



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาคุณลักษณะและยีนส์ของ malic enzymes ในไรโซเบียมที่แยกได้ ในประเทศไทย

Studies on characteristic and genes of malic enzymes in local rhizobia isolated in Thailand

โดย นาย สุวัฒน์ สิ้นสุวงศ์วัฒน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สัญญาเลขที่ MRG4680158

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาคุณลักษณะและยีนส์ของ malic enzymes ในไรโซเบียมที่แยกได้ ในประเทศไทย

Studies on characteristic and genes of malic enzymes in local rhizobia isolated in Thailand

โดย นาย สุวัฒน์ สินสุวงศ์วัฒน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ทบวงมหาวิทยาลัยและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการการศึกษาคุณลักษณะและยีนส์ของ malic enzymes ในโรสเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยแก่ข้าพเจ้า ภายใต้โครงการสนับสนุนการวิจัยแก่อาจารย์รุ่นใหม่ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัย สร้างสมประสบการณ์ เพื่อพัฒนาไปสู่การเป็นนักวิจัยที่มีคุณภาพของประเทศต่อไป อีกทั้งยังเป็นการสร้างกำลังใจ ความกระตือรือร้นทางวิชาการ และทำให้งานวิจัยเป็นส่วนหนึ่งในชีวิตประจำวันและวิชาชีพอาจารย์ในอนาคต ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. อัจฉรา นันทกิจ นักวิชาการเกษตร 7 กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ได้กรุณารับเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงของข้าพเจ้าในการทำวิจัยนี้ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำในการทำวิจัยและการสนับสนุนต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

ศุภวัฒน์ สิ้นสุวงศ์วัฒน์

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4680158

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณลักษณะและยีนส์ของ malic enzymes ในไรโซเบียมที่แยกได้ ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : ศุภวัฒน์ สีนสูงศ์วัฒน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : aiissnsw@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 เมษายน 2546 - 30 เมษายน 2552

การจัดจำแนกไรโซเบียม 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย โดย การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุม 16S rRNA และการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับไรโซเบียม มาตรฐานและ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ผลของการวิเคราะห์ 16S rDNA และความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมทำให้จัดจำแนกไรโซเบียมออกเป็น 6 สปีชีส์คือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* และ *Rhizobium galegae*. จึงคัดเลือก *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 เป็นตัวแทนของแต่ละสปีชีส์เพื่อใช้ในการตรวจสอบ กิจกรรมของ TME และ DME เปรียบเทียบกับไรโซเบียมมาตรฐาน 3 ชนิดคือ *Rhizobium meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 พบกิจกรรมของทั้ง DME และ TME มาลิคเอนไซม์ ในไรโซเบียมทั้ง 6 ชนิด เมื่อใช้ Native-PAGE และการย้อมสีตรวจกิจกรรมของ DME และ TME มาลิคเอนไซม์ พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในสารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดจาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 และ *B. japonicum* USDA122 จึงเลือก *B. japonicum* USDA122 เพื่อใช้ศึกษาการโคลนและตรวจสอบลักษณะ ยีนที่ควบคุมมาลิคเอนไซม์ ไพรเมอร์ ME1f และ ME1r ได้รับการออกแบบจากการลำดับการจัดเรียงตัวของ เบสบนบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ควบคุมมาลิคเอนไซม์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ME1 ขนาด 678 คู่เบสที่ คาดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีน dme ได้จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวโดย PCR ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน ME1 ถูกนำไปเปรียบเทียบกับ dme ยีนของจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยมีความเหมือนกับ dme ยีนของ *M. loti* (AP002995) 75.0% และของ *S. meliloti* (AF017443) 75.6% ดังนั้น จึงใช้ ME1 เป็นตัวติดตาม dme ยีน ในจีโนมของไรโซเบียม เมื่อเปรียบเทียบลำดับการจัดเรียงตัวของเบส ของ ME1 กับข้อมูลจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 จากสถาบันดีเอ็นเอ Kazusa ทำให้สามารถออกแบบ ไพรเมอร์หนึ่งคู่ คือ DMEf และ DMEr ไพรเมอร์นี้ออกแบบจากจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดที่คาดว่าจะ เป็น ORF ในจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้งสองในการทำ PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ *Bjdme2* จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ได้ ดีเอ็นเอที่ได้ถูกเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T ก่อน แล้วจึงโคลนอีกครั้งสู่เวกเตอร์ pET32a(+) เพื่อศึกษาการแสดงออก โปรตีนที่แสดงออกและผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถแสดงกิจกรรมของ DME เมื่อใช้ NAD⁺ และ NADP⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ โดยมีค่ากิจกรรมเป็น 0.316 และ 0.044 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ โปรตีน ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ Southern Blot พบว่าตัวติดตาม ME1 เข้าคู่กับ *Bjdme2* และให้สัญญาณชัดเจน DME ที่แสดงออกมีน้ำหนักโมเลกุล 83 และ 664 kDa เมื่อหาด้วย SDS-PAGE และ การย้อมสีกิจกรรมเอนไซม์ใน native-PAGE ตามลำดับ

คำหลัก : *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, Malic enzymes, DME and Thailand

Abstract

Project Code : MRG4680158

Project Title : Studies on characteristic and genes of malic enzymes in local rhizobia isolated in Thailand

Investigator : Suphawatt Sinsuwongwat, Department of Biotechnology, Chiangmai University

E-mail Address : aissnsw@chiangmai.ac.th

Project Period : 1st April 2003 – 30th April 2009

Twenty-six bacteria isolates nodules of leguminous plant in Thailand were identified by 16S rRNA gene analysis and biochemical test and compared with standard rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The result of 16S rRNA gene analysis and phylogenetic relationships identified their into six species, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium galegae*. Represents of each species *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 and *R. galegae* DASA12028 were determined of TME and DME activities and compared to those of 3 standard rhizobia, *Rhizobium meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 and *B. japonicum* USDA110. It was found that all six rhizobia showed both activities of DME and TME. Native-PAGE showed both activities staining of DME and TME in crude enzymes extracted from *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 and *B. japonicum* USDA122. *B. japonicum* USDA122 was selected for cloning and characterization of malic enzymes encoding genes. The degenerated primers, ME1f and ME1r, were designed according to the conserve region of malic enzyme genes, using the multiple sequence analysis. A proposed conserved region of DME gene (ME1: 678 bp) was amplified from genomes of *B. japonicum* USDA122 using those degenerated primers by PCR. The DNA sequence of the ME1 PCR product was compared with those DME genes of other microorganisms, the similarity in values was 75.0% with *M. loti* (AP002995) and 75.6% with *S. meliloti* (AF017443). Therefore, the ME1 PCR product used as a probe to follow the DME gene in rhizobium genome. When the DNA sequence of ME1 was compared with *B. japonicum* USDA110 genomic data of Kazusa institute, a set of PCR primers, DMEf and DMEr were designed based on the sequence at the beginning and end of proposed ORF on *B. japonicum* USDA110 genome. The PCR product (*Bjdme2*) amplified from *B. japonicum* USDA122 by those primers and subjected to pGEM[®]-T Easy Vector, then subcloned to pET32a(+) for expression. The expressed and purified protein showed the DME activity with NAD⁺ and NADP⁺ at 0.316 and 0.044 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively. The *Bjdme2* showed the strong signal with ME1 probe by Southern Blot analysis. The molecular weight of expressed DME was 83 kDa by SDS-PAGE and 664 kDa by native-PAGE with activity stain.

Keywords : *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, Malic enzymes, DME and Thailand

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
1.1. ตรวจสอบเอกสาร	1
2. วิธีการทดลอง	8
2.1 เชื้อจุลินทรีย์	8
2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ	8
2.3 การสกัดดีเอ็นเอ	8
2.4 การวิเคราะห์ยีน 16S-rDNA	9
2.5 การย้อมสีกรัม	10
2.6 การทดสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S)	10
2.7 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท(Citrate utilization)	10
2.8 การทดสอบความสามารถในการผลิต 3-ketolactose	11
2.9 การสกัดเอนไซม์	11
2.10 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของ NAD ⁺ -dependent malic enzyme (DME)	12
2.11 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของ NADP ⁺ -dependent malic enzyme (TME)	12
2.12 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์	12
2.13 การคำนวณค่ากิจกรรมของมาลิกเอนไซม์	13
2.14 การตรวจกิจกรรมเอนไซม์มาลิกในไรโซเปียมด้วย Native-PAGE	13
2.15 การพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ <i>dme</i> มาลิกเอนไซม์ยีน	14
2.16 การโคลน <i>dme</i> มาลิกเอนไซม์ยีน จาก <i>B. japonicum</i> USDA122 (<i>Bjdme2</i>)	14
2.17 การแสดงออกของ <i>dme</i> มาลิกเอนไซม์ยีน จาก <i>B. japonicum</i> USDA122 (<i>Bjdme2</i>)	15
2.18 การตรวจสอบหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไซม์	16
2.19 การวิเคราะห์ไโคเนติกส์ของ DME มาลิกเอนไซม์	16
2.20 การเข้ากันได้ของดีเอ็นเอคู่สม (Southern Hybridization)	16
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	18
3.1 การจัดจำแนกไรโซเปียมด้วยการวิเคราะห์ 16S-rDNA	18
3.2 การศึกษากิจกรรมของ DME และ TME ในไรโซเปียม	26
3.3 การศึกษากิจกรรมของ DME และ TME โดย Native-PAGE	27

3.4 การโคลนยีนที่ควบคุม DME มาลิกเอนไทม์	31
3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ <i>dme</i> ยีน	32
3.4.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อพิมพ์ขยาย <i>dme</i> ยีนที่สมบูรณ์	36
3.4.3 การโคลน <i>Bjdme2</i> มาลิกเอนไทม์ยีนที่สมบูรณ์ของ <i>B. japonicum</i> USDA122	43
3.4.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ <i>Bjdme2</i> มาลิกเอนไทม์ยีนที่สมบูรณ์ ของ <i>B. japonicum</i> USDA122	45
3.4.5 การตรวจหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไทม์	48
3.4.6 การวิเคราะห์โคเนดิกส์ของ DME มาลิกเอนไทม์	49
4. เอกสารอ้างอิง	51
5. ภาคผนวก	53

1. บทนำ

1.1. ตรวจเอกสาร

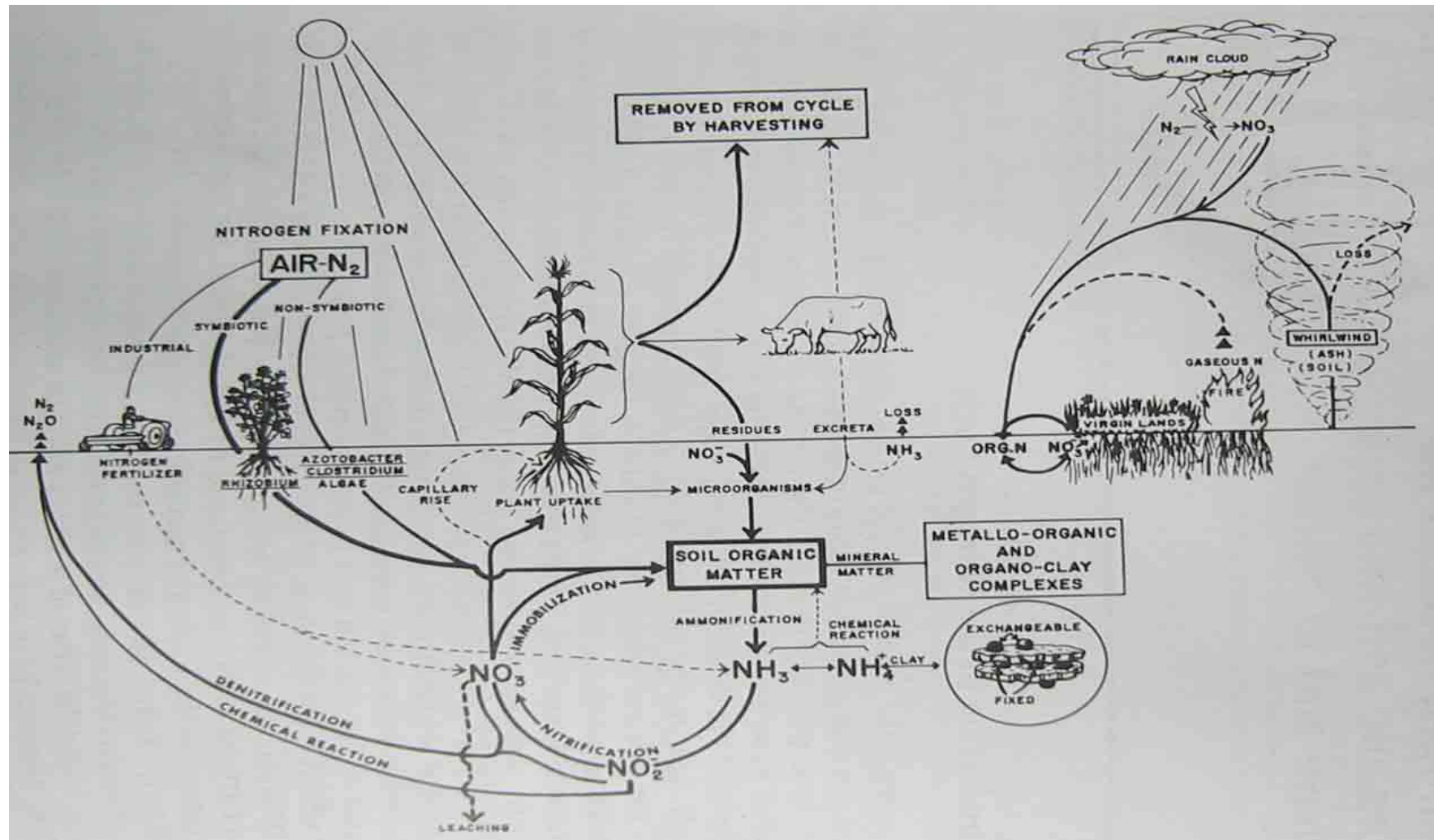
ไนโตรเจนเป็นหนึ่งในธาตุหลักในส่วนประกอบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งคาร์บอน, ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตในรูปแบบต่าง ๆ แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตและเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดคือ ก๊าซไนโตรเจนในชั้นบรรยากาศ แม้ว่าในบรรยากาศจะมีไนโตรเจนถึงร้อยละ 78 แต่พืชส่วนใหญ่ไม่อาจนำมาใช้ประโยชน์ได้ ธาตุไนโตรเจนอาจเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลายเป็นแอมโมเนียหรือไนเตรทโดย กระบวนการตรึงไนโตรเจน(nitrogen fixation) ซึ่งมีอยู่สองวิธี คือ การตรึงโดยกระบวนการทางเคมีอุตสาหกรรม (industrial chemical process) และการตรึงโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (natural process) ดังแสดงในภาพที่ 1

การตรึงโดยกระบวนการทางเคมีอุตสาหกรรม(industrial chemical process) ได้แก่ การผลิตแอมโมเนียโดยให้ไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ต่อจากนั้นก็นำแอมโมเนียไปผลิตปุ๋ยเคมีชนิดต่างๆ

การตรึงโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (natural process) ซึ่งสามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือ

- ออกซิเดชันของแก๊สไนโตรเจนในอากาศ เมื่อฟ้าแลบแก๊สไนโตรเจน ออกซิเจน และไอน้ำจะทำปฏิกิริยากันได้กรดไนตริก ซึ่งจะละลายในน้ำฝนและตกลงมาสู่พื้นดิน ส่วนนี้ราวร้อยละ 10 ของการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด

- การตรึงไนโตรเจนโดยชีววิธี (biological nitrogen fixation) การตรึงโดยชีววิธีมีความสำคัญมากเนื่องจากร้อยละ 90 ของไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยกระบวนการตามธรรมชาติมาจากกิจกรรมการตรึงของจุลินทรีย์ ซึ่งมี 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ การตรึงโดยสิ่งมีชีวิตที่เจริญแบบไม่พึ่งพาอาศัย(non-symbiosis) เช่น *Azotobacter*, *Clostridium* และ *Algae* กลุ่มที่ 2 คือ สิ่งมีชีวิตที่เจริญแบบพึ่งพาอาศัย(symbiosis) เช่น ไรโซเบียม (*rhizobium*) กับพืชตระกูลถั่ว



