด้วย รีดักเทส (reductase) เฟอริดอกซิน (ferredoxin) และเทอร์มินอลออกซิเดส (terminal oxidase) ซึ่งจะทำหน้าที่เติมออกซิเจนให้กับโมเลกุลของสารประกอบ PAHs ที่ตำแหน่งพันธะคู่ เปลี่ยนเป็น ซิส-ไดไฮโดรไดออล (cis-dihydrodiol) ซึ่งจะมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่โดยเอนไซม์ ซิส-ไดออล ดีไฮโดรจีเนส เปลี่ยนเป็น สารมัธยันตร์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) สองหมู่ ซึ่งสารมัธยันตร์ต่างๆจะถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ไดออกซิจีเนสผ่านทาง *ortho-cleavage pathway* หรือ *meta-cleavage pathway* และเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) ต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

##### 2.1.1 วิธีการย่อยสลายแนพทาลีน

วิธีการย่อยสลายแนพทาลีนเป็นวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีการศึกษาและมีรายงานกล่าวถึงมากที่สุด เนื่องจากโครงสร้างของแนพทาลีนประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 วง ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยจุลินทรีย์หลายชนิดจึงนิยมใช้แนพทาลีนเป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมหลายชนิดสามารถย่อยสลายแนพทาลีนและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ จากรายงานแรกของ Davies และ Evans (1964) กล่าวถึงวิธีการย่อยสลายแนพทาลีนโดย *Pseudomonas* sp. กล่าวว่าแนพทาลีนจะถูกย่อยสลายไปเป็นกรดซาลิไซลิกโดยเริ่มต้นจากการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้ายังวงอะโรมาติกที่ตำแหน่ง 1,2 ได้เป็นซิส-1,2-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออล (cis-1,2-naphthalene dihydrodiol) โดยพบว่ากระบวนการนี้เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของแนพทาลีนไดออกซิจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่สำคัญในการแตกวงอะโรมาติกของแนพทาลีน

(Ensley และคณะ, 1982; Ensley และ Gibson, 1983) โดยแนพทาลีนไดออกซิจีเนสประกอบด้วย เอนไซม์ 3 ชนิดทำงานร่วมกัน (multicomponent enzyme system) ประกอบด้วย เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน และ iron sulfur protein (ISP) ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่ต่างกัน คือ large subunit ( $\alpha_2$ ) และ small subunit ( $\beta_2$ )

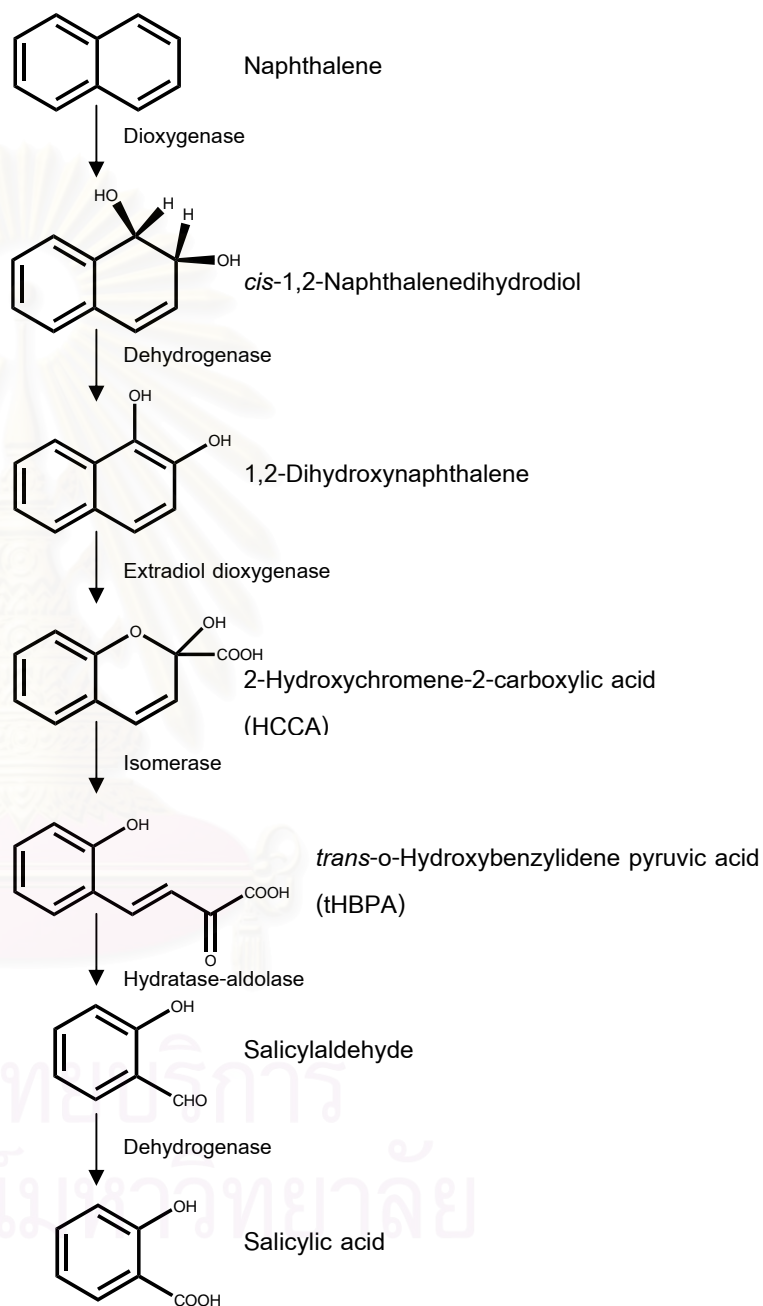
โดยแนพทาลีนไดออกซิจีเนสจะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เริ่มจาก NADH หรือ NADPH จะส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยัง FAD ในเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส แล้วส่งต่อไปยัง [2Fe-2S] ของเฟอร์รีดอกซิน และสุดท้ายอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านไปยัง iron sulfur protein ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนเข้ายังวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออล ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเร่งปฏิกิริยาของแนพทาลีนไดออกซิจีเนส (Yen และ Serdar, 1988)

ต่อจากนั้นซิส-แนพทาลีนไดไฮโดรไดออลจะถูกเปลี่ยนเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพทาลีน (1,2-dihydroxynaphthalene) และ กรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิก (2-hydroxychromene-2-carboxylic acid, HCCA) โดยแนพทาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส และ ไดไฮดรอกซีแนพทาลีนดีไฮโดรจีเนสตามลำดับ จากนั้นกรด 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลิกจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็น ทรานส์-ออลโท-ไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans*-o-hydroxybenzylidenepyruvic acid, tHBPA) โดย HCCA ไฮโซเมอเรส แล้วเปลี่ยนเป็นซาลิไซลัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) จนได้กรดซาลิไซลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาของไฮดรอกซี-อัลโดเลส และ

ซาลิไซลต์ดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสตามลำดับ ซึ่งเรียกว่าวิถีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



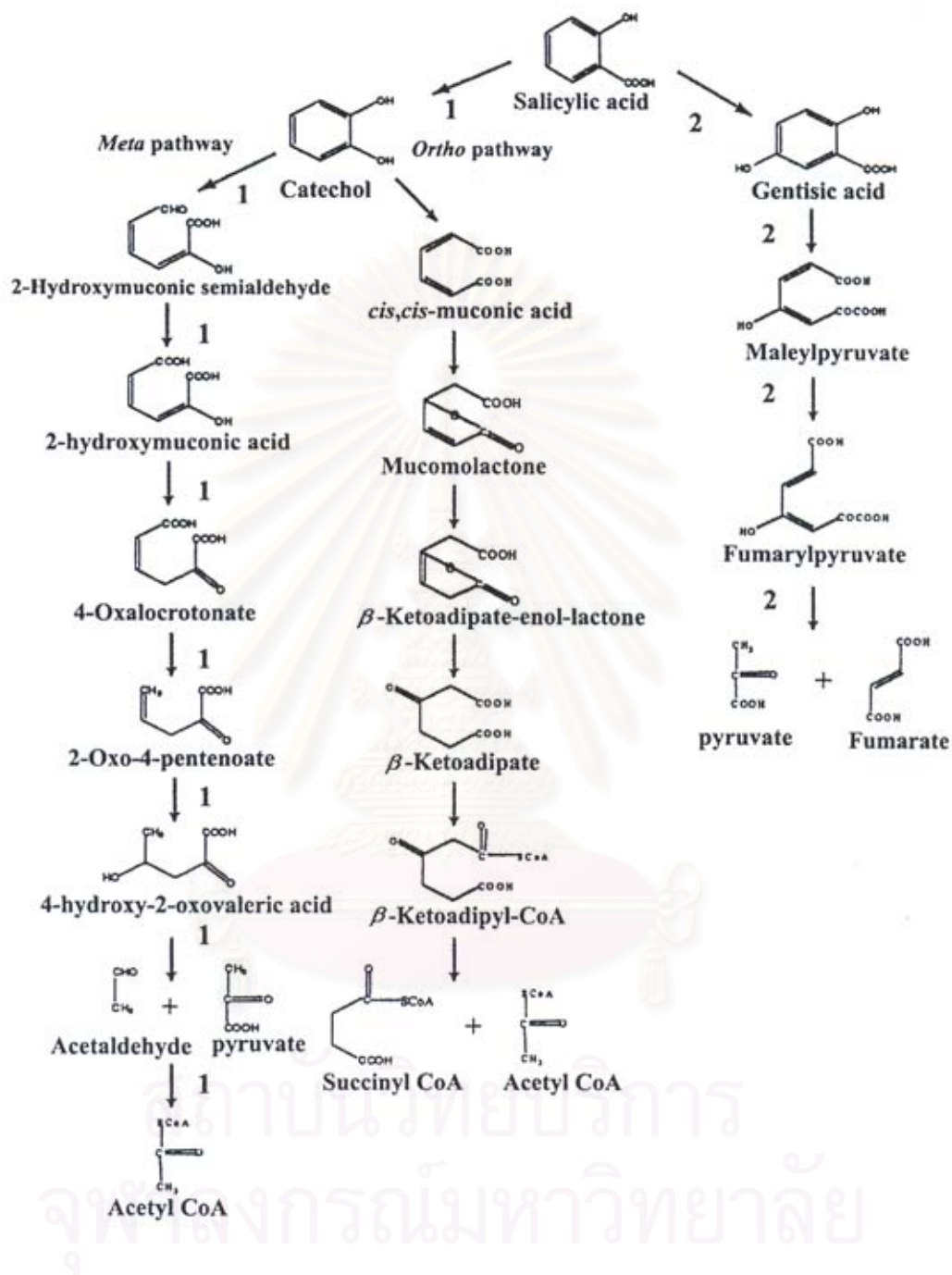
รูปที่ 2.2 วิถีบนของการย่อยสลายเนฟทาลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonads* (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982)

กรดซาลีไซลิกจะถูกย่อยสลายต่อไปผ่านวิถีการย่อยสลายคะทีคอล (catechol) โดยการแตกวงเบนซีนแบบ *ortho* หรือ *meta* จนได้ผลิตภัณฑ์เข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกต่อไป นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังมีการย่อยสลายกรดซาลีไซลิกที่ไม่ผ่านคะทีคอล แต่เปลี่ยนกรดซาลีไซลิกไปเป็นกรดเจนทิสิก (gentisic acid) ซึ่งจะถูกรย่อยสลายต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สามารถเข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกได้แก่ ไพรูเวต และฟิวมาเรต เรียกวิถีการย่อยสลายตั้งแต่กรดซาลีไซลิกจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์ที่เข้าวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกว่าวิถีการย่อยสลายส่วนล่าง (lower pathway) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.3 วิธีล้างของการย่อยสลายเนพธาซีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001)

## 2.1.2 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีลิน

อะซีแนพทีลินมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าแนพทีลินโดยประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 วงต่อกับวงไฮโคลเพนทีน 1 วง จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายอะซีแนพทีลินได้ แต่รายงานเกี่ยวกับวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีลินยังไม่สมบูรณ์ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีลินแล้วเปลี่ยนโครงสร้างของสารได้ และสารมัธยันตร์ที่พบเมื่อมีการย่อยสลายอะซีแนพทีลินคือ กรดแนพทีลิน-1,8- ไดคาร์บอกซิลิก การย่อยสลายอะซีแนพทีลินเคยมีรายงานดังนี้

Schocken และ Gibson (1984) พบว่า *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 ที่มีความสามารถย่อยสลายไปฟีนอลได้ สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีลินร่วมกับอะซีแนพทีลินแบบโคออกซิเดชันโดยมีไปฟีนอลเป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยศึกษาการออกซิไดซ์ของอะซีแนพทีลินจากการติดตามการสะสมของสารมัธยันตร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการเติมออกซิเจนเข้ายังวงไฮโคลเพนทีนของอะซีแนพทีลินโดยการเร่งปฏิกิริยาของไดออกซิจีเนส ได้เป็น ซิส-1,2-อะซีแนพทีนไดออล (*cis*-1,2-acenaphthenediol) 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพทีลิน (1,2-dihydroxyacenaphthylene) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซีแนพทีนควิโนน (acenaphthenequinone)

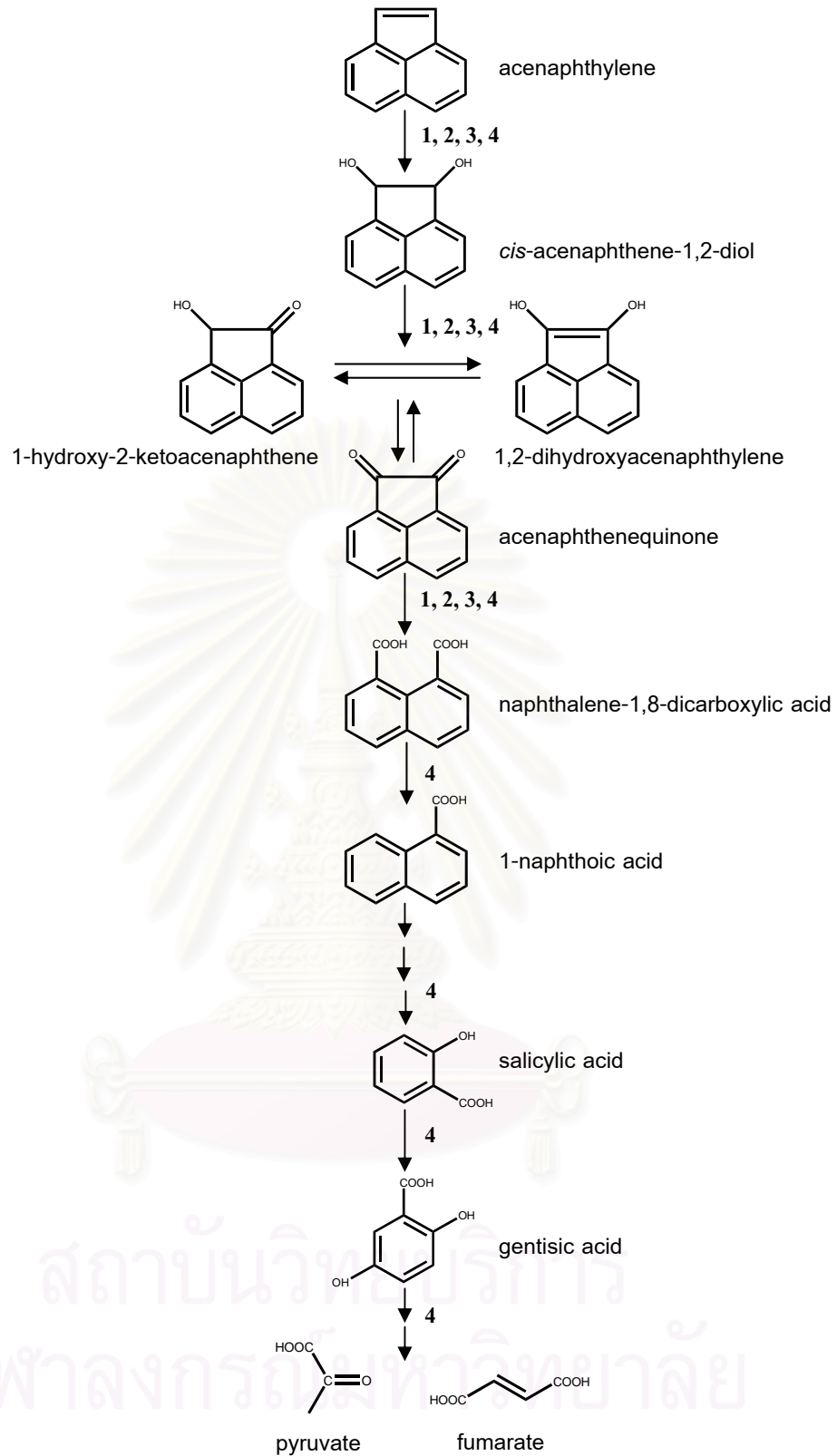
Komatsu และคณะ (1993) พบการสะสมของกรดแนพทีลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายอะซีแนพทีลินในน้ำเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Spingomonas* sp. สายพันธุ์ A4; (Pinyakong และคณะ, 2004)) และพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ใช้อะซีแนพทีลินเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

Selifonov และคณะ (1996) ทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีลินโดยทำการวิเคราะห์สารมัธยันตร์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ซึ่งได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 พบว่าอะซีแนพทีลินถูกออกซิไดส์ได้ด้วยไดออกซิจีเนสเหมือนกับในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ได้เป็น ซิส-1,2-อะซีแนพทีนไดออล ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไฮดรอกซีอะซีแนพทีลิน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพทีน และถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นอะซีแนพโร-1,2-ควิโนน และกรดแนพทีลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ (2545) ศึกษาการสะสมสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนในสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 พบการสะสมของ 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) อะซีแนฟโทควิโนน และกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ในสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์พบสารมัธยันตร์ดังกล่าวสามารถทำนายวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ว่าน่าจะมีวิถีการย่อยสลายที่คล้ายกับ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ที่มีพลาสมิด pRE695 ที่ได้รับยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสจากพลาสมิด NAH7 จนได้กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากนั้นกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจะถูกย่อยสลายต่อไปจนได้กรดเจนทิลิก

จากการศึกษาเพิ่มเติมพบสารมัธยันตร์จากการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือกรด 1-แนฟโทอิกและกรดซาลิไซลิก จึงคาดว่ากรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ที่หมู่คาร์บอกซิลจนได้เป็นกรด 1-แนฟโทอิก และมีการย่อยสลายต่อไปจนได้กรดซาลิไซลิก (Poonthrigpun และคณะ, 2006)

โดยสรุปวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนในสภาวะที่มีอากาศโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เริ่มต้นโดยระบบเอนไซม์ไดออกซีจีเนสเข้าไปเติมออกซิเจนสองอะตอมให้กับวงไฮโดรเพนทีนได้สารมัธยันตร์เป็นซิส-อะซีแนฟทีน-1,2-ไดออล (*cis-acenaphthene-1,2-diol*) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนฟทีลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนฟทีน และสารมัธยันตร์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนฟโท-1,2-ควิโนน และกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ และมีการสะสมสารมัธยันตร์กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และมีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถย่อยสลายกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกต่อไปจนได้กรดซาลิไซลิก โดยสามารถสรุปวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีลีนของ 1) *Beijerinckia* sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) 3) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) และ 4) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณทริกพันธ์, 2545; Poonthrigpun และคณะ, 2006)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการย่อยสลายอะซีแนพทีนร่วมกับอะซีแนพทีนใน *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) และ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 (Grifoll และคณะ, 1995) โดยในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีนจะมีสารมัธยันตร์ชนิดเดียวกันคือกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

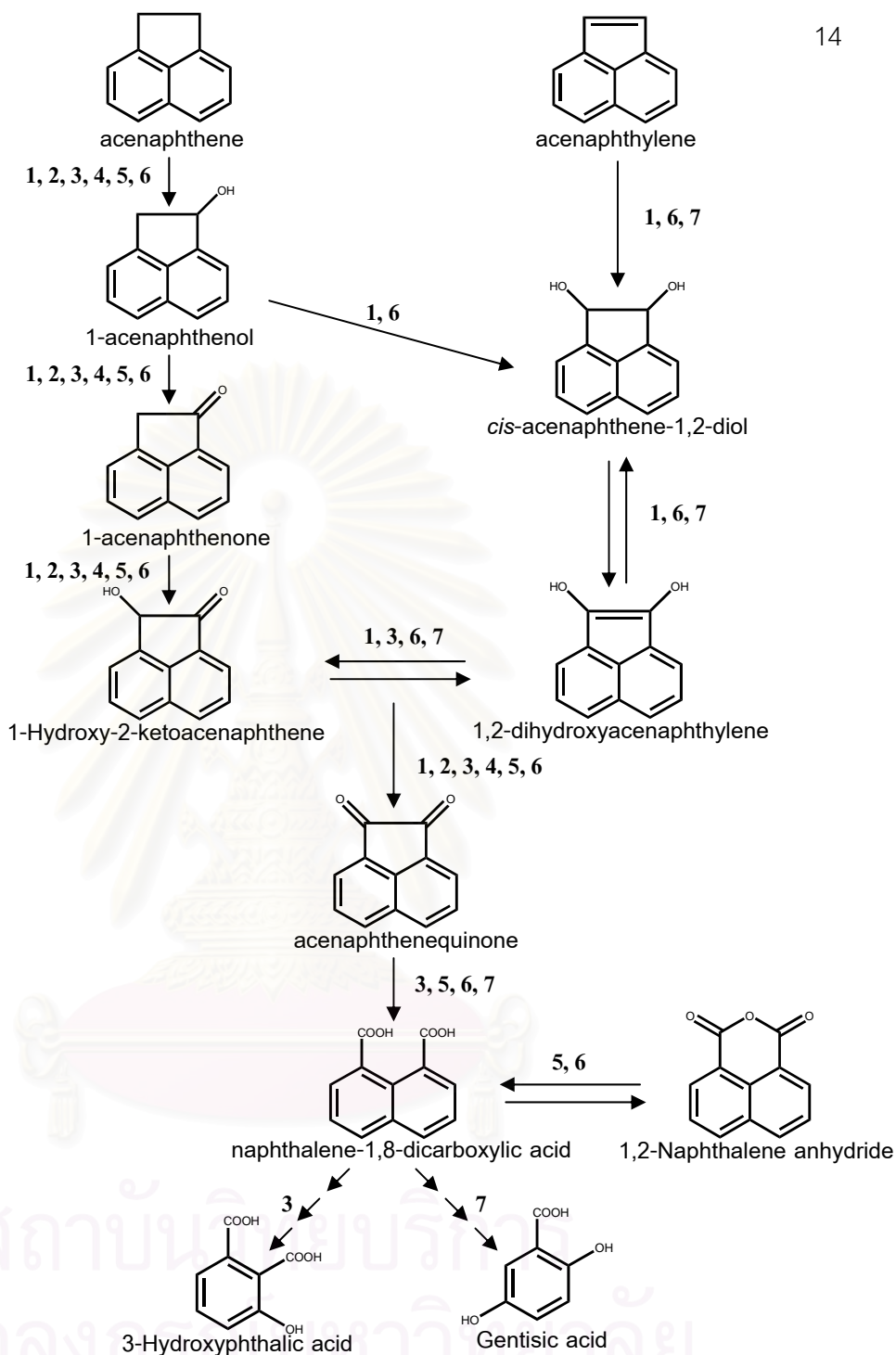
Selifonov และคณะ (1993) รายงานว่า *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* ซึ่งสามารถใช้อะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนได้ด้วย จากการศึกษาสารมัธยันตร์ของการย่อยสลายอะซีแนพทีนได้เสนอว่าอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นอะซีแนพโท-1,2-ควิโนนเหมือนกันโดยใช้วิถีการย่อยสลายที่ต่างกัน และจากนั้นจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 3-ไฮดรอกซีพธาลิก ตามลำดับ

Grifoll และคณะ (1995) รายงานว่า *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 ซึ่งสามารถย่อยสลายฟลูออรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีนแบบโคออกซิเดชันกับฟลูออรีนได้เป็น 1-อะซีแนพทีนอล (1-acenaphthenol) 1-อะซีแนพทีโนน (1-acenaphthenone) อะซีแนพโท-1,2-ควิโนน (acenaphtho-1,2-quinone) 1,2-แนพธาลิกแอนไฮไดรด์ (1,2-naphthalic anhydride) และกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ

โดยสามารถสรุปวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีนโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ดังแสดงในรูปที่ 2.5