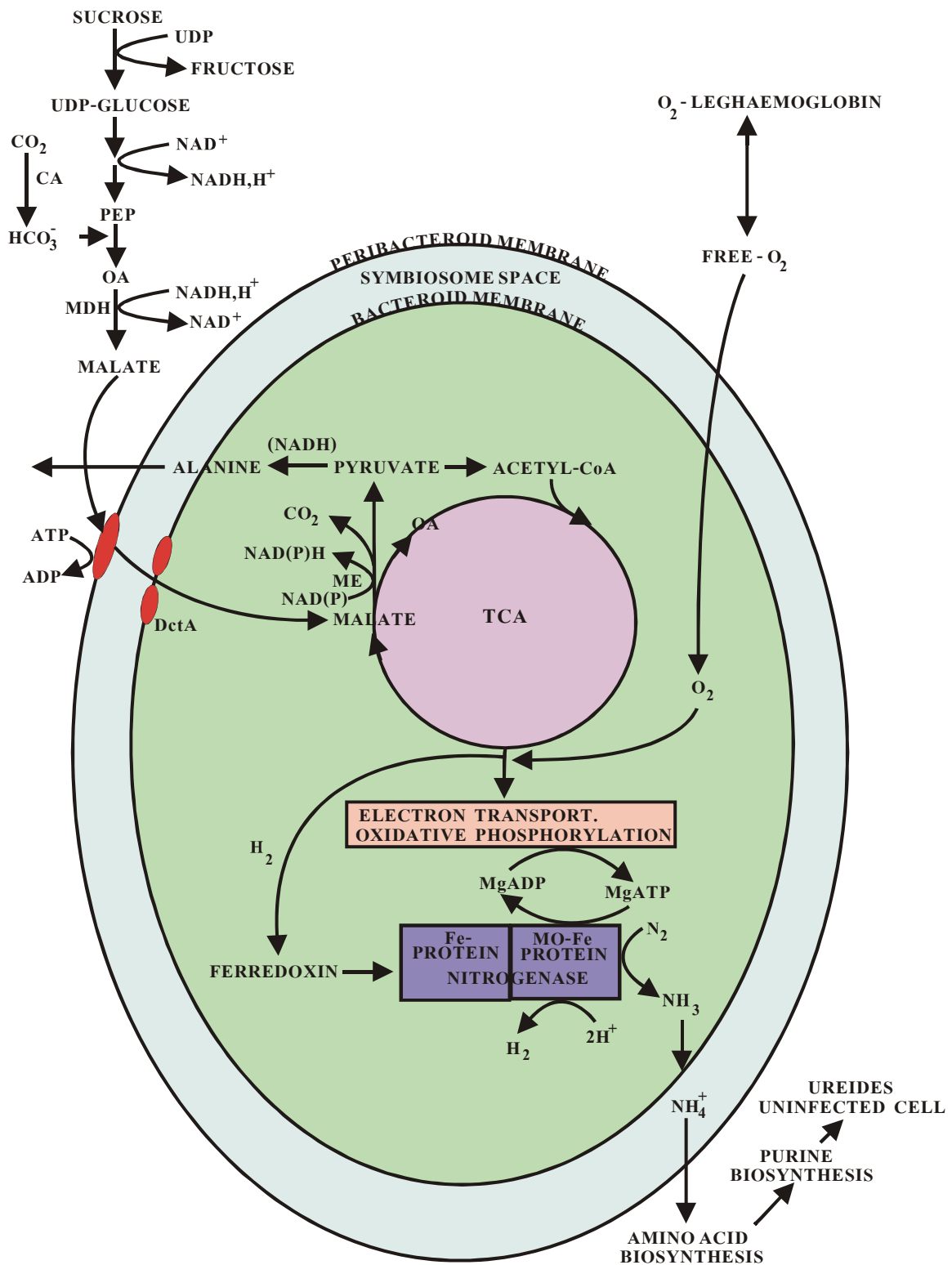
ภาพที่ 1. วัฏจักรไนโตรเจนในโลก. (Stevenson, 1982)

กลุ่มเบคทีเรียที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ สารประกอบคาร์บอนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสูง (C_4 -dicarboxylic acid) เช่น มาเลท (malate) และ ซัคซิเนท (succinate) เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการสร้าง ATP และพลังงานที่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนส การสังเคราะห์แสงเป็นสิ่งจำเป็นอันดับแรกที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของปมรากแก้ว และการเพิ่มจำนวนของเบคทีเรียในระยะแรกของการเข้าสู่รากพืช ซูโครส (sucrose) เป็นตัวหลักสำคัญที่เป็นอาหารแก่ปมราก โดยถูกส่งผ่านทางท่อลำเลียงอาหาร (phloem) กระบวนการเปลี่ยนซูโครสให้เป็นกรดอินทรีย์ (organic acid) ดังแสดงในภาพที่ 2

ในขั้นแรก ซูโครส จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ซูโครส ซินเทส (sucrose synthase; SSase) และมีการรวมตัวกับ UDP กลายเป็น UDP-glucose ซึ่งจะถูกลดต่อไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้น จะผ่านเข้าสู่กระบวนการคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation; CA) ที่เร่งปฏิกิริยาโดย ฟอสโฟอินอลไพรูเวท คาร์บอกซิเลส (phosphoenolpyruvate carboxylase; PEPCase) ได้ผลลัพธ์เป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) ซึ่งออกซาโลอะซิเตตนี้จะเปลี่ยนเป็นมาเลท ซึ่งเบคทีเรียสามารถรับเข้าสู่เซลล์ได้ และใช้เอนไซม์มาลิก (malic enzyme) ภายในเซลล์เปลี่ยนมาเลทให้กลายเป็นสารอินทรีย์ชนิดตัวอื่นๆ เพื่อใช้ในการสร้างพลังงาน (ATP) ต่อไป

มาลิกเอนไซม์ (malate oxidoreductase; ME) เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีคาร์บอกซิเลชัน (oxidative decarboxylation) ของมาเลท ให้อยู่ในรูปไพรูเวท และ คาร์บอนไดออกไซด์ มาลิกเอนไซม์มีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะต่อไพริมิดีน นิวคลีโอไทด์ (pyrimidine nucleotides) ตัวเร่ง ตัวยับยั้งปฏิกิริยา ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน ของออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate-decarboxylating activity) ตำแหน่งภายในเซลล์จุลินทรีย์ และหน้าที่ทางชีวภาพ จากความแตกต่างดังกล่าว สามารถจำแนกมาลิกเอนไซม์ได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

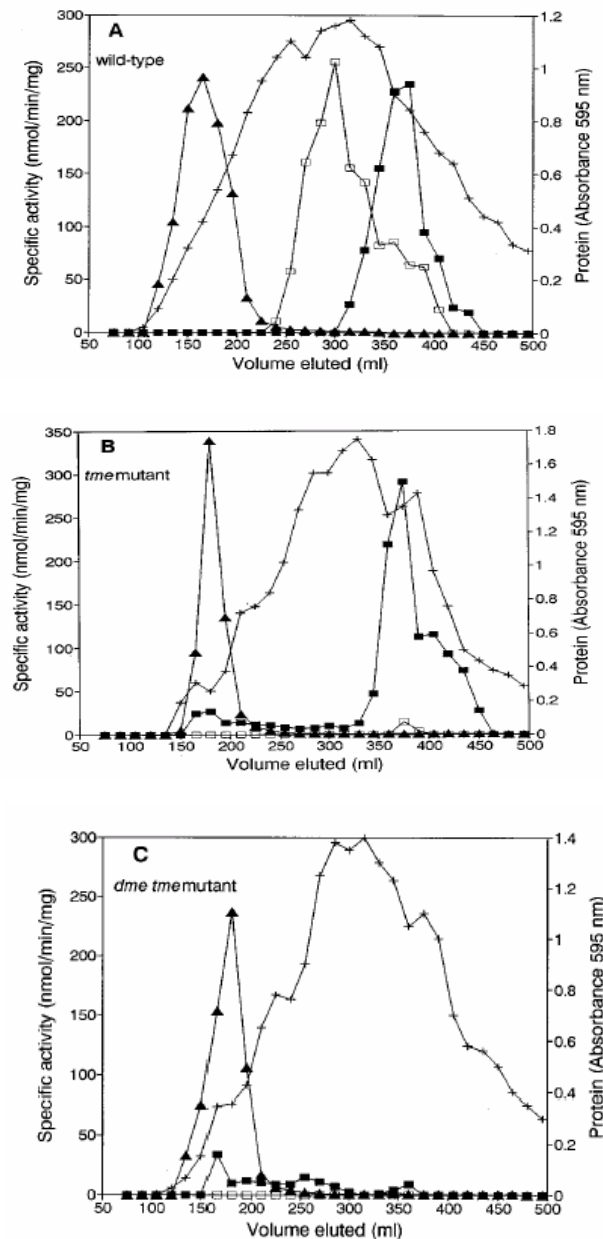
- NAD^+ -dependent malic enzyme (NAD^+ -ME, EC 1.1.1.38) เป็นเอนไซม์ ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของออกซาโลอะซิเตตได้ และใช้ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ ได้เพียงชนิดเดียว
- $NAD(P)^+$ -dependent malic enzyme ($NAD(P)^+$ -ME, EC 1.1.1.39) ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน ของออกซาโลอะซิเตตได้ สามารถใช้ได้ทั้ง NAD^+ และ $NADP^+$ เป็นโคแฟกเตอร์
- $NADP^+$ -dependent malic enzyme ($NADP^+$ -ME, EC 1.1.1.40) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของออกซาโลอะซิเตตได้ และใช้โคแฟกเตอร์ คือ $NADP^+$ เพียงชนิดเดียว



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงการแลกเปลี่ยนสารเมตาบอไลต์ระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

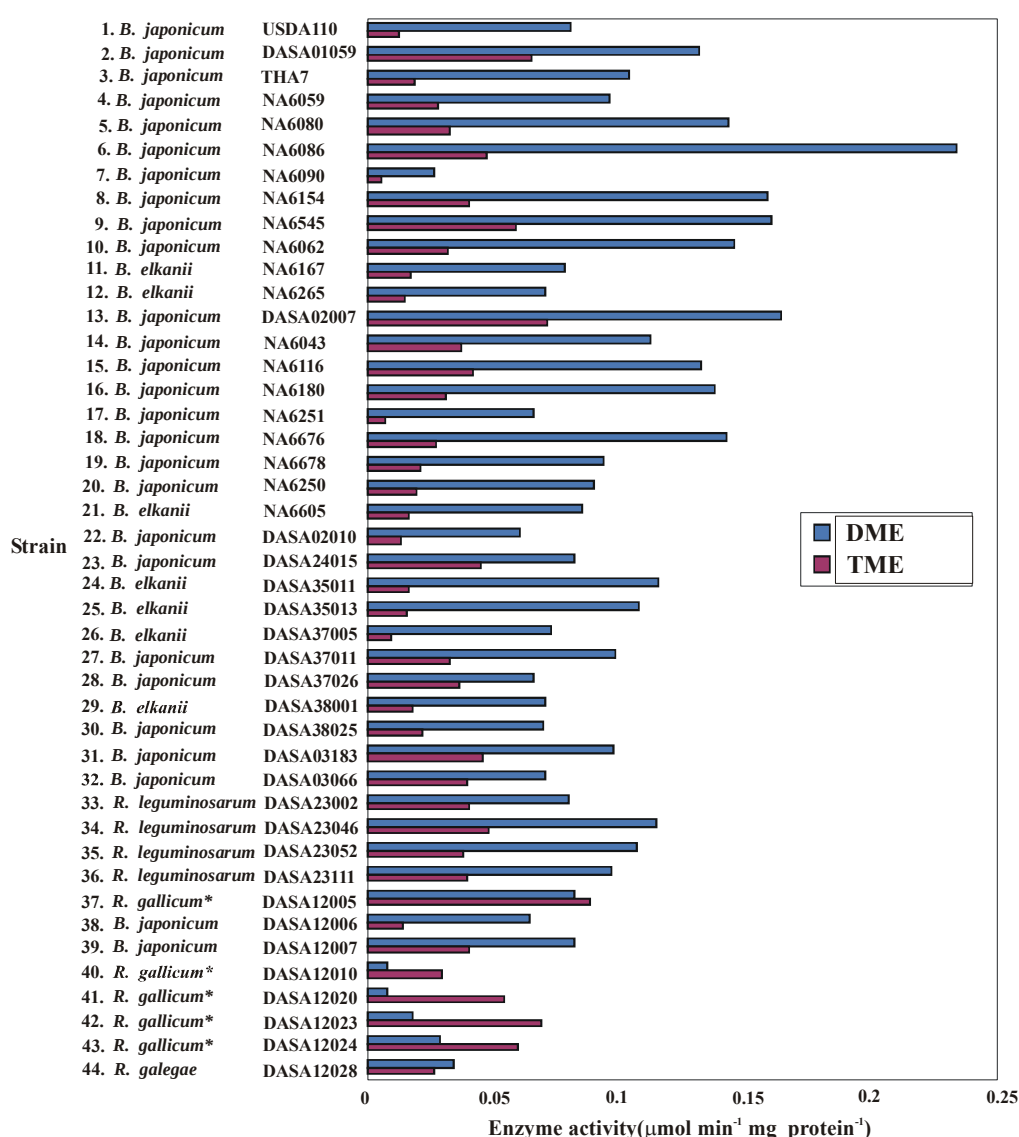
(nitrogen fixing bacteroids) กับเซลล์ของพืช โดย PBM คือ peribacteroid membrane และ BM คือ bacteroid membrane. (Spaink และคณะ, 1998)

Diriscoll และ Finan (1996) ได้ศึกษาคุณลักษณะ ยีนส์ และความสำคัญของ เอนไซม์มาติกใน *Rhizobium meliloti* แล้ว พบว่าเฉพาะ DME เท่านั้นที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนใน *R. meliloti* เพราะ ตัวกลายพันธุ์ที่ยีนส์ควบคุม DME บกพร่อง ทำให้ขาดความสามารถ สร้างเอนไซม์ DME ไป ส่งผลให้เชื้อ ไรโซเบียมที่กลายพันธุ์ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 แต่ไม่ได้ตรวจสอบสัดส่วนระหว่าง DME และ TME ในสายพันธุ์นี้และไรโซเบียมอื่นๆ ว่ามีความสัมพันธ์กับการตรึงไนโตรเจนหรือไม่



ภาพที่ 3 DEAE – เซลลูโลส โครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *R. meliloti* Rm1021 ไวด์ไทป์ (A), *tme* มิวแตนท์ RmG927 (B) และ *tme, dme* มิวแตนท์ RmG994 (C) โดย (■) DME, (□) DME และ (▲) DME (Diriscoll และ Finan, 1996)

Sinsuwongwat และคณะ(2002b) รายงานถึงลักษณะการสร้างเอนไซม์มาลิก (malic enzymes) ของจุลินทรีย์จำนวน 43 ไอโซเลท (isolate) ที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลถั่ว 9 ชนิด *Glycine max*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogaea*, *Desmanthus virgatus*, *Acacia mangium*, *Centrosema pascuorum*, *Pterocarpus indicus*, *Xylia xylocarpa* และ *Sesbania rostrata* ที่ปลูกในประเทศไทย พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 43 ไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ 1,000 คู่เบสของยีน 16S-rRNA (16S-rRNA gene analysis) จากแอมพลิคอนขนาด 1.5 Kb ที่ได้จากไพรเมอร์ 27f และ 1492r แต่สามารถหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบสได้เพียง 1,000 เบส และสามารถจำแนกจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็น 5 ชนิด คือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium gallicum* และ *Rhizobium galegae* ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ไรโซเบียมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้



ภาพที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์มาลิกในไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย โดยไรโซเบียมที่มีกิจกรรม

TME สูงกว่า DME ระบุด้วยสัญลักษณ์ * (Sinsuwongwat และคณะ, 2002b)

เชื้อไรโซเบียมเหล่านี้ สามารถแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์มาลิกได้ทั้ง 2 ชนิด คือ เอนไซม์มาลิกที่สามารถใช้ได้ทั้ง NAD^+ และ NADP^+ เป็นโคแฟกเตอร์ (NAD^+ -dependent malic enzyme : DME) และ เอนไซม์มาลิกที่มี NADP^+ เป็นโคแฟกเตอร์ ได้เพียงชนิดเดียว (NADP^+ -dependent malic enzyme : TME) โดยพบเอนไซม์ทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถจัดไรโซเบียมทั้ง 43 ไอโซเลทที่แยกได้ในประเทศไทย ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยสัดส่วนระหว่าง DME และ TME ที่แสดงออกในแต่ละไอโซเลทโดยกลุ่มที่ 1 คือ *B. japonicum*, *B. elkanii*, *R. leguminosarum* และ *R. galegae* แสดงปฏิกิริยาของ DME สูงกว่าปฏิกิริยาของ TME ในขณะที่กลุ่มที่ 2 คือ *R. gallicum* แสดงปฏิกิริยาของ TME สูงกว่าปฏิกิริยาของ DME ดังแสดงใน ภาพที่ 4 และเกษตรกรในประเทศได้ใช้ไรโซเบียมอย่างกว้างขวาง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษา ค้นคว้า และวิจัยหาคุณลักษณะของเอนไซม์มาลิกในไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย

2. วิธีการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Mesorhizobium loti* NZP และ *B. japonicum* USDA110 จาก National Institute of Agrobiological Sciences (Tsukuba, Japan) *B. japonicum* USDA122, *R. meliloti* 1021 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 และ ไรโซเบียมอื่น ๆ ที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลท จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเหลว YM (Yeast-mannitol medium) ส่วนเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* นั้น ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วันสำหรับในสกุล *Rhizobium* ซึ่งเป็นไรโซเบียมที่โตเร็ว เชื้อในสกุล *Mesorhizobium* และ *Agrobacterium tumefaciens* ส่วนเชื้อในสกุล *Bradyrhizobium* นั้นต้องใช้เวลาบ่ม 7 วัน เพราะจัดเป็นไรโซเบียมที่โตช้า

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว HM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 270 รอบต่อวินาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (genomic DNA) ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1987a) โดยทำการแขวนลอยเซลล์ที่ได้ใน 250 ไมโครลิตรของ STE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl และ 1 mM EDTA, pH 8.0) ในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ 25 ไมโครลิตรของ สารละลาย 10% SDS ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำให้แข็งด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลว สลับกับการทำให้ละลายด้วยการบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 3 รอบ เมื่อสารละลายเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องจึงทำการเติมน้ำ 25 ไมโครลิตรของ STE บัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตรของสารละลาย 5 โมลาร์ NaCl และ

80 ไมโครลิตรของสารละลาย CTAB/NaCl (10% CTAB และ 0.7 โมลาร์ NaCl) บ่มสารละลายผสมที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำ 800 ไมโครลิตรของสารละลายผสม chloroform 24 ส่วน /iso- amylalcohol 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเวอร์เทก แล้วทำการเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คูดสารละลายใสด้านบนใสในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำ 390 ไมโครลิตรของสารละลายผสม สารละลาย phenol 24 ส่วน/ chloroform 24 ส่วน/ iso-smylalcohol 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเวอร์เทก เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คูดสารละลายใสด้านบนใสในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำสารละลาย iso-propanaol ปริมาตรเป็นสองเท่าของสารละลายใส เพื่อทำการตกตะกอนกรดนิวคลีอิก โดยบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70 % เอทานอลที่เย็น นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้ง แล้วละลายด้วย 20 ไมโครลิตรของ TE บัฟเฟอร์

เพาะเลี้ยง *E. coli* JM109 และ *E. coli* BL21 ด้วยอาหารเหลว 2xTY 3 ml ที่ 37°C ด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ใช้ต่างในการทำให้เซลล์แตก (alkaline lysis) ตามวิธีของ Sambrook et al. (1989).