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

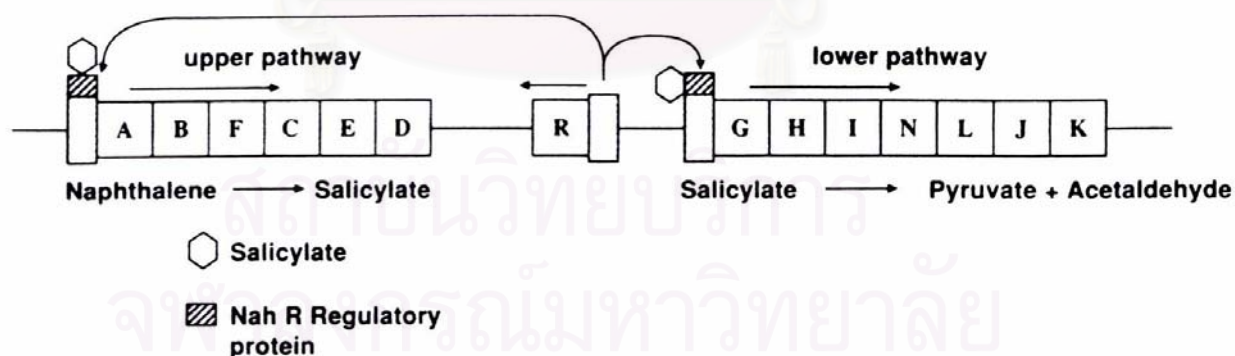




รูปที่ 2.5 วิธีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนและอะซีแนฟทีนโดยแบคทีเรีย 1) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ B1 (Schocken และ Gibson, 1984) 2) *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816 (Schocken และ Gibson, 1984) 3) *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) 4) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Komatsu และคณะ, 1993) 5) *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 6) *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) (Selifonov และคณะ, 1996) 7) *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ศิริวัตร ปุณทริกพันธ์, 2545)

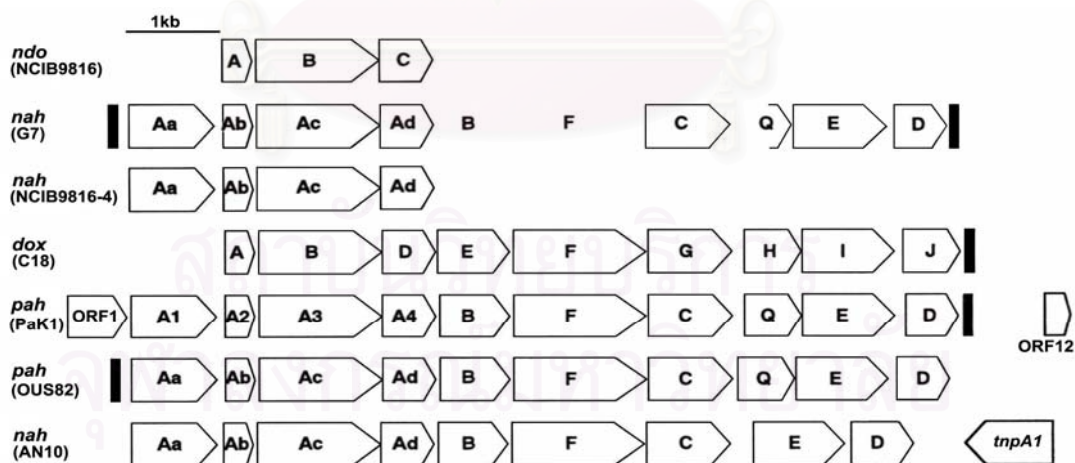
## 2.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs

ปัจจุบันมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในจุลินทรีย์ชนิดต่างๆอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่พบมากกว่ามีความสามารถสูงในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้หลายชนิด และมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียชนิดนี้ค่อนข้างสมบูรณ์ จากรายงานของ Yen และ Gunsalus (1982) พบว่า *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีพลาสมิด NAH7 ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาไลน์ โดยพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ โอเปอรอน *nah* ประกอบด้วย *nahABFCED* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเนฟธาไลน์ในวิถีการย่อยสลายส่วนบน (upper pathway) โดยเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาไลน์ไปเป็นซาลิไซเลต และ โอเปอรอน *sal* ประกอบด้วย *nahGDINLJK* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยซาลิไซเลตผ่านทางคะทิกคอลจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไพรูเวทและอะซีตัลดีไฮด์ (lower pathway) นอกจากนี้ยังพบยีนที่ควบคุมการทำงานของทั้ง 2 โอเปอรอน (regulatory gene) คือ *nahR* อยู่ระหว่างโอเปอรอน *nah* และ *sal* ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของทั้ง 2 โอเปอรอน ซึ่งต้องการตัวเหนี่ยวนำ ได้แก่ ซาลิไซเลต และโปรตีน NahR ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากยีนควบคุม *nahR* (Yen และ Gunsalus, 1982; Schell, 1983) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาไลน์และระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)

พบว่า *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นๆที่มีความสามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเช่น แนพธาดีนและพีแนนทีน มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ที่มีการเรียงตัวคล้ายกันกับ *nah* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มากกว่า 90% (Simon และคณะ, 1993) จึงเรียกยีนกลุ่มนี้ว่ากลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) ได้แก่ *ndo* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816 (Kurkela และคณะ, 1988) *nah* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB 9816-4 (Simon และคณะ, 1993) *dox* ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C18 (Denome และคณะ, 1993) *pah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) และ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1 (Takizawa และคณะ, 1994) และ *nah* ของ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) เป็นต้น โดย *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในวิถีการย่อยสลายส่วนบนจนถึงกรดซาลิไซลิกจะประกอบด้วยยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซิน (*nahAa*) เพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nahAb*) เทอร์มินอลออกซิจีเนส  $\alpha$  และ  $\beta$ -subunit (*nahAc* และ *nahAd* ตามลำดับ) ซิส-ไดไฮโดรไดออกดีไฮโดรจีเนส (*nahB*) ซาลิไซลิตไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nahF*) 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาดีนไดออกซิจีเนส (*nahC*) ทรานส์-โอ-ไฮดรอกซีเบนซิลดีนไพรูเวท ไฮดราเทส-อัลโดเลส (*nahE*) และ 2-ไฮดรอกซีโครมีน-2-คาร์บอกซิลเอสไฮโซเมอเรส (*nahD*) ตามลำดับ โดยมีการจัดเรียงตัวของยีนดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การเรียงตัวของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในส่วนวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาดีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆได้แก่ *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)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาอื่นในแบคทีเรียชนิดอื่นๆนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs และพบว่าการจัดเรียงตัวของยีนมีความแตกต่างไปจากกลุ่มคล้าย *nah* ดังมีรายงานต่อไปนี้

Goyal และ Zylstra (1996) รายงานเกี่ยวกับ *nah* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนใน *Comamonas teststeroni* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าในสายพันธุ์ GZ42 มีความแตกต่างจาก *nah* ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 โดยไม่เกิดสัญญาณไฮบริดส์กับดีเอ็นเอติดตาม *nah* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nah* บนพลาสมิด NAH7 และพบยีนประมวลรหัสรหัสเฟอริโดอกซินรีดักเทส (*nahAa*) เฟอริโดอกซิน (*nahAb*) ISP large subunit และ small subunit (*nahAcAd*) ซิส-ไดไฮโดรไดออกซีไดไฮโดรจีเนส (*nahB*) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nahF*) แต่ระหว่าง *nahAa* และ *nagAb* มี *nahAc2* และ *nahAd2* ที่ประมวลรหัส ISP large subunit และ small subunit แทรกอยู่ นอกจากนี้ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนในสายพันธุ์ GZ39 ซึ่งต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* และยีนที่พบในสายพันธุ์ GZ42 และพบว่า *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ที่มีพลาสมิด pGJZ1712 ซึ่งประกอบด้วยยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนส และซิส-ไดไฮโดรไดออกซีไดไฮโดรจีเนสของสายพันธุ์ GZ39 สามารถย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบไดไฮดรอกซีได้

Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 พบ *phnR* และ *phnS* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม และพบยีนประมวลรหัสอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*phnF*) ไฮดรอะเทส-อัลโดเลส (*phnE*) ไดออกซีจีเนส (*phnC*) ไอโซเมอเรส (*phnD*) ISP large subunit และ small subunit (*phnAcAd*) และไดไฮโดรไดออกซีไดไฮโดรจีเนส (*phnB*) ซึ่งมีการเรียงตัวเป็น *phnFECDAcAdB* ต่างจาก *nahAaAbAcAdBFCQED* ของสายพันธุ์ G7 และไม่พบยีนประมวลรหัสเฟอริโดอกซินรีดักเทสและเฟอริโดอกซิน แต่เมื่อโคลน *phnFECDAcAdB* รวมทั้ง *phnR* และ *phnS* เข้าใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  พบว่าสามารถย่อยสลายแนพทาลีนจนได้กรดซาลิไซลิกได้ และพบว่า *phn* นี้มีการถอดรหัสร่วมกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในแนพทาลีนและพีแนทรีน

Romine และคณะ (1999) รายงานว่า *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingobium aromaticivorans* สายพันธุ์ F199; Takeuchi และคณะ 2001) มีพลาสมิด pNL1 ขนาด 184 กิโลเบสที่มียีนที่มีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด ได้แก่ไบฟีนิล แนพทาลีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล กระจายอยู่บนพลาสมิด จากการระบุตำแหน่งของยีนต่างๆพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีน ได้แก่ *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างกันและถูกคั่นด้วยยีนในวิถีการย่อยสลายสารอื่น และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 กับลำดับกรดอะมิโนที่ประมวลรหัสจากยีนในกลุ่มคล้าย *nah* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนค่อนข้างต่ำ แต่เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายแนพทาลีนไปเป็นซาลิไซเลตได้ แสดงว่ายีนประมวลรหัสวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนส่วนหนึ่งที่ขาดหายไป น่าจะมีการทดแทนโดยยีนประมวลรหัสเอนไซม์สำหรับวิถีการย่อยสลายสารอื่น เช่นวิถีการย่อยสลายไบฟีนิลที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กับสับสเตรทอื่นๆที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ส่วนในวิถีล่างไม่พบ *nahG* ซึ่งจำเป็นต่อการย่อยสลายแนพทาลีนผ่านทางคะทีคอล แสดงว่าการย่อยสลายแนพทาลีนในวิถีล่างของเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่ผ่านทางคะทีคอล หรืออาจมีเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคะทีคอล

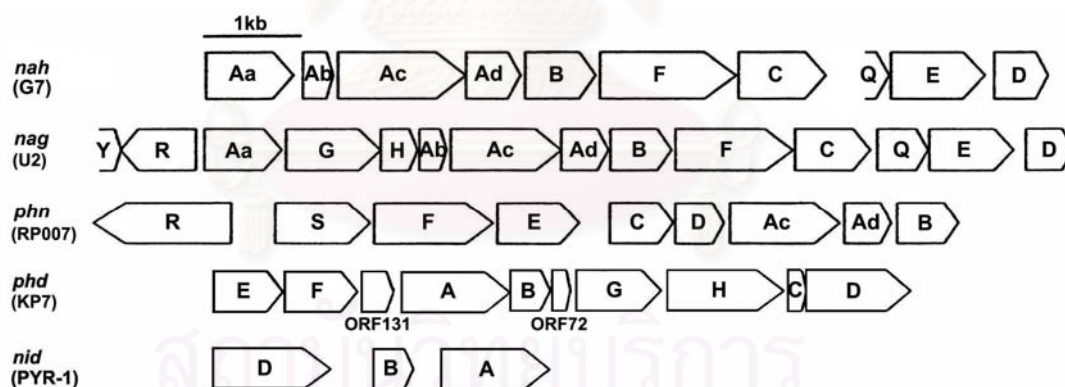
Saito และคณะ (2000) รายงานว่า *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 มี *phd* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนทรีนผ่านทางพธาลเอท โดย *phd* ประกอบด้วยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *phdEFABGHCD* ประมวลรหัสเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพีแนทรีนไปเป็น 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานอเอท (1-hydroxy-2-naphthoate) และ *phdIJK* ประมวลรหัสยีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย 1-ไฮดรอกซี-2-แนพธานอเอท ไปเป็นพธาลเอท (phthalate)

Zhou และคณะ (2001) รายงานว่า *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 ซึ่งสามารถย่อยสลายแนพทาลีนได้ มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนผ่านไปทางเจนทีเสต โดยพบยีนประมวลรหัสเฟอร์ริดอกซินรีดักเทส (*nagAa*) เฟอร์ริดอกซิน (*nagAb*) ISP large subunit และ small subunit (*nagAcAc*) ซีส-ไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*nagB*) และ อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*nagF*) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวเหมือนกับ *nah* ในพลาสมิด NAH7 แต่ระหว่าง *nagAa* และ *nagAb* มี *nagGH* ซึ่งประมวลรหัสหน่วยย่อยของซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซีเลสคั่น โดยมีการเรียงตัวของยีนดังนี้ *nagAaGHAbAcAdBFCQED* และพบ *nagJKLMN* ซึ่งประมวลรหัสยีนที่ย่อยสลายเจนทีเสตที่



ตำแหน่ง downstream ของ *nagD* โดยเมื่อศึกษาโปรตีนที่ประมวลผลโดย *nagl nagL* และ *nagK* พบว่า *nagl* ประมวลผลเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเจนิสเตเป็นมาเลิลไพรูเวท *nagL* ประมวลผลเป็นมาเลิลไพรูเวทไอโซเมอเรสทำหน้าที่เปลี่ยนมาเลิลไพรูเวทเป็นฟูมาริลไพรูเวท และ *nagK* ประมวลผลเป็นไฮโดรเลสทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ฟูมาริลไพรูเวทเป็นฟูมาเรทและไพรูเวท และคาดว่า *nag* น่าจะมีการถอดรหัสร่วมกันเป็นโอเปอรอนเดียวกัน

Khan และคณะ (2001) รายงานว่า *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 มีความสามารถในการย่อยสลายไพรีน ฟลูออแรนทรีน พีแนนทรีน แอนทราซีน เบนโซ (เอ) ไพรีน มี *nid* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และการจัดเรียงตัวของยีนที่แตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ในกลุ่มคล้าย *nah* โดยมีการเรียงตัวเป็น *nidDBA* ซึ่งยีนที่ประมวลผลไดออกซิจีนเนสของสายพันธุ์นี้มีเพียง *nidBA* ที่ประมวลผลไดออกซิจีนเนสในส่วน ISP small subunit ( $\beta_2$ ) และ ISP large subunit ( $\alpha_2$ ) ตามลำดับ แต่ขาดยีนส่วนที่ประมวลผลเพอร์ริดอกซินและเพอร์ริดอกซินรีดักเทส นอกจากนี้ยังพบว่า *nidBA* มีความแตกต่างจาก *nah*-like มากกว่า 60%



รูปที่ 2.8 กลุ่มยีนอื่นที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2, *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007, *phd* ของ *Nocardioideis* sp. สายพันธุ์ KP7 และ *nid* ของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ PYR-1 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ *nah* ของ *P. putida* สายพันธุ์ G7 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)

นอกจากนี้ Larkin และคณะ (1999) และ Kulakov และคณะ (2005) ยังได้รายงานถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลีนของแบคทีเรียแกรมบวกด้วย โดยพบว่า *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลีนทางด้านเมตา (meta) กระจายอยู่บนพลาสมิด p2SL1 โดยพบ *narAa narAb* และ *narB* ประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit และ  $\beta$ -subunit ของเนฟทาลีนไดออกซิจีเนส และ ซิส-เนฟทาลีนไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ พบว่ายีนทั้งสามมีการถอดรหัสร่วมกันเพื่อตอบสนองต่อเนฟทาลีนเท่านั้น โดยเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *narAa* และ *narAb* กับฐานข้อมูล EMBL และ GenBank พบว่า *narAa* และ *narAb* มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัส  $\alpha$  และ  $\beta$ -subunit ของ aromatic-ring-hydroxylating-dioxygenases ของ *Pseudomonas* sp. เพียง 31% และ 39% ตามลำดับ และไม่พบยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินรีดักเทส และเพอร์ริดอกซิน นอกจากนี้ยังพบ *narR1* และ *narR2* ประมวลรหัสโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของยีนกลุ่มนี้ด้วย

ปัจจุบันข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนยังไม่มีรายงานมากนัก มีเพียงรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) ได้ทำห้องสมุดยีน (genomic library) ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้เฉพาะในอะซีแนฟทาลีนและอะซีแนฟทาลีน พบยีนประมวลรหัส large subunit ( $\alpha$ ) และ small subunit ( $\beta$ ) ของไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบที่มีวงอะโรมาติกใน ให้ชื่อว่า *arhA1* และ *arhA2* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 56% และ 45% กับ *phnAc* และ *phnAd* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทรีนของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 และได้ศึกษาการทำงานของโปรตีนที่ประมวลรหัสโดย *arhA1A2* โดยทรานสพอร์มพลาสมิดที่มี *arhA1A2* (pUArhA1A2) และพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซินและเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (pSA3A4) เข้าใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาโมโนออกซิจีเนชันเปลี่ยนอะซีแนฟทาลีนไปเป็นอะซีแนฟทาลีนอล และเร่งปฏิกิริยาไดออกซิจีเนชันเปลี่ยนอะซีแนฟทาลีนเป็นอะซีแนฟทาลีน ซิส-1,2-ไดไฮโดรไดออกซี และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาไดออกซิจีเนชันให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นซิส-ไดไฮโดรไดออกซีของสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆด้วย ได้แก่ เนฟทาลีน พีแนนทรีน แอนทราซีน และฟลูออแรนทีน

## 2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก โดยเทคนิคทางอาร์เอ็นเอ

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs สามารถทำได้หลายวิธี ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางอาร์เอ็นเอมาติดตามการถอดรหัสของยีนโดยติดตามอาร์เอ็นเอนำรหัส (messenger RNA, mRNA) ที่จำเพาะกับยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs โดยอาจใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อวัตถุประสงค์หลายด้าน เช่น ติดตามกิจกรรมและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs หากจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีน คือ การศึกษาการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนโดยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ การศึกษาการจัดเรียงตัวของยีนว่ามีการเรียงตัวเป็นโอเปอรอนหรือมีการเรียงตัวแบบกระจาย เป็นต้น

### 2.3.1 นอร์ทเทอร์นไฮบริไดเซชัน (Northern hybridization)

เทคนิคนอร์ทเทอร์นไฮบริไดเซชัน คือวิธีการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยแยกขนาดของอาร์เอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยมีอะกาโรสเจลเป็นตัวกลาง ภายใต้สภาวะที่ทำให้โครงสร้างของอาร์เอ็นเอเป็นสายตรง แล้วย้ายอาร์เอ็นเอไปตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน ติดตามอาร์เอ็นเอของยีนที่ต้องการโดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือเอนไซม์ ที่จำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษานั้น โดยวิธีนี้จะสามารถทราบขนาดของอาร์เอ็นเอนำรหัสที่ถอดรหัสออกมาได้ และสามารถเปรียบเทียบปริมาณการถอดรหัสได้ แต่วิธีนี้จะต้องใช้อาร์เอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณมาก และสภาวะระหว่างการทดลองอาจมีการปนเปื้อนของนิวคลีเอส (nuclease) ได้ง่าย (Williams และ Mason, 1985 และ Rapley, 2000)

Kulakova และคณะ (2001) ใช้เทคนิคนอร์ทเทอร์นไฮบริไดเซชันเพื่อศึกษาการถอดรหัสของ *phnA* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ฟอสโฟโนอะซิเตทไฮโดรเลส (phosphonoacetate hydrolase) ใน *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 23F เมื่อใช้ฟอสโฟโนอะซิเตทเป็นสารชักนำ พบว่าฟอสโฟโนอะซิเตทสามารถชักนำให้ *phnA* มีการถอดรหัสได้และยังพบว่า *phnA* และ *phnB* มีการถอดรหัสออกมาพร้อมกัน

lida และคณะ (2002) ศึกษาการแสดงออกของยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสสำหรับการย่อยสลายไคเบนโซฟูแรน และไบฟีนิลใน *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ YK3 โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงใน LB กลูโคสและไคเบนโซฟูแรนที่เวลา 2 และ 6 ชั่วโมง แล้วทำอาร์เทอร์ไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับ *dfdA* ซึ่งประมวลรหัส large subunit ของไดออกซีจีเนส พบว่าไคเบนโซฟูแรนสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้โดยให้สัญญาณไฮบริดซ์เข้มที่สุดที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง และไม่พบสัญญาณไฮบริดซ์จากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย LB และกลูโคส และสามารถทำนายขนาดของอาร์เอ็นเอเข้ารหัสได้ว่ามีขนาดอยู่ระหว่าง 2.0-2.5 กิโลเบส

Kahng และคณะ (2002) ติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาลินและพีแนนทรีนใน *Pseudomonas rhodesiae* สายพันธุ์ KK1 ที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานผลิตก๊าซธรรมชาติซึ่งมีการปนเปื้อนของสารประกอบ PAHs หลายชนิด โดยสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนสำหรับการย่อยสลายเนฟทาลินและพีแนนทรีนจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสที่พบในสายพันธุ์ KK1 สองกลุ่มคือ กลุ่มพีแนนทรีนไดออกซีจีเนส และกลุ่มเนฟทาลินไดออกซีจีเนส พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ KK1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีแนนทรีนและเนฟทาลินให้สัญญาณไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอติดตามทั้งสองชนิด ซึ่งผู้วิจัยได้สรุปว่าเอนไซม์สำหรับย่อยสลายเนฟทาลินและพีแนนทรีนน่าจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันมาก และไม่พบสัญญาณไฮบริดซ์เมื่อเลี้ยงเชื้อในกลูโคสจึงกล่าวว่าเนฟทาลินและพีแนนทรีนเป็นสารชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

Urata และคณะ (2004) ศึกษาการชักนำการถอดรหัสของ *antABC* ซึ่งประมวลรหัสแอนทรานิลิก 1,2-ไดออกซีจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคาบาโซล (carbazole) ใน *Pseudomonas resinovorans* สายพันธุ์ CA10 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแอนทรานิลิก (anthranilate) พบว่าแอนทรานิลิกสามารถชักนำให้มีการถอดรหัสของ *antABC*

### 2.3.2 ดอต และสล็อตบลอตไฮบริไดเซชัน (Dot and slot blot hybridization)

เทคนิคดอตและสล็อตบลอตไฮบริไดเซชันมีหลักการเช่นเดียวกับนอร์thernไฮบริไดเซชัน โดยหยดอาร์เอ็นเอตัวอย่างไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรนแล้วตรึงอาร์เอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และตรวจหาอาร์เอ็นเอของยีนที่ต้องการโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับอาร์เอ็นเอของยีนที่ต้องการศึกษา โดยดีเอ็นเอติดตามจะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือเอนไซม์ วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็วจึงนิยมใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนเบื้องต้น แต่ไม่สามารถบอกปริมาณหรือขนาดของอาร์เอ็นเอที่ถอดรหัสออกมาได้ (Williams และ Mason, 1985)

Barnes และคณะ (1997) ศึกษาการชักนำการแสดงออกของ *hpp* ที่เกี่ยวกับการย่อยสลาย 3-hydroxyphenyl propionic acid ใน *Rhodococcus globerulus* สายพันธุ์ PWD1 โดยสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ในช่วง mid-exponential phase ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3HPP 3HPA เมธา-ครีซอล (*m-cresol*) และซัคซิเนต เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วติดตามอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RNA dot blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนนั้นเป็นดีเอ็นเอติดตามพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มี 3HPP และ 3HPA เท่านั้นที่มีอาร์เอ็นเอที่สามารถเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามได้ ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงในเมธา-ครีซอล และซัคซิเนต นั้นไม่เกิดสัญญาณ จึงกล่าวได้ว่า *hpp* ถูกชักนำให้แสดงออกได้โดยซับสเตรทที่จำเพาะคือ 3HPP และ 3HPA

Yamada และคณะ (1998) ศึกษาการถอดรหัสของ *bphD*, *etbD1* และ *etbD2* ซึ่งควบคุมการสร้างไฮโดรเลส (hydrolase) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพอลิคลอริเนตไบฟีนิล (polychlorinated biphenyl) ใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ RHA1 โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ได้แก่ ไบฟีนิล เอธิลเบนซีน เบนซีน ซัคซิเนต และเบนโซเอต แล้วติดตามอาร์เอ็นเอโดยเทคนิคสล็อตบลอตไฮบริไดเซชัน โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนแต่ละชนิดนั้น พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในไบฟีนิล เอธิลเบนซีน และเบนซีน เท่านั้นที่สามารถเกิดสัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามได้ แสดงว่าการถอดรหัสของยีนนี้ถูกชักนำได้โดยไบฟีนิล เอธิลเบนซีน และเบนซีน



Hübner และคณะ (1998) ศึกษาการชักนำการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค สลอบบลอตไฮบริไดเซชัน โดยสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid ตีรังอาร์เอ็นเอไว้บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วใช้ *tfc* เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าในสถานะที่มีการเติมสารชักนำจะมีการแสดงออกของ *tfc* มากกว่าที่สถานะที่ไม่มีสารชักนำถึง 8 เท่า

Kitagawa และคณะ (2001) ตรวจสอบการถอดรหัสของกลุ่มยีนชนิดใหม่ที่คาดว่าควบคุม การสังเคราะห์ไดออกซิจีเนสที่ย่อยวงอะโรมาติกใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ RHA1 ซึ่งเป็น สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายพอลิคลอริเนตไบฟีนิล ด้วยเทคนิคสลอบบลอตไฮบริไดเซชัน โดยใช้ สารชักนำชนิดต่างๆ ได้แก่ ซัคซิเนต ไบฟีนิล เบนโซเอต และเอธิลเบนซีน จากผลการทดลองการชัก นำการถอดรหัสของยีน ร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนพบว่า ยีน (A) ที่ถูกชัก นำให้แสดงออกด้วยไบฟีนิล และเบนโซเอตได้จึงน่าจะเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เบน โซเอตไดออกซิจีเนส (benzoate dioxygenase) และยีน (C) ที่ถูกชักนำให้แสดงออกด้วยไบฟีนิล และเอธิลเบนซีน น่าจะเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ไบฟีนิลไดออกซิจีเนส (biphenyl dioxygenase)

### 2.3.3 Nuclease protection assay

Nuclease protection assay อาศัยหลักการที่ว่าเมื่อสายดีเอ็นเอติดตามสายเดี่ยวจับกับ อาร์เอ็นเอจำเพาะแล้ว บริเวณที่จับกันเป็นสายคู่จะถูกปกป้องไม่ให้นิวคลีเอสย่อย ดังนั้นส่วนของ ดีเอ็นเอติดตามที่ยาวเกินอาร์เอ็นเอเป็นสายเดี่ยว จึงถูกย่อยออกจนถึงตำแหน่งเริ่มต้นของการ ถอดรหัสที่แท้จริงทางปลาย 5' ของอาร์เอ็นเอ และปลาย 3' ของดีเอ็นเอซึ่งเมื่อนำขึ้นดีเอ็นเอ ติดตามดังกล่าวมาหาลำดับเบสที่ปลาย 3' ก็จะทราบตำแหน่งเริ่มต้นของการถอดรหัสของยีนที่ สนใจ โดยสามารถทราบขนาดของดีเอ็นเอที่ไม่ถูกย่อยสลายได้โดยวิธีอะกาโรสเจลหรืออะครีลา ไมด์เจลอีเล็กโทรโฟเรซิส โดยทั่วไปนิวคลีเอสที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ 1) S1 Nuclease ซึ่งแยกได้จาก *Aspergillus oryzae* มีความจำเพาะสูงกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ภายใต้สภาวะที่มี อุณหภูมิต่ำและมีความแรงของไอออนสูง 2) Mung bean nuclease ซึ่งคล้าย S1 Nuclease และ 3) Exonuclease VII ซึ่งแยกจาก *Escherichia coli* นั้นจำเป็นต้องมีปลาย 5' และ 3' ที่เป็น อิสระเพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ชนิดนี้เริ่มทำงาน วิธีนี้สามารถให้รายละเอียดโครงสร้างของอาร์เอ็นเอ นำรหัส (messenger RNA, mRNA) ได้ เช่น จุดเริ่มต้นการถอดรหัสของยีน (transcriptional start

site) เป็นต้น และสามารถวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณได้ โดยใช้อาร์เอ็นเอ ปริมาณน้อยกว่าวิธีนอร์thern ไฮบริดเซชัน (Williams และ Mason, 1985; Adams และคณะ, 1992; Rapley, 2000; จริญญา ณรงค์ชวณะ, 2536)

Schell (1986) หาตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสของโอเปอรอน *nah* และ *sal* ของพลาสมิด NAH7 ใน *Pseudomonas putida* ด้วยวิธี S1 nuclease mapping โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซาลิไซเลต ซึ่งเป็นสารชักนำการแสดงออกของทั้งสองโอเปอรอน แล้วนำมาไฮบริดกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเหนือโอเปอรอน *nah* และ *sal* แล้วทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อหาขนาดของอาร์เอ็นเอที่ถอดรหัสออกมา แล้วตัดชิ้นอะคริลาไมด์ที่มีแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ พบตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งโปรโมเตอร์ของโอเปอรอน *nah* และ *sal* โดยพบว่าบริเวณ 100 เบสก่อนถึงจุดเริ่มต้นการถอดรหัสของทั้งสองโอเปอรอนมีความคล้ายกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งระหว่าง -80 ถึง -60 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 81% ระหว่าง -40 ถึง -28 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 75% และระหว่าง -1 ถึง +15 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 70% และยังพบโปรโมเตอร์ของยีน *nahR* อยู่ซ้อนทับตำแหน่ง -35 ของโปรโมเตอร์ของโอเปอรอน *sal* แต่มีการถอดรหัสไปในทิศทางตรงกันข้าม

### 2.3.4 Ribonuclease protection assay (RPA)

มีหลักการคล้ายกับวิธี Nuclease protection assay แต่ใช้อาร์เอ็นเอติดตาม (RNA probe) แทนดีเอ็นเอติดตาม โดยอาร์เอ็นเอติดตามที่สังเคราะห์ขึ้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับอาร์เอ็นเอที่ศึกษา (anti-sense RNA probe) ซึ่งจะจับกับอาร์เอ็นเอที่จำเพาะในสถานะที่เหมาะสม ทำให้บริเวณที่จับจำเพาะเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ และถูกป้องกันไม่ให้ย่อยสลายโดยไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) หรืออาร์เอ็นเอส (RNase) ได้ ส่วนอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ไม่สามารถจับกับอาร์เอ็นเอติดตามจะถูกละลายไป อาร์เอ็นเอติดตามจะถูกตัดฉีกด้วยสารกัมมันตภาพรังสี จึงสามารถติดตามผลโดยทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วใช้ฟิล์มเอกซเรย์ติดตามแถบอาร์เอ็นเอได้ วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนได้โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบอาร์เอ็นเอบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ และเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ต่ออาร์เอ็นเอที่จำเพาะอย่างน้อย 0.1 พิโคกรัม ทั้งนี้ความไวของการวิเคราะห์ขึ้นกับกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของอาร์เอ็นเอติดตามด้วย (Fleming และคณะ, 1993 และ Rapley, 2000)

Fleming และคณะ (1993) พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ระดับการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธาลีนของจุลินทรีย์ในแหล่งดินบริเวณโรงงานผลิตก๊าซ และดินที่ปนเปื้อนด้วยคลีโอสไทต์โดยวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เนพธาลีนไดออกซิจีเนส (naphthalene dioxygenase gene, *nahA*) ด้วยเทคนิค Ribonuclease protection assay โดยสังเคราะห์อาร์เอ็นเอติดตามจาก *nahA* บนพลาสมิด NAH7 และติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี  $^{32}\text{P}$  เพื่อนำไปจับกับอาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์ที่สกัดได้จากดิน แล้วย่อยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ไม่เกิดไฮบริดเซชันด้วยอาร์เอ็นเอส ตรวจสอบอาร์เอ็นเอสายคู่ที่เกิดจากการจับกันของอาร์เอ็นเอ-อาร์เอ็นเอโดยอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดจากดินจากบริเวณโรงงานผลิตก๊าซ 2 แหล่ง และดินที่ปนเปื้อนด้วยคลีโอสไทต์ สามารถจับกับอาร์เอ็นเอติดตามและป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์อาร์เอ็นเอสได้ แสดงว่าในแหล่งดินดังกล่าวมีจุลินทรีย์ที่มี *nahA* และมีการถอดรหัสของยีน จึงน่าจะมียุทธกรรมในการย่อยสลายเนพธาลีนโดยจุลินทรีย์ในดินบริเวณนั้น และเมื่อทดลองนำดินไปบ่มกับไซเดียมซาลิไซเลต แล้วสกัดอาร์เอ็นเอจากดินมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเดียวกันนี้ พบว่าระดับการถอดรหัสของ *nahA* เพิ่มขึ้นมากกว่าในดินที่ไม่เติมไซเดียมซาลิไซเลต แสดงว่าไซเดียมซาลิไซเลตสามารถชักนำให้มีการถอดรหัสของ *nahA* ได้

### 2.3.5 Primer extension

หลักการคือ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สายสั้นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นหรือเป็นส่วนที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ให้สามารถจับกับอาร์เอ็นเอจำเพาะที่ต้องการศึกษา โดยเลือกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่สามารถจับกับตำแหน่งถัดลงมา (downstream) จากโปรโมเตอร์ของยีนที่สนใจและติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่ปลาย 5' เมื่อใช้รีเวอร์สทรานสคริปเทสได้ในหลอดปฏิบัติการ เอนไซม์จะสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์นั้นโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบสร้างไปจนสุดปลาย 5' ของอาร์เอ็นเอ ดังนั้นเมื่อนำสายคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ (complementary DNA) สร้างใหม่นั้นไปวิเคราะห์ก็จะทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จุดเริ่มต้นการถอดรหัสของอาร์เอ็นเอนั้นได้ และสามารถหาตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีนได้ วิธีนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของอาร์เอ็นเอจำเพาะของยีนที่สนใจได้ โดยปริมาณของคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นสัดส่วนกับอาร์เอ็นเอที่เป็นต้นแบบ (Williams และ Mason, 1985; Adams และคณะ, 1992; Boorstein และ Craig, 1998; จรัญญา, 2536)

Fukumori และ Saint (1997) ศึกษาการควบคุมการถอดรหัสของ *tdnQ* บนพลาสมิด pTDN1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถีการเปลี่ยนอะนิลีนไปเป็นอะซิโตนใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ KT2442 เมื่อทำการวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนด้วยวิธี primer extension และทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสพบว่าแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอะนิลีนมีความเข้มมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอะนิลีน แสดงว่าอะนิลีนสามารถชักนำให้มีการถอดรหัสของ *tdnQ* มากขึ้น และพบว่า *tdnQ* มีการถอดรหัสมากที่สุดในช่วงเวลา 8 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะนิลีน

Hübner และคณะ (1998) ใช้เทคนิค Primer extension เพื่อหาจุดเริ่มต้นการถอดรหัสของ *tffCD* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid ใน *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ AC1100 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid พบจุดเริ่มต้นการถอดรหัสมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ CATT

Kulakov และคณะ (2005) ใช้เทคนิค primer extension หาตำแหน่งเริ่มต้นของการถอดรหัสของ *narA* ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแอนทราซีนใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 โดยออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สมกับสาย antisense ของ *narAa* และติดฉลากโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ด้วยสารเรืองแสงที่ปลายด้าน 5' แล้วทำการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอด้วยรีเวอร์สทรานสคริปเทส จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencer) พบตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสเป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดพิวรีน และพบตำแหน่งโปรโมเตอร์สำหรับ  $\sigma^{70}$  และตำแหน่งจับของไรโบโซม (ribosom binding site) บริเวณเหนือ *narAa*

### 2.3.6 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

หลักการคือการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับบริเวณยีนที่ศึกษา และให้อาร์เอ็นเอที่ถูกถอดรหัสออกมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เรียกว่าคอมพลีเมนต์ที่หนึ่ง โดยมียูเออาร์เอสทราสคริปเทสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ถ้ามีอาร์เอ็นเอถอดรหัสออกมาจากยีนที่ศึกษาจะสามารถสังเคราะห์คอมพลีเมนต์ที่หนึ่งได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนนั้น แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส วิธีนี้นิยมใช้ติดตามการแสดงออกของยีนกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีข้อดีคือรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ได้หลายยีนและหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และยังเป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถวิเคราะห์ยีนที่มีระดับการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอต่ำๆได้ แต่การออกแบบไพรเมอร์จะต้องมีความจำเพาะกับยีนที่ศึกษาอย่างมาก และสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณเท่านั้นเนื่องจากข้อจำกัดของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังสามารถพัฒนาเทคนิคให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณการถอดรหัสของยีนได้ เช่น cRT-PCR (competitive Reverse Transcription-PCR) และ Real Time-PCR (Rapley, 2000 และ Sharkey และคณะ, 2004)

Barnes และคณะ (1997) ศึกษาการแสดงออกของ *hpp* ที่เกี่ยวกับการย่อยสลาย 3-hydroxyphenyl propionic acid ใน *Rhodococcus globerulus* สายพันธุ์ PWD1 โดยใช้เทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่แบบถอดรหัสย้อนกลับ โดยสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์ในช่วง mid-exponential phase ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3HPP 3HPA เมธา-ครีซอล (*m*-cresol) และซัคซิเนตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *hpp* แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอของ *hppCBKR* ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนจากโครโมโซม และยังพบว่า *hppA* ถูกถอดรหัสแยกออกจาก *hppC*, *hppB*, *hppK* และ *hppR* ซึ่งถูกถอดรหัสออกมาเป็นอาร์เอ็นเอสายเดียวกัน



Laurie และ Lloyd-Jones (1999) ศึกษาการถอดรหัสของยีน *phn* ที่ควบคุมการสังเคราะห์แนพทาลีนไดออกซิจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนและพีแนทรีนใน *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ RP007 โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแนพทาลีน พีแนทรีน และอะซีเตต เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ให้ครอบคลุมส่วนของ *phnC/ phnD/ phnAc* ซึ่งดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาด 1,524 เบส และอีกคู่หนึ่งครอบคลุมส่วนภายในของยีนที่มีขนาด 673 เบสเพื่อเป็น internal primers พบว่าอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแนพทาลีน และพีแนทรีน มีอาร์เอ็นเอที่สามารถเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ ส่วนอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอะซีเตต ไม่มีอาร์เอ็นเอที่สามารถเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ จากการทดลองนี้พบว่า *phnCDAc* สามารถถูกชักนำให้มีการถอดรหัสได้ด้วยแนพทาลีนและพีแนทรีน

Laurie และ Lloyd-Jones ยังได้วิเคราะห์การถอดรหัสของ *phn* อื่นๆด้วย โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับให้ครอบคลุมส่วนของ *phnSF* และ *phnFEC* พบว่า *phnSFECDAc* ถูกถอดรหัสออกมาเป็นอาร์เอ็นเอสายเดียวกันโดยมีความยาว 7.2 กิโลเบส ไม่รวม *phnAd* และ *phnB* แต่เนื่องจาก *phnAc* และ *phnAd* เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์หน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์เดียวกัน จึงน่าจะถูถอดรหัสออกมาพร้อมกัน และเนื่องจาก *phnAd* และ *phnB* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คั่นระหว่างทั้ง 2 ยีนอยู่ 82 เบส และไม่มีตำแหน่งของโปรโมเตอร์ จึงคาดว่า *phnAd* และ *phnB* น่าจะถอดรหัสออกมาพร้อมกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *phnSFECDAcAdB* มีการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอสายเดียวกัน และมีการเรียงตัวในลักษณะเป็นโอเปอรอน จากการทดลองนี้คณะวิจัยพบยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในวิถีการย่อยสลายส่วนบนอย่างสมบูรณ์

Wilson และคณะ (1999) ติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนของจุลินทรีย์ในน้ำใต้ดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนของถ่านหิน โดยให้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ โดยสร้างโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของ *nahAc* ซึ่งพบในแบคทีเรียกลุ่มที่มีแนพทาลีนไดออกซิจีเนส ติดตามการแสดงออกของยีนได้โดยเก็บตัวอย่างน้ำใต้ดินมาสกัดอาร์เอ็นเอจากจุลินทรีย์ แล้วสร้างคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้น แล้วใช้คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เป็นต้นแบบใน

ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์สโดยทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์สที่มีขนาดตรงตามที่คาดหมาย แสดงว่าในบริเวณเก็บตัวอย่าง ณ เวลานั้นมีจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมในการย่อยสลายเนพธาไลน์อยู่

Grimm และ Harwood (1999) ใช้ปฏิกิริยาถูกใช้แบบถอดรหัสย้อนกลับศึกษาการแสดงออกของ *nahY* บนพลาสมิด NAH7 ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ตอบสนองต่อเนพธาไลน์ (chemotaxis transducer protein) โดย *nahY* ที่มีการเรียงตัวอยู่ต่อจาก *nahX* ซึ่งอยู่ต่อจาก *nahOMKJ* ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการแตกวงคะที่คอลทางด้านเมตา พบว่า *nahY* มีการถอดรหัสร่วมกับ *nahX* และ *nahX* มีการถอดรหัสร่วมกับ *nahJ* ดังนั้นจึงคาดว่า *nahX* และ *nahY* น่าจะประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธาไลน์ในวิถีการย่อยสลายส่วนล่างต่อจากซาลิไซเลตผ่านทางคะที่คอลแล้วมีการแตกวงต่อไปทางด้านเมตาด้วย

Marlowe และคณะ (2002) ติดตามการแสดงออกของ *nahAc* และ *rpoD* ใน *Pseudomonas putida* PpG7 โดยเทคนิค RT-PCR เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซาลิไซเลต พบว่ามีการแสดงออกของ *nahAc* ในทุกๆเวลาที่ยังมีซาลิไซเลตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหยุดแสดงออกเมื่อซาลิไซเลตถูกใช้หมดไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน *rpoD* ซึ่งเป็น house-keeping gene มีการแสดงออกตลอดเวลา และพบว่าพีแนนทรีนสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ *nahAc* ได้เช่นกัน และเมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวไฮดรอกซีโพรพิล-เบต้า-ไซโคลเดรกซ์ทริน (hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, HPCD) หรือแรมโนลิปิด (Rhamnolipid) ด้วย พบว่า *nahAc* มีการแสดงออกได้เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงในพีแนนทรีนอย่างเดียว

Lessne และคณะ (2003) ใช้ปฏิกิริยาถูกใช้แบบถอดรหัสย้อนกลับศึกษาการเรียงตัวของ *nbzAaAbAcAd* ซึ่งประมวลรหัสไนโตรเบนซีนไดออกซิจีเนสใน *Comamonas* sp. สายพันธุ์ JS765 และ *ntdAaAbAcAd* ซึ่งประมวลรหัส 2-ไนโตรโทลูอินไดออกซิจีเนสใน *Acidovorax* sp. สายพันธุ์ JS42 พบว่ายีนแต่ละชุดมีการถอดรหัสเป็นสายอาร์เอ็นเอเดียวกัน

Jones และคณะ (2003) ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับศึกษาการเรียงตัวของ *nag* ซึ่งเกี่ยวข้องกับยอยสลายแวนธาลีนใน *Ralstonia* sp. U2 และมีความคล้ายกับ *nah* พบว่า *nag* มีการเรียงตัวของยีนในวิถีการย่อยสลายบนที่ย่อยสลายแวนธาลีนเป็นซาลิไซเลต 5-ไฮดรอกซีเลต ซึ่งเปลี่ยนซาลิไซเลตเป็นเจนทิเสต ซึ่งต่างจาก *nah* และพบว่า *nag* ชุดนี้เรียงตัวเป็นโอเปอรอนสำหรับวิถีการย่อยสลายแวนธาลีนโดยผ่านทางเจนทิเสต

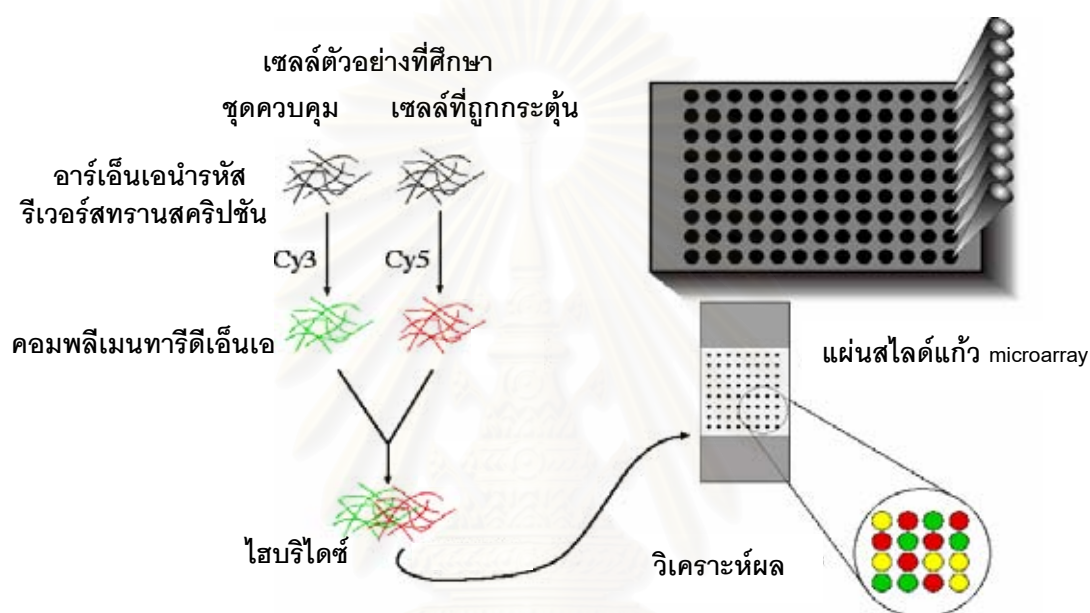
Urata และคณะ (2004) ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับยืนยันการชักนำการถอดรหัสของ *antABC* โดยแอนทรานิลิก ใน *Pseudomonas resinovorans* สายพันธุ์ CA10 โดยสังเคราะห์โพลิโนคลีโอไทด์ไพรเมอร์คู่ที่ครอบคลุม *antABC* พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดตรงตามที่คาดหมาย แสดงว่า *antABC* มีการถอดรหัสออกมาเป็นอาร์เอ็นเอสายเดียวกัน

Kulakov และคณะ (2005) ศึกษาการถอดรหัสร่วมกันของยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแวนธาลีนใน *Rhodococcus* sp. สายพันธุ์ NCIMB12038 สายพันธุ์ P200 และสายพันธุ์ P400 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ พบว่า *narAa narAb* และ *narB* ซึ่งประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit และ  $\beta$ -subunit ของแวนธาลีนไดออกซิจีเนส และซิส-แวนธาลีนไดไฮโดรไดออกซิไดไฮโดรจีเนสของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีการถอดรหัสร่วมกันเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแวนธาลีน

### 2.3.7 Microarrays หรือ DNA microchips

เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ปกติและเซลล์ที่ต้องการศึกษาการแสดงออกจะถูกสังเคราะห์เป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอโดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างชนิดกัน โดยสารเรืองแสงที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Cy3 และ Cy5 ซึ่งเรืองแสงสีเขียวและสีแดงตามลำดับ จากนั้นจะนำคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วไปไฮบริไดซ์กับคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอหรือโพลิโนคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ที่ถูกจัดอยู่บนแผ่นสไลด์แก้ว โดยตำแหน่งจุด 1 ตำแหน่งจะจำเพาะกับยีน 1 ยีน เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอที่ไม่ได้จับอยู่บนสไลด์จะถูกล้างออกไป จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปวิเคราะห์โดยฉายแสงเลเซอร์ แล้วตรวจวัดการเรืองแสงของยีนแต่ละจุด ถ้ายีนจากเซลล์ปกติและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการแสดงออกเท่ากันจะเรืองแสงสีเหลือง และยีนที่มีการแสดงออกต่างกันเซลล์ปกติ

และเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะเรืองแสงสีเขียวหรือสีแดงที่ความเข้มแสงต่าง ๆ กัน ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถวิเคราะห์การถอดรหัสของยีนในเชิงปริมาณได้หลายยีนในเวลาเดียวกัน โดยสามารถวิเคราะห์ยีนได้ถึง 8,000 ยีนต่อตารางเซ็นติเมตรของแผ่นสไลด์ และสามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพง (Rapley, 2000 และ Sharkey และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.9 ขั้นตอนวิธีการติดตามการแสดงออกของยีนโดย Microarrays (ดัดแปลงจาก [www.vetmed.iastate.edu](http://www.vetmed.iastate.edu))