2.4 การวิเคราะห์ยีน 16S-rDNA

การเพิ่มจำนวนของยีน 16S - rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับยีนดังกล่าวใน eubacteria โดยเหมือนกับตำแหน่งของยีนใน *Escherichia coli* (Brosius และคณะ, 1978 และ Weisburge และคณะ, 1991) โดย 8 - 27 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') เรียกว่าไพรเมอร์ 27f และ 821 - 803 (5' - CATCGTTTACGGCGTGGAC - 3') เรียกว่าไพรเมอร์ 803r เป็นไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S-rDNA ขนาด 800 คู่เบสแรกของยีน คู่ที่สอง 518-536 (5'-CCAGCA GCCGCGTAATAG-3') เรียกว่าไพรเมอร์ 536f และ 1,510 - 1,492 (5' - GGCTACCTTGTTACGACTT- 3') เรียกว่าไพรเมอร์ 1492r เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S - rDNA ขนาด 1,000 คู่เบสสุดท้าย คู่ที่สามไพรเมอร์ 27f และ 1,111 - 1,093 (5' - TTGCGCTCGTTGCGGGACT - 3') เรียกว่าไพรเมอร์ 1093r เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S-rDNA ขนาด 1,100 คู่เบสแรกของยีน คู่ที่สี่ 1,094 - 1,112 (5' -GTCCCCGAACGAGCGCAAC-3') เรียกว่าไพรเมอร์ 1112f และ 1492r เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S - rDNA ขนาด 500 คู่เบส สุดท้ายของยีน ด้วยเครื่อง MyCycler ของ Bio-Rad โดยโปรแกรมการทำ PCR คือ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ และ 4 องศาเซลเซียส

อย่างน้อย 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยสารละลาย เอธิเดียมโบรไมด์ก่อนนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้รังสีเหนือม่วง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ดังกล่าวถูกนำไปหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบส และลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่ได้โดยรวม ประมาณ 1,500 คู่เบส ถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของยีน 16S-rDNA จาก จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ใน DDBJ/NCBI/EMBL ด้วยซอฟต์แวร์ CLUSTAL W

2.5 การย้อมสีกรัม

เก็บเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้นให้กระจายบนแผ่นสไลด์ ตรึงเซลล์ให้ติดสไลด์โดยการผ่าน เปลวไฟทำการย้อมสีกรัม โดยหยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตบนรอยสมิธทิ้งไว้ 1 นาที เททิ้งล้างน้ำ จากนั้นหยดกรีมไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที เททิ้งล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์อย่างรวดเร็ว ล้างด้วยน้ำ หยด สารละลายซาฟฟานีนโอ ทิ้งไว้ 30 วินาที เททิ้ง ล้างน้ำ แล้วจึงซับให้แห้งก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตผลการติดสีกรัมของเซลล์และรูปร่างของเซลล์

2.6 การทดสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

ถ่ายเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น นำไปแทง (stab) ลงในหลอดอาหารวุ้น TSI แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลทุกวันจนครบ 5 วัน โดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหาร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ถ้าเกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยแทง แสดงว่าผลการทดลองเป็นบวก คือ แบคทีเรียนั้นสามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (ดวงพร, 2537)

2.7 การทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรท(Citrate utilization)

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารวุ้นเอียง Simmons' citrate agar แล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง อ่านผล ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงผลการทดลองเป็นบวก คือแบคทีเรียนั้นสามารถใช้ซิเตรทได้ แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าผลการทดลองเป็นลบ คือ แบคทีเรียนั้นไม่สามารถใช้ซิเตรทได้ (นันทนา, 2537)

แบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรทจะผลิตเอนไซม์ซิเทรียส (citriase) ย่อยซิเตรท แล้วได้ ออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) และอะซิเตท (acetate) และยังมีเอนไซม์อีกชนิด คือ ออกซาโลอะซิเตทดีคาร์บอกซิเลส (oxaloacetate decarboxylase) ย่อยอะซิเตทได้ไพรูเวท (pyruvate) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกับ โซเดียม (Na) และน้ำ (H_2O) ได้เป็นโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) และสารประกอบที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้อาหาร เลี้ยงเชื้อมีฟิเอชสูงขึ้น และสีของอินดิเคเตอร์โบรโมไธมอลบลู (bromothymolblue) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons' citrate agar เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน (นันทนา, 2537)

2.8 การทดสอบความสามารถในการผลิต 3-ketolactose

ใช้ห้วงถ่ายเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร 3-ketolactose medium แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อขึ้นเป็นโคโลนี จึงราดเบนเนดิกต์รีเอเจนต์ (Benedict reagent) ให้ทั่วผิวน้ำเล็กน้อย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที สังเกตผลการทดสอบ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ถ้าปรากฏสีเหลืองของคอปเปอร์ออกไซด์ (Cu_2O) โดยรอบที่เชื้อขึ้น แสดงว่าเชื่อนั้นมีการผลิต 3-ketolactose (Bernaerts and Deley, 1963)

เป็นตัวทดสอบความแตกต่างของ *Agrobacterium* spp. กับแบคทีเรียอื่นๆ เช่น *Rhizobium* spp. และ *Escherichia* spp. โดย *Agrobacterium* spp. เจริญบนอาหารที่มีแลกโตสได้ เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ที่เรียกว่า เฮกโซไพราโนไซด์ไซโครโครมซีออกซิโดรีดักเตส (hexopyranoside cytochrom C oxidoreductase) ซึ่งสามารถ เปลี่ยนแลกโตสไปเป็น 3-ketolactose ได้ (Bernaerts and Deley, 1963)

2.9 การสกัดเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว HM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 270 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญ และวัดความขุ่นได้ 0.5 ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ทำการเก็บเซลล์โดยนำเชื้อที่ได้ไปเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ความคมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเติมด้วย prebuffer 1 มิลลิลิตร แล้วเปลี่ยนถ่ายสารละลายตะกอน เซลล์ลงในไมโครทิวป์ หลอดละ 500 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงเพื่อล้างตะกอนความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ความคมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย prebuffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องโซนิเคเตอร์เพื่อทำให้เซลล์แตก 4 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที โดยใช้ คลื่นเสียงที่ แอมพลิจูด 54 % ปรับเพาส์ (pulse) เป็น 2.0 : 1.0 ด้วยเครื่อง SonicVibraCell™ (USA) เมื่อทำให้เซลล์แตก

เรียบร้อยแล้วนำสารละลายที่ได้ไปเข้า เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ความคมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แยกการเซลล์ทิ้งไป ส่วนใสที่ได้ คือ สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ต้องนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

2.10 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของ NAD⁺-dependent malic enzyme (DME)

ปีเปตสารละลาย NAD-ME Assay Buffer 430 ไมโครลิตร ลงในควอตซ์คิวเวท จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ ที่สกัดได้จากโรโซเปียม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ สับสเตรท คือ NAD⁺ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเพื่อให้สารเข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เลือกโหมด time scan ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Chen และคณะ, 1998) ด้วยเครื่อง UV-1700 (Shimadzu)

2.11 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของ NADP⁺-dependent malic enzyme (TME)

ปีเปตสารละลาย NADP-ME Assay Buffer 430 ไมโครลิตร ลงในควอตซ์คิวเวท จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ ที่สกัดได้จากโรโซเปียม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ สับสเตรท คือ NADP⁺ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเพื่อให้สารเข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เลือกโหมด time scan ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Chen และคณะ, 1997) ด้วยเครื่อง UV-1700 (Shimadzu)

2.12 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ด้วยวิธีเบรคฟอร์ด โดยเติมน้ำกลั่น 798 ไมโครลิตร ในควอตซ์คิวเวท แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ 2 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายเบรคฟอร์ด 200 ไมโครลิตร เขย่าให้สารเข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณเป็นปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine serum albumin โดยวิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (Bradford, 1976) ด้วยเครื่อง UV-1700 (Shimadzu)

2.13 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ค่ากิจกรรมของ DME (Chen และคณะ, 1998) และ TME (Chen และคณะ, 1997) วัดจากปริมาณผลิตภัณฑ์ คือ NADH และ NADPH ตามลำดับ ที่เกิดขึ้น เทียบกับปริมาณโปรตีนในสารละลาย ในหนึ่งหน่วยเวลาดังสูตรต่อไปนี้ โดยค่า Extinction coefficient = 6.2 หมายความว่า ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร NADH หรือ NADPH 1 ไมโครโมล/มิลลิลิตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 6.2

$$\text{Activity} \left(\frac{\mu\text{mol NADH or NADPH formed}}{\text{min} \cdot \text{mg protein}} \right) = \frac{\text{Abs. (units/min)} \cdot \text{reaction volume } (\mu\text{L})}{6.2 \cdot \text{sample volume}(\mu\text{L}) \cdot \text{protein } (\mu\text{g}/\mu\text{L})}$$

2.14 การตรวจกิจกรรมเอนไซม์มัลิกในไรโซเปียมด้วย Native-PAGE

โปรตีนมาตรฐาน (High molecular weight calibration kit for native electrophoresis, Amersham pharmacial biotech) และสารสกัดเอนไซม์จากไรโซเปียมถูกนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยไม่ทำให้เสียสภาพตามธรรมชาติ โดยปรับจากวิธีของ Mitch และคณะ (1998) ใช้เจลที่ความเข้มข้น 6 % กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ย้อมเจลดด้วยคูมาซี บิลเลี่ยน บลู (Coomassie Brilliant Blue R-250) การย้อมสีเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์มัลิก โดยล้างเจลใน 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 7.8 ที่ผสมด้วย 30 มิลลิโมลาร์ K-L-malate, pH 7.8 3 มิลลิโมลาร์ MnCl₂ 50 มิลลิโมลาร์ KCl แล้วแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของ 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide และ 0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร phenazine methosulfate โดยเติม NAD⁺ เมื่อต้องการตรวจ DME และโดยเติม NADP⁺ เมื่อต้องการตรวจ TME ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มในที่มืดโดยไม่ต้องเขย่า และอ่านหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที น้ำหนักมวโมเลกุลของเอนไซม์มัลิกหาได้โดยการเทียบกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนักมวโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่ไป

2.15 การพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* มาลิกเอนไชม์ยีน

การเปรียบเทียบมาลิกเอนไชม์ยีนของ *E. coli* (AE000333), *N. meningitidis* (AL162754), *P. aeruginosa* (AE0004918) และ *S. meliloti* (AF017443) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN (Version 5.0) ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ดีเอ็นเอ (ME1f) และย้อนกลับ (ME1r) ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อใช้ในการพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิกเอนไชม์ยีน สังกะหรณ์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้โดย GENSET KK (Kyoto, Japan) นำไพรเมอร์ที่ได้มาใช้ในการพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* มาลิกเอนไชม์ยีน โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. japonicum* USDA122 เป็นแม่แบบ ด้วยเครื่อง MyCycler ของ Bio-Rad โดยโปรแกรมการทำ PCR คือ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยสารละลาย เอทิดีเอมโบรไมด์ก่อนนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้รังสีเหนือม่วง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (ME1) ถูกนำไปหาลำดับ การจัดเรียงตัวของเบส และลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่ได้โดยรวมถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับ การจัดเรียงตัวของเบสของยีน *dme* มาลิกเอนไชม์จาก จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ใน DDBJ/NCBI/EMBL ด้วยซอฟต์แวร์ CLUSTAL W

2.16 การโคลน *dme* มาลิกเอนไชม์ยีน จาก *B. japonicum* USDA122 (*Bjdme2*)

นำลำดับการจัดเรียงตัวของเบสบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* มาลิกเอนไชม์ยีนของ *B. japonicum* USDA122 (ME1, 678 bp) ไปเปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 จากสถาบันดีเอ็นเอ Kazusa ประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีความเหมือนกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโคลนหมายเลข 110c1410 ทำการค้นหา ORF ที่มีลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของ DME มาลิกเอนไชม์ ใช้ลำดับ การจัดเรียงตัวของเบสที่ควบคุม ORF ดังกล่าวในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ดีเอ็นเอ (DMEf) และไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ (DMEr) ในการพิมพ์ขยายมาลิกเอนไชม์ยีนทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4 ทั้งนี้ได้เพิ่มบริเวณจำเพาะสำหรับตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* เพิ่มที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ DMEf และ DMEr, ตามลำดับ สังกะหรณ์ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้โดย GENSET KK (Kyoto, Japan) นำไพรเมอร์ที่ได้มาใช้ในการพิมพ์ขยาย *dme* มาลิกเอนไชม์ยีน โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. japonicum* USDA122 เป็นแม่แบบ ด้วยเครื่อง MyCycler ของ Bio-Rad โดยโปรแกรมการทำ PCR คือ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ และ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยสารละลายเอทิดีเอมโบรไมด์ก่อนนำไปตรวจสอบการเรืองแสง

ภายใต้รังสีเหนือม่วง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (*Bjdme2*) ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy Vector Systems สภาวะที่ใช้สำหรับเชื่อมต่อประกอบด้วย 0.8 µl ของ pGEM[®]-T Easy Vector, 3.2 µl of PCR product (*Bjdme2*) และ 4 µl ของ solution I, Ligation Kit (Takara, Japan) บ่มสารละลายผสมที่ 16 °C ข้ามคืน สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อถูกทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock method) ตามวิธีของ Sambrook et al. (1989b) คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2xTY ที่ผสม 50 µg/ml ของ ampicillin, 0.5 mM IPTG และ 80 µg/ml ของ X-Gal ทรานสฟอร์มแมนต์ที่ผ่านการคัดเลือกละถูกนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย Quantum Prep[®]:Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD, USA) เพื่อใช้สำหรับศึกษาลักษณะของ *Bjdme2* เช่น ความสามารถในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ ในการสร้างแผนที่ยีน (Gene mapping)

2.17 การแสดงออกของ *dme* มาจาก *B. japonicum* USDA122 (*Bjdme2*)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พิมพ์ขยายได้ (*Bjdme2*), *EcoRI/HindIII*, ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกจากอะกาโรสเจลที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ แล้วจับโคลนเข้าใน multiple cloning site ของ pET32a(+) เวกเตอร์ (Novagen) ได้เป็น pDME02 ดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อแล้วถูกทรานสฟอร์มสู่ *E. coli* JM109 ภายหลังจากการตรวจสอบแผนที่ของดีเอ็นเอดังกล่าวถูกทรานสฟอร์มสู่ *E. coli* BL21 จากนั้น *E. coli* BL21 จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 1 mL แล้วจึงถ่ายเทต่ออาหารเหลว 2xTY ปริมาตร 200 mL จนกระทั่งมีค่า O.D. ที่ 600 nm เป็น 0.6 แล้วจึงเติม 1 mM IPTG บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน แล้วทำการเหวี่ยงที่ 3,500 xg ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บเซลล์ นำเซลล์ที่ได้ไปทำการแขวนลอยใน 10 mL ของ 10mM imidazole-phosphate บัฟเฟอร์, pH 7.4 ก่อนทำให้เซลล์แตกด้วยอัลตราโซนิก เพื่อให้เซลล์แตก โดยใช้คลื่นเสียงที่ แอมพลิจูด 54 % ปรับเพาส์ (pulse) เป็น 2.0 : 1.0 ด้วยเครื่อง SonicVibraCell[™] (USA) เป็นเวลา 30 sec สลับกับการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที และทำซ้ำทั้งสิ้น 4 รอบ สารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการโซนิเคตถูกนำไปเหวี่ยงที่ 8,000 xg, 4°C เป็นเวลา 10 นาที สารละลายใสที่ได้ถูกนำไปกรองผ่านแผ่นกรอง 0.45 µm สารละลายใสที่กรองได้ถูกนำไปผ่าน HisTrap[™] column (Pharmacia Biotech, U.S.A.) เพื่อกักเก็บฟิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่แสดงออกเชื่อมอยู่กับ histidine-tagged protein ไว้ในคอลัมน์ และปล่อยโปรตีนอื่นๆ ผ่านคอลัมน์ออกไป เมื่อผ่านการล้างโปรตีนอื่นๆ ที่อาจตกค้างอยู่ได้แล้ว จึงทำการชะ ฟิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ที่กักเก็บอยู่ในคอลัมน์ ให้ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10 mM, 60 mM, 100mM, 150 mM, 250 mM และ 500 mM imidazole-phosphate บัฟเฟอร์, pH 7.4 อย่างละ 3 mL ตามลำดับ สารละลายที่ชะออกมาได้แต่ละส่วนถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของ DME มาจากเอนไซม์ต่อไป

2.18 การตรวจสอบสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไซม์

ฟิวชั่นโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 150 mM imidazole-phosphate บัฟเฟอร์, pH 7.4 ถูกนำไปศึกษาหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไซม์ โดยใช้ 50 mM MES (pH 5.6-6.8), 50 mM MOPS (pH 6.6-7.6), 50 mM Glycylglycine (pH 7.4-8.4) และ 50 mM Tricine (pH 8.2-8.8) บัฟเฟอร์ในการศึกษาหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

2.19 การวิเคราะห์โคเอนติคส์ของ DME มาลิกเอนไซม์

ค่า K_m ของ DME ต่อ L-malate และ NAD^+ คำนวณด้วย Lineweaver-Burks plot โดยใช้ NAD^+ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002 mM ถึง 0.1 mM ที่ความเข้มข้นของ L-malate คงที่ที่ค่าใดค่าหนึ่งจาก 0.25 mM ถึง 5 mM. นำค่าที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟด้วย Lineweaver-Burk plots เพื่อหาค่า K_m ของ DME ต่อ L-malate และ NAD^+

2.20 การเข้าถึงได้ของดีเอ็นเอคู่สม (Southern Hybridization)