Rhee และคณะ (2004) ติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธา ลินในเชื้อแบคทีเรียผสมด้วยเทคนิค microarray โดยใช้เครื่องกลจุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาว 50 เมอร์ (เบส) ที่จำเพาะกับยีนชนิดต่างๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มชั้น 250 ไมโครโมลาร์ลงบน แผ่นสไลด์แก้ว สกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียผสมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเนพธา ลิน และ ไพรูเวท เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาสังเคราะห์คอมพลิเมทาร์ดีเอ็นเอและติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Cy5 และ Cy3 แล้วนำไปโอบริไดซ์กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์บนแผ่นสไลด์แก้ว เมื่อวิเคราะห์การเรืองแสงที่จุดต่างๆ พบว่าเชื้อแบคทีเรียผสมที่เลี้ยงด้วยเนพธา ลินมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธา ลินแตกต่างจากเชื้อที่เลี้ยงด้วยไพรูเวท และพบว่ายีนที่ประมวลรหัสสำหรับ large และ small subunit ของเนพธา ลินไดออกซิจีเนส และ ซีเอส-เนพธา ลินไดไฮโดร ไดออกซิล ดีไฮโดรจีเนส มีการแสดงออกมากที่สุด



## 2.4 ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1

จากข้อมูลการศึกษาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยเทคนิคซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชัน โดยการติดตามยีนข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพทีลินแล้วทำการสร้างดีเอ็นเอติดตามจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 เพื่อติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์ปกติ ดวงกมล ฐปมมงคล (2546) ได้ติดตามยีนข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 แล้วสร้างดีเอ็นเอติดตามจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 เพื่อใช้ติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์ปกติ ได้พบยีนที่มีความเหมือนกับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนส และไดไฮโดรไดออกซิลไฮโดรจีเนสที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และมีการจัดเรียงตัวของยีนดังแสดงในรูปที่ 2.10

นอกจากนี้ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยรงค์ (2545) และฐิติวรรณ นินทนางศา (2546) พบยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินเมื่อติดตามยีนข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์กลาย E11 ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และมีการจัดเรียงตัวของยีนดังแสดงในรูปที่ 2.11 ซึ่ง *Rhizobium* sp. CU-A1 มียีนแตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อื่นตามที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว ทั้งลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงตัวของยีน

เนื่องจากไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สองแบบคือ เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันหรือเร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก โดยไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น NADH หรือ NADPH ในการเร่งปฏิกิริยาเติมออกซิเจนเข้ายังวงอะโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ซิส-ไดออกซิล ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก จะเร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติกของสารอนุพันธ์ไฮดรอกซิล เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เปรียบเทียบกับไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ เช่น แนพทาลีนไดออกซิจีเนส ไบฟีนิลไดออกซิจีเนส ไนโตรโทลูอินไดออกซิจีเนส และไตรคลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนส ได้พบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับ Rieske และบริเวณอนุรักษ์ของ catalytic domain ของ *acnAc* จึงคาดว่าไดออกซิจีเนสที่พบน่าจะจัดเป็น



ได้ออกซิเจนที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิลเลชันในการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกมากกว่าได้ออกซิเจนที่เร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติก (ดวงกมล ฐปมงคล, 2546)

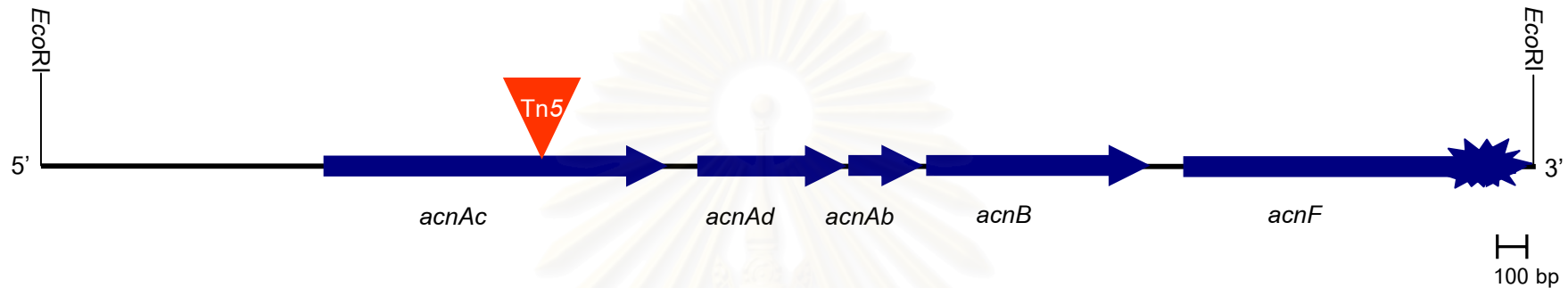
ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับ เพื่อแสดงให้เห็นยีนดังกล่าวมีการแสดงลักษณะตลอดเวลาหรือถูกเหนี่ยวนำได้ และมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธินจริง



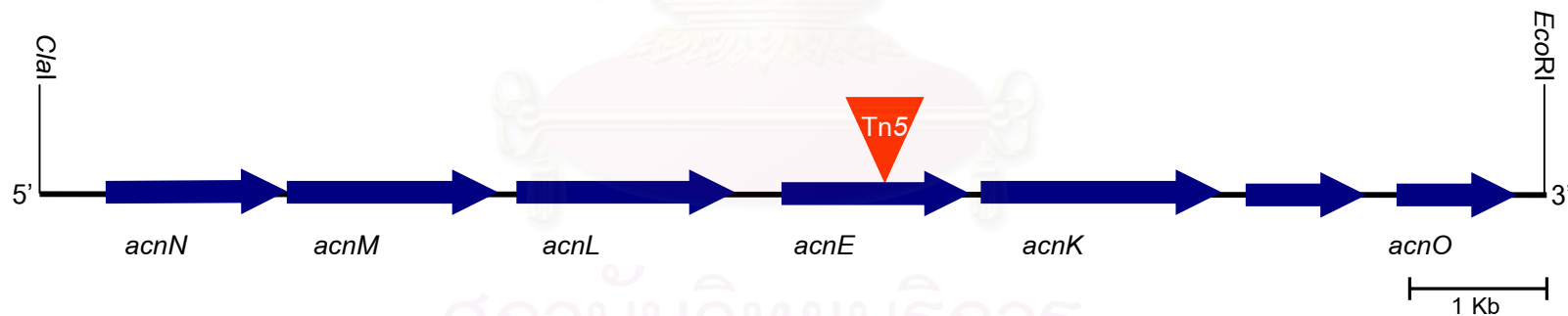
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทีลินใน *Rhizobium* sp. CU-A1 หน้าที่และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีนอ้างอิง

ORF	ยีนอ้างอิงที่มีความใกล้เคียงสูงสุดและ GenBank Accession No.	ความเหมือนกับ กรดอะมิโนของยีน อ้างอิง (%)	ประมวลรหัสเอ็นไซม์	เอกสารอ้างอิง
<i>acnAc</i>	<i>dbdCa</i> ของ <i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i> 127W (Hirano และคณะ, 2006)	76%	$\alpha$ -subunit dioxygenase	ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546
<i>acnAd</i>	<i>dbdCb</i> ของ <i>Xanthobacter polyaromaticivornas</i> 127W (Hirano และคณะ, 2006)	60%	$\beta$ -subunit dioxygenase	ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546
<i>acnAb</i>	<i>dbdCc</i> ของ <i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i> 127W (Hirano และคณะ, 2006)	71%	Ferredoxin	ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546
<i>acnB</i>	<i>dbdD</i> ของ <i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i> 127W (Hirano และคณะ, 2006)	67%	Dihydrodiol dehydrogenase	ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546
<i>acnF</i>	<i>phnF</i> ของ <i>Burkholderia</i> sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)	65%	Aldehyde dehydrogenase	ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546
<i>acnN</i>	<i>ophC</i> ของ <i>Burkholderia cepacia</i> DBO1 (Chang และ Zylstra, 1998): AAD03553	36%	4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase	ฐิติวรดา นินทนาวงศา, 2546
<i>acnM</i>	<i>pht4</i> ของ <i>Pseudomonas putida</i> (Nomura และคณะ, 1992): Q05184	45%	cis-4,5-dihydroxyphthalate dehydrogenase	ฐิติวรดา นินทนาวงศา, 2546
<i>acnL</i>	<i>mocF</i> ของ <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (Bahar และคณะ, 1998): AAC31188	36%	putative ferredoxin reductase	ฐิติวรดา นินทนาวงศา, 2546
<i>acnE</i>	<i>phnE</i> ของ <i>Burkholderia</i> sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999): AAD09869	38%	hydratase-aldolase	ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์, 2545
<i>acnK</i>	<i>phdK</i> ของ <i>Nocardioides</i> sp. KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997): BAA31236	46%	2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase	ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์, 2545
<i>acnO</i>	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (Romine และคณะ, 1999) : ZP_00093213	56%	short-chain alcohol dehydrogenase	ฐิติวรดา นินทนาวงศา, 2546



รูปที่ 2.10 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดย *acnAc* ประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนส *acnAd* ประมวลรหัส  $\beta$ -subunit ของไดออกซิจีเนส *acnAb* ประมวลรหัสเฟอรัรีดอกซิน *acnB* ประมวลรหัสไดไฮโดรไดออกซิดิไฮโดรจีเนส และ *acnF* ประมวลรหัสอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส เครื่องหมาย \* ครอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ (ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546)



รูปที่ 2.11 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดย *acnN* ประมวลรหัส 4,5-ไดไฮดรอกซิพธาลเทดีคาร์บอกซิเลส *acnM* ประมวลรหัส ซีส-4,5-ไดไฮดรอกซิพธาลเทดีไฮโดรจีเนส *acnL* ประมวลรหัสเฟอรัรีดอกซินรีดักเทส *acnE* ประมวลรหัสไฮดราเทส-อัลโดเลส *acnK* ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และ *acnO* ประมวลรหัสแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยรงค์, 2545 และ วิฑิตวิรดา นินทนาวงศา, 2546)

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany.
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) ของบริษัท Memmert, Germany.
4. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland.
5. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
6. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, Germany.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น SORVALL<sup>®</sup> Biofuge pico ของบริษัท Kendro laboratory products, Germany.
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan.
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดกลาง รุ่น AG-506R
  - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น AG-2506
10. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lamda 25 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
12. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
13. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 °ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.

14. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 °ซ รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
  - Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-2 Advance, Japan.
  - Mini Sub-Cell GT agarose gel electrophoresis systems ของบริษัท Bio-Rad, USA.
16. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
17. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น Acure<sup>®</sup> manual 825 ของบริษัท Sochorex, Switzerland.
  - ปริมาตร 0.1-10 ไมโครลิตร
  - ปริมาตร 10-200 ไมโครลิตร
  - ปริมาตร 100-1000 ไมโครลิตร
18. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น Mylab<sup>™</sup> Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
19. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
20. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร รุ่น Millex<sup>®</sup>-FG ของบริษัท Millipore, USA.
21. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
22. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Nalgene, USA.
23. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan.
24. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
25. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
  - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.



26. ทิปปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free tip) ปริมาตร 0.1-10 1-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning, USA.
27. ชุดเครื่องมือ High performance liquid chromatography (HPLC)
- liquid chromatography รุ่น LC-10ADvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - UV-visible detector รุ่น SPD-10Avp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - Auto injector รุ่น SIL-10ADvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - Column oven รุ่น CTO-10ASvp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - Column: Inertsil® ODS-3 ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร ของบริษัท GL Sciences Inc. Japan.
  - Degasser รุ่น DGU-14A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - System controller รุ่น SCL-10Avp ของบริษัท Shimadzu, Japan.
  - โปรแกรม Class-VP ของบริษัท Shimadzu, Japan.

### 3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท IUI, Japan.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany.
6. โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) ของบริษัท APS Chemicals, Australia.
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
9. แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ของบริษัท J.T. Baker, USA.
10. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
11. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, Germany.
12. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
13. กรดโปรโตคาเทอิก (protocatechuic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
14. กรดซัคซินิก (succinic acid) ของบริษัท May & Baker, England.

15. อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
16. อะซีแนพทีน (acenaphthene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
17. แนพทาลีน (naphthalene) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
18. กรดแนพโทอิก (1-naphthoic acid) ของบริษัท Kanto Chemical, Japan.
19. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, AUS.
20. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) ของบริษัท Merck, Germany.
21. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo ERBA, France.
22. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Merck, Germany.
23. คลอโรฟอร์ม (chloroform,  $\text{CH}_3\text{Cl}$ ) ของบริษัท Merck, Germany.
24. ฟอรัมาลดีไฮด์ (formaldehyde) ของบริษัท Merck, Germany.
25. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.
26. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ของบริษัท Fluka, Germany.
27. สีไซลีนไซยานอล (xylene cyanol) ของบริษัท Sigma, USA.
28. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ) ของบริษัท Sigma, USA.
29. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Sigma, USA.
30. SDS (sodium dodecyl sulfate,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$ ) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
31. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide,  $(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}(\text{CH}_3)_3)\text{Br}$ ) ของบริษัท TCK-EP, Japan.
32. MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid) ของบริษัท BIO BASIC, USA.
33. DEPC (diethylpyrocarbonate) ของบริษัท US, USA.
34. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, USA.
35. Proteinase K ของบริษัท Promega, USA.
36. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอปริมาณน้อย RNeasy Mini Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.
37. RNase-free DNase Set ของบริษัท Qiagen, Germany.
38. Hexanucleotide mix ของบริษัท Roche, Germany.
39. Ribonuclease inhibitor ของบริษัท Promega, USA.
40. Taq DNA polymerase ของบริษัท New England Biolabs, USA.

41. MMLV reverse transcriptase ของบริษัท New England Biolabs, USA.

42. dNTP mix ของบริษัท New England Biolabs, USA.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นชนิดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย	จีโนม/พีนไทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhizobium</i> sp. CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีน	ศรัลยา แพงไตร, 2543
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์กลาย D2	สายพันธุ์กลายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีน	ธัญนุช เกรียงไกร พิพัฒน์, 2544
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์กลาย E11	สายพันธุ์กลายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีน	ธัญนุช เกรียงไกร พิพัฒน์, 2544

### 3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( $T_m$ )	เอกสารอ้างอิง
TN5-OE	5'-GGTTCGTTTCAGGACGCTAC-3' (64 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยวงศ์, 2545
F933	5'-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3' (72 <sup>o</sup> ซ)	Widada และคณะ, 2002
1492R	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (62 <sup>o</sup> ซ)	Widada และคณะ, 2002
DOXF-1	5'-CACGATTACGACCGAGA-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	ดวงกมล ฐปมงคล, 2546
DOXF-2	5'-AGATCATGTCCGATGTG-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	ดวงกมล ฐปมงคล, 2546
DOXF-4	5'-CAAATTCTACATGGACATC-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DOXR-2	5'-CCAGTACAGGAATTGTT-3' (48 <sup>o</sup> ซ)	ดวงกมล ฐปมงคล, 2546
DOXR-3	5'-ACATCGGTCCGCGACTT-3' (54ซ)	ดวงกมล ฐปมงคล, 2546
DOXR-Ab	5'-GCTTGCAGATCAGGATC-3' (52ซ)	สร้างในการทดลองนี้
DDH-R	5' -ATAGAACGATGCATTTCG- 3' (48 <sup>o</sup> ซ)	สร้างในการทดลองนี้
FD2	5'-TCTACATCGACTGCTGA-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	ดวงกมล ฐปมงคล, 2546
FW1	5'-AATCTCTTCCCGCCAGA-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยวงศ์, 2545
FW3	5'-GTGGTCCTTGAAGTTGA-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยวงศ์, 2545
RV2	5'-ACAATGATCCGGACGAG-3' (52 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยวงศ์, 2545
RV4	5'-GACTGAAGGAAGTATC-3' (50 <sup>o</sup> ซ)	ทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยวงศ์, 2545

### 3.5 การเลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.5.1 เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย E11 และสายพันธุ์กลาย D2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรดโปรโตคาทิกเป็นแหล่งคาร์บอน ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Km) ใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ ในอาหารแข็งเป็นเวลา 2-3 วัน ในอาหารเหลวบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หรือจนกว่าอาหารเหลวจะเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นสีขาวขุ่น

3.5.2 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย E11 และสายพันธุ์กลาย D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.5.1 นำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70° ซ เป็นเวลา 1 ปี

### 3.6 ยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย D2 และ E11

3.6.1 สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 และ E11

ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 และ E11 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเลี้ยงเชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สำหรับสายพันธุ์กลายต้องเติมกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชม. ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครพิวซ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และใช้ปิเปตดูดส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมด เติมน้ำฟอสเฟต TE ปริมาตร 576 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนเซลล์โดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง แล้วเติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และโปรตีนเอสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของโปรตีนเอสเคใน 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลดไปมาแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 1 ชม. เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ



กลับหลอดไปมา เติมสารละลาย CTAB/NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปต้มที่อุณหภูมิ 65° ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลายสุดท้าย (ประมาณ 700-800 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันจนกลายเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือตะกอนและชั้นคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ใสในหลอดไมโครพิพจีใหม่ จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตรเท่ากับปริมาณของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันจนเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ใสในหลอดไมโครพิพจีใหม่แล้วเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส กลับหลอดไปมาจนปรากฏตะกอนขาวของดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเทส่วนน้ำใสทิ้ง ระบายเอทานอลให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4° ซ

### 3.6.2 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อกำหนดให้ ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ, 1999)

### 3.6.3 ปฏิกริยาหลูกลูโซพอลิเมอเรส

ดำเนินปฏิกริยาหลูกลูโซพอลิเมอเรสโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 และ E11 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1 เป็นต้นแบบในปฏิกริยา โดยใช้ไพรเมอร์ TN5-OE ที่จำเพาะกับทรานสโปซอน Tn5 ร่วมกับไพรเมอร์ DOXF-4 และ DOXR-2 ที่อนุพัทธ์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnAc* หรือไพรเมอร์ RV4 และ FW3 ที่อนุพัทธ์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnE* โดยมีส่วนผสมของปฏิกริยาดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยาหลูกลูโซพอลิเมอเรสสำหรับการตรวจสอบการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5

สารเคมี	ความเข้มข้น สุดท้าย
<i>Taq</i> DNA polymerase buffer	1 X
Forward primer และ reverse primer ดังแสดงในรูปที่ 3.1	1 $\mu$ M (ของแต่ละชนิด)
dNTP	200 $\mu$ M (ของแต่ละตัว)
<i>Taq</i> DNA polymerase	2.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	1 pg – 1 $\mu$ g
ปริมาตรสุทธิ	50 $\mu$ l

และดำเนินสภาวะการทำปฏิกริยาดังต่อไปนี้

Hot start	ที่อุณหภูมิ	95 <sup>o</sup> ซ	2 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 <sup>o</sup> ซ	1 นาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ	46 <sup>o</sup> ซ	1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 <sup>o</sup> ซ	1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ	72 <sup>o</sup> ซ	5 นาที	

ดำเนินการปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ 2% อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่เกินออกในน้ำกลั่นปลอดประจุ เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.7 การแสดงออกของ *acnAc acnK* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 หรือสายพันธุ์กลาย E11 ในอะซีแนพติสซิน โดยปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ (RT-PCR)

#### 3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 หรือสายพันธุ์กลาย E11 โคโตนีเดี่ยวจากบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาทิกติกเป็นแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีกรดโปรโตคาทิกติกความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 24 ชม. หรือจนกว่าอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น แล้วบีบถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีซัคซิเนต ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ วัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าความขุ่นประมาณ 0.6 แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4° ซ ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสออก แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 100 มิลลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4° ซ นาน 10 นาที แล้วเท 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ออก ทำการล้างเซลล์ด้วย 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์เช่นเดิมอีก 2 ครั้ง จากนั้นแขวนลอยเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM และใช้เชื้อส่วนนี้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

### 3.7.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

#### 3.7.2.1 สกัดอาร์เอ็นเอ

ปีเปตหัวเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 หรือสายพันธุ์กลาย E11 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เก็บตัวอย่างที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมงของการบ่ม มาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอปริมาณน้อย RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเติมบัฟเฟอร์ TE pH 8.0 ที่มีไลโซไซม์ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ให้ทั่วสารละลายแล้วเติมบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสาร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีนที่เสียหาย เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีอาร์เอ็นเออยู่ในหลอดไมโครพิวจีใหม่แล้วเติมเอทานอลปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นนำสารละลายใส่ลงใน RNeasy column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที เติมสารละลาย RNase-free DNase ในบัฟเฟอร์ RDD ปริมาตร 80 ไมโครลิตร (Qiagen, Germany) ลงตรงกลางคอลัมน์แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ย้ายคอลัมน์ไปใส่ใน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจีใหม่ เติมน้ำปลอดอาร์เอ็นเอสปริมาณ 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายอาร์เอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใส เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -70° ซ

### 3.7.2.2 การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ

เจือจางสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 250 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส โดยปิเปตสารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่าง 3 ไมโครลิตรลงในน้ำปลอดอาร์เอ็นเอส 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอสเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากสมการ

$$\text{ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อกำหนดให้ อาร์เอ็นเอ 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ, 1999)

### 3.7.2.3 ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 1.2% อะกาโรสเจล ซึ่งเตรียมโดยหลอมละลายอะกาโรส 0.6 กรัมในน้ำปลอดอาร์เอ็นเอสปริมาตร 43.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 55° ซ จึงเติม สารละลาย MOPS ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 37% ฟอรั่มดีไฮด์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วจึงเทลงในถาดสำหรับเตรียมอะกาโรสเจลที่ปลอดอาร์เอ็นเอส ตั้งทิ้งไว้ให้อะกาโรสเจลแข็งจึงนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ MOPS ความเข้มข้น 1 เท่า

ปิเปตสารละลายอาร์เอ็นเอตัวอย่างลงในหลอดไมโครพิวเจอร์ที่สะอาด เติม 10X gel loading buffer แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 65° ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอ

หยอดสารละลายอาร์เอ็นเอแต่ละตัวอย่างลงในช่องของอะกาโรสเจล แล้วทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ MOPS ความเข้มข้น 1 เท่า ด้วยความต่างศักย์คงที่ 90 โวลต์ นาน 50 นาที หลังจากนั้นย้อมอะกาโรสเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกโดยแช่เจลในน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV)



### 3.7.3 สังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอโดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

ใช้อาร์เอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมได้ตามข้อ 3.7.2.1 เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอ โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยา โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.4

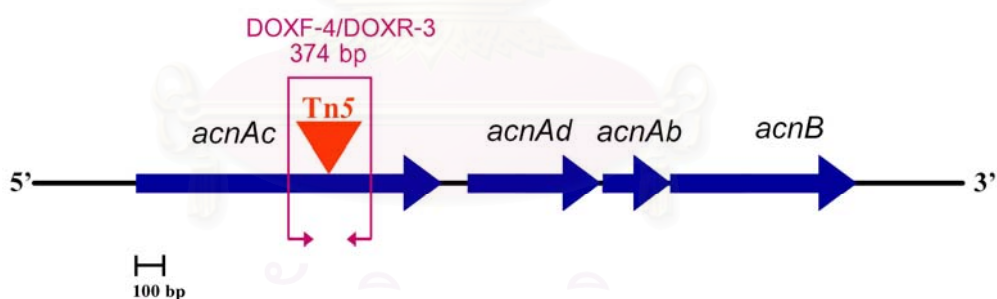
ตารางที่ 3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาการสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอโดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย
10X Reverse transcriptase buffer	10 X	2	1 X
Hexanucleotide mix	10 X	2	1 X
Ribonuclease inhibitor	20 U/ $\mu$ l	1	20 U
dNTP	10 mM (ของแต่ละตัว)	2	400 $\mu$ M (ของแต่ละตัว)
MMLV reverse transcriptase	5 U/ $\mu$ l	1	5 U
อาร์เอ็นเอแม่แบบ	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1	1 $\mu$ g
น้ำปลอดอาร์เอ็นเอส		2	
ปริมาตรสุทธิ		20	

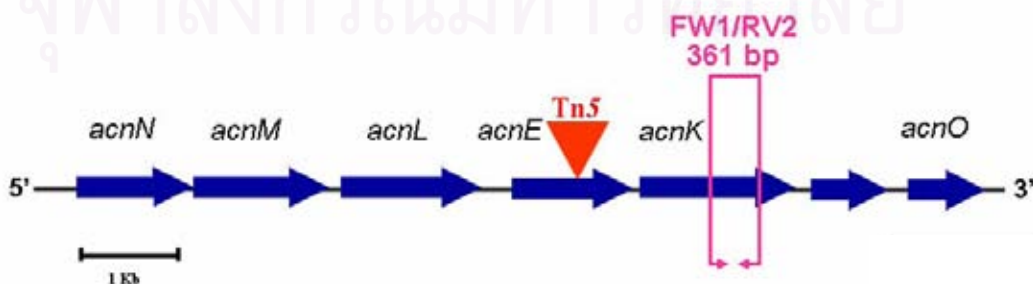
ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95° ซ นาน 5 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) เก็บรักษาคอมพลีเมนต์อาร์ดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -70° ซ เป็นเวลา 1 เดือน

3.7.4 ปฏิกริยาปลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อ *acnAc* หรือ *acnK* และไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะกับส่วนของ 16S rDNA (house-keeping gene)

ดำเนินการปฏิกริยาปลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้คู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ DOXF-4 และ DOXR-3 ที่จำเพาะต่อ *acnAc* และคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ RV2 และ FW1 ที่จำเพาะต่อ *acnK* และคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ F933 และ 1492R ซึ่งจำเพาะกับส่วนของ 16S rDNA ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยมีขนาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาปลูกโซ่พอลิเมอไรสที่คาดหวัง 374 361 และ 559 เบส ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2 โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.7.4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกริยา ทำปฏิกริยาปลูกโซ่พอลิเมอไรสตามวิธีในข้อ 3.6.3 โดยใช้อุณหภูมิ annealing 46° ซ สำหรับ *acnAc* และ 16S rDNA และอุณหภูมิ 50° ซ สำหรับ *acnK* และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 เป็นต้นแบบในปฏิกริยาที่เป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้อาร์เอ็นเอในปฏิกริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเป็นตัวควบคุมผลลบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาปลูกโซ่พอลิเมอไรสด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลจากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถอดรหัสของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 3.2 ตำแหน่งของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถอดรหัสของ *acnK* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1

### 3.8 การแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ต่างๆเมื่อเลี้ยงในชั้นสเตรทชนิดต่างๆโดยปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์แบบถดถอยย้อนกลับ

เตรียมอาร์เอ็นเอจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชั้นสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซีแนพธิน แนพธาลีน กรด 1-แนพโทอิก (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) กรดโปรโตคาทิกูอิก (ความเข้มข้นสุดท้าย 250 มิลลิกรัมต่อลิตร) กรดซัคซินิก และกลูโคส (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 3 8 12 และ 18 ชม. ตามวิธีในข้อ 3.7.2 แล้วสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอตัวอย่างโดยใช้ส่วนผสมปฏิริยาตามวิธีในข้อ 3.7.3

เตรียมส่วนผสมในปฏิริยาและดำเนินปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์ตามข้อ 3.6.3 โดยใช้คู่อิทธิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ DOXF-4 และ DOXR-3 ที่จำเพาะต่อ *acnAc* และคู่อิทธิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ F933 และ 1492R ซึ่งจำเพาะกับส่วนของ 16S rDNA และอุณหภูมิ annealing เท่ากับ 46° ซ แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 2% อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

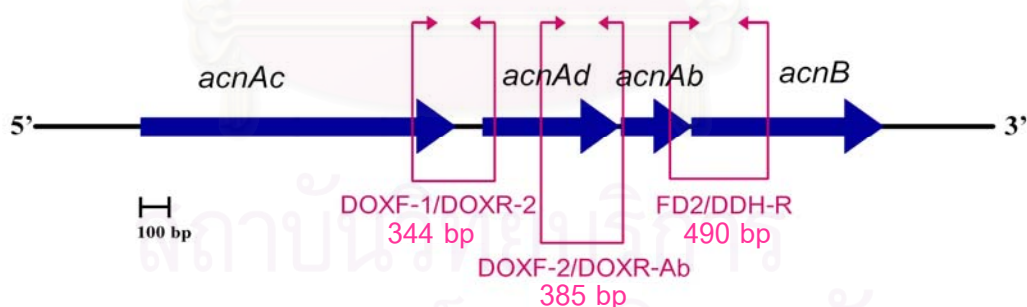
### 3.9 การแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 ในกรด 1-แนพโทอิก โดยปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์แบบถดถอยย้อนกลับ

เลี้ยงเชื้อ *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนพโทอิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชม. ของการบ่มมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดตามวิธีในข้อ 3.7.2 แล้วสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอตัวอย่างโดยใช้ส่วนผสมปฏิริยาตามวิธีในข้อ 3.7.3

เตรียมส่วนผสมในปฏิริยาและดำเนินปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์ตามข้อ 3.6.3 โดยใช้คู่อิทธิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ DOXF-4 และ DOXR-3 ที่จำเพาะต่อ *acnAc* และคู่อิทธิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ F933 และ 1492R ซึ่งจำเพาะกับส่วนของ 16S rDNA โดยใช้อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 46° ซ แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิริยาปลูกใช้พอลิเมอร์โดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 2% อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

### 3.10 การถอดรหัสร่วมกันของประมวลรหัสไดออกซีจีเนสและไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนสของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (*acnAcAdAbB*)

สังเคราะห์คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้จาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพรีลินความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรด 1-แนพโทอิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชม. โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและสภาวะการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.7.4 แล้วใช้คอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่อิเล็กทริกไอโทดไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.2 โดยใช้คู่อิเล็กทริกไอโทดไพรเมอร์ DOXF-1/DOXR-2 สำหรับ *acnAcAd* DOXF-2/DOXR-Ab สำหรับ *acnAdAb* และ FD2/DDH-R สำหรับ *acnAbB* โดยมีขนาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่คาดหมาย 344 385 และ 490 เบส ตามลำดับ ดังมีตำแหน่งดังแสดงในรูปที่ 3.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีในข้อ 3.6.3 โดยใช้อุณหภูมิ annealing 48° ซ สำหรับ *acnAcAd* และอุณหภูมิ 50° ซ สำหรับ *acnAdAb* และ *acnAbB* ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 2% อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร



รูปที่ 3.3 ตำแหน่งของอิเล็กทริกไอโทดไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1

### 3.11 การเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอะซีแนพทิลีน และกรด 1-แนพโทอิก

เตรียมหัวเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 หรือสายพันธุ์กลาย D2 ตามข้อ 3.5 ถ่ายหัวเชื้อจำนวน 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีอะซีแนพทิลีน (ความเข้มข้นสุดท้าย 60 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือกรด 1-แนพโทอิก (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ เก็บตัวอย่างที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมงของการบ่มมาสกัดสารประกอบ PAHs ด้วยเอธิลอะซิเตทตามวิธีของ Supaka และคณะ (2001) โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้มีค่าความเป็นกรดต่าง 2-3 เดิมเอธิลอะซิเตทในอัตราส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเอธิลอะซิเตทเป็น 1:1 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บชั้นเอธิลอะซิเตท แล้วทำการสกัดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตทซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บชั้นเอธิลอะซิเตทรวมกัน เดิมโซเดียมซัลเฟตแล้วเขย่าจนโซเดียมซัลเฟตไม่จับเป็นก้อน นำส่วนน้ำใสไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ ละลายตะกอนของสารด้วยเมธานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพทิลีนและกรด 1-แนพโทอิกด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ Inertsil® ODS-3 ขนาด 4.6x150 มิลลิเมตร (GL Sciences Inc., Japan) ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40° ซ ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ใช้สารละลาย 80% เมธานอลในน้ำเป็นสารละลายตัวพาภายในคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ นำพื้นที่ได้กราฟที่ได้ไปเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงของอะซีแนพทิลีนและกรด 1-แนพโทอิกเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ

ติดตามการเจริญของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยวิธี viable plate count โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ มาทำการเจือจางเชื้อให้เหมาะสมด้วย 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วเปิดเชื้อที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณค่า log CFU/ มิลลิลิตร



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของดวงกมล ฐปมมงคล (2546) ได้ศึกษาขึ้นที่เกี่ยวกับกาวย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยใช้เทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชัน ติดตามทรานสโพรอน Tn5 ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์กลาย D2 ที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโพรอน Tn5 แล้วสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนบริเวณข้างเคียงทรานสโพรอน Tn5 ในสายพันธุ์โวลต์ไทป์ พบยีนที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ  $\alpha$ -subunit  $\beta$ -subunit เฟอร์รีดอกซิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไดออกซิจีเนส และไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก ได้แก่ ไตเบนโซไทโอพีน ไบฟีนิล แนพทาลีน แอนทราซีน และฟีแนนทรีนของ *Xanthobacter polyaromaticivoran* 127W (Hirano และคณะ, 2006) ประมวลรหัสโดย *dbdCa dbdCb dbdCc* และ *dbdD* ตามลำดับ โดยมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 76% 60% 71% และ 67% ตามลำดับ ตั้งชื่อยีนกลุ่มที่พบใน *Rhizobium* sp. CU-A1 นี้ว่า *acn* ประกอบด้วยยีนประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit (*acnAc*)  $\beta$ -subunit (*acnAd*) เฟอร์รีดอกซิน (*acnAb*) และไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนส (*acnB*)

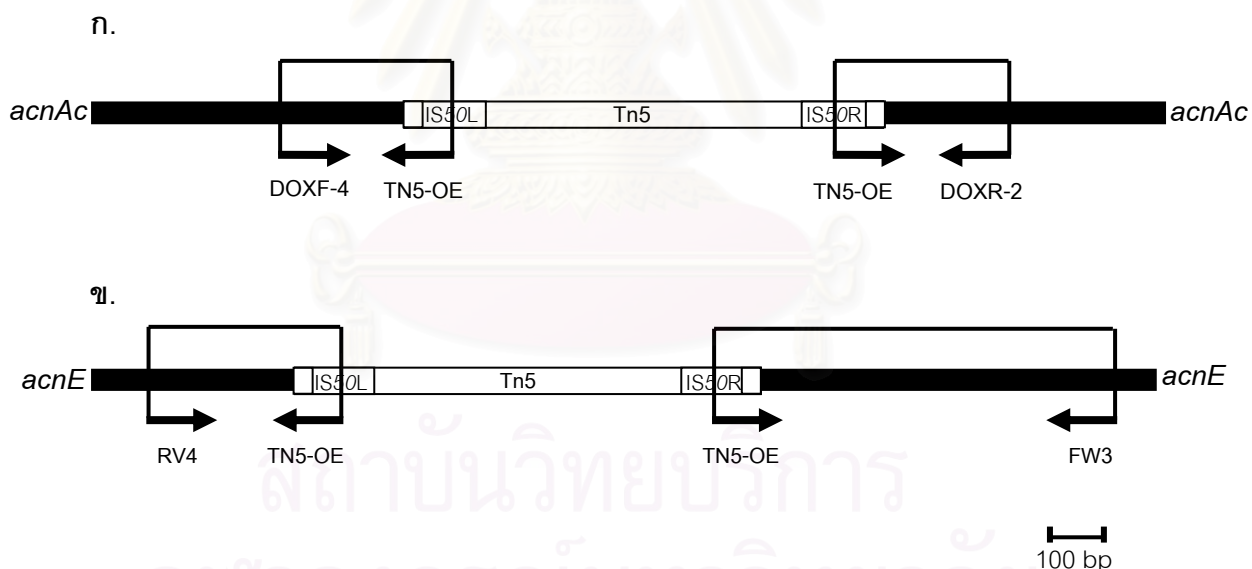
ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยรงค์ (2545) ทำการติดตามทรานสโพรอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย E11 แล้วสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียงทรานสโพรอน Tn5 เพื่อติดตามในสายพันธุ์โวลต์ไทป์ พบ *acnE* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 เท่ากับ 38% (Lauria และ Lloyd-Jones, 1999) *acnK* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ในวิธีการย่อยสลายฟีแนนทรีน ที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. KP7 เท่ากับ 46% (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

เนื่องจากยีนดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ จึงต้องศึกษาว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวข้างต้นสัมพันธ์กับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 หรือไม่โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถอดรหัสย้อนกลับ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการแสดงออกของยีนที่พบดังกล่าว เพื่อทราบว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกตลอดเวลาหรือถูกเหนี่ยวนำได้

#### 4.1 ตรวจสอบยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในโครโมโซมของสายพันธุ์ D2 และ E11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 รวมทั้งสายพันธุ์กลาย D2 และ E11 จึงได้ตรวจสอบยืนยันว่าสายพันธุ์กลาย D2 และ E11 มีการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ขนาด 5.7 กิโลเบสที่ตำแหน่ง *acnAc* และ *acnE* อยู่จริง โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและคู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทรานสโปซอน Tn5 ดังแสดงในรูปที่ 4.1

เนื่องจากไพรเมอร์ TN5-OE ที่จำเพาะกับทรานสโปซอน Tn5 สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ IS50 ของทรานสโปซอน ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของทรานสโปซอน Tn5 จึงใช้ไพรเมอร์ TN5-OE เป็น forward primer หรือ reverse primer ร่วมกับไพรเมอร์ที่อนุพัทธ์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnAc* หรือ *acnE* ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังแสดงในรูปที่ 4.1

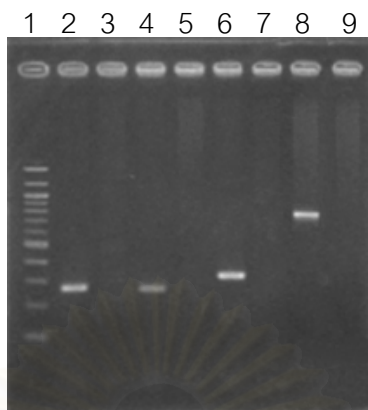


รูปที่ 4.1 ตำแหน่งของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย D2 (ก.) และสายพันธุ์กลาย E11 (ข.)

จากการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากสายพันธุ์กลาย D2 (รูปที่ 4.2 ช่องวิ่งที่ 2 และ 4) และ E11 (รูปที่ 4.2 ช่องวิ่งที่ 6 และ 8) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้จีโนมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเชื้อ *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์โวลต์ไทป์ที่ไม่ถูกกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 (ช่องวิ่งที่ 3 5 7 และ 9) จึงเป็นการยืนยันว่าสายพันธุ์กลาย D2 และ E11 มีทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดที่ *acnAc* และ *acnE* ตามลำดับอยู่จริง ดังนั้นจึงจะใช้สายพันธุ์กลาย D2 และ E11 เป็นเชื้อควบคุมผลลบบในการศึกษาการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ CU-A1 เมื่อถูกชักนำด้วยสารทดสอบชนิดต่างๆ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



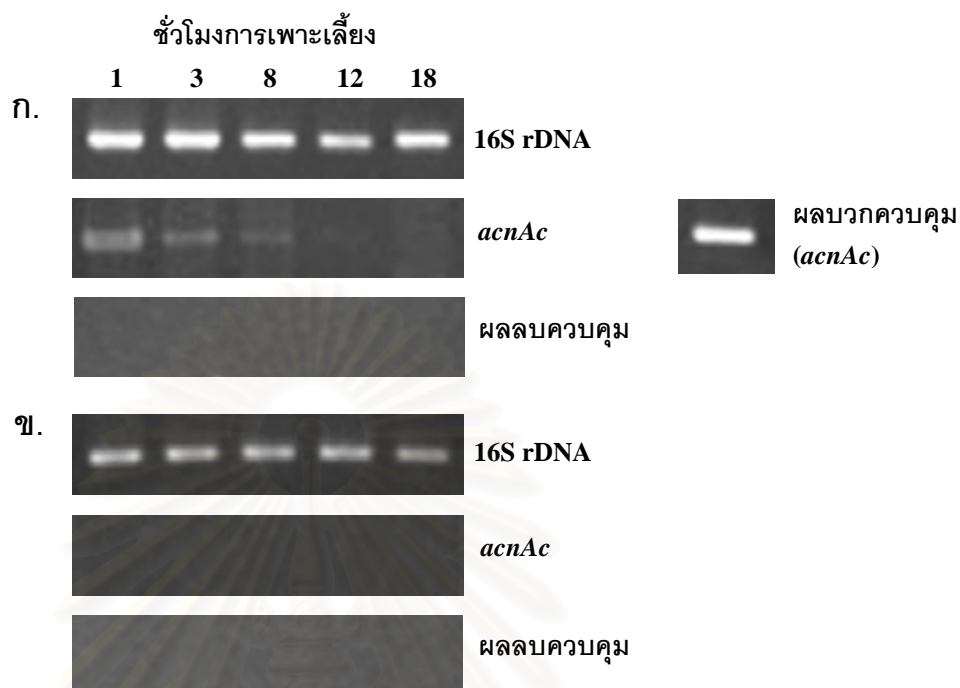
รูปที่ 4.2 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์สเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1	100 bp DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ DOXF-4 และ TN5-OE
ช่องวิ่งที่ 3	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์โวลด์ไทป์เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ DOXF-4 และ TN5-OE (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 4	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย D2 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ TN5-OE และ DOXR-2
ช่องวิ่งที่ 5	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์โวลด์ไทป์เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ TN5-OE และ DOXR-2 (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 6	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ RV4 และ TN5-OE
ช่องวิ่งที่ 7	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์โวลด์ไทป์เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ RV4 และ TN5-OE (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 8	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ TN5-OE และ FW3
ช่องวิ่งที่ 9	จีโนมิกดีเอ็นเอของสายพันธุ์โวลด์ไทป์เป็นแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ TN5-OE และ FW3 (ตัวควบคุมผลลบ)

#### 4.2 การแสดงออกของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อใช้อะซิแนพิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถอดรหัสย้อนกลับ

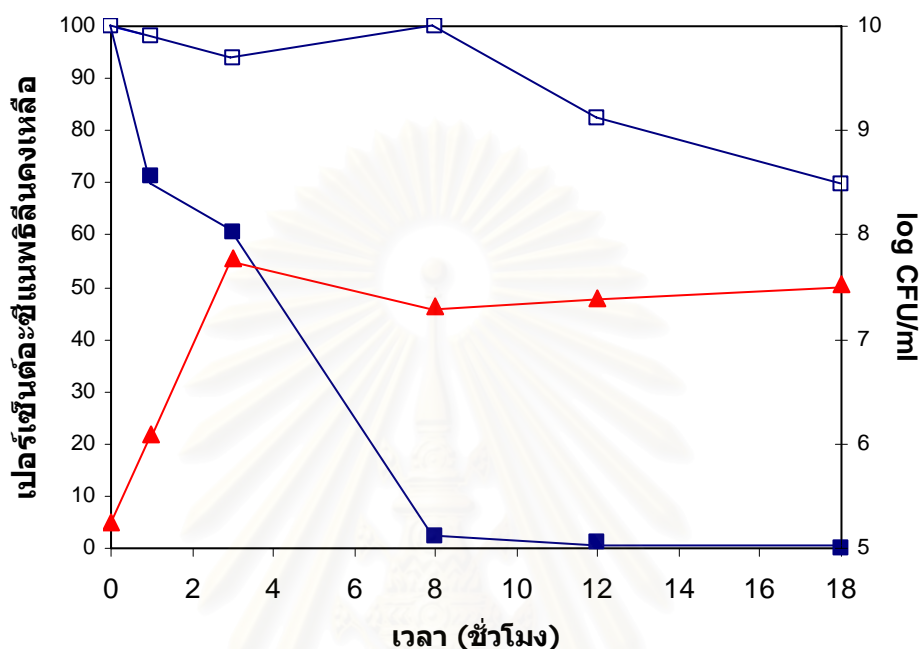
จากข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่า *acnAc* มีความเหมือนกับ *dbdCc* ของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W (Hirano และคณะ, 2006) ซึ่งประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit ของไดออกซีจีเนสเท่ากับ 76% (ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546) โดย  $\alpha$ -subunit เป็นตัวกำหนดความจำเพาะต่อซับสเตรทของไดออกซีจีเนสที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Parales, 2003) จึงได้ติดตามการแสดงออกของ *acnAc* เมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซิแนพิดีนความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นซับสเตรทที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถอดรหัสย้อนกลับ โดยมีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ที่คาดหมายขนาด 374 เบส ใช้ยีนประมวลรหัส 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (house keeping gene) เป็นตัวควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา (Stroncek และคณะ, 2005) และหลุดปฏิกิริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเป็นตัวควบคุมผลลบ ดังแสดงในรูปที่ 4.3





รูปที่ 4.3 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ก.) และสายพันธุ์กลาย D2 (ข.) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซิแนพทิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง ผลลบควบคุมคือ ปฏิกริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnAc*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาที่ใช้พอลิเมอเรส

ผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซิแนพทิลีนเป็นซับสเตรท *acnAc* มีการแสดงออกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ของการบ่ม โดยมีการแสดงออกมากที่สุด แล้วลดลงในชั่วโมงที่ 3 8 และ 12 ตามลำดับจนไม่สามารถติดตามการแสดงออกของยีนได้ในชั่วโมงที่ 18 ในขณะที่พบการแสดงออกของยีนควบคุมผลบวก (16S rDNA) ตลอดเวลานอกจากนี้ไม่พบการแสดงออกของ *acnAc* ในสายพันธุ์กลาย D2 ซึ่งถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 ที่เวลาใดๆเลย



รูปที่ 4.4 การเจริญของ *Rhizobium sp. CU-A1* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพติลินความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร และการย่อยสลายอะซีแนพติลิน

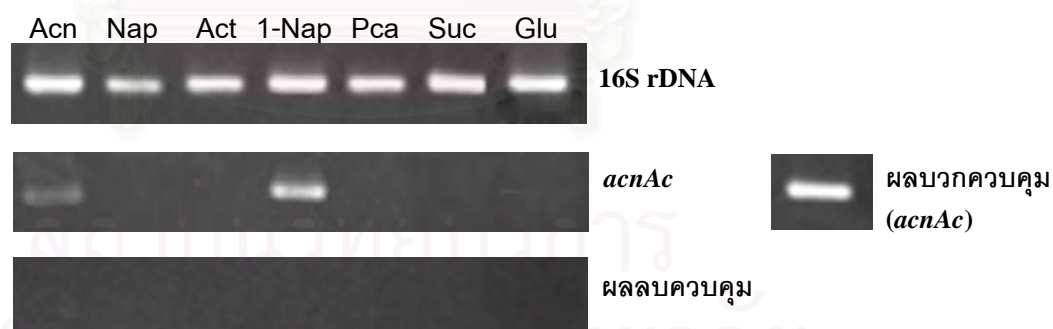
- ▲ การเจริญของ *Rhizobium sp. CU-A1*
- เปอร์เซนต์คงเหลือของอะซีแนพติลินในชุดควบคุมไม่เติมเชื้อ
- เปอร์เซนต์คงเหลือของอะซีแนพติลินในชุดที่เติมเชื้อ *Rhizobium sp. CU-A1*

จากการติดตามความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อกับการลดลงของอะซีแนพติลินพบว่า *Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1* มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 3 ชั่วโมงแรก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณอะซีแนพติลินที่ลดลงถึง 40% และลดลงจนเกือบหมดภายในชั่วโมงที่ 12 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ในขณะที่สายพันธุ์กลาย D2 ไม่มีการเจริญ

#### 4.3 การแสดงออกของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อใช้สารประกอบ PAHs และ สารมัยยัณตร์ชนิดต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถาวรหัตถ์ ย้อนกลับ

จากผลการทดลองในข้อ 4.2 พบว่า *acnAc* มีการแสดงออกเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพทิลีนเป็นซับสเตรท ดังนั้นเพื่อศึกษาว่า *acnAc* มีการแสดงออกแบบชักนำได้โดยซับสเตรทชนิดอื่นๆ จึงเลือกซับสเตรทในกลุ่มสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอะซีแนพทิลีน ได้แก่ แนพทาลีน และอะซีแนพทิลีน และสารมัยยัณตร์ที่พบจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน โดยใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ คือ กรด 1-แนพโทอิก (Poonthrigpun และคณะ, 2006) เป็นซับสเตรท