ดีเอ็นเอตัวอย่าง (10 μ g) ถูกนำไปแยกผ่านอะกาโรสเจล (0.8%) ใน TAE บัฟเฟอร์ ด้วยกระแสไฟฟ้า การทำ Southern blot ใช้วิธีของ Ausubel et.al. (1987b) นำอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วยกระแสไฟฟ้าอยู่แช่ใน สารละลาย 0.25 M HCl เพื่อสลายพิวรีน (depurination) ก่อนนำไปทำให้ดีเอ็นเอเส้นคู่แยกออกจากกัน (denature) โดยแช่ในสารละลาย 0.4 N NaOH ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้เสียสภาพถูกถ่ายทอดสู่แผ่นกรอง Hybond-N⁺ nylon nitrocellulose (Amersham, USA) โดยอาศัยแรงดึงคาปิลารี (capillary method) ตรึงดีเอ็นเอกับแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยการอบแห้งที่ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสดังกล่าวมาล้างสองรอบด้วยสารละลาย 2x SSC ที่มี 0.1% SDS อยู่ ก่อนผึ่งให้แห้งบนกระดาษฟางและนำไปใส่ในขวดไฮบริไดซ์ นำบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำไฮบริไดซ์ประกอบด้วย 5xSSC, 1% blocking agent (Amersham LIFE SCIENCE, U.S.A.), 0.1% SDS (w/v) และ 5% dextran sulfate (w/v) ในปริมาณที่เหมาะสมเดิมในขวดไฮบริไดซ์ พร้อมอบที่ 65 °C และหมุนขวดเบาๆ ในตู้อบไฮบริไดซ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เตรียมได้โดย ตัด pGEM[®]-T Easy เวกเตอร์ที่มี ME1 ขนาด 678 bp ที่พิมพ์ขยายจากจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 บรรจุอยู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ทำการแยกชิ้นส่วนของ ME1 ที่ตัดได้จากอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ แล้วนำไปติดด้วยสารเรืองแสง (fluorescein) โดยใช้ Gene Image[™] random prime labeling

module kit (Amersham LIFE SCIENCE, U.S.A.) ดีเอ็นเอติดด้วยสารเรืองแสง ที่ได้ถูกใช้เป็น ตัวติดตาม ME1 (ME1 probe) เพื่อใช้ในการค้นหา *dme* ยีน เจือจางตัวติดตามที่ได้ให้มีความเข้มข้น 2-25 ng/ μ l ด้วย น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และถูกทำให้เสียสภาพโดยการแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา สั้น ๆ นำสารละลายตัวติดตามที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลาสั้น ๆ คูลสารละลายใส่เดิมลงในบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน การทำไฮบริไดซ์ที่อบอยู่ในขวดและผสมเบา ๆ บ่มข้ามคืนที่ 65 °C เพื่อให้เกิดการไฮบริไดซ์ จึงทำการล้าง แผ่นเมมเบรนสองครั้งด้วย สารละลาย 1xSSC ที่มี 0.1% SDS (w/v) และ 0.5xSSC ที่มี 0.1% SDS (w/v) ตามลำดับ ตรวจสอบการเรืองแสงของตัวติดตามด้วย Gene Images CDP-Star detection module (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.) ตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงด้วยเครื่อง ChemiDoc -XRS (Bio-Rad)

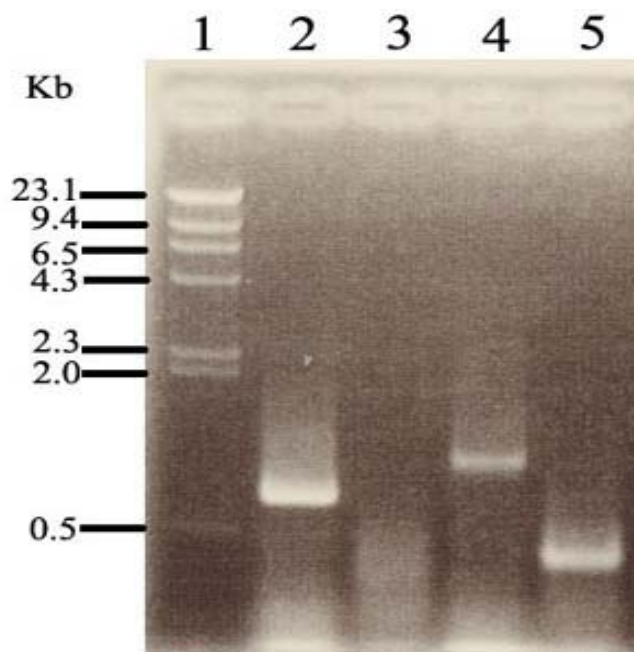
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การจัดจำแนกไรโซเบียมด้วยการวิเคราะห์ 16S-rDNA

Sinsuwongwat และคณะ(2002) ได้จัดจำแนกจุลินทรีย์ 43 ไอโซเลทที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย ด้วยวิธีวิเคราะห์ยีน 16S-rRNA (16S-rRNA gene analysis) สามารถจำแนกจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็น 5 ชนิด คือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium gallicum* และ *Rhizobium galegae* ดังแสดงในภาพที่ 3 แต่การจัดจำแนกดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์เนื่องจากลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W นั้นมีความยาวเพียง 500 เบสจากจุดเริ่มต้นของยีน และ 500 เบส จากด้านท้ายของยีน อันเนื่องมาจากข้อจำกัดของวิธีการที่ใช้ในการหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบสสามารถหาได้อย่างแม่นยำด้วยความยาว 500 เบส จึงทำให้สามารถทราบลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในยีนดังกล่าวรวมทั้งสิ้น 1,000 เบส จากแอมพลิคอนขนาด 1.5 Kb ที่ได้จากไพรเมอร์ 27f และ 1492r เพราะขนาดลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในช่วงกลางของยีนดังกล่าว

ดังนั้นเพื่อให้การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย ด้วยวิธีวิเคราะห์ยีนที่ควบคุม 16S-rRNA (16S-rRNA gene analysis) เป็นไปโดยสมบูรณ์ จึงทำการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อให้ได้แอมพลิคอนขนาดที่เหมาะสมกับการหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่แม่นยำ จึงใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ คือ 27f คู่กับ 803r, 536f คู่กับ 1492r, 27f คู่กับ 1093r และ 1112f คู่กับ 1492r ผลปรากฏดังแสดงในภาพที่ 5 กล่าวคือ เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไรโซเบียมไอโซเลท DASA12028 เป็นแม่แบบนั้น เมื่อใช้ไพรเมอร์ 27f คู่กับ 803r สามารถเพิ่มพีชยายแอมพลิคอนขนาด 0.8 กิโลเบสได้ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ 536f คู่กับ 1492r ไม่สามารถเพิ่มจำนวนส่วนยีนที่ต้องการได้ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 27f คู่กับ 1093r และ 1112f คู่กับ 1492r พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถเพิ่มพีชยายแอมพลิคอนขนาด 1.1 กิโลเบส และ 0.5 กิโลเบส ได้ ตามลำดับ จึงเลือกใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 3 และคู่ที่ 4 ในการเพิ่มพีชยายยีนที่ควบคุม 16S-rRNA ของไรโซเบียมไอโซเลทอื่น ๆ ต่อไป

แอมพลิคอนของยีน 16S-rDNA ที่เพิ่มพีชยายได้จากไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ ถูกนำไปหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบส นำลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่ได้จากแต่ละแอมพลิคอนที่มีดีเอ็นเอแม่แบบจากไอโซเลทเดียวกันมาเชื่อมต่อกันโดยใช้โปรแกรม Genetyx 5.0 แล้วจึงนำลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่มีความยาว 1,400 เบสเป็นอย่างต่ำ ไปแทนที่ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในหมายเลขเดิมของแต่ละไอโซเลทที่มีความยาวไม่เกิน 1,000 เบส ในศูนย์ข้อมูลของ DDBJ/NCBI/EMBL ดังแสดงในตารางที่ 1



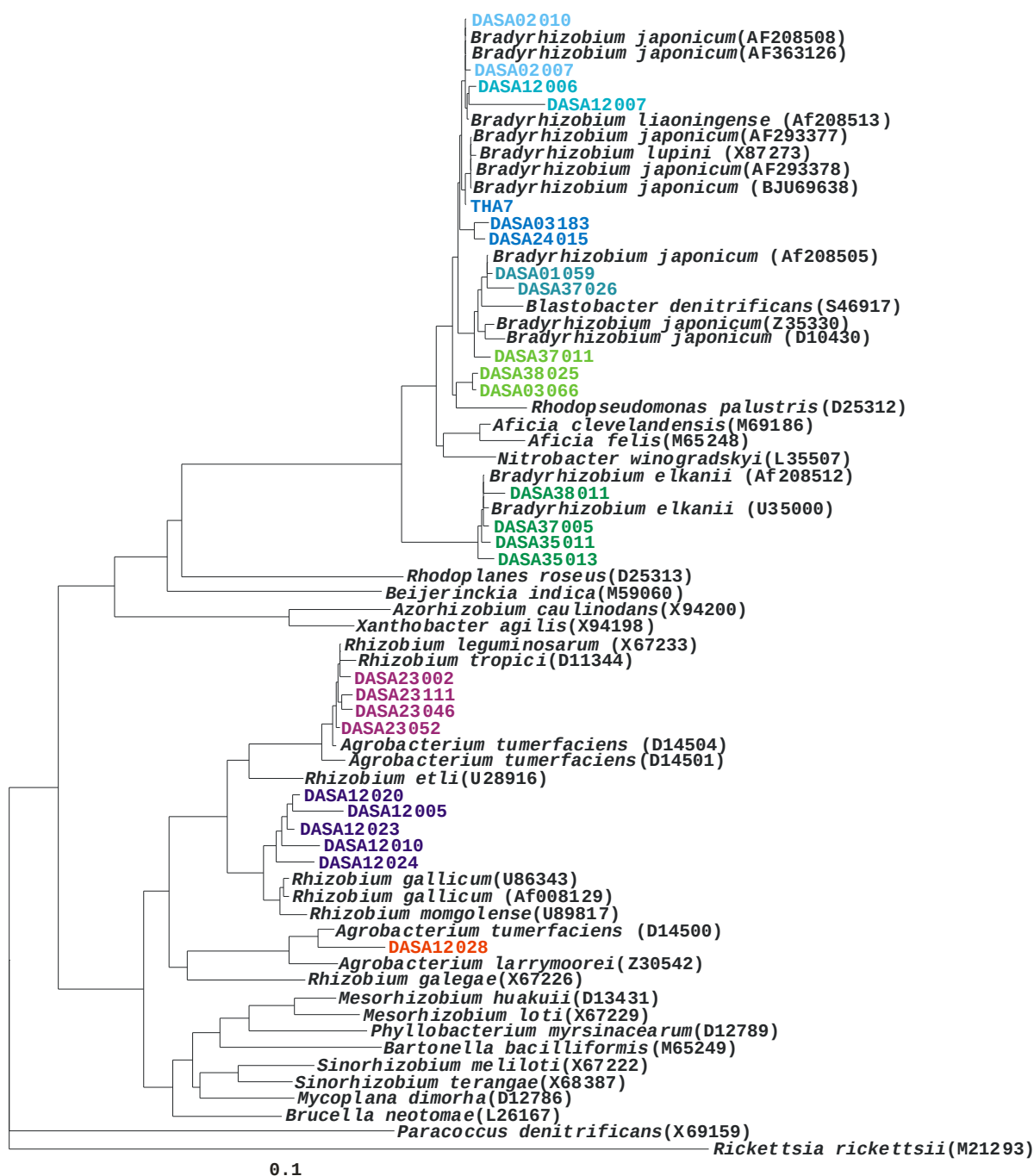
1 % Agarose gel electrophoresis, 100 V, 30 mins.

ภาพที่ 5 การใช้เทคนิค PCR ในการพิมพ์ขยายส่วนของยีน 16S-rDNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไรโซเบียม DASA12028 เป็นแม่แบบ ด้วยไพรเมอร์คู่ต่างๆ

เลนที่	ดีเอ็นเอ	ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	รีเวอร์สไพรเมอร์	แอมพลิคอน(Kb)
1	λ DNA/ <i>Hind</i> III marker	-	-	-
2	Amplicon	27f	803r	0.8
3	Amplicon	536f	1492r	ไม่ได้
4	Amplicon	27f	1093r	1.1
5	Amplicon	1112f	1492r	0.5

เมื่อนำลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของ 16S-rDNA ดังกล่าวไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของยีน 16S-rDNA จาก จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ใน DDBJ/NCBI/EMBL ด้วยซอฟต์แวร์ CLUSTAL W แล้วสามารถจัดจำแนกไรโซเบียมได้ดังแสดงในภาพที่ 6 ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน 16S-rDNA ยีนของจุลินทรีย์เหล่านี้ใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici* และ *Rhizobium gallicum* ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ไรโซเบียมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เป็นส่วนใหญ่ เป็นที่น่าสังเกตว่า DASA38025 และ DASA03066 ที่ใกล้เคียงกับ *Rhodopseudomonas palustris* แต่

เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ทั้งสอง ควรจัดเป็น *Bradyrhizobium japonicum* ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของลำดับการจัดเรียงตัวของเบสความยาว 1,400 เบสจากยีน 16S-rDNA ของเชื้อ

ไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย สร้างโดยวิธี neighbor-joining

ตารางที่ 1 ผลการจัดจำแนกเชื้อด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S-rRNA และการทดสอบการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี acetylene reduction test ของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย

Host legume plant	Strain Name	Proposed Species	Accession number	Sampling site	Acetylene reduction ($\mu\text{mole g nodules}^{-1} \text{ hr}^{-1}$)	
					Index host plant ^a	Original host plant ^b
<i>Glycine max</i>	DASA01059	<i>B. japonicum</i>	AF417550	Loey	7.16	32.82
	THA7	<i>B. japonicum</i>	AF417545	Bangkok	13.98	14.01
<i>Vigna sinensis</i>	DASA02007	<i>B. japonicum</i>	AF417541	Bangkok	13.85	8.63
	DASA02010	<i>B. japonicum</i>	AF417542	Bangkok	10.07	6.29
<i>Arachis hypogaea</i>	DASA03066	<i>B. japonicum</i>	AF417546	Karnchanaburi	53.66	1.77
	DASA03183	<i>B. japonicum</i>	AF417548	Nakhonrajchasi	22.64	12.42
<i>Desmanthus virgatus</i>	DASA23002	<i>R. tropici</i>	AF417562	Nakhonrajchasi	6.82	0.93
	DASA23046	<i>R. tropici</i>	AF417564	Lopburi	4.80	1.15
	DASA23052	<i>R. tropici</i>	AF417565	Lampang	3.81	1.30
	DASA23111	<i>R. tropici</i>	AF417563	Bangkok	3.01	0.94
<i>Sesbania rostrata</i>	DASA12005	<i>R. gallicum</i>	AF417558	Pathumthani	10.77	0.66
	DASA12006	<i>B. liaoningense</i>	AF417543	Lampang	15.22	0.71
	DASA12007	<i>B. liaoningense</i>	AF417544	Nonthaburi	4.78	0.67
	DASA12010	<i>R. gallicum</i>	AF417559	Udonthani	9.73	16.53
	DASA12020	<i>R. gallicum</i>	AF417557	Udonthani	5.68	12.37
	DASA12023	<i>R. gallicum</i>	AF417560	Yala	7.06	0.76
	DASA12024	<i>R. gallicum</i>	AF417561	Pracheenburi	13.60	18.47
	DASA12028	<i>R. galegae</i>	AF417566	Karnchanaburi	49.42	0.92
<i>Acacia mangium</i>	DASA35011	<i>B. elkanii</i>	AF417555	Narathiwat	15.72	3.07
	DASA35013	<i>B. elkanii</i>	AF417556	Narathiwat	10.57	2.11
<i>Centrosema pascuorum</i>	DASA24015	<i>B. japonicum</i>	AF417549	Nakhonrajchasi	15.2	8.43
<i>Pterocarpus indicus</i>	DASA37005	<i>B. elkanii</i>	AF417554	Bangkok	14.82	0.58
	DASA37011	<i>B. japonicum</i>	AF417552	Ubonratchani	70.80	0.55
	DASA37026	<i>B. japonicum</i>	AF417551	Petchburi	13.65	0.51
<i>Xylia xylocarpa</i>	DASA38001	<i>B. elkanii</i>	AF417553	Nakhonrajchasi	7.94	0.58
	DASA38025	<i>B. japonicum</i>	AF417547	Rajchaburi	16.1	0.68

a and b

Ethylene reduction from the host plant under 10% acetylene was determined as inoculated test strain and uninoculated as control. Values given are the averages of triplicate determination as reported in Sinsuwongwat and *et.al.* (2002b).