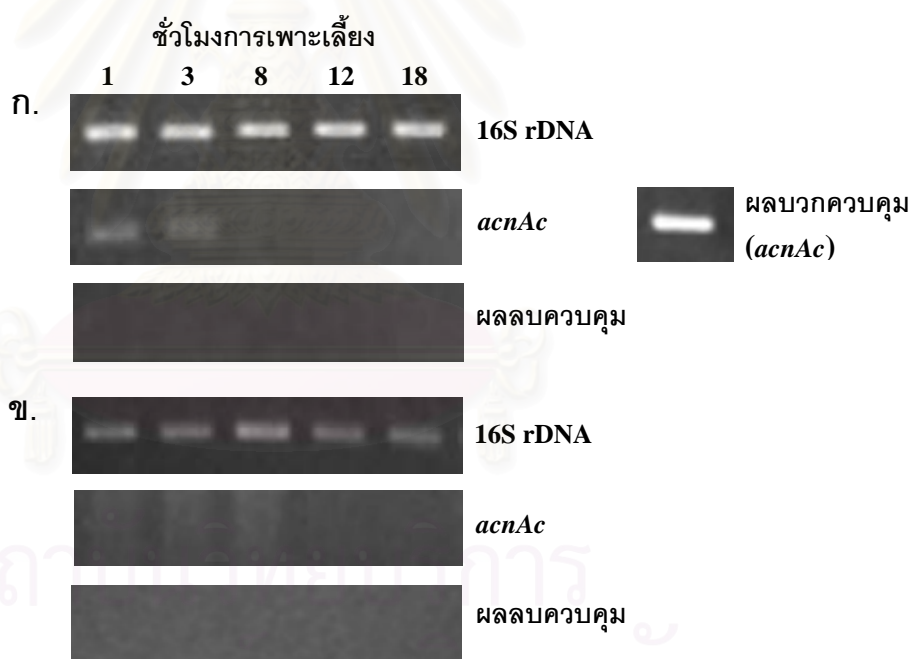
เพื่อศึกษาว่า *acnAc* มีการแสดงออกตลอดเวลายังได้ใช้ซับสเตรทชนิดอื่นๆนอกเหนือจาก ซับสเตรทในกลุ่มสารประกอบ PAHs ซึ่งเป็นซับสเตรทที่เชื้อสายพันธุ์ CU-A1 สามารถใช้ในการเจริญได้ด้วย ได้แก่ กรดโปรโตคาทิกอิก กรดซัคซินิก และกลูโคส ติดตามการแสดงออกของยีนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถาวรหัตถ์ย้อนกลับเช่นเดียวกับในข้อ 4.2 โดยเลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 ในซับสเตรทชนิดต่างๆเป็นเวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงกรด 1-แนพโทอิกเท่านั้นที่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ *acnAc* ในเชื้อสายพันธุ์นี้ ส่วนซับสเตรทชนิดอื่นๆไม่สามารถชักนำการแสดงออกของยีนที่เวลาต่างๆได้ โดยแสดงผลการแสดงออกของ *acnAc* ใน ชั่วโมงที่ 1 ของการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีน (Acn) แนพทาลีน (Nap) อะซีแนพทิลีน (Act) กรด 1-แนพโทอิก (1-Nap) กรดโปรโตคาทิกอิก (Pca) กรดซัคซินิก (Suc) และกลูโคส (Glu) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ผลลบควบคุมคือ ปฏิกิริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnAc*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์

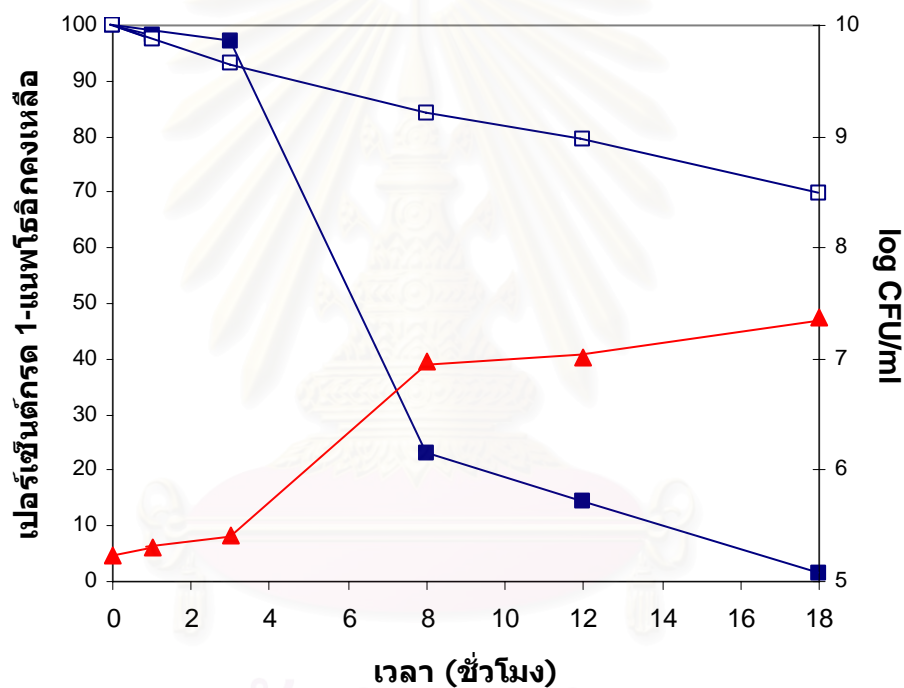
#### 4.4 การแสดงออกของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อใช้กรด 1-แนฟโธอิกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถดถอยย้อนกลับ

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่ากรด 1-แนฟโธอิกซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่พบในวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนในเชื้อสายพันธุ์ CU-A1 นี้สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ได้ จึงทำการติดตามการแสดงออกของ *acnAc* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนฟโธอิกเป็นซับสเตรทที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมงของการบ่มโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถดถอยย้อนกลับ เช่นเดียวกับการติดตามการแสดงออกของ *acnAc* ในอะซีแนฟทิลีนในข้อ 4.2 โดยใช้ยีนประมวลรหัส 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (house keeping gene) เป็นตัวควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา และหลอดปฏิกิริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเป็นตัวควบคุมผลลบ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 อะกาโรสเจลแสดงผลผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnAc* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ก.) และสายพันธุ์กลาย D2 (ข.) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีกรด 1-แนฟโธอิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง ผลลบควบคุมคือ ปฏิกิริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnAc*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์

จากผลดังกล่าวแสดงว่าเมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนพโทอิกเป็นขั้วสเตรท *acnAc* มีการแสดงออกในชั่วโมงที่ 1 และ 3 ของการบ่ม โดยมีการแสดงออกมากที่สุดในชั่วโมงที่ 1 และไม่สามารถติดตามการแสดงออกของยีนได้ในชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป โดยยังพบการแสดงออกของยีนควบคุมผลบวกของปฏิกิริยา RT-PCR (16S rDNA) ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังไม่พบการแสดงออกของ *acnAc* ในสายพันธุ์กลาย D2 ซึ่งถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 ที่เวลาใดๆ เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงเชื้อในอะซีแนพทิลีน



รูปที่ 4.7 การเจริญของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนพโทอิก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และการย่อยสลายกรด 1-แนพโทอิก

- ▲ การเจริญของ *Rhizobium* sp. CU-A1
- เปอร์เซ็นต์คงเหลือของกรด 1-แนพโทอิกในชุดควบคุมไม่เติมเชื้อ
- เปอร์เซ็นต์คงเหลือของกรด 1-แนพโทอิกในชุดที่เติมเชื้อ *Rhizobium* sp. CU-A1



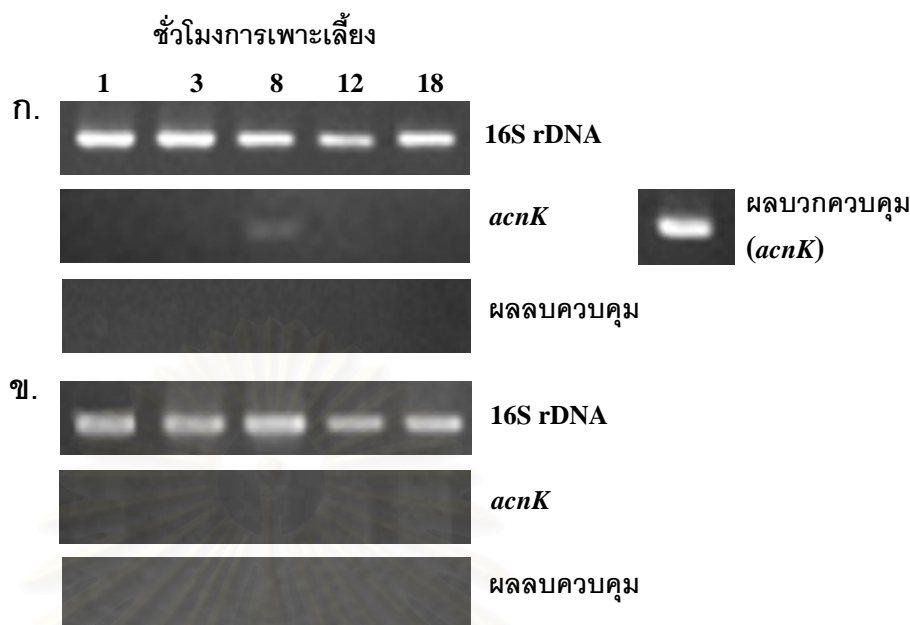
เมื่อติดตามการเจริญของเชื้อและการลดลงของกรด 1-แนฟโธอิกพบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนฟโธอิก ในขณะที่สายพันธุ์ กลาย D2 ไม่เจริญ โดยในชุดทดลองที่มีการเติมเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบว่ากรด 1-แนฟโธอิกลดลงจนเกือบหมดไปในชั่วโมงที่ 18 ของการบ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.7

#### 4.5 การแสดงออกของ *acnK* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อใช้อะซีแนฟธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถาวรหีสย้อนกลับ

จากงานวิจัยของทิพวรรณ ล้อรัตน์ไชยงค์ (2545) เมื่อติดตามการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย E11 แล้วสร้างดีเอ็นเอติดตามยีนในสายพันธุ์โวลต์ไทป์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างเคียง Tn5 พบยีนที่ถูกแทรกสอดด้วยทรานสโปซอน Tn5 ในสายพันธุ์กลาย E11 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 38 % กับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ให้ชื่อว่า *acnE* และพบยีนประมวลรหัสเหมือน 46 % กับ 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ K7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ให้ชื่อว่า *acnK* ซึ่งมีการเรียงตัวอยู่เหนือขึ้นไปจาก *acnE* และเนื่องจากไม่สามารถติดตามการแสดงออกของ *acnE* ได้เลย ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ที่ประมวลรหัสโดย *acnE* มีการทำงานในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในช่วงเวลาสั้นๆ การถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอจึงเกิดอย่างรวดเร็วแล้วอาร์เอ็นเอถูกย่อยสลายไปด้วยนิวคลีโอเลส (McGarvey และ Quandt, 2003, Deustcher, 2006) ในงานวิจัยนี้จึงได้ติดตามการแสดงออกของ *acnK* ซึ่งอยู่ถัดจาก *acnE* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง

พบว่า *acnK* ใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีการแสดงออกในชั่วโมงที่ 8 ของการบ่มเท่านั้น โดยพบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์ที่มีขนาดตามที่คาดหมายคือ 361 เบส และไม่พบการแสดงออกของ *acnK* ในสายพันธุ์กลาย E11 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.8

นอกจากนี้เมื่อชักนำการแสดงออกของ *acnK* โดยซัสเตรทชนิดอื่นๆ ได้แก่ อะซีแนฟธิลีน แนฟธาลิน กรด 1-แนฟโธอิก กรดซัคซินิก และกลูโคส ที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมงของการบ่มพบว่าไม่มีซัสเตรทชนิดใดสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ *acnK* ได้



รูปที่ 4.8 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR แสดงการแสดงออกของ *acnK* และ 16S rDNA ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 (ก.) และสายพันธุ์กลาย E11 (ข.) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟติลีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมง ผลลบควบคุมคือ ปฏิกริยาที่ไม่เติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส และผลบวกควบคุม (*acnK*) ใช้ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 เป็นแม่แบบในปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส

#### 4.6 การถอดรหัสร่วมกันของกลุ่มยีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสและไดไฮโดรไดออกลิไฮโดรจีเนสของ *Rhizobium* sp. CU-A1 (*acnAcAdAbB*) เมื่อเลี้ยงในอะซีแนฟติลีน

ดวงกมล ฐูปมงคล (2546) รายงานว่านอกจาก *acnAc* แล้วยังพบ *acnAd* ประมวลรหัส  $\beta$ -subunit ของไดออกซีจีเนส *acnAb* ประมวลรหัสเพอร์ริดอกซิน และ *acnB* ประมวลรหัสไดไฮโดรไดออกลิไฮโดรจีเนสมีการเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกันและอยู่ถัดลงไปจาก *acnAc* และยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็โปรโมเตอร์เหนือ *acnAc*

จากลักษณะการเรียงตัวของยีนและพบบริเวณที่น่าจะเป็นโปรโมเตอร์บริเวณเหนือขึ้นไปของ *acnAc* จึงคาดว่า *acnAc acnAd acnAb* และ *acnB* น่าจะมีการถอดรหัสร่วมกัน จึงเลือกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่คร่อมระหว่าง *acnAc* ถึง *acnB* เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การถอดรหัสร่วมกันของยีนดังกล่าวโดยปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ แต่เมื่อทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วไม่พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกริยาถูกใช้พอลิเมอเรส จึงเลือกโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่คร่อมระหว่าง *acnAcAd acnAdAb* และ *acnAbB* ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 3.3

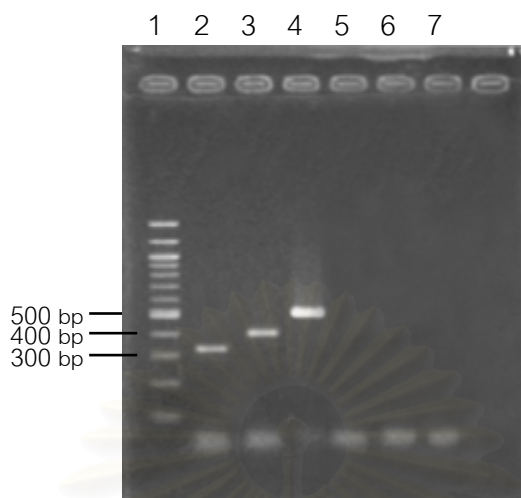
เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การถอดรหัสร่วมกันของยีนดังกล่าวโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับในการทดลองนี้

ตารางที่ 4.1 คูโอโลโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ ยีนเป้าหมายและขนาดผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังสำหรับตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของกลุ่ม *acnAcAdAbB*

คูโอโลโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	ยีนเป้าหมาย	ขนาดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่คาดหวัง
DOXF-1/ DOXR-2	<i>acnAc/ acnAd</i>	344 เบส
DOXF-2/ DOXR-Ab	<i>acnAd/ acnAb</i>	385 เบส
FD2/ DDH-R	<i>acnAb/ acnB</i>	490 เบส

ผลการตรวจสอบแสดงในรูปที่ 4.9 เมื่อใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จาก *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพติลีนความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมาวิเคราะห์การถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้คูโอโลโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดตรงตามที่คาดหวังคือ 344 385 และ 490 เบสตามลำดับ (ช่องวิ่งที่ 2-4) และปฏิกิริยาควบคุมผลลบของ RT-PCR ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส (ช่องวิ่งที่ 5-7) ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆเพื่อตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAdAbB* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอะซิแนพธิลิน

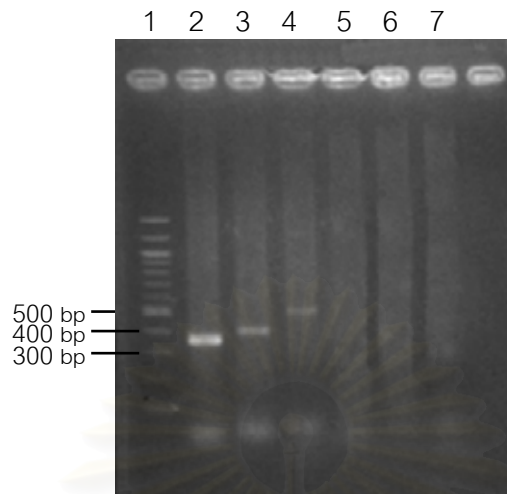
- |                 |  |
|-----------------|--|
| ช่องวิ่งที่ 1   | 100 bp DNA ladder  |
| ช่องวิ่งที่ 2   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-1 และ DOXR-2<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAc</i> และ <i>acnAd</i> )                          |
| ช่องวิ่งที่ 3   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-2 และ DOXR-Ab<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAd</i> และ <i>acnAb</i> )                         |
| ช่องวิ่งที่ 4   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ FD2 และ DDH-R<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAb</i> และ <i>acnB</i> )                               |
| ช่องวิ่งที่ 5-7 | ตัวควบคุมผลลบของปฏิกิริยา RT-PCR ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-1/ DOXR-2 DOXF-2/ DOXR-Ab และ FD2/ DDH-R ตามลำดับ |

#### 4.7 การถอดรหัสร่วมกันของยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสและไดไฮโดรไดออกซีไฮโดรจีเนสของ *Rhizobium* sp. CU-A1 (*acnAcAdAbB*) เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรด 1-แนพโธอิก

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.3 และ 4.4 พบว่ากรด 1-แนพโธอิกสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ *acnAc* ได้เช่นเดียวกับอะซีแนพธิดีน ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์การถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับและคู่อิเล็กโทรนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์เช่นเดียวกับในข้อ 4.6 เมื่อใช้กรด 1-แนพโธอิกเป็นซับสเตรทด้วย

ผลการตรวจสอบแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จาก *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรด 1-แนพโธอิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมาวิเคราะห์การถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้คู่อิเล็กโทรนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับ *acnAcAd* *acnAdAb* และ *acnAbB* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดตรงตามที่คาดหมายคือ 344 385 และ 490 เบส ตามลำดับ (ช่องวิ่งที่ 2-4) และปฏิกิริยาควบคุมผลลบของ RT-PCR ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส (ช่องวิ่งที่ 5-7) ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR เช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 4.6 เมื่อใช้อะซีแนพธิดีนเป็นซับสเตรท





รูปที่ 4.10 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆเพื่อตรวจสอบการถอดรหัสร่วมกันของ *acnAcAdAbB* เมื่อเลี้ยงเชื้อในกรด 1-แนฟโธอิก

- |                 |  |
|-----------------|--|
| ช่องวิ่งที่ 1   | 100 bp DNA ladder  |
| ช่องวิ่งที่ 2   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-1 และ DOXR-2<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAc</i> และ <i>acnAd</i> )                          |
| ช่องวิ่งที่ 3   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-2 และ DOXR-Ab<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAd</i> และ <i>acnAb</i> )                         |
| ช่องวิ่งที่ 4   | ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ FD2 และ DDH-R<br>(ติดตามการแสดงออกร่วมกันของ <i>acnAb</i> และ <i>acnB</i> )                               |
| ช่องวิ่งที่ 5-7 | ตัวควบคุมผลลบของปฏิกิริยา RT-PCR ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ DOXF-1/ DOXR-2 DOXF-2/ DOXR-Ab และ FD2/ DDH-R ตามลำดับ |

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดวงกมล ฐูปมมงคล (2546) ได้ศึกษาเอ็นที่เกี่ยวข้อกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 พบ *acnAc acnAd* และ *acnAb* ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 76% 60% และ 71% กับ *dbd* ที่ประมวลรหัสโปรตีนที่เป็น  $\alpha$ - และ  $\beta$ -subunit และเพอร์ริดอกซิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไดออกซิจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivoran* สายพันธุ์ 127W ที่สามารถย่อยสลายไดเบนโซไทโอพีน ไบฟีนิล แนพทาลีน แอนทราซีน และพีแนนทรีนได้ (Hirano และคณะ, 2006) จึงเป็นที่คาดหมายว่าไดออกซิจีเนสที่พบในสายพันธุ์ CU-A1 เกี่ยวข้อกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีน นอกจากนี้ยังพบ *acnB* ซึ่งประมวลรหัสเหมือน 67% กับไดไฮโดรไดออกดีไฮโดรจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivoran* สายพันธุ์ 127W (Hirano และคณะ, 2006) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในการออกซิไดส์ไดไฮโดรไดออกดีไฮโดรจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivoran* สายพันธุ์ 127W (Hirano และคณะ, 2006) ยังได้ศึกษาหน้าที่ของ *dbdCa* โดยทำให้ *dbdCa* สูญเสียหน้าที่ด้วยการแทรกสอดของยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (*kan*) พบว่าสายพันธุ์กลายที่มี *kan* แทรกสอดอยู่บน *dbdCa* สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายแอนทราซีน ไดเบนโซไทโอพีน และไบฟีนิล แต่สามารถย่อยสลายพีแนนทรีนได้เล็กน้อย โดย McKay และคณะ (2003) กล่าวว่าแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกได้ มีไอโซไซม์ของไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันได้หลายชนิด จึงคาดว่าไดออกซิจีเนสที่พบในสายพันธุ์ 127W น่าจะเกี่ยวข้อกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนผลิตภัณฑ์ของ *dbd* ในสายพันธุ์นี้

ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยรงค์ (2545) พบ *acnK* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส มีความเหมือน 46% กับ *phdK* ที่พบใน *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่เกี่ยวข้อในวิธีการย่อยสลายพีแนนทรีน ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสให้เป็นกรดฟทาลิก (o-phthalic acid) แบบจำเพาะต่อซัสเตรท (2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์) ที่เป็นสารมัธยันตรในวิธีการย่อยสลายพีแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997) โดยในสายพันธุ์ CU-A1 พบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับ  $NAD^+$  ของ aldehyde dehydrogenase superfamily ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 226-233 ของ *acnK* และยังพบบริเวณอนุรักษ์ที่เป็น

บริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch และคณะ, 1999) ที่ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 250-257 ของ *acnK* ด้วย จึงคาดว่า *acnK* น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในสายพันธุ์ CU-A1 ด้วย

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่พบดังกล่าวที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยเบื้องต้นใช้เทคนิค northern blotting ไฮบริไดเซชันในการติดตามการแสดงออกของ *acnAc* โดยใช้ดีเอ็นเอติดตาม DOX ซึ่งสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *acnAc* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรส ติดฉลากด้วย digoxigenin-dUTP แต่ไม่สามารถติดตามการแสดงออกได้ อาจเนื่องจากวิธีการติดตามสัญญาณไฮบริไดเซชันด้วยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรทมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการติดตามตำแหน่งการเกิดไฮบริไดเซชันของอาร์เอ็นเอโดยดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธีการติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (Kricka, 1992) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs อย่างแพร่หลาย (Kahng และคณะ, 2002, Iida และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนมาใช้วิธีปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในสายพันธุ์ CU-A1 แทน