เป็นที่น่าสังเกตว่า DASA38025 และ DASA03066 ที่ใกล้ชิดกับ *Rhodopseudomonas palustris* แต่เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ทั้งสองควรจัดเป็น *Bradyrhizobium japonicum* ดังแสดงในตารางที่ 1 ยกเว้น DASA12028 ที่ใกล้ชิดกับ *Agrobacterium tumerfaciens* ซึ่งควรทดสอบลักษณะทางชีวเคมีอื่นๆ ประกอบ

การทางชีวเคมีในการตรวจสอบให้เห็นความแตกต่างของ *Rhizobium* และ *Agrobacterium* เพื่อยืนยันว่าเป็นคุณลักษณะของเชื้อสกุลนั้นจริง จากข้อมูลในหนังสือ Bergey's manual determinative of microbiology พบว่าลักษณะที่นำมาใช้ทดสอบ คือ การผลิต 3-ketolactose ซึ่งไรโซเบียมไม่สามารถผลิตได้ แต่ *Agrobacterium* สามารถผลิตได้ การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งไรโซเบียมไม่สามารถผลิตได้ ส่วน *Agrobacterium* มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิตได้ และการใช้ซิเตรทซึ่งไรโซเบียมไม่สามารถใช้ได้ แต่ *Agrobacterium* ใช้ได้ และสามารถสรุปเป็นตารางการจำแนก Rhizobiaceae ได้ดังตารางที่ 2

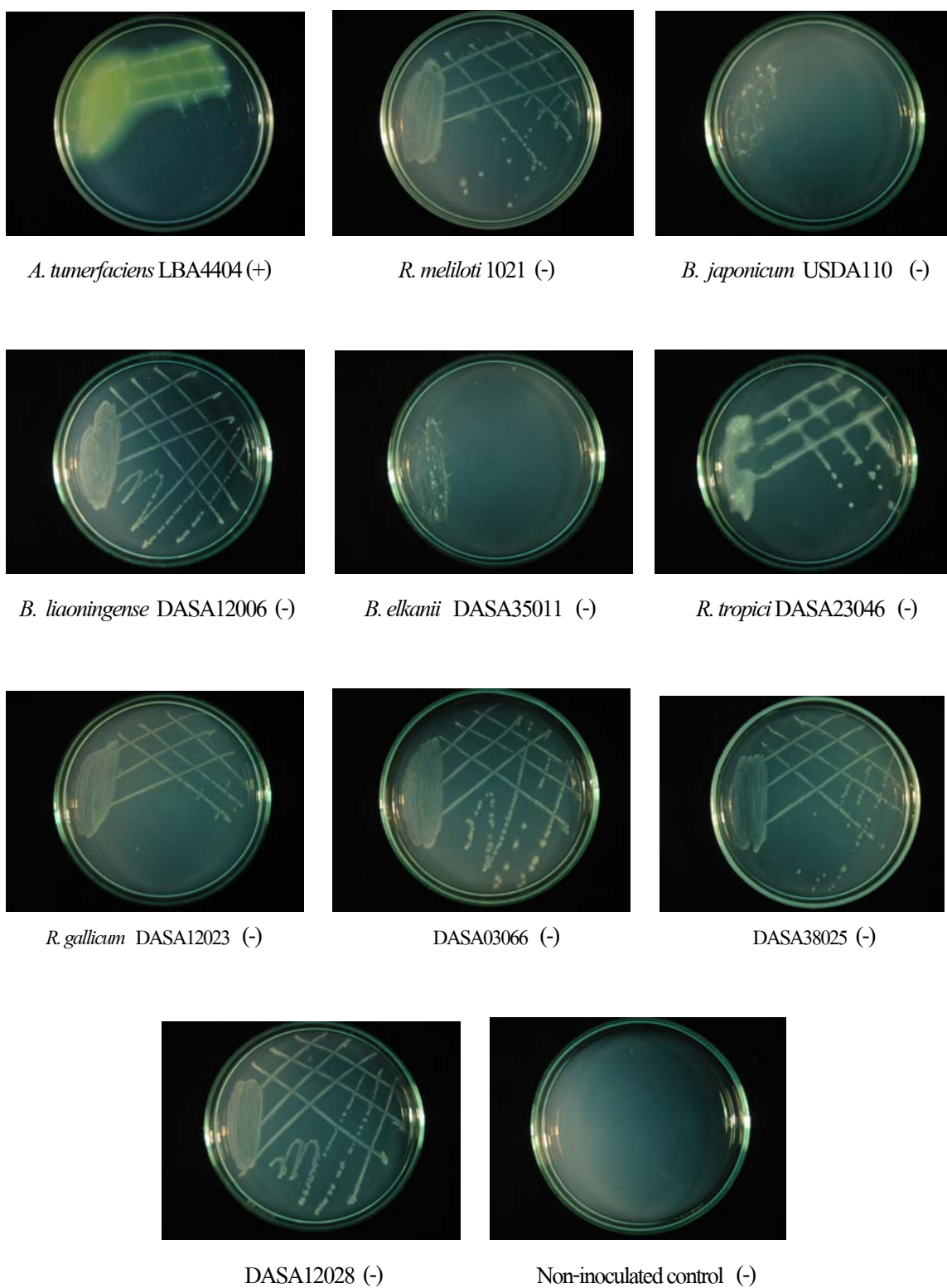
ตารางที่ 2 ลักษณะทางชีวเคมีบางประการของ *Rhizobium* และ *Agrobacterium*

ลักษณะทางชีวเคมี	<i>Rhizobium</i>	<i>Agrobacterium</i>
Gram	-	-
Bacilli / Cocci	B	B
Fix free nitrogen	+	-
Produced 3-ketolactose	-	+
H ₂ S production	-	D
Utilize citrate	-	+

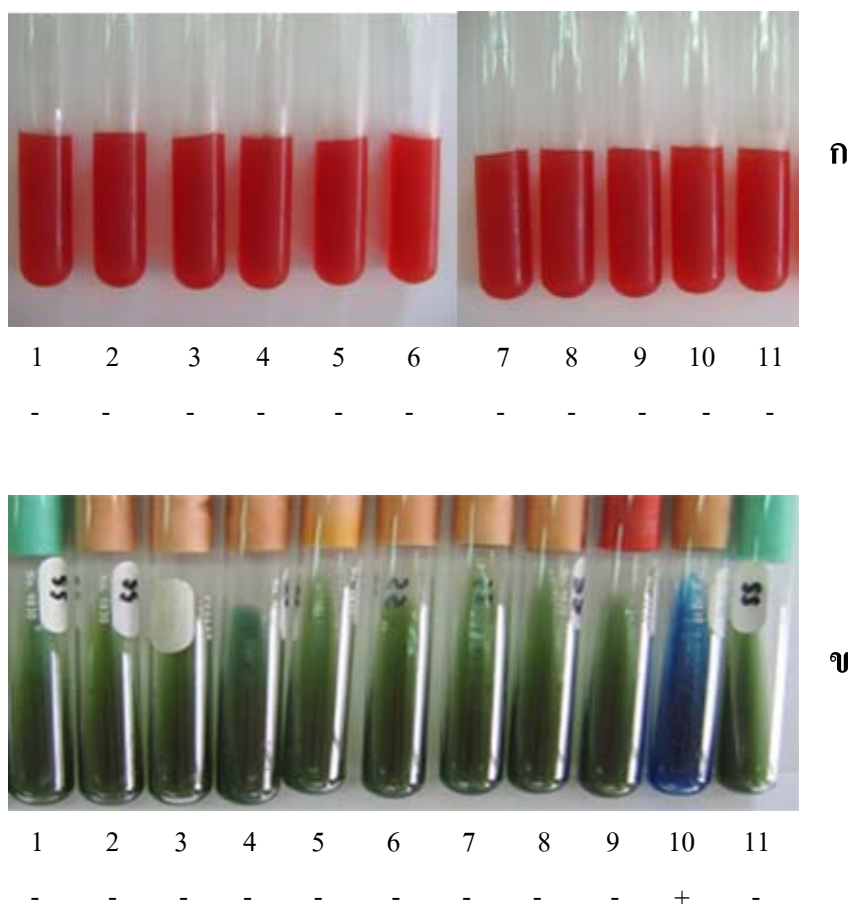
ที่มา : Buchaman and Gibbons(1975)

หมายเหตุ : B หมายถึง Bacilli รูปแท่ง, D หมายถึง มีบางสายพันธุ์, + หมายถึง เกิดผลบวก และ - หมายถึง เกิดผลลบ

คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้ทดสอบความสามารถในการผลิต 3-ketolactose ของ *A. tumerfaciens* LBA4404, *R. meliloti* 1021 และ *B. japonicum* USDA110 เปรียบเทียบกับตัวแทนของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งผลดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิต 3-ketolactose ของ *A. tumerfaciens* LBA4404, *R. meliloti* 1021 และ *B. japonicum* USDA110 เปรียบเทียบกับตัวแทนของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย



ภาพที่ 8 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการสร้าง H₂S (ก) และการใช้ซิเตรท (ข) ของ *A. tumefaciens* LBA4404 , *R. meliloti* 1021 และ *B. japonicum* USDA110 เปรียบเทียบกับตัวแทนของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Control | 7. <i>B. japonicum</i> USDA110 |
| 2. DASA03066 | 8. <i>R. tropici</i> DASA23046 |
| 3. DASA38025 | 9. <i>R. gallicum</i> DASA12023 |
| 4. DASA12028 | 10. <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 |
| 5. <i>B. elkanii</i> DASA35011 | 11. <i>R. meliloti</i> 1021 |
| 6. <i>B. liaoningense</i> DASA12006 | |

จากการทดสอบความสามารถในการผลิต 3-ketolactose ของ *A. tumefaciens* LBA4404 , *R. meliloti* 1021 และ *B. japonicum* USDA110 เปรียบเทียบกับตัวแทนของไรโซเบียม

ที่แยกได้ในประเทศไทย ที่แสดงในภาพที่ 7, 8 และ 9 สามารถสรุปผลการจัดจำแนกไรโซเบียมโดยอาศัยการวิเคราะห์ ยีน 16S-rDNA และการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการได้ดังตารางที่ 3

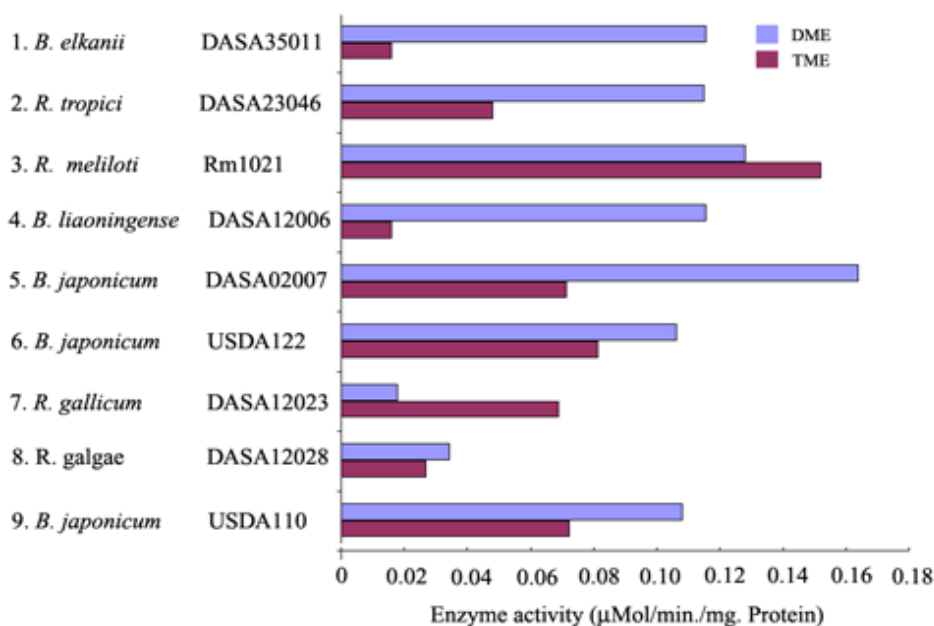
ตารางที่ 3 สรุปผลการจัดจำแนกไรโซเบียมโดยอาศัยการวิเคราะห์ ยีน 16S-rDNA และการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการของของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทย

จุลินทรีย์	ลักษณะที่ทดสอบ				
	การติดสี กรัม	รูปร่าง เซลล์	การผลิต 3- ketolactose	การผลิต H ₂ S	การใช้ ซีเตรท
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	-	แท่ง	+	-	+
<i>R. meliloti</i> 1021	-	แท่ง	-	-	-
<i>B. japonicum</i> USDA110	-	แท่ง	-	-	-
<i>B. elkanii</i> DASA35011	-	แท่ง	-	-	-
<i>B. liaoningense</i> DASA12006	-	แท่ง	-	-	-
<i>R. tropici</i> DASA23046	-	แท่ง	-	-	-
<i>R. gallicum</i> DASA12023	-	แท่ง	-	-	-
<i>B. japonicum</i> DASA03066	-	แท่ง	-	-	-
<i>B. japonicum</i> DASA38025	-	แท่ง	-	-	-
<i>R. galegae</i> DASA12028	-	แท่ง	-	-	-

จุลินทรีย์จำนวน 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากปมของพืชตระกูลถั่ว 9 ชนิด *Glycine max*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogaea*, *Desmanthus virgatus*, *Acacia mangium*, *Centrosema pasuorum*, *Pterocarpus indicus*, *Xylia xylocarpa* และ *Sesbania rostrata* ที่ปลูกในประเทศไทย พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ 1,400 คู่เบสของยีน 16S-rRNA (16S-rRNA gene analysis) และการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการนั้น สามารถจำแนกจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็น 6 ชนิด คือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* และ *Rhizobium galegae* ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ไรโซเบียมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

3.2 การศึกษากิจกรรมของ DME และ TME ในไรโซเบียม

ตรวจสอบกิจกรรมและสัดส่วนของ DME และ TME ในไรโซเบียมอ้างอิงที่ได้ศึกษาคุณลักษณะ ยีนส์ และความสำคัญของเอนไซม์มาลิคแล้ว คือ *R. meliloti* 1021 และไรโซเบียมอ้างอิงที่ได้ศึกษาคุณลักษณะ และยีนส์ ของเอนไซม์มาลิคแล้วบางส่วน คือ *B. japonicum* USDA110 และไรโซเบียมอ้างอิงที่ยังไม่ได้ศึกษาคุณลักษณะ และยีนส์ ของเอนไซม์มาลิคและเกษตรกรในประเทศไทย ใช้สำหรับคลุกเมล็ดถั่วในการเพาะปลูกอย่างแพร่หลาย คือ *B. japonicum* USDA122 เปรียบเทียบกับ DME และ TME ของตัวแทนจากแต่ละสปีชีส์ของไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์ คือ *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 พบว่าไรโซเบียมทั้งหมดยังคงสามารถสร้างเอนไซม์มาลิคทั้งสองชนิดได้ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอาศัยสัดส่วนระหว่าง DME และ TME ที่แสดงออกในแต่ละสปีชีส์ ดังแสดงในภาพที่ 9



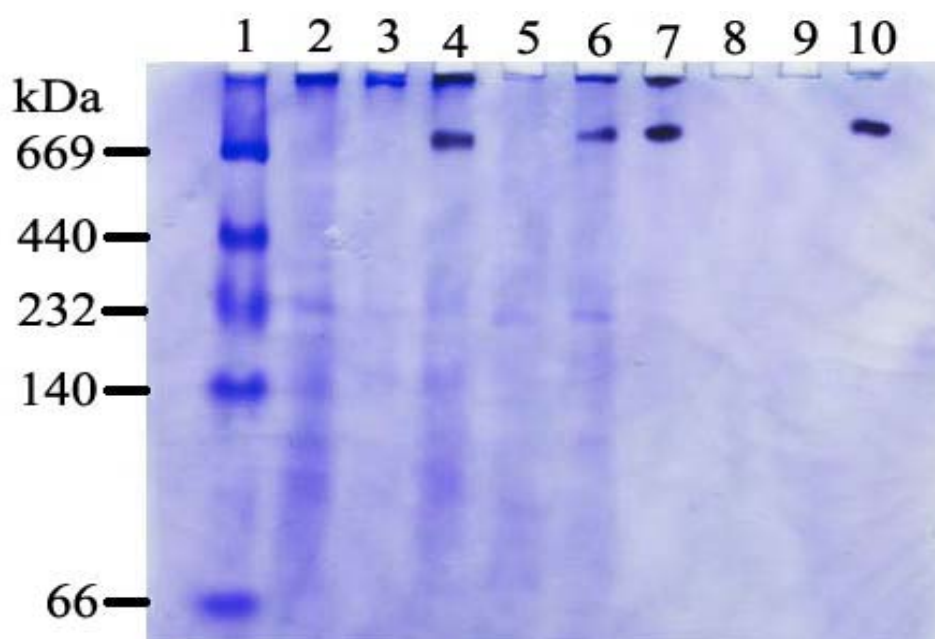
ภาพที่ 9 กิจกรรมของ DME และ TME ในไรโซเบียมอ้างอิงและไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์

กลุ่มที่ 1 คือ *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *B. japonicum* USDA122, *R. galegae* DASA12028 และ *B. japonicum* USDA110 แสดงกิจกรรมของ DME สูงกว่ากิจกรรมของ TME จากพิจารณาจาก จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ พบว่ามีเพียง *B. japonicum* เท่านั้นที่มีการศึกษาและเปรียบเทียบกิจกรรมของ เอนไซม์มาติก โดย Chen และคณะ (1998) ได้ศึกษากิจกรรมของ DME และกิจกรรมของ TME (Chen และคณะ, 1997) ใน *B. japonicum* A1017 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลในเอกสารดังกล่าวพบว่า *B. japonicum* A1017 แสดงกิจกรรมของ DME สูงกว่ากิจกรรมของ TME ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้ จากการศึกษากิจกรรมของ DME และกิจกรรมของ TME จาก *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 ในครั้งนี้ การศึกษากิจกรรมเปรียบเทียบกิจกรรมของ DME และ TME ใน *B. elkanii*, *R. tropici*, *B. liaoningense* และ *R. galegae* ไม่พบผู้รายงานมาก่อน จึงไม่สามารถ หาเอกสารเปรียบเทียบได้

กลุ่มที่ 2 คือ *R. meliloti* 1021 และ *R. gallicum* DASA12023 แสดงกิจกรรมของ TME สูงกว่ากิจกรรมของ DME ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Driscoll และ Finan (1993) รายงานกิจกรรม ของ DME และ TME ใน *R. meliloti* ไว้ แต่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Voegelé และคณะ (1999) ส่วน *R. gallicum* นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ DME และ TME

3.3 การศึกษากิจกรรมของ DME และ TME โดย Native-PAGE

ภาพที่ 10 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของ DME ในสารสกัดเอนไซม์จากไรโซเบียม อ่างอิง *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 และ *B. japonicum* USDA122 และไรโซเบียม ที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์ คือ *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 ถูกนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยไม่ทำให้เสียสภาพ ตามธรรมชาติ เปรียบเทียบกันโปรตีนมาตรฐาน (High molecular weight calibration kit for native electrophoresis, Amersham pharmacia biotech) ที่ประกอบด้วย Thyroglobulin, porcine thyroid น้ำหนักโมเลกุล 669 กิโลดาลตัน Ferritin, equin spleen น้ำหนักโมเลกุล 440 กิโลดาลตัน Catalase, bovine liver น้ำหนักโมเลกุล 232 กิโลดาลตัน Lactate dehydrogenase, bovine heart น้ำหนักโมเลกุล 140 กิโลดาลตัน Albumin, bovine serum น้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน



6% Native Polyacrylamide gel electrophoresis, 25 mA, 8 Hrs.

ภาพที่ 10 การตรวจสอบกิจกรรมของ DME ที่ไม่เสียสภาพของไรโซเบียมอ้างอิงและไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์ ด้วยกระแสไฟฟ้า

เลขที่

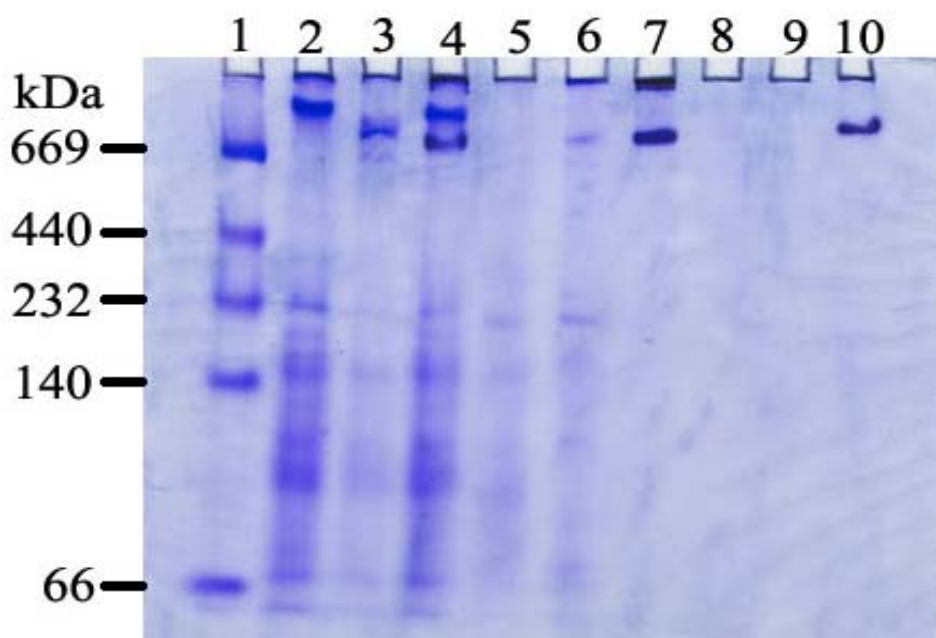
ตัวอย่างโปรตีน

- | | |
|----|--|
| 1 | โปรตีนมาตรฐาน |
| 2 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. elkanii</i> DASA35011 |
| 3 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. tropici</i> DASA23046 |
| 4 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. meliloti</i> 1021 |
| 5 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. liaoningense</i> DASA12006 |
| 6 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> DASA02007 |
| 7 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> USDA122 |
| 8 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. gallicum</i> DASA12023 |
| 9 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. galegae</i> DASA12028 |
| 10 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> USDA110 |

พบว่าเมื่อย้อมเจลที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมด้วยคัมมาซี บิลเลียน บลู (Coomassie Brilliant Blue R-250) พบว่าโปรตีนมาตรฐานปรากฏอย่างชัดเจน และปรากฏแถบของโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* DASA02007, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 ในเลนที่ 4, 6, 7 และ 10 ตามลำดับ เมื่อนำเจلدังกล่าวไปทำการย้อมสีเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ DME พบว่าแถบของโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* DASA02007, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 ดังกล่าวสามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ DME ได้ เนื่องจากแถบโปรตีนดังกล่าวเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วง แต่ไม่ปรากฏแถบของโปรตีนโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของ DME ในสารสกัดเอนไซม์จาก *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 ในการทดสอบดังกล่าว

ภาพที่ 11 แสดงผลการศึกษากิจกรรมของ TME ในสารสกัดเอนไซม์จากไรโซเบียมอ้างอิง *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 และ *B. japonicum* USDA122 และไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์ คือ *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 ถูกนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยไม่ทำให้เสียสภาพตามธรรมชาติ เปรียบเทียบกันโปรตีนมาตรฐาน (High molecular weight calibration kit for native electrophoresis, Amersham pharmacia biotech) ที่ประกอบด้วย Thyroglobulin, porcine thyroid น้ำหนักโมเลกุล 669 กิโลดาลตัน Ferritin, equin spleen น้ำหนักโมเลกุล 440 กิโลดาลตัน Catalase, bovine liver น้ำหนักโมเลกุล 232 กิโลดาลตัน Lactate dehydrogenase, bovine heart น้ำหนักโมเลกุล 140 กิโลดาลตัน Albumin, bovine serum น้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน พบว่าเมื่อย้อมเจลที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าและย้อมด้วยคัมมาซี บิลเลียน บลู (Coomassie Brilliant Blue R-250) พบว่าโปรตีนมาตรฐานปรากฏอย่างชัดเจน และปรากฏแถบของโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จาก *R. meliloti* 1021, *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 ในเลนที่ 1, 2, 4, 7 และ 10 ตามลำดับ เมื่อนำเจلدังกล่าวไปทำการย้อมสีเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ TME พบว่าแถบของโปรตีนในสารสกัดเอนไซม์จาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 ดังกล่าวสามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ TME ได้ เนื่องจากแถบโปรตีนดังกล่าวเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วง แต่ไม่ปรากฏแถบของโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของ TME ในสารสกัดเอนไซม์จาก *B. elkanii* DASA35011 และ *R. tropici* DASA23046 อีกทั้งไม่ปรากฏแถบของโปรตีนและโปรตีนที่

แสดงกิจกรรมของ TME ในสารสกัดเอนไซม์จาก *B. liaoningense* DASA12006, *R. gallicum* DASA12023, *B. japonicum* DASA02007 และ *R. galegae* DASA12028 ในการทดสอบดังกล่าว



6% Native Polyacrylamide gel electrophoresis, 25 mA, 8 Hrs.

ภาพที่ 11 การตรวจสอบกิจกรรมของ TME ที่ไม่เสียสภาพของไรโซเบียมอ้างอิงและไรโซเบียมที่แยกได้ในประเทศไทยจำนวน 6 สปีชีส์ ด้วยกระแสไฟฟ้า

เลขที่

ตัวอย่างโปรตีน

- | | |
|----|--|
| 1 | โปรตีนมาตรฐาน |
| 2 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. elkanii</i> DASA35011 |
| 3 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. tropici</i> DASA23046 |
| 4 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. meliloti</i> 1021 |
| 5 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. liaoningense</i> DASA12006 |
| 6 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> DASA02007 |
| 7 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> USDA122 |
| 8 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. gallicum</i> DASA12023 |
| 9 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>R. galegae</i> DASA12028 |
| 10 | สารสกัดเอนไซม์จาก <i>B. japonicum</i> USDA110 |

3.4 การโคลนยีนที่ควบคุม DME มาลิกเอนไซม์

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดเอนไซม์จาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ DME และ TME ได้ชัดเจนทั้งสองชนิด ในการศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมมาลิกเอนไซม์ทั้งสองชนิด ผู้วิจัยจึงไม่เลือก *R. meliloti* 1021 ซึ่งเป็นตัวแทนของไรโซเบียมที่เจริญเร็ว เนื่องจาก Driscoll และ Finan (1993) ได้ทำการศึกษาลักษณะของ DME และ TME อีกทั้ง Driscoll และ Finan (1996b) ได้ทำการศึกษาบทบาทของมาลิกเอนไซม์ต่อการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมแล้ว พบว่า *Rhizobium meliloti* สายพันธุ์กลาย *dme⁻* ที่ไม่มีกิจกรรมของ $\text{NAD}^+\text{-ME}$ (DME: EC 1.1.1.39) แต่ยังคงมีกิจกรรมของ $\text{NADP}^+\text{-ME}$ (TME: 1.1.1.40) สูญเสียความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่ว ในขณะที่สายพันธุ์กลาย *tme⁻* ที่สูญเสียกิจกรรมของ TME ยังคงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ จากหลักฐานดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า DME มีบทบาทสำคัญต่อการตรึงไนโตรเจนของ *R. meliloti* ในขณะที่ TME ไม่มีความจำเป็นต่อการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย (bacteroid)

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาลักษณะของยีนที่ควบคุมมาลิกเอนไซม์ทั้งสองชนิด ในไรโซเบียมที่เจริญช้า คือ *B. japonicum* USDA110 และ *B. japonicum* USDA122 ผู้วิจัยได้สนใจ *B. japonicum* USDA122 เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษายีนที่ควบคุม DME และ TME และลักษณะของเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนยีนดังกล่าวจาก *B. japonicum* ผู้วิจัยจึงประสงค์ที่จะทำการศึกษายีนที่ควบคุม DME และ TME และลักษณะของเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนยีนดังกล่าวจาก *B. japonicum* ต่อไป ซึ่ง Sinsuwongwat และคณะ (2002a) ได้โคลนยีน *tme* มาลิกเอนไซม์ใน *B. japonicum* USDA110 พบยีน *Bjtmel1* ขนาด 2,277 คู่เบส ซึ่งควบคุมโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 758 ตัว ยีนนี้ถูกบรรจุในเวกเตอร์ pET32a(+) ได้พลาสมิดลูกผสม pTME01 และถ่ายทอดสู่ *E. coli* BL21 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน พลาสมิดลูกผสมดังกล่าวสามารถแสดงออกและให้ฟิวชั่นโปรตีนที่สามารถแสดงกิจกรรมของ TME มาลิกเอนไซม์ได้ ทั้งในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และ Native-PAGE โปรตีนที่แสดงออกนี้มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 81.3 kDa และ *pI* เท่ากับ 6.07 ภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ 7.8 โดยเมื่อใช้ Line Weaver Burk plot พบว่ามีค่า K_m ต่อ L-malate และ NADP^+ เป็น 1.1 mM และ 0.010 mM ตามลำดับ

ผู้วิจัยจึงศึกษาขึ้นที่ควบคุม DME และลักษณะของเอนไซม์ที่ได้จากการโคลนยีนดังกล่าว ใน *B. japonicum* USDA122 ซึ่งยังไม่พบการตีพิมพ์ในวารสารต่าง ๆ ต่อไป

3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* ยีน

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* ยีน ดำเนินการโดยทำการค้นหายีนของมาลิคเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จาก DDBJ/NCBI/EMBL และทำการการเปรียบเทียบมาลิคเอนไซม์ยีนของ *E. coli* (AE000333), *N. meningitidis* (AL162754), *P. aeruginosa* (AE0004918) และ *S. meliloti* (AF017443) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN (Version 5.0) ผลการเปรียบเทียบดังกล่าวแสดงในภาพที่ 12 เลือกบริเวณที่มีความเหมือนกันของเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบไพรเมอร์ สามารถออกแบบไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดินหน้า (ME1f) และย้อนกลับ (ME1r) เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* ยีน ซึ่งแต่ละไพรเมอร์ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ละ 21 นิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในภาพที่ 12 และตารางที่ 4

<i>E. coli</i> (AE000333)	257: CAGGCAAACCGGTGATGGAAGGCAAGGGCGTTCTGTTTAAGAAATTCGCCGGGATTGATG 316
<i>N. meningitidis</i> (AL162754)	257: CGGGCAAACCGGTGATGGAAGGCAAGGGCGTATTGTTCAAAAAATTCGCCGGTGTGGACG 316
<i>P. aeruginosa</i> (AE0004918)	254: CCTCCAAGCCGGTGATGGAAGGCAAGGGTGTGCTGTTCAAGCGCTTCGCCGGCATCGACG 313
<i>S. meliloti</i> (AF017443)	296: CCTCCAACCGGTGATGGAAGGTAAGGCTGTTCTCTTCAAGAAATTCGCAAGGGATCGACG 355
	* *** ** ***** ** ** ** **
(Primer ME1f, 21 mer) 5'-CAARCCSGTGATGGAAGGYAA-3'	
<i>E. coli</i> (AE000333)	916: ATCATTTGCACCGGTCGTTCTGACTATCCGAACAGGTGAACAACGTCTGTGCTTCCCG 975
<i>N. meningitidis</i> (AL162754)	922: GTTATCGGTACCGGCCGCTCCGACTTCCGAACCAAGTGAACAATGTATTGTGCTTCCCG 981
<i>P. aeruginosa</i> (AE0004918)	905: ATCATGGCTACCGGTCGTTCCGACTATCCGAATCAGGTCAACAACGTGCTCGGTTTCCCG 966
<i>S. meliloti</i> (AF017443)	952: ATGATCTGCACCGGACGCTCGGACTTCCGAACAGGTCAACAATGTTCTCTGTTTCCCG 1011
	* ** . ***** ** ** ***** ** ** ***** ** ** *****
(Primer ME1r, 21 mer) 5'-AAGCCYGTNYTWKGYTTCCW-3'	
3'-TTCTTRCANRAWMCRAGGGW-5'	

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบมาลิคเอนไซม์ยีนของ *E. coli* (AE000333), *N. meningitidis* (AL162754), *P. aeruginosa* (AE0004918) และ *S. meliloti* (AF017443) เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดินหน้า (ME1f) และย้อนกลับ (ME1r) ในการพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิคเอนไซม์ยีน

ตารางที่ 4. ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *dme* โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดจาก *B. japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ ด้วยเทคนิค PCR.

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (จาก 5' ไป 3')	บริเวณเป้าหมาย
ME1f	CAARCCSGTGATGGAAGGYAA	บริเวณอนุรักษ์ของ <i>dme</i>
ME1r	WGGAARCMWARNACRTTCTT	บริเวณอนุรักษ์ของ <i>dme</i>
DMEf	CCCGAATTCATGTCGTCTTATTCT	ORF ที่สมบูรณ์ของ <i>dme</i>
DMEr	GGGAAGCTTTCAGGTAAACAACGT	ORF ที่สมบูรณ์ของ <i>dme</i>

หมายเหตุ:

อักษรที่ใช้แทนนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ในไพรเมอร์ที่ออกแบบเป็นไปตามมาตรฐานของ IUPAC.2.2.2 Biochemical assay

f; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดินหน้า (forward primer)

r; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ (reverse primer)

DME; NAD⁺-dependent malic enzyme.

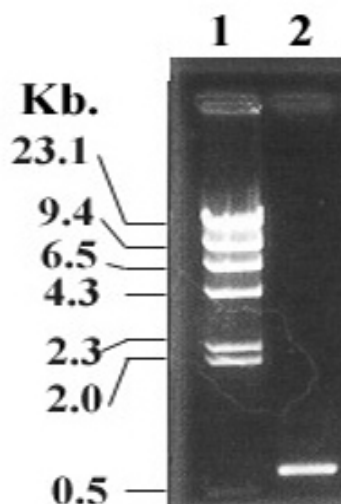
ME1f; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดินหน้า เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิกเอนไซม์

ME1r; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ เพื่อพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิกเอนไซม์

DMEf; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดินหน้า เพื่อพิมพ์ขยายมาลิกเอนไซม์ทั้งหมด

DMEr; ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ เพื่อพิมพ์ขยายมาลิกเอนไซม์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สังเคราะห์โดย GENSET KK (Kyoto, Japan) เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้มาใช้ในการพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของ *dme* มาลิกเอนไซม์ โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. japonicum* USDA122 เป็นแม่แบบ ด้วยเครื่อง MyCycler ของ Bio-Rad โดยโปรแกรมการทำ PCR คือ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยสารละลาย เอทิดีเอมโบรไมด์ก่อนนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้รังสีเหนือม่วง พบว่าสามารถพิมพ์ขยายได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด ~ 700 bp ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของมาลิกเอนไซม์ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ในภาพที่ 12 เรียกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พิมพ์ขยายได้นี้ว่า ME1



1 % Agarose gel electrophoresis, 100 V, 30 mins.