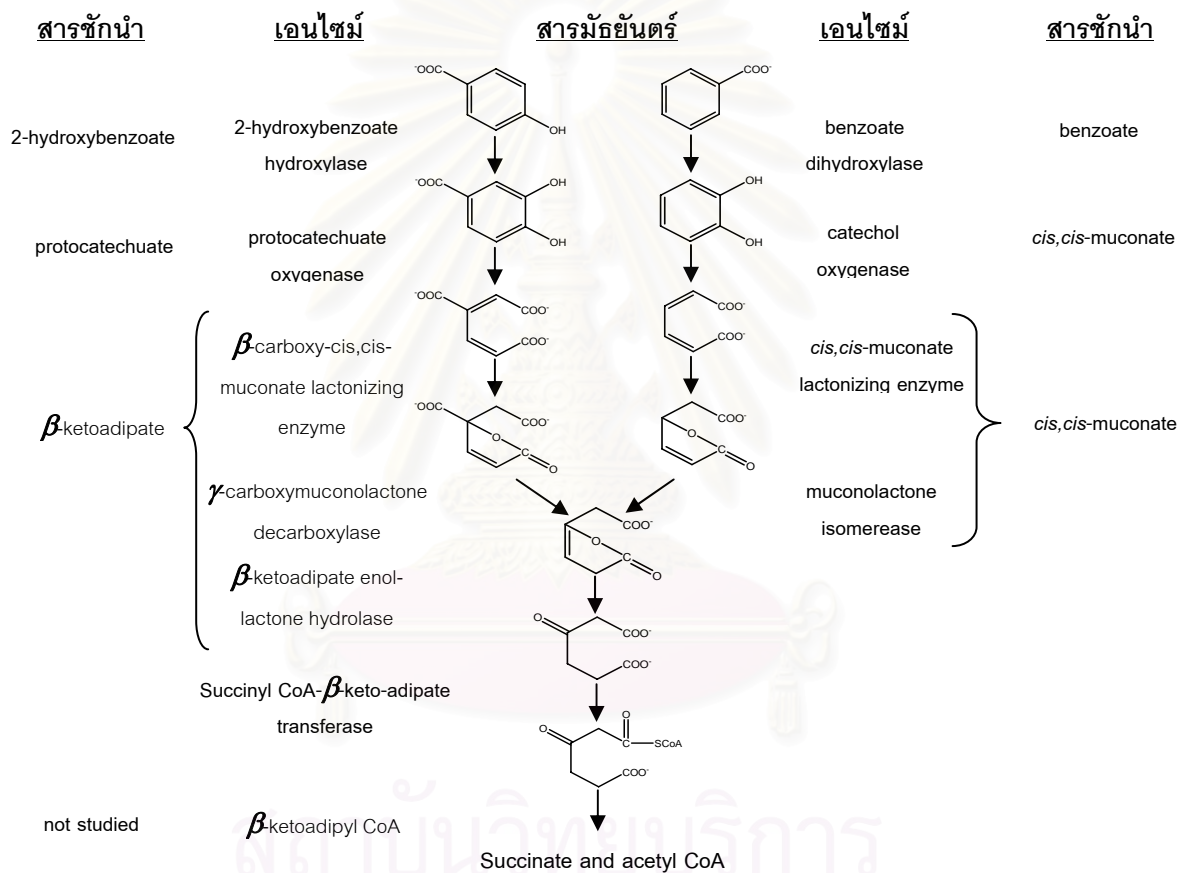
การศึกษากการแสดงออกทำได้โดยเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 1 3 8 12 และ 18 ชั่วโมงมาสกัดอาร์เอ็นเอ สังเคราะห์เป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) ด้วยรีเวอร์สทรานสคริปเทส จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสโดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา คือ *acnAc* และ *acnK* ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า มีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ ขนาด 374 และ 361 เบส เกิดขึ้นตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดหมาย แสดงว่า *acnAc* และ *acnK* ถูกชักนำให้มีการแสดงออก เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนกับการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนฟธิลีน พบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในช่วงเวลาที่มีอะซีแนฟธิลีนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่ออะซีแนฟธิลีนถูกย่อยสลายจนหมดไปหลังจากเวลา 12 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบการ

แสดงออกของทั้งสองยีนนี้โดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ ซึ่งให้ผลคล้ายกับงานวิจัยของ Marlowe และคณะ (2002) ที่ติดตามการแสดงออกของ *nahAc* ประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนส และ *rpoD* ซึ่งเป็น house-keeping gene ใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PpG7 พบว่า *nahAc* มีการแสดงออกตอบสนองต่อซาลิไซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหยุดแสดงออกเมื่อซาลิไซเลตถูกย่อยสลายหมดไป ในขณะที่เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์กลาย D2 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพทิลีน ไม่พบการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* ในสายพันธุ์กลายทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์กลายทั้งสองไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพทิลีนได้ (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544)

เพื่อตรวจสอบว่า *acnAc* และ *acnK* มีการแสดงออกตลอดเวลาหรือถูกชักนำได้ จึงได้เลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยซับสเตรทในกลุ่มสารประกอบ PAHs ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอะซีแนพทิลีน ได้แก่ แนพทาลีน และอะซีแนพทิลีน และสารมัธยันตร์ที่พบจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ คือ กรด 1-แนพโธอิก (Poonthrigpun และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังได้ใช้ซับสเตรทชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากซับสเตรทในกลุ่มสารประกอบ PAHs ซึ่งเป็นซับสเตรทที่เชื้อสายพันธุ์ CU-A1 สามารถใช้ในการเจริญได้ด้วย ได้แก่ กรดโปรโตคาทิกูอิก กรดซัคซินิก และกลูโคส จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสแบบถอดรหัสย้อนกลับ พบว่านอกจากอะซีแนพทิลีนแล้ว กรด 1-แนพโธอิกยังสามารถชักนำให้ *acnAc* แสดงออกได้ เมื่อติดตามการเจริญของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ในกรด 1-แนพโธอิกพบว่าสามารถเจริญและย่อยสลายกรด 1-แนพโธอิกได้แต่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญและการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ในขณะที่ซับสเตรทอื่นไม่สามารถชักนำการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ สำหรับ *acnK* ไม่มีซับสเตรทใดที่ชักนำการแสดงออกได้เลย ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า *acnAc* และ *acnK* น่าจะเป็นยีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกได้

Fleming และคณะ (1993) กล่าวว่าโอเปอรอน *nah* สำหรับวิถีการย่อยสลายแนพทาลีน ทั้งส่วนบนและส่วนล่าง ซึ่งอยู่บนพลาสมิด NAH7 ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 ถูกชักนำให้มีการถอดรหัสด้วยซาลิไซเลตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากวิถีการย่อยสลายแนพทาลีนส่วนบนเท่านั้น โดยซาลิไซเลตที่เกิดจากการย่อยสลายแนพทาลีนจะไปรวมกับ NahR ซึ่งเป็นโปรตีนผลิตภัณฑ์จาก *nahR* แล้วจับที่บริเวณเหนือโปรโมเตอร์ของโอเปอรอน *nah* ทำให้เกิดการถอดรหัสได้ นอกจากนี้ Ornston (1971) กล่าวว่าในวิถีเบต้า-คีโตอะดิเพธในการย่อยสลายคะทีคอล ซึ่งเป็น

สารมัธยันตร์หลักของการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกหลายชนิด เช่น ซาลิไซเลต ฟีนอล เบนโซเอต แอนทราโนเลต และเบนซีน ของแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonads มีการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์โดยสารมัธยันตร์ในวิธีการย่อยสลายได้ โดยสารมัธยันตร์ เช่น เบต้า-คีโตอะดิเพต ( $\beta$ -ketoadipate) และซิส,ซิส-มิวโคเนต (*cis, cis*-muconate) สามารถชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ในวิธีการย่อยสลายได้หลายขั้นตอนของวิธีการย่อยสลาย ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 วิธีเบต้า-คีโตอะดิเพต เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิธีการย่อยสลายและสารชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ใน *Pseudomonas putida* (Ornston, 1971)



จากงานวิจัยนี้จึงอาจกล่าวได้ว่า *acnAc* ประมวลรหัสไดออกซิจีเนสของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีความจำเพาะต่อซีสเตรทชนิดอื่นนอกจากอะซีแนพธิดีนด้วย จึงสามารถย่อยสลายได้ทั้งอะซีแนพธิดีนและกรด 1-แนพโทอิก สอดคล้องกับงานวิจัยของศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์) ที่พบว่าไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ CU-A1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีแนพธิดีนเป็นสารชักนำการแสดงออกสามารถออกซิไดส์อะซีแนพธิดีนและกรด 1-แนพโทอิกได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Hirano และคณะ (2006) กล่าวว่า *dbdCa* ที่ประมวลรหัสเป็น  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W มีลำดับกรดอะมิโนอยู่ในกลุ่มเดียวกับไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันกลุ่มที่ 4 (Werlen และคณะ, 1996) เป็นไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเบนซีน โทลูอีน และไบฟีนิล ซึ่งมีความจำเพาะต่อซีสเตรทหลายชนิดและสามารถออกซิไดส์แนพธาลีนได้ด้วย (Haddock และ Gibson, 1995 และ Werlen และคณะ, 1996) นอกจากนี้ Parales และคณะ (2000) และ Parales (2003) รายงานว่าบริเวณข้างเคียงบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของ  $\alpha$ -subunit ของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสเป็นส่วนที่กำหนดความจำเพาะต่อซีสเตรทของเอนไซม์ และพบว่าไดออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสโดย *nah* ของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIB 9816-4 สามารถเกิดปฏิกิริยาไดออกซิจีเนชันได้กับซีสเตรทที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติกหลายชนิด และมีรายงานกล่าวถึงไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ N3 ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน 2 อะตอมเข้าที่พันธะคู่ของสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ ได้แก่ เบนซีนและอนุพันธ์ของเบนซีนชนิดต่างๆ ไบฟีนิล และสารประกอบ PAHs บางชนิด เช่น อะซีแนพธิดีน แอนทราซีน พีแนนทริน แอนทราควิโนน และฟลูออรีน (Gennaro และคณะ, 1997)

จากการศึกษาการแสดงออกของ *acnK* ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ประมวลรหัส 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ให้เป็นกรดพธาลิกในวิถีการย่อยสลายพีแนนทริน (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เมื่อใช้กรด 1-แนพโทอิกเป็นซีสเตรท พบว่าไม่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของ *acnK* ที่เวลาใดๆ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก *acnK* อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารมัธยันตร์ที่ต่อจากกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 1-แนพโทอิก แต่ยีนอาจมีการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอในช่วงเวลาสั้นๆ และจากนั้นอาร์เอ็นเอจะถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็ว (Wilson และคณะ, 1999, Widada และคณะ, 2002) โดย Fleming และคณะ (1993) กล่าวว่าอาร์เอ็นเอเข้ารหัสของ *nahA* ที่ประมวล

รหัสแนพธาลีนไดออกซีจีเนสบนพลาสมิด NAH7 ของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 มีครึ่งชีวิต (half life) หลังจากมีการถอดรหัสเพียง 12 นาที

ในงานวิจัยนี้ยังได้ใช้แนพธาลีนเป็นซับสเตรทเพื่อชักนำการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* เนื่องจากแนพธาลีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 สามารถใช้ในการเจริญได้ (ศรีลยา แพงไตร, 2543) จากการศึกษาพบว่าแนพธาลีนไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ในช่วงเวลาที่ศึกษาคือ 18 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการชักนำการแสดงออกโดยแนพธาลีนเกิดขึ้นได้ช้ากว่าอะซีแนพธาลีน เช่นเดียวกับ Marlowe และคณะ (2002) รายงานว่าพีแนพทรินมีการชักนำการแสดงออกของ *nahAc* ที่ประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit ของไดออกซีจีเนสใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ PpG7 ในชั่วโมงที่ 312 ของการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อพิจารณาจากพีโนไทป์ของสายพันธุ์กลาย E11 ซึ่งทรานสโปซอน Tn5 เข้าแทรกสอดบริเวณ *acnE* ที่ประมวลรหัสโปรตีนซึ่งมีความเหมือน 38% กับไฮดราเทส-อัลโดเลสที่ประมวลรหัสโดย *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ในขณะที่มีรายงานเกี่ยวกับไฮดราเทส-อัลโดเลสที่ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของกรด ทรานส-โอ-ไดไฮดรอกซีเบนซิลิดีนไพรูวิก (*trans-o*-hydroxybenzylidene-pyruvic acid; tHBPA) ได้เป็นซาลิไซลัลดีไฮด์ (salicylaldehyde) ในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนและพีแนพทริน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าสายพันธุ์กลาย E11 ไม่สามารถเจริญในอะซีแนพธาลีน อะซีแนพโทควิโนน กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 1-แนพโทอิก แต่สามารถเจริญในแนพธาลีนได้ (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544) ดังนั้นจึงคาดว่ายีนประมวลรหัสไฮดราเทส-อัลโดเลส (*acnE*) และยีนประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (*acnK*) ที่พบใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายแนพธาลีน แต่จำเพาะกับการย่อยสลายสารมัธยันตร์ในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธาลีนหลังจากขั้นตอนกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 1-แนพโทอิก โดยธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้เสนอไว้ว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 น่าจะมีเอนไซม์เฉพาะในการย่อยสลายแนพธาลีนแยกต่างหากจากเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธาลีน

สายพันธุ์ CU-A1 ไม่สามารถใช้อะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ (ศรัลยา แพงไตร, 2543) แต่มีรายงานว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนและอะซีแนพทีลินแบบโคออกซิเดชัน (cooxidation) ได้ เช่น *Alcaligenase eutrophus* และ *A. paradoxus* (Selifonov และคณะ, 1993) และ *Burkholderia cepacia* สายพันธุ์ F297 (Grifoll และคณะ, 1995) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ติดตามการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* ของสายพันธุ์ CU-A1 เมื่อใช้อะซีแนพทีนเป็นซับสเตรทด้วย ผลจากปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอไรส์แสดงให้เห็นว่า อะซีแนพทีนไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของ *acnAc* และ *acnK* ได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับการที่สายพันธุ์ CU-A1 ไม่สามารถใช้อะซีแนพทีนเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ ดังนั้นจึงคาดว่า *acnAc* และ *acnK* น่าจะมีความจำเพาะกับการย่อยสลายอะซีแนพทีลินเท่านั้น

งานวิจัยนี้ยังได้ใช้กลูโคสและซัคซิเนตซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถใช้เพื่อการเจริญได้ง่ายโดยไม่ต้องผ่านวิถีการย่อยสลายที่ซับซ้อน จึงสามารถใช้ซับสเตรททั้งสองชนิดเพื่อศึกษาว่า *acnAc* และ *acnK* มีการแสดงออกตลอดเวลาหรือไม่ ผลการศึกษาแสดงว่า *acnAc* และ *acnK* ไม่มีการแสดงออกเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและซัคซิเนต ทั้งนี้อาจเนื่องจากไม่มีสารชักนำการแสดงออกคือ อะซีแนพทีลินในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายพีแนทรีนและแนพทาลีนของ *Pseudomonas rhodesiae* สายพันธุ์ KK1 ที่ไม่มีการแสดงออกเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ KK1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส แต่แสดงออกเมื่อมีพีแนทรีนหรือแนพทาลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kahng และคณะ, 2002) และยีนประมวลรหัส  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสสำหรับย่อยสลายไดเบนโซฟูแรน (*dfdA1*) ใน *Terrabacter* sp. สายพันธุ์ YK3 มีการแสดงออกเมื่อถูกชักนำด้วยไดเบนโซฟูแรน แต่ไม่มีการแสดงออกของ *dfdA1* เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอจากเชื้อสายพันธุ์ YK3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (lida และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากลูโคส และซัคซิเนตอาจมีกลไกกดการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก (catabolic repression) ดังเช่นรายงานของ Semba และคณะ (2001) รายงานว่ากลูโคสและซัคซิเนตกดการแสดงออกของยีน *pahA* ซึ่งประมวลรหัสไดออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีนของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ OUS82 โดยซัคซิเนตจะกระตุ้นการทำงานของ *acc* ซึ่งประมวลรหัสคล้ายกับ *crc* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเกิด catabolic repression โดยซัคซิเนตใน *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 ทำให้กดการทำงานของ *pahA* ส่วนกลูโคสกดการทำงานของ *pahA* เช่นเดียวกันแต่ไม่เกี่ยวข้องกับ *acc* จึงคาดว่ากลูโคสอาจกดการทำงานของ *pahA* ด้วยกลไกอื่น

โดย Shingler (2003) กล่าวว่ากลูโคสมีกลไกอื่น ๆ ยับยั้งการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกของเชื้อกลุ่ม *Pseudomonads* และสายพันธุ์ใกล้เคียงแตกต่างกันไปจากการยับยั้งการทำงานของยีนโดยระบบ cAMP-CRP ใน *E. coli* โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้าง  $\sigma^{54}$  ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ที่จะนำไปสู่การถอดรหัสของยีน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ายีนทั้งสองเป็นยีนที่ถูกชักนำได้

กรดโปรโตคาทิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสายพันธุ์ CU-A1 สามารถใช้ในการเจริญได้ (ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์, 2544) และพบว่ากรดโปรโตคาทิกเป็นสารมัธยันตร์ในวิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในจุลินทรีย์บางชนิด เช่นวิถีการย่อยสลายพีแนทรีนโดย *Aeromonas* sp. โดยพีแนทรีนจะถูกย่อยสลายจนได้กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิก (1-hydroxy-2-naphthoic acid) และจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็น 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ กรดพธาลิก และโปรโตคาทิกตามลำดับ (Kiyohara และคณะ, 1976, Kiyohara และ Nagao, 1978) นอกจากนี้ในวิถีการย่อยสลายไพรีนของ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ KR2 มีการย่อยสลายไพรีนจนได้กรด 1-ไฮดรอกซี-2-แนฟโธอิกและถูกย่อยสลายต่อไปโดยวิถีการย่อยสลายพีแนทรีนจนได้กรดโปรโตคาทิกเช่นเดียวกัน (Rehmann และคณะ, 1998) ในงานวิจัยนี้พบว่ากรดโปรโตคาทิกไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการสะสมสารมัธยันตร์ในเชื้อสายพันธุ์กลายของสายพันธุ์ CU-A1 โดยศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์ (2545) พบกรดเจทิลิกเป็นสารมัธยันตร์สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Rhizobium* sp. CU-A1 สายพันธุ์กลาย A53 และยังพบสารมัธยันตร์มาเลิลไพรูเวทและฟูมาริลไพรูเวท ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายกรดเจทิลิก (Zhou และคณะ, 2001) ในขณะที่ไม่พบซัคซินิลโคเอและอะซีทิลโคเอ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลายกรดโปรโตคาทิกผ่านวิถีเบต้า-คีโตแอดิเพธ (Parke และ Ornston, 1986)

อย่างไรก็ตาม Poonthrigpun (2006) ยังได้รายงานถึงการพบกิจกรรมของไดออกซีจีเนสเมื่อเลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดโปรโตคาทิกเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย ซึ่งสามารถพบกิจกรรมของไดออกซีจีเนสในระดับต่ำ แต่เมื่อให้อะซีแนพธิลีนเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ามีความกิจกรรมของไดออกซีจีเนสเพิ่มขึ้นถึง 60% ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ายีนประมวลรหัสไดออกซีจีเนสของ CU-A1 ถูกชักนำให้แสดงออกโดยกรดโปรโตคาทิกได้ในระดับต่ำๆ สอดคล้องกับรายงานของ Ornston (1971) ที่กล่าวว่ากรดโปรโตคาทิกสามารถชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีทิลโคเอในวิถีการย่อยสลายเบต้า-คีโตอะดิ



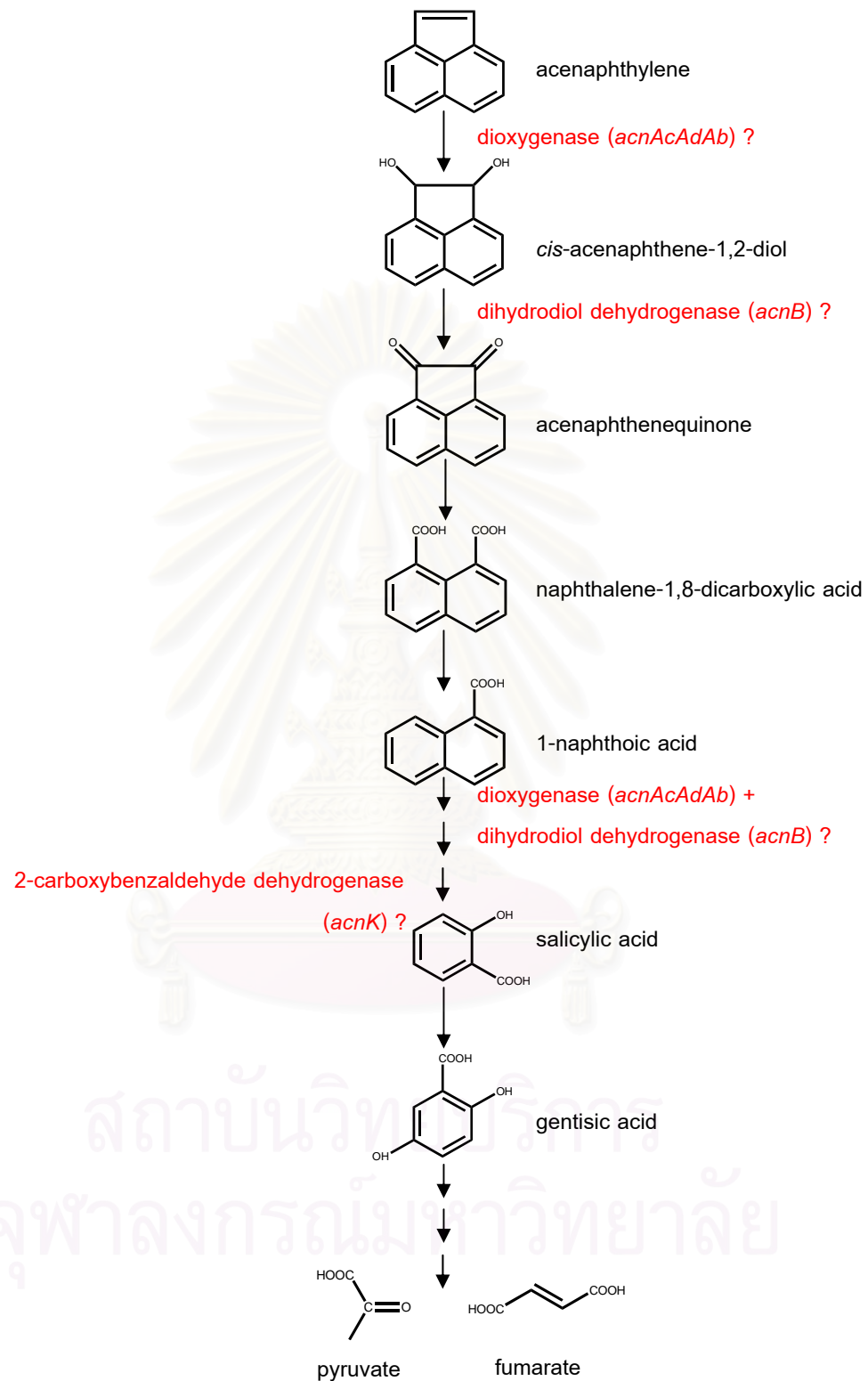
เพธ ( $\beta$ -ketoacid pathway) ในแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonads* แต่วิธีการติดตามการ แสดงออกของยีนโดยปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถอดรหัสย้อนกลับอาจไม่สามารถตรวจวัดได้ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ การถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็วโดยนิวคลีเอส ในขณะที่ทำการทดลอง (Fleming และคณะ, 1993, McGarvey และ Quandt, 2003, Deustcher, 2006)

งานวิจัยนี้ยังได้พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 น่าจะมีการถอดรหัสร่วมกันเป็นโอเปอรอนที่ประกอบด้วย *acnAcAdAbB* ที่ประมวลรหัส  $\alpha$ - และ  $\beta$ -subunit และเพอร์ริดอกซินของไดออกซิจีเนส และไดไฮโดรไดออกดีไฮโดรจีเนส จากปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์แบบถอดรหัสย้อนกลับที่ใช้โพลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์คร่อมระหว่าง *acnAc* และ *acnAd* *acnAd* และ *acnAb* *acnAb* และ *acnB* พบว่า *acnAcAdAbB* มีการถอดรหัสร่วมกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ของยีนที่ประมวลรหัสสำหรับไดออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหลาย subunit และการจัดเรียงตัวของยีนมีความใกล้เคียงกันมาก ทั้งยังพบบริเวณที่เป็นโปรโมเตอร์เพียงตำแหน่งเดียวบริเวณ upstream ของ *acnAc* (ดวงกมล ฐูปมงคล, 2546) จึงคาดว่า *acnAcAdAbB* จะมีการจัดเรียงตัวกันอยู่เป็นโอเปอรอน ซึ่งรายงานส่วนใหญ่พบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติก มีการเรียงตัวเป็นโอเปอรอน ดังเช่น ยีนประมวลรหัสแนพทาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ G7 และสายพันธุ์ NCIB 9816-4 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มคล้าย *nah* (*nah*-like) มีการเรียงตัวเป็น *nahAaAbAcAd* โดยประมวลรหัสรีดักเทส เพอร์ริดอกซิน ISP large subunit ( $\alpha$ -subunit) และ small subunit ( $\beta$ -subunit) ตามลำดับ (Simon และคณะ, 1993) ยีนประมวลรหัสเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายแนพทาลีนของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 มีการเรียงตัวเป็น *nagAaGHAbAcAdBFCQED* (Zhou และคณะ, 2001) ยีนประมวลรหัสเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายพีแนนทรินและแนพทาลีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 มีการเรียงตัวเป็น *phnSFECDAcAdB* (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เป็นต้น