ภาพที่ 13 ผลการพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิเอนไซม์ยีน เมื่อใช้ดีเอ็นเอจาก *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ (template) ด้วยไพรเมอร์ ME1f และ ME1r โดยเทคนิค PCR

เลนที่	ตัวอย่าง	ไพรเมอร์
1	λ ดีเอ็นเอที่ย่อยด้วย <i>Hind</i> III	-
2	ME1 (PCR product)	ME1f และ ME1r

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (ME1) ถูกนำไปหาลำดับการจัดเรียงตัวของเบส และ ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสที่ได้โดยรวมถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของยีน *dme* มาลิเอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ใน DDBJ/NCBI/EMBL ด้วยซอฟต์แวร์ CLUSTAL W พบว่าลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน ME1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน *dme* มาลิเอนไซม์ของไรโซเบียม คือ *M. loti* และ *S. meliloti* เป็นอย่างสูง ดังปรากฏในภาพที่ 14 จึงมีความมั่นใจว่าชิ้นดีเอ็นเอ ME1 นี้เป็นส่วนหนึ่งของ *dme* มาลิเอนไซม์

<i>M. loti</i> NAD-ME	256:GGCCTCGGCAACATCGGCCGCTGGCCTCCAAGCCGGTCATGGAAAGGCAAGCGTTCTGTTCAGAAAGTTTCGCCGGCATCGACGTCTTC	345
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	271:GGCCTCGGCAATATCGGTCCCTCGCCTCCAACCCGTCGATGGAAGGTAAGGCTGTTCTCTTCAAGAAAGTTTCGACGGATCGACGTCTTC	360
<i>B. japonicum</i> ME1	0:-----GTCTGTTCAAGAAAGTTTGCCGGCATCGACGTGTT	45

<i>M. loti</i> NAD-ME	346:GACATCGAGATCGACGCTCCCGAGATCGAGCGCATGGTGGAGACCGTCGCCGCCCTCGAACCCCATTTTCGGCGCATCAATCTCGAGGAC	435
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	361:GACATCGAGATCGACGACCCGACGGTCGATCGGATGGTCGACGTCATCTCGGCGCTGGAAGCCGACTTTCGGCGCATCAATCTCGAGGAC	450
<i>B. japonicum</i> ME1	46:GATATCGAGATCGCGCCGACACCATCGACCCGGTGGTCGAGACCGTGGCGGCTCGAGCCGACTTTCGGCGCATCAATCTCGAGGAC	136

<i>M. loti</i> NAD-ME	436:ATCAAGGCGCCGAGTGTTTTGAAGTCGAGGAACGGTGAAGCCCGCATGAGCATACCGGATTTCACGACGACGACATGGCACC	525
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	451:ATCAAGGCTCCCGAATGTTCGAGGTGGAGCGCGCTGTCGCGGAGAAATGGAATACCGGTCCTTCACGACGACGACGACGGACCG	540
<i>B. japonicum</i> ME1	136:ATCCGCGGCGGAGTGCTTCGAGATCGAGCGCGGCTGAAGGAGCGCATGAAGATCCCGGTCCTTCATGACGACGACGACGACCG	225

<i>M. loti</i> NAD-ME	526:ATCATCGTCGCCGCCGCGTGTCTCAACGGACTGGAATTGCGCGGCAAAACGATCTCGGACATCAAGTGTGTCACCTCCGGCGCCGGTGC	615
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	541:ATCATCGTCGCCGCCGCGCTCTGAACGGCTGGAAGTGGCGGCAAGGACATTGCGGAGCCGAGATGTCGCGCTCCGGTCCGGCG	630
<i>B. japonicum</i> ME1	226:ATCATCGTCGCCGCCGACCATACCAACGGCTCAAGGCTGAAGGCGCAAGGAGCTGTGCGAGTCAAGATGTCGCGTCAGGGGCAAGTGTCT	315

<i>M. loti</i> NAD-ME	616:GCCGCCCTTGCTGCTGAACCTTCTGCTGTCGCTGGCGTGGCGATCGAAACATCTGGG--TCACCGACCGTTTCGGCGTCGCCACAA	704
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	631:GGCGCGCTTGCTGCTCAACCTCCTGTCACGCTGGCGGCCAGGCGCGAAACATCTGGG--TCCACGACATCGAAGTCTGCTACAA	719
<i>B. japonicum</i> ME1	316:GCCGCGATTGCGACGCTCAATCTTCTGCTGTCGATGGCGCGCAGCGCAAGATACATCTGGGTCGCGACATCGACGGCACCTCGTCAT	405

<i>M. loti</i> NAD-ME	705:GGGCGCACCGAAGA--GATGACCGCTGGAAGACCCCTATGTGAAGGACACCGAGGCGCGACGCTGGCGGATGTCATCCCGGGCGC	792
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	720:AGGGCGCGAGGCCCT--GATGGACGAGTGGAAAGCCGCTACGCGCAGGAGAGCGACAATCGCGTGCTGCCGACAGCATCGGCGGGCG	807
<i>B. japonicum</i> ME1	406:GAGGCGCGCAACACCTCGATGACCGCTGGAAGCGGCTCTATGCGCAGAAAGCCGACAGCGACGCTCGCCGACGTCATCGGCGGCG	495

<i>M. loti</i> NAD-ME	793:GATGTTCTCTCGGCTCTCTGCGCGGGCGTGTGAAGCCGGAAGTCTGTCGACATATGCGCCAAAGCCGCTGATCTGGCGCTCGCC	882
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	808:GACGTGTTCTGGGCTCTCGCGCGCGGCTCTCAAGCTGAAGTGTGGCCGGATGCGCGAAAGCCGCTGATCATGCGCTGCGC	897
<i>B. japonicum</i> ME1	496:GACATCTTCATCGGCTGTGCGGACCGGCGTCTCAAGCTGAGATGGCAAGGCGATGGGCGCAAGCCGCTCATCATGCGCTCGCC	585

<i>M. loti</i> NAD-ME	883:AATCCCAATCCGAGATCATGCGGAAGTGGCGGCGCGGCGTCCGATGCCATGATCTGCACGGCGCTCCGATTTTCCCAATCAG	972
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	898:AATCTACGCGGAGATCATGCGAGAGGTGGCGCGCGCGCGCGCCGATGCCATGATCTGCACGGAGCTCGGACTTCCGAACCAAG	987
<i>B. japonicum</i> ME1	586:AATCCGACGCCGGAATCATGCGGAGGAAGCGGGAAGTGCGCCCGACGCCATGATCTGCACGGCGCTCGGACTATCCGAACCAAG	675

<i>M. loti</i> NAD-ME	973:GTCAACAACGTCCTGTGCTTCCCTATATCTTCGCTGGCGGCTCGACTGCGGCGCAGCGCCATCAACGAGGAGATGAAGATGGCCGCC	1062
<i>S. meliloti</i> NAD-ME	988:GTCAACAATGTTCTGTGTTCCCGCATATCTTCGCTGGCGGCTCGATTGCGGCGCAGCACCATCAACGAAGAAATGAAGATGGCGGCG	1077
<i>B. japonicum</i> ME1	676:GTC-----	678

ภาพที่ 14 ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของผลิตภัณฑ์ (ME1) ที่ใช้โคลนนิ่งจาก *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ (template) และไพรเมอร์ ME1f กับ ME1r สำหรับพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิกเอนไซม์จีน เปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในยีน *dme* ของ *M. loti* (AP002995) และยีน *dme* ของ *S. meliloti* (AF017443).

3.4.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อพิมพ์ขยาย *dme* ยีนที่สมบูรณ์

เพื่อค้นหาดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่ควบคุม DME มาลิกเอนไซม์ใน *B. japonicum* ที่สมบูรณ์ จึงนำลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน ME1 ไปเปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 จาก Kazusa DNA Institute ด้วยโปรแกรม GENETYX-WIN (Version 5.0) พบว่าลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน ME 1 มีความคล้ายคลึงกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโคลน หมายเลข 110c1410 จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 ดังแสดงในภาพที่ 15 และภาพที่ 16

B. japonicum USDA110C14011	301:CCCGTGATGGAGGGCAAGGCGGTCTGTCAAAGAAGTTT	GCCGGCATCGACGTGTTTCGAT	360
B. japonicum USDA122 ME1	18:-----	TGCCGGCATCGACGTGTTTCGAT	39
B. japonicum USDA110C14011	361:ATCGAGATCGCCGCCGACACCATCGACCGGGTGGTCGAGACCGTGGCGGCCTCGAGCCG		420
B. japonicum USDA122 ME1	40:ATCGAGATCGCCGCCGACACCATCGACCGGGTGGTCGAGACCGTGGCGGCCTCGAGCCG		99
B. japonicum USDA110C14011	421:ACTTTCGGCGGCATCAATCTCGAGGACATCCGCGGGCCGGAGTGTCTTCGAGATCGAGGGC		480
B. japonicum USDA122 ME1	100:ACTTTCGGCGGCATCAATCTCGAGGACATCCGCGGGCCGGAGTGTCTTCGAGATCGAGGGC		159
B. japonicum USDA110C14011	481:CGGCTGAAGGAGCGCATGAAGATCCCGGTCTTCCATGACGACCGACCGGCACCGCCATC		540
B. japonicum USDA122 ME1	160:CGGCTGAAGGAGCGCATGAAGATCCCGGTCTTCCATGACGACCGACCGGCACCGCCATC		219
B. japonicum USDA110C14011	541:ATCGTCCGCCGCCCATCACCAACGGCCCTCAGGCTGAACGGCAAGAGCTGTCCGACGTC		600
B. japonicum USDA122 ME1	220:ATCGTCCGCCGCCCATCACCAACGGCCCTCAGGCTGAACGGCAAGAGCTGTCCGACGTC		279
B. japonicum USDA110C14011	601:TAGATCGTGGCGTCAGGGGCAAGGTGCTGCGCGGATTGCGACGCTCAATCTTCTGGTGTG		660
B. japonicum USDA122 ME1	280:TAGATCGTGGCGTCAGGGGCAAGGTGCTGCGCGGATTGCGACGCTCAATCTTCTGGTGTG		339
B. japonicum USDA110C14011	661:ATGGGCGCGCAGCGCANTACATCTGGG--TGTGGACATCGACGGCTCGT--GCATGAG		717
B. japonicum USDA122 ME1	340:ATGGGCGCGCAGCGCANTACATCTGGG--TGTGGACATCGACGGCTCGT--GCATGAG		399
B. japonicum USDA110C14011	718:GGCCGCAACATCTCGATGGACCGCTGGAAGGCGGTCTATGCGCAGAAGACCGACAAAGCGC		777
B. japonicum USDA122 ME1	400:GGCCGCAACATCTCGATGGACCGCTGGAAGGCGGTCTATGCGCAGAAGACCGACAAAGCGC		459
B. japonicum USDA110C14011	778:ACGCTCGCCGACGTCATCGCGGGCGCGGACATCTTCATCGGGCTGTGCGCACCGGGCGTC		837
B. japonicum USDA122 ME1	460:ACGCTCGCCGACGTCATCGCGGGCGCGGACATCTTCATCGGGCTGTGCGCACCGGGCGTC		519
B. japonicum USDA110C14011	838:CTCAAGCCTGAGATGGCCAAGGCGATGACGACAAAGCCGCTCATATGGCGCTCGCCAAAT		897
B. japonicum USDA122 ME1	520:CTCAAGCCTGAGATGGCCAAGGCGATGACGACAAAGCCGCTCATATGGCGCTCGCCAAAT		579
B. japonicum USDA110C14011	898:CCGACGCCCGAATCATGCCGGAGGAAGCGCGGAAGGTGCGCCCCGACGCCATGATCTGC		957
B. japonicum USDA122 ME1	580:CCGACGCCCGAATCATGCCGGAGGAAGCGCGGAAGGTGCGCCCCGACGCCATGATCTGC		639
B. japonicum USDA110C14011	958:ACCGGCCGCTCGGACTATCCGAACCGGTCAACAACGTCCTGTGCTTTCCTTCATCTTC		1017
B. japonicum USDA122 ME1	640:ACCGGCCGCTCGGACTATCCGAACCGGTCAACAACGTCCTGTGCTTTCCTTCATCTTC		669
B. japonicum USDA110C14011	1018:CGCGGGCGGCTCGACGTCGGTGCCAGCGCCATCAACGAGGAGATGAAGCACGCCGCGGTC		1077
B. japonicum USDA122 ME1	670:-----		670

ภาพที่ 15 ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของผลิตภัณฑ์ (ME1) ที่ใช้ดีเอ็นเอจาก *B. japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ (template) และไพรเมอร์ ME1f กับ ME1r สำหรับพิมพ์ขยาย บริเวณอนุรักษ์ของ *dme* มาลิกเอนไซม์ขึ้น เปรียบเทียบกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโครงการจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 โคลนที่ C14011 ของสถาบันดีเอ็นเอ Kazusa ประเทศญี่ปุ่น

```

23341  GGCCGGTAACGCGAGGCAAGAGACCGCATGTCGTCCTATTCTGATGACCTCCACCAGGCG 23400
      G R * R E A R D R M S S Y S D D L H Q A
      A G N A R Q E T A C R P I L M T S T R R
      R P V T R G K R P H V V L F * * P P P G

23401  GCGCTCGCCTATCATCGTCTGCCGCGCCCGGCAAGCTCGAGATCCAGGCGACCAAGCCG 23460
      A L A Y H R L P R P G K L E I Q A T K P
      R S P I I V C R A P A S S R S R R P S R
      G A R L S S S A A P R Q A R D P G D Q A

23461  CTTGCCAACGAGCGCGACCTCGCGCTTGCTATTCTCCGGGCGTTGCGGCTGCCTGCACC 23520
      L A N Q R D L A L A Y S P G V A A A C T
      L P T S A T S R L P I L R A L R L P A P
      A C Q P A R P R A C L F S G R C G C L H

23521  GAGATCGCCAAGAACCCGGCCGAGGCCGCGACGCTGACCACCGCGCCAACCTGGTCGC 23580
      E I A K N P A E A G D A D H P R Q P G R
      R S P R T R P R P A T L T T R A N L V A
      R D R Q E P G R G R R R * P P A P T W S

23581  CGGTGGTCTCGAACGGCACCGGGTGCTCGGCTTGCCATATGGCCCGCTGGCCTCCAAG 23640
      R W S R T A P R C S A L A Y G P L A S K
      P G V L E R H R A R P W H M A R W P P S
      P V V S N G T A V L G L G I W P A G L Q

23641  CCCGTGATGGAGGGCAAGGCGGTCTGTCAAAGAAGTTGCGGCGATCGACGTGTTGAT 23700
      P V M E G K A V L S K K F A G I D V F D
      P * W R A R R S C Q R S L P A S T C S I
      A R D G G Q G G P V K E V C R H R R V R

23701  ATCGAGATCGCCGCCGACCATCGACCGGGTGGTCGAGACCGTGGCGGCGCTCGAGCCG 23760
      I E I A A D T I D R V V E T V A A L E R
      S R S P P T P I S T G W S R P W R R S S R
      Y R D R R R H H R P G G R D R G G A R A

23761  ACTTTCGGCGGCATCAATCTCGAGGACATCCGCGGGCCGGAGTGCTTCGAGATCGAGGCG 23820
      T F G G I N L E D I R G P E C F E I E A
      L S A A S I S R T S A G R S A S R S R
      D F R R H Q S R G H P R A G V L R D R G

23821  CGGCTGAAGGAGCGCATGAAGATCCCGGTCTTCCATGACGACCAGCACGGCACCGCCATC 23880
      R L K E R M K I P V F H D D Q H G T A I
      A G * R S A * R S R S S M T T S T A P P S
      A A E G A H E D P G L P * R P A R H R H

23881  ATCGTCGCCGCCGACCATCAACGCGCTCAGGCTGAACGGCAAGAAGCTGTGCGACGTC 23940
      I V A A A I T N G L R L N G K K L S D V
      S S P P P S P T A S G * T A R S C R T S
      H R R R H H Q R R P Q A E R Q E A V G R

23941  AAGATCGTGGCGTCAGGGGCGAGTGTGCGCGATTGCGACGCTCAATCTTCTGGTGTGCG 24000
      K I V A S G A G A A A I A T L N L L V S
      R S W R Q G Q V L P R L R R S I F W C R
      Q D R G V R G R C C R D C D A Q S S G V

24001  ATGGGCGCGCAGCGCAATAACATCTGGTCTGCGACATCGACGGCCTCGTGCATGAGGGC 24060
      M G A Q R N N I W V C D I D G L V H E G
      W A R S A I T S G S A T S T A S C M R A
      D G R A A Q * H L G L R H R R P R A * G

24061  CGCAACATCTCGATGGACCGCTGGAAGGCGGTCTATGCGCAGAAGACCGACAAGCGCACG 24120
      R N I S M D R W K A V Y A Q K T D K R T
      A T S R W T A G R R S Y M R R P T S A R
      P Q H L D G P L E G G L C A E D R Q A H

```

ภาพที่ 16 การหา ORF ของ *dme* มาลิเอนไซม์ จากลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโครงการจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 โคลนที่ C14011 โดยเลือก ORF ที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน ต่าง ๆ ที่ระบุด้วยอักษรสีเขียว โดยอักษรสีแดงคือนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ DMElf และ DMElr *dme* อักษรสีน้ำเงินคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ ME 1

24121 CTCGCCGACGTCATCGGCGGCGCGGACATCTTCATCGGGCTGTCGGCACCGGGCGTCTCTC 24180
 L A D V I G G A D I F I G L S A P G V L S
 A R R R H R R R G H L H R A V G T G R P

24181 AAGCCTGAGATGGCCAAGGCGATGAGCGACAAGCCGCTCATCATGGCGCTCGCCAATCCG 24240
 K P E M A K A M S D K P L I M A L A N P
 Q A * D G Q G D E R Q A A H H G A R Q S

24241 ACGCCCGAAATCATGCCGGAGGAAGCGCGGAAGGTGCGCCCCGACGCCATGATCTGCACC 24300
 T P E I M P E E A R K V R P D A M I C T
 D A R N H A G G S A E G A P R R H D L H

24301 GGCGGCTCGGACTATCCGAACAGGTC AACAACGTCTGTGCTTTCCTTCATCTTCCGC 24360
 G A R S D Y P N Q V N N V L C F P F I F R
 R P L G L S E P G Q Q R P V L S L H L P

24361 GCGCGCTCGACGTCGGTGCCAGCGCCATCAACGAGGAGATGAAGCACGCCGCGGTGCAA 24420
 G A L D V G A S A I N E E M K H A A V E
 R A R S T S V P A P S T R R * S T P R S K

24421 GCCATCGCGCAGCTCGCGCGGAGGCGCGTGGATGCGGTGGCGCAAGGGGTCGACACC 24480
 A I A Q L A R E A P S D A V A Q G V D T
 S H R A A R A R G A V G C G G A R G R H

24481 GCGGAGATGGGAGGCTTCGGTCCGGGCTCGTGATTCCGAGCCGTTTCGATCCACGGCTG 24540
 G E M G F G P G S L I P S P F D P R L
 R R D G R L R S G L A D S E P V R S T A

24541 ATCCTGCGCGTGGCGCGCGGTTGCGAAGGCCGCGATCGAGTCGGGCGTCGCGACGCGC 24600
 I L R V A P A V A K A A I E S G V A T R
 D P A R G A G G C E G R D R V G R R D A

24601 CCCATCACCAATTTTCGACGAATATGCCGCGCAGCTCATGCGCTTCGCTTCCGCTCCGGC 24660
 P I T N F D E Y A A Q L M R F A F R S G
 P H S P I S T N M P R S S C A S P S A P A

24661 CTCGTCATGAAGCCGATGTTGCGCAAGGCCAAGACCCAGCCGGTGGCGGTGATCTATGCC 24720
 L V M K P M F A K A K T Q P V R V I Y A
 P S S * S R C S P R P S R C A * S M P

24721 GAAGGCGAGGACGAGCGGTGTTGCGCGCCACGCAGGTGGTGCTGGAGGAGAAGCTGGCG 24780
 E G E D E R V L R A T Q V V L E E K L A
 R R R G R A R V A R H A G G A G G E A G

24781 ACGCCGATCCTGGTTCGGTCCGTCCGTGGAGGCGCGCATCAAGCGCTTCGGCCTG 24840
 T P I L V G R P S V V E A R I K R F G L
 D A D P G R S S V R G G G A H Q A L R P

24841 TCGATCAAGGCCGGAAGGATTTTCGACCTCGTCAACCCGAGGACGATCCGCGCTACCGA 24900
 S I K A G K D F D L V N P E D D P R Y R
 V D Q G R Q G F R P R Q P R G R S A L P

ภาพที่ 16 การหา ORF ของ *dme* มาลิเอนไชม์ จากลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน
 โครงการจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 โคลนที่ C14011 โดยเลือก ORF ที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย
 กรดอะมิโน ต่าง ๆ ที่ระบุด้วยอักษรสีเขียว โดยอักษรสีแดงคือนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์
 DMElf และ DMElr *dme* อักษรสีน้ำเงินคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ ME 1 (ต่อ)

```

24901 TCCTACGTGCAGTCCTATGTCGAGGTCGCCGCCGCCGCCGCGTACGCCGGATGCGGCG 24960
      S Y V Q S Y V E V A G R R G V T P D A A
      P T C S P M S R S P A A A A * R R M R R
24961 I L R A V L C R G R R P P R R D A G C G
      CGCACGGTGGTACGCACCAACAACACGGTCATCGCCGCGCTCGCGGTGACGCGCGGGGAG 25020
      R T V V R T N N T V I A A L A V T R G E
      A R W Y A P T T R S S P R S R * R A G R
      A H G G T H Q Q H G H R R A R G D A R G
25021 GCGGATGCCATGCTCTGCGGCGTCGAGGGCCGCTACATGAGCCATCTGCGCCATGTCCGC 25080
      A D A M L C G V E G R Y M S H L R H V R
      R M P C S A A S R A A T * A I C A M S A
      G G C H A L R R R G P L H E P S A P C P
25081 GAGATCGTCGGCTTCTCGGCAGGGATCAGCGACTATGCGGCGCTGGCGCTGCTGATCACC 25140
      E I V G F S A G I S D Y A A L A L L I T
      R S S A S R Q G S A T M R R W R C * S P
      R D R R L L G R D Q R L C G A G A A D H
25141 AGCAAGGGCGCGTTCTTCATCGCCGATACGCAGGTTTCGCCCAATCCGAGCGCGGAAGAA 25200
      S K G A F F I A D T Q V R P N P S A E E
      A R A R S S S P I R R F A P I R A R K N
      Q Q G R V L H R R Y A G S P Q S E R G R
25201 CTCGCCGAGATCGCTCGCTCGCGGCGGTCCACGTCCAGCGCTTCAACATCAAGCCGAAG 25260
      L A E I A S L A A V H V Q R F N I K P K
      S P R S P R S R S T S S A S T S S R R
      T R R D R L A R G G P R P A L Q H Q A E
25261 ATCGCCTTCGTTTCGCATTCCGATTTTCGGCAGCTACGACACCGAGTCTCGCGCAAGATG 25320
      I A F V S H S D F G S Y D T E S S R K M
      S P S F R I P I S A A T T P S P R A R C
      D R L R F A F R F R Q L R H R V L A Q D
25321 CGCCGGGCGACCCAGCTTCTGAAGGAGAAGCATCCGGAGATCGAGGCCGACGGCGAGATG 25380
      R R A T Q L L K E K H P E I E A D G E M
      A G R P S F * R R S I R R S R P T A R C
      A P G D P A S E G E A S G D R G R R R D
25381 CAGGGCGACACGGCACTTTCGGCCGCTGCGCGCAAGATGGTGCTGCCGCACTCCAACCTC 25440
      Q G D T A L S A A A R K M V L P H S N L
      R A D T R H F R P L R A R W C C R T P T S
      A G R H G T F G R C A Q D G A A A L Q P
25441 GAGGGCGAGGCCAACATCATGATCATGCCGACGCTCGACACCGCCAACGTGCGCTATCAG 25500
      E G E A N I M I M P T L D T A N V A Y Q
      R A R G P T S * S C R R S T P P T S P I R
      R R R G Q H H D H A D A R H R Q R R L S
25501 ATGATCAAGTCGCTCGCGGATGCACTGCCCGTCGCCCGCATCCTGATCGGCCCGGCGCGC 25560
      M I K S L A D A L P V G P I L I G P A R
      * S S R S R M H C P S A R S * S A R R A
      D D Q V A R G C T A R R P D P D R P G A
25561 CCGGCGCATATCCTCACCCCTCGGTGACCGCGCGGCGCATCCTCAACATGACTGCGGTC 25620
      P A H I L T P S V T A R G I L N M T A V
      R R I S S P P R * P R A A S S T * L R S
      P G A Y P H P L G D R A R H P Q H D C G
25621 GCCGTCGTGGAAGCGCAGGAGCGCGCGGCGCGGCGAGCAGCCGACGTTGTTTACCTGAGGC 25680
      A V V E A Q E R A A R G Q Q P T L F T * G
      P S W K R R S A R R G S S R R C L P E A
      R R R G S A G A R G A A A A D V V Y L R

```

ภาพที่ 16 การหา ORF ของ *dme* มาลิกเอนไซม์ จากลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโครงการจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 โคลนที่ C14011 โดยเลือก ORF ที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน ต่าง ๆ ที่ระบุด้วยอักษรสีเขียว โดยอักษรสีแดงคือนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ DME1f และ DME1r *dme* อักษรสีน้ำเงินคือนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ ME 1 (ต่อ)

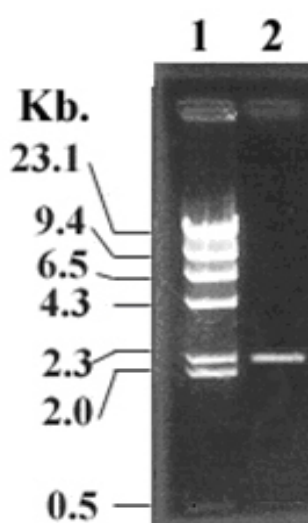
จากภาพที่ 15 เมื่อทราบบริเวณที่มีลำดับการจัดเรียงตัวของเบสบนจีโนมของ *B.japonicum* USDA110 ที่เหมือนกับลำดับการจัดเรียงตัวของ ME1 ซึ่งมีความเหมือนไม่ต่ำกว่า 97% โดยนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันถูกแรเงาด้วยแถบสีดำ จากนั้นจึงใช้โปรแกรม GENETYX-WIN (Version 5.0) ช่วยในการวิเคราะห์หา ORF ของ *dme* มาลิกเอนไซม์ จากลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในโคลนที่ C14011 จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 ดังแสดงในภาพที่ 16 เมื่อพิจารณาจากทั้งสาม ORF พบว่า ORF ที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่ระบุด้วยอักษร สีเขียวมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็น ORF ของ *dme* มาลิกเอนไซม์ ซึ่ง ORF ดังกล่าวเริ่มจากกรดอะมิโนเมไทโอนีนที่ควบคุมโดยนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 23368 เป็นต้นไป DMEf ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิมพ์ขยาย *dme* มาลิกเอนไซม์ทั้งหมด จึงถูกออกแบบโดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปทางขวามือ รวมทั้งสิ้น 21 นิวคลีโอไทด์และระบุโดยอักษรสีแดง เมื่ออ่านจากเมไทโอนีนที่เป็นจุดเริ่ม ORF ของ *dme* มาลิก เอนไซม์ขึ้นไปทางขวามืออย่างต่อเนื่อง พบว่า ORF ดังกล่าวสิ้นสุดที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 25676 ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สำหรับเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ DME1r ซึ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ ในการพิมพ์ขยายมาลิกเอนไซม์ทั้งหมด จึงถูกออกแบบโดยเริ่มจากนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปทางซ้ายมือรวมทั้งสิ้น 21 นิวคลีโอไทด์และระบุโดยอักษรสีแดง ส่วนอักษรสีน้ำเงินนั้นแสดงถึงนิวคลีโอไทด์จากโคลนหมายเลข 110c1410 ของ *B. japonicum* USDA110 ที่เหมือนกับ ME 1

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ดังภาพที่ 17 กล่าวคือหากใช้ชิ้นที่ควบคุม *dme* มาลิกเอนไซม์ ใน *B. japonicum* ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 2,310 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสามารถพิมพ์ลอกและแปรรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งสิ้น 770 หน่วย

ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ดีเอ็นเอ (DMEf) และไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ (DMEr) ในการพิมพ์ขยายมาลิกเอนไซม์ทั้งหมดที่แสดงในตารางที่ 4 นั้นได้เพิ่มบริเวณตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* เพิ่มที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ DMEf และ DMEr, ตามลำดับ เมื่อ นำไพรเมอร์ที่ได้มาใช้ในการพิมพ์ขยาย *dme* มาลิกเอนไซม์ขึ้น โดยใช้จีโนมดิเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. japonicum* USDA122 เป็นแม่แบบ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยการแยก ดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยสารละลายเอทิดียมโบโรไมด์ก่อนนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้รังสีเหนือม่วงแล้วผลปรากฏดังภาพที่ 18

ภาพที่ 17 บริเวณลำดับการจัดเรียงตัวของเบสในจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 จาก Kazusa DNA Institute (โคลนหมายเลข 110c1410) ที่มีความเหมือนกับลำดับการจัดเรียงตัวของเบสของผลิตภัณฑ์ (ME1) ที่ใช้ดีเอ็นเอจาก *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ (template) และไพรเมอร์ ME1f กับ ME1r สำหรับพิมพ์ขยายบริเวณอนุรักษ์ของมาลิคเอนไซม์ฮัยนสูง ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับพิมพ์เดีนหน้า (DMEf, ●) และ ไพรเมอร์สำหรับพิมพ์ย้อนกลับ (DMEr, ●) ในการพิมพ์ขยาย มาลิคเอนไซม์ฮัยนทั้งหมด

จากภาพที่ 18 เมื่อทำการการพิมพ์ด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ DMEf, DMEr และใช้จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *B. japonicum* USDA122 เป็นแม่แบบ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ขนาด 2300 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะได้ เรียกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มจำนวนได้นี้ว่า *Bjdme2*



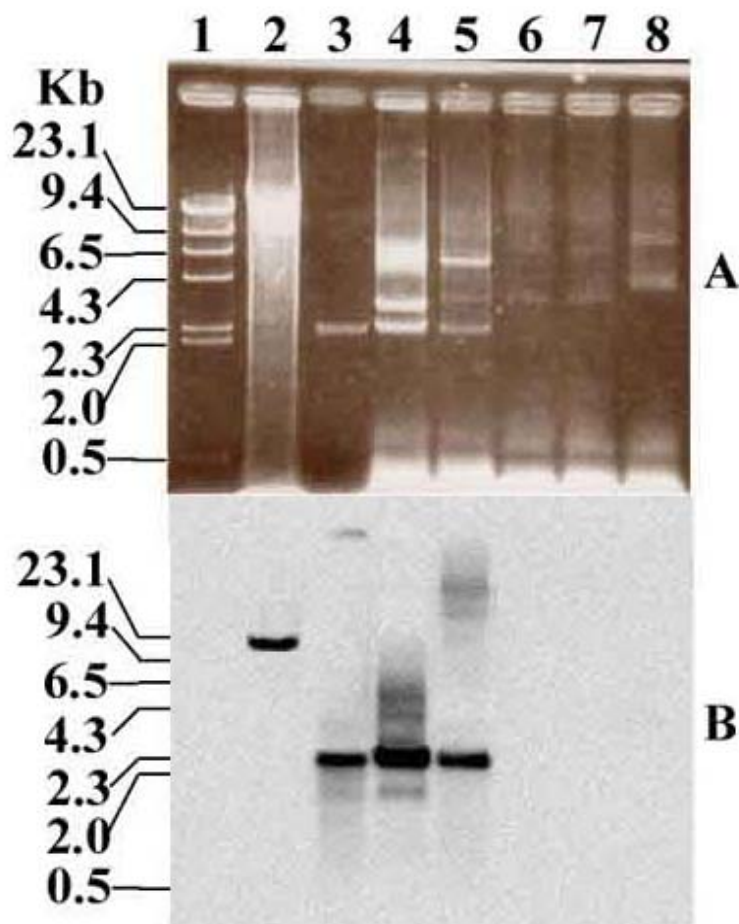
1 % Agarose gel electrophoresis, 100 V, 30 mins.

ภาพที่ 18 ผลการพิมพ์ขยายมาลิเอนไซม์ขึ้นทั้ง ORF เมื่อใช้ดีเอ็นเอจาก *B. japonicum* USDA122 เป็นต้นแบบ (template) ด้วยไพรเมอร์ DMEf และ DMEr โดยเทคนิค PCR

เลขที่	ตัวอย่าง	ไพรเมอร์
1	λ ดีเอ็นเอที่ย่อยด้วย <i>Hind</i> III	-
2	<i>Bjdme 2</i> (PCR product)	DMEf และ DMEr

3.4.3 การโคลน *Bjdme2* มาลิกเอนไซม์ยีนที่สมบูรณ์ของ *B. japonicum* USDA122

ผลการแยกดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลภายใต้สนามไฟฟ้า ที่เชื่อมด้วยสารละลาย เอทรีเดียมโบรไมด์ และการตรวจวิเคราะห์หา *Bjdme2* ในจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ด้วยวิธี Southern blot โดยใช้ ME 1 เป็นตัวติดตาม(probe) แสดงในภาพที่ 19 (A) และ 19 (B) ตามลำดับ โดยในเลนที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อตัดดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งหมดจาก *B. japonicum* USDA 122 และตัดด้วย *Hind*III จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ปะปนกันอยู่ จึงไม่สามารถมองเห็นเป็นแถบใด แถบหนึ่งชัดเจน แต่เมื่อติดตามหาชิ้นที่ควบคุม DME มาลิกเอนไซม์ยีนด้วย ME1-probe พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 17 kb ที่สามารถจับกับ ME1-probe ได้ แสดงให้เห็นว่าในจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 มีดีเอ็นเอที่ควบคุมการสร้าง DME มาลิกเอนไซม์อยู่ แต่ไม่เหมาะสมที่จะเก็บเกี่ยวเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวมาทำการโคลนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน เนื่องจากมีขนาดเล็กกว่าขนาดของ *dme* มาลิกเอนไซม์ยีนที่ตั้งสมมุติฐานไว้ก่อนหน้านี้ จึงมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มจำนวน *Bjdme2* ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสอดคล้องกับที่ตั้งสมมุติฐานไว้และแสดงสัญญาณว่าสามารถเข้าสู่ได้กับ ME1-probe ดังปรากฏในเลนที่ 3 เมื่อทำการโคลน *Bjdme2* สู่อุปกรณ์ pGEM[®]-T Easy เวกเตอร์ เรียกพลาสมิดลูกผสมที่ได้ว่า pGACD2 และทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*DIII ก็พบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ *Bjdme2* สอดแทรกอยู่จริงและชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกนั้นได้แสดงสัญญาณว่าสามารถเข้าสู่ได้กับ ME1-probe ดังปรากฏในเลนที่ 4 เพื่อทำการศึกษาการแสดงออกของ *Bjdme2* ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวจึงโคลนอีกครั้งเข้าสู่ pET32a(+) เวกเตอร์ เรียกพลาสมิดลูกผสมที่ได้ว่า pDME2 เมื่อทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*DIII พบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ *Bjdme2* สอดแทรกอยู่จริงและชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกนั้นได้แสดงสัญญาณว่าสามารถเข้าสู่ได้กับ ME1-probe ดังปรากฏในเลนที่ 5 ในเลนที่ 6 แสดงจีโนมดีเอ็นเอของ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ยังไม่มีการรับ pGACD2 เข้าสู่เซลล์ เลนที่ 7 แสดงจีโนมดีเอ็นเอของ *E. coli* BL21 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ยังไม่มีการรับ pDME2 เข้าสู่เซลล์ และเลนที่ 8 pET32a(+) เวกเตอร์ที่ยังไม่มีการสอดแทรก *Bjdme2* ผลปรากฏว่าในเลนที่ 6 – 8 นี้ปรากฏว่ามีดีเอ็นเออยู่แต่ดีเอ็นเอเหล่านั้นไม่สามารถแสดงสัญญาณการเข้าคู่กันได้กับ ME1-probe ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นในเลนที่ 2- เลนที่ นั้นเป็นสัญญาณที่เกิดจากการเข้าคู่กันได้ของ *Bjdme2* และ ME1-probe จริง และ ME1-probe นี้มีความจำเพาะพอที่จะใช้เป็นตัวติดตามในการค้นหาชิ้นที่ควบคุม DME มาลิกเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 19 การแยกดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลภายใต้สนามไฟฟ้า ที่เชื่อมด้วยสารละลาย เอทรีเดียมโบรไมด์ (A) และการตรวจวิเคราะห์หา *Bjdme2* ในจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ด้วยวิธี Southern blot โดยใช้ ME 1 เป็นตัวติดตาม(probe) (B)

เลขที่	ตัวอย่าง
1	MW marker (lambda DNA ตัดด้วย <i>Hind</i> III),
2	<i>B. japonicum</i> USDA122 จีโนมดีเอ็นเอ ตัดด้วย <i>Hind</i> III
3	<i>Bjdme2</i> (Amplicon จาก DMEf และ DMEr ไพรเมอร์)
4	pGEMT เวกเตอร์ ที่มี <i>Bjdme2</i> อยู่ในชิ้นส่วนที่ตัดด้วย <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III
5	pDME2 (pET32a(+))ที่มี <i>Bjdme2</i> อยู่ในชิ้นส่วนที่ตัดด้วย <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III)
6	จีโนมดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i> JM109
7	จีโนมดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i> BL21
8	pET32a(+) เวกเตอร์