เมื่อนำข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้ทำการศึกษามาประกอบการพิจารณาพร้อมกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 จึงคาดว่ายีนที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน โดย *acnAcAdAb* น่าจะแปลรหัสเป็นไดออกซิจีเนสทำหน้าที่ในการย่อยสลายอะซีแนพริลีนไปเป็น ซิส-1,2-อะซีแนพริลไดออล จากนั้น *acnB* แปลรหัสเป็นไดไฮโดรไดออล ดีไฮโดรจีเนสย่อยสลาย ซิส-1,2-อะซีแนพริลไดออลต่อไปเป็นอะซีแนพริลควิโนน ส่วน *acnK* ซึ่งประมวลรหัส 2-คาร์บอกซิเบนซัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารมัธยันตรีนในวิถีย่อยสลายอะซีแนพริลีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในวิถีการย่อยสลายหลังจากกรด 1-แนพโทอิก และคาดว่า *acnAcAdAbB* น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรด 1-แนพโทอิกในต่อไปได้ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 5.2

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *acnAc* ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 กับลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบอะโรมาติกชนิดต่างๆ ซึ่ง Hirano และคณะ (2006) กล่าวไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 206 216 219 และ 226 ของ DbdCa ซึ่งเป็น  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสของ *Xanthobacter polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W น่าจะมีผลทำให้บริเวณที่จับกับซับสเตรทของไดออกซิจีเนสขยายขึ้น จึงมีความจำเพาะต่อซับสเตรทได้หลายชนิด โดย AcnAc ซึ่งเป็น  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสที่พบใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีความเหมือนกับ DbdCa มากที่สุดคือมีความเหมือน 76% (ดวงกมล ฐปมงคล, 2546) พบว่า AcnAc มีลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 206 216 219 และ 226 แตกต่างจาก DbdCa และ  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสชนิดอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 5.3 จึงคาดว่า  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนส ที่ประมวลรหัสโดย *acnAc* ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 น่าจะเป็นไดออกซิจีเนสชนิดใหม่ที่สามารจับกับอะซีแนพริลีนแล้วเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้



รูปที่ 5.2 ไดอะแกรมเสนอความเกี่ยวข้องของยีนของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 กับวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีลีน ตัวอักษรสีแดงคือ ยีนและเอนไซม์ที่เสนอในวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทีลีนของ CU-A1

	206	216	219	226			
	↓	↓	↓	↓			
<b>AcnAc:</b>	GIQKWVIPC	NWKF	AAEQ	AASDAYHAGTTS	SHLSGIMAGVPDDVDLS-QVAPPTTGLNVHMS-N-GHGCG-L		
<b>DbdCa:</b>	GVQKFVI	PANWK	FAAEQ	FGSIA	YHAGTTAHVSGI IAGVPAGTDLS-KVQPPTDGMNVYIG-N-GHGCG-L		
<b>TodC1:</b>	GVQKWVIPC	NWKF	AAEQ	FCSIM	YHAGTTS	SHLSGI LAGLPEDLEMA-DLAPPTVGKQYRASWG-GHGSG-F	
<b>TcbAa:</b>	GVQKWVIPC	NWKF	AAEQ	FCSIA	YHAGTTS	SHLSGI LAGLPDGVELA-DLALPTVGKQYRAPWG-GHGTG-F	
<b>BphA1:</b>	GMQKWVIPC	NWKF	AAEQ	FCSIM	YHAGTMS	SHLSGI LAGMPP	EMDLS-HAQVPTKGNQFRAGWG-GHGSG-W
<b>NahAc:</b>	PPGKVVIK	ANWK	KAP	AE	NFVGI	AYHVGWT-HASSLRSGESI FSSLAGNAALPPEGAGLQMTSKYGS	GMGVL

รูปที่ 5.3 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$ -subunit ของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ประมวลผลโดย *acnAc* กับลำดับกรดอะมิโนของ  $\alpha$ -subunit ของไดออกซิจีเนสชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคเบนไซโทโอพิน ไดออกซิจีเนส (DbdCa) ของ *X. polyaromaticivorans* สายพันธุ์ 127W, โทลูอิน ไดออกซิจีเนส (TodC1) ของ *P. putida* สายพันธุ์ F1, คลอโรเบนซีน ไดออกซิจีเนส (TcbAa) ของ *P. putida* สายพันธุ์ P51, ไบฟีนิล ไดออกซิจีเนส (BphA1) ของ *P. pseudoalcaligenes* สายพันธุ์ KF707 และ แนพธาลีน ไดออกซิจีเนส (NahAc) ของ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 ตามลำดับ หมายเลข 206 216 219 และ 226 แสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลง (ดัดแปลงจาก Hirano และคณะ, 2006)

อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับนี้ เป็นเพียงการวิเคราะห์การถอดรหัสของยีน (transcription) ในแบบกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ไม่สามารถใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต้องการหาปริมาณที่แน่นอนได้ ดังนั้นในงานวิจัยที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนอย่างละเอียดจึงนิยมใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับชนิด Real-Time (Real-time RT-PCR) แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แบบ Real-time RT-PCR จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับการคำนวณที่จำเพาะเจาะจงซึ่งมีราคาสูง (Sharkey และคณะ, 2004) และข้อดีของการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบถอดรหัสย้อนกลับคือ สามารถใช้ติดตามการแสดงออกของยีนได้ในระดับการถอดรหัสเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนผลิตภัณฑ์ของยีนต่อไป

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- จรัญญา ณรงค์ชวณะ. 2536. การศึกษาวีเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ. หน้า 18.55-18.63  
 วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ) เทคนิคทางอณูพันธุ  
 ศาสตร์และพันธุวิศวกรรม เล่ม 2 สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย
- จิตติวรดา นินทนาวงศา. 2546. การแยกและลักษณะสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีบนของการ  
 ย่อยสลายอะซีแนพธิดีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต  
 สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ดวงกมล ฐปมงคล. 2546. ยีนประมวลรหัสไดออกซิจีเนสสำหรับการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนใน  
*Rhizobium* sp. CU-A1 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทาง  
 อุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ทิพวรรณ ล้อรัตนชัยยงค์. 2545. การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ  
 ย่อยสลายอะซีแนพธิดีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 วิทยานิพนธ์ปริญญา  
 มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยา  
 ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์. 2544. การสร้างสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์จากการย่อยสลาย  
 อะซีแนพธิดีนและการติดฉลากด้วยโปรตีนเรืองแสงสีเขียวของ *Rhizobium* sp. CU-A1  
 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุ  
 ลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศรัลยา แพงไทร. 2543. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนโดย  
 แบคทีเรียที่ออกซิไดซ์อะซีแนพธิดีน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุ  
 ลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
 มหาวิทยาลัย
- ศิริวัตร ปุณฺทริกพันธ์. 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะ  
 ซีแนพธิดีนโดยสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน  
 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุ  
 ลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาษาอังกฤษ

- Adams, R. L. P, Knowler, J. T. and Leader, D. P. 1992. p. 632-634. Mapping of RNA transcripts. In Adams, R. L. P, Knowler, J. T. and Leader, D. P.(eds.), The Biochemistry of the Nucleic Acids. Chapman & Hall, UK.
- Ahn, S., Ghiorse, W. C., Lion, L. W. and Shuler, M. L. 1998. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. Biotechnol. Bioeng. 59(5): 587-594.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidan, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, New York.
- Bahar, M., 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 degradative pathway. Mol. Plant. Microbe. Interact. 11(11): 1057-1068.
- Barnes, M. R., Duetz, W. A. and Williams, P. A. 1997. A 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globerulus* PWD1: cloning and characterization of the *hpp* operon. J. Bacteriol. 179(19): 6145-6153.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E. and Moore, E. R. B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.
- Boorstein, W. R. and Craig, E. A. 1998. Primer extension analysis of RNA. p. 347-349. In Dahlberg, J.E. and Abelson, J.N.(eds.), Methods in Enzymology volume 180. Academic Press, USA.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.
- Dagher, F., Déziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisailon, J. and Villemur, R. 1996. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Can. J. Microbiol. 43: 368-377.



- 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: 6890-3901.
- Deustcher, M. P. 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. Nucleic Acids Research. 34(2): 659-666.
- Ensley, B. D., Gibson, D. T. and Laborde, A. L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 149: 948-954.
- Ensley, B. D. and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 174: 7542-7554.
- Faust, R. A. (ed.) 1994. Toxicity summary for acenaphthylene [online]. <http://cira.oml.gov/documents/Acenaphthylene%20.pdf>. Accessed 5 December 2003.
- Fleming, J. T., Sanseverino, J. and Saylor, G. S. 1993. Quantitative relationship between naphthalene catabolic gene frequency and expression in predicting PAH degradation in soils at town gas manufacturing sites. Environ. Sci. Technol. 27: 1068-1074.
- Fukumori, F. and Saint, C.P. 1997. Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1). J. Bacteriol. 179(2): 399-408.
- Gennaro, P. D., Sello, G. Bianchi, D. and D'Amico, P. 1997. Specificity of substrate recognition by *Pseudomonas fluorescens* N3 dioxygenase. J. Bio. Chem. 272(48): 30254-30260.
- Goyal, A. K. and Zylstra, G. J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. Appl. Environ. Microbiol. 62: 230-236.

- Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V. and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Grimm, A. C. and Harwood, C. S. 1999. NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. J. Bacteriol. 180(10): 3310-3316.
- Habe, H. and Omori, T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotech. Biochem. 67(2): 225-243.
- Haddock, J. D. and Gibson, D. T. 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. J. Bacteriol. 177: 5834-5839.
- Hedlund, B. P., Geiselbrecht, A. D., Bair, T. J. and Staley, J. T. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. Nov. Appl. Environ. Microbiol. 65(1): 251-259.
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P. and Cerniglia, C. E. 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: estimates of degradation rates and characterization of metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 53(1): 129-136.
- Hirano, S., Haruki, M., Takano, K., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 2006. Gene cloning and in vivo characterization of a dibenzothiophene dioxygenase from *Xanthobacter polyaromaticivorans*. Appl. Microbiol. Biotech. 69(6): 672-681.
- Hübner, A., Danganan, C. E., Xun, L., Chakrabarty, A. M. and Hendrickson, W. 1998. Gene for 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: characterization of the *tftC* and *tftD* genes and locations of the *tft* operons on multiple replicons. Appl. Environ. Microbiol. 64(6): 2086-2093.
- Iida, T., Mukouzaka, Y., Kakamura, K. and Kudo, T. 2002. Plasmid-borne genes code for an angular dioxygenase involved in dibenzofuran degradation by *Terrabacter* sp. strain YK3. Appl. Environ. Microbiol. 68(8): 3716-3723.

- Iwabuchi, T. and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, and enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179(20): 6488-6494.
- Jones, R. M., Britt-Compton, B. and Williams, P. A. 2003. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator. J. Bacteriol. 185(19): 5847-5853.
- Kahng, H. Y., Nam, K., Kudor, J. J., Yoon, B. J., Lee, D. H., Oh, D. C., Kam, S. K. and Oh, K. H. 2002. PAH utilization by *Pseudomonas rhodesiae* KK1 isolated from a former manufactured-gas plant site. Appl. Microbiol. Biotech. 60: 475-480.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68(2): 699-704.
- Kitagawa, W., Suzuki, A., Hoaki, T., Masai, E. and Fukuda, M. 2001. Multiplicity of aromatic ring hydroxylation dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 demonstrated by denaturing gradient gel electrophoresis. Biosci. Biotech. Biochem. 65(8): 1907-1911.
- Kiyohara, H., Nagao, K. and Nomi, R. 1976. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. Agric. Biol. Chem. 40: 1075-7082.
- Kiyahara, H. and Nagao, K. 1978. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. J. Gen. Microbiol. 105: 69-75.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Lida, T., Hayashi, H. and Takizawa, N. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176(8): 2439-2443.
- 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.

- Kricka, L. J. 1992. Nonisotopic DNA Probe Techniques. 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, San Diego.
- Kulakova, A. N., Kulakov, L. A., Akulenko, N. V., Ksenzenko, V. N., Hamilton, J. T. G. and Quinn, J. P. 2001. Structural and functional analysis of phosphonoacetate hydrolase (*phnA*) gene region in *Pseudomonas fluorescens* 23F. J. Bacteriol. 183(11): 3268-3275.
- Kulakov, L. A., Chen, S., Allen, C. C. R. and Larkin, M. J. 2005. Web-Type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. Appl. Environ. Microbiol. 71(4): 1754-1764.
- Larkin, M. J., Allen, C. C. R., Kulakov, L. A. and Lipscomb, D. A. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. J. Bacteriol. 181(19): 6200-6204.
- Laurie, A. D. and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* gene of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.
- Lessne, D. J. Parales, R. E., Narayan, S. and Gibson, D. T. 2003. Expression of the nitroarene dioxygenase genes in *Comamonas* sp. strain JS765 and *Acidovorax* sp. strain JS42 is induced by multiple aromatic compounds. J. Bacteriol. 185(13): 3895- 3904.
- McGarvey, D.J. and Quandt, A. 2003. p. 140. Stabilisation of RNA prior to isolation. In Lorkowski, S. and Cullen (eds.), Analysing Gene Expression: A Handbook of Possibilities and Pitfalls. Wiley-VCH, Germany.
- McKay, D. B, Prucha, M., Reineke, W., Timmis, K. N. and Pieper, D. H. 2003. Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6. J. Bacteriol. 185: 2944-2951.
- Marlowe, E. M., Wang, J. M., Pepper, I. L. and Maire, R. M. 2002. Application of a reverse transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic *nahAc* gene during phenanthrene degradation. Biodegradation. 13: 251-260.

- Omori, T., Monna, L., Saiki, Y. and Komma, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. Appl. Environ. Microbiol. 58L 911-918.
- Ornston, L. N. 1971. Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonas*. Bacteriol. Rev. 35(2): 87-116.
- Parke, D. and Ornston, N. L. 1986. Enzyme of the  $\beta$ -keto adipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. J. Bacteriol. 165(1): 288-292.
- Patnaik, P. 1992. Hydrocarbon, aromatic. p. 425-445. In Patnaik, P. (ed.), A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner, D. J. and Gibson, D. T. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of amino acid at the active site of the enzyme. J. Bacteriol. 182(6): 1641-1649.
- Parales, R. E. 2003. The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 271-278.
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H. and Omori, T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. FEMS Microbiol. Lett. 238(2): 297-305.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., Müller, R. and Pinphanichakarn, P. 2006. Oxidation of acenaphthylene by cell free extract from *Rhizobium* sp. CU-A1. Abstract: International conference of hazardous waste management for sustainable future, Bangkok, Thailand. p 132.
- Rapley, R. 2000. Molecular cloning and gene analysis. p. 184-186. In Wilson, K. and Walker, J.(eds.), Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press, UK.
- Rehmann, K., Noll, H. P., Steinberg, C. E. W. and Kettrup, A. A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. Chemosphere. 36(14): 2977-2992.



- Rhee, S. K., Liu, S., Wu, L., Chong, S. C., Wan, X. and Zhou, J. 2004. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. Appl. Environ. Microbiol. 70(7): 4303-4317.
- 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 from *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. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schell, M. A. 1983. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7. J. Bacteriol. 153: 822-829.
- Schell, M. A. 1986. Homology between nucleotide sequences of promoter regions of *nah* and *sal* operons of NAH7 plasmid of *Pseudomonas putida*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 369-373.
- 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., Slepkin, 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.

- Semba, S., Kawazu, H., Kiyohara, H. and Takizawa, N. (ed.) 2001. Acc: a negative controlling factor on the aromatic hydrocarbon catabolism of *Pseudomonas putida* OUS82. [online]. <http://www2.dac.ous.ac.jp/kiyo/abst-1999.html>. Accessed 2 February 2006.
- Sharkey, F. H., Banat, I. M. and Marchant, R. 2004. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7): 3795-3806.
- Shingler, V. 2003. Intergrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behavior. *Environ. Microbiol.* 5(12): 1226-1242.
- 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.
- Smith, C. A. and Wood, E. J. 1991. *Protein biosynthesis*. p. 63-66. In Smith, C. A. and Wood, E. J.(eds.), *Molecular Biology and Biotechnology*. Chapman & Hall, UK.
- Stroncek, J., Denery, J. R., Li, Q. X. (ed.) 2005. Relationship between gene expression and cell metabolism in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. [online]. <http://www.jyi.org/research/re.php?id=142>. Accessed 15 February 2006.
- Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T. and Junthongjin, K. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluornathrene and pyrene via cometabolism. *Science Asia.* 27: 21-28.
- Taira, K., Hirose, J., Hayashida, S. and Furukawa, K. 1992. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Bio. Chem.* 267(7): 4844-4853

- Takeuchi, M., Hamana, K. and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* 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.
- Urata, M., Miyakoshi, M., Kai, S., Maeda, K., Habe, H., Omori, T., Yamane, H. and Nojiri, H. 2004. Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. J. Bacteriol. 186(20): 6815-6823.
- Werlen, C., Kohler, H. P. and Van Der Meer, J. R. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. J. Biol. Chem. 271: 4009-4016.
- Widada, J., Nojiri, H. and Omori, T. 2002. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. Appl. Microbiol. Biotech. 60: 45-49.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. and Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. Appl. Microbiol. Biotech. 58: 202-209.
- Williams, J. G. and Mason, P. J. 1985. Hybridization in the analysis of RNA. p. 139-160. *In* Hames, B.D. and Higgins, S.J. (eds.), *Nucleic Acid Hybridisation*. IRL Press, Oxford.
- Wilson, M. S., Bakermans, C. and Madsen, E. L. 1999. *In situ*, real - time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 65(1): 80-87.

- Yamada, A., Kishi, H., Sugiyama, K., Hatta, T., Nakamura, K. Masai, E. and Fukuda, M. 1998. Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. Appl. Environ. Microbiol. 64(6): 2006-2012.
- Yen, K. M. and Gunsalus, I. C. 1982. Plasmid gene organization: Naphthlene/salicylate oxidation. Proc. Nat. 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) (Sambrook และ Russell, 2001)

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

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar) (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM broth)

(Omori และคณะ, 1992)

ก) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโคเดคะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	5.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.8	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	3.0	กรัม

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ข) เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.05	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.10	กรัม

ละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. กรองผ่านแผ่นกรองที่ปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร เตรียมไว้ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง และเก็บที่อุณหภูมิ  $4^\circ \text{C}$  ผสมสารละลาย ก. และ ข. เข้าด้วยกัน

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Carbon Free Mineral Salt Medium (CFMM broth) ที่เติมสับเซตรชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

##### ก) อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีซัคซินेट

ละลายกรดซัคซินิก 1 กรัมในอาหารเหลว CFMM ข้อ 3 ก) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^\circ \text{C}$  ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นลงประมาณ  $55^\circ \text{C}$  จึงเติมสารละลายตามข้อ 3 ข) โดยวิธีปลอดเชื้อ

##### ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีกรดโปรโตคาทิวอิก

เตรียมสารละลายกรดโปรโตคาทิวอิกความเข้มข้นสูงโดยละลายกรดโปรโตคาทิวอิก 3.0 กรัมในเอทานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 12 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปราศจากเชื้อขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ  $4^\circ \text{C}$  เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

##### ค) อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีน

เตรียมสารละลายอะซีแนพธิดีนความเข้มข้นสูงโดยละลายอะซีแนพธิดีน 0.3 กรัมใน DMSO ปริมาตร 9 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ปราศจากเชื้อขนาด 0.20 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ  $4^\circ \text{C}$  โดยไม่ให้ถูกแสง เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) อาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นๆ

เตรียมสารละลายของสารประกอบ PAHs ความเข้มข้นสูงโดยละลาย 1 กรัมใน DMSO ปริมาตร 10 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป PTFE ปราศจากเชื้อขนาด 0.20 ไมครอนเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ โดยไม่ให้ถูกแสง เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. กาลีเซอรอล

นำกาลีเซอรอลมาหนึ่งชาม่าเชื่อมด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121<sup>o</sup>ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหนึ่งชาม่าเชื่อมซ้ำอีกรอบหนึ่ง

#### 2. สารปฏิชีวนะ

ละลายกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมในน้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพีพิจ์ที่อุณหภูมิ -20<sup>o</sup>ซ เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4<sup>o</sup>ซ ได้นาน 1 เดือน

#### 3. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอปริมาณน้อย RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Buffer RLT

Buffer RWT

Buffer RPE

Collection tube

QIAquick Spin column

ก่อนใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอครั้งแรกให้เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Buffer RLT ปริมาตร 1 มล. และเติมเอทานอลปริมาตร 44 มล. ลงใน Buffer RLP ปริมาตร 11 มล. และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4. ชุดดีเอ็นเอส I ปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free DNase Set) (Qiagen, Germany)

ประกอบด้วย

Lyophilized DNaseI

Buffer RDD

น้ำปลอดอาร์เอ็นเอส

ละลาย Lyophilized DNaseI ด้วยน้ำปลอดอาร์เอ็นเอสปริมาตร 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสมสารเพราะจะทำให้ดีเอ็นเอส I เสียสภาพ) แบ่งใส่หลอดไมโครพีพิจ์ที่ปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ก่อนใช้ผสมสารละลายดีเอ็นเอส I ปริมาตร 10 ไมโครลิตรกับ Buffer RDD ปริมาตร 70 ไมโครลิตร

#### 5. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเนื่องจากสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

#### 6. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB 10.0 กรัม

โซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์

ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที



## 7. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0

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

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. เติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.0 สำหรับอาร์เอ็นเอเตรียมโดยใช้น้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยสภาวะเดียวกัน

## 8. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 9. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

## 10. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 68 °ซ เติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ใช้ magnetic stirrer ค่อยๆคนเป็นเวลา 15 นาที ดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง เติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครึ่ง ค่อยๆคนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วดูดน้ำใส่ส่วนบนทิ้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งได้สารละลายที่ความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.8 (วัดด้วย pH paper) สุดท้ายเติม Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ที่ผสม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในขวดสีชาที่ปิดแน่น

## 11. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25:24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 12. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

## 13. Loading dye สำหรับดีเอ็นเอ

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

#### 14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

#### 15. สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายโซเดียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายโซเดียมอะซีเตทสำหรับอาร์เอ็นเอต้องละลายในน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอสแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเดียวกัน

#### 16. สารละลายโปรตีนเนสเค (Proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

#### 17. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

#### 18. น้ำปลอดอาร์เอ็นเอส

เติมสารละลายไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (Diethylpyrocarbonate; DEPC) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อน้ำปลอดประจุ 1,000 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 19. ฟีนอลสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ

หลอมละลายฟีนอลในรูปของแข็ง 250 กรัมในน้ำอุ่น 68 °ซ เติมผงไฮดรอกซีควิโนลีน ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 250 มล. ใช้ magnetic stirrer คนให้เข้ากันแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

### 20. RNA gel loading buffer

สารละลาย EDTA, pH 8.0	1	มิลลิโมลาร์
Bromphenolblue	0.25	%
Xylen cyanol	0.25	%
กลีเซอรอล	50	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอสปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

### 21. บัฟเฟอร์ 10X MOPS (3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid)

MOPS	41.8	กรัม
สารละลายโซเดียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ (สำหรับอาร์เอ็นเอ)	16.6	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์, pH 8.0 (สำหรับอาร์เอ็นเอ)	20	มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส ฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บในที่มืด

### 22. บัฟเฟอร์ 1X MOPS

เจือจางบัฟเฟอร์ 10X MOPS ปริมาตร 10 มล. ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ผสมให้เข้ากัน

## ภาคผนวก ค

### การเตรียมอุปกรณ์ปลอดอาร์เอ็นเอส

#### 1. เครื่องแก้ว

ล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาดแล้วนำไปอบเพื่อฆ่าเชื้อ และกำจัดอาร์เอ็นเอส ที่อุณหภูมิ 180° ซ เป็นเวลา 3 ชม.

#### 2. ภาชนะพลาสติก

ล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด ชะด้วยน้ำปลอดประจุปลอดอาร์เอ็นเอส (DEPC-DW) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. อุปกรณ์สำหรับทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ล้างอุปกรณ์สำหรับเตรียมอะกาโรสเจลและอุปกรณ์ทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสให้สะอาด ด้วยน้ำยาทำความสะอาด เช็ดด้วยสำลีปลอดเชื้อที่ชุบ 70% เอทานอล แล้วแช่อุปกรณ์ใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติม 0.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในอ่างสำหรับทำ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ชะด้วยน้ำปราศจากเชื้อปลอดประจุปลอดอาร์ เอ็นเอส

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริภัทร พฤษชัยไพบูลย์ เกิดเมื่อวันที่ 18 ตุลาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 และเข้ารับการศึกษาคณะศึกษาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย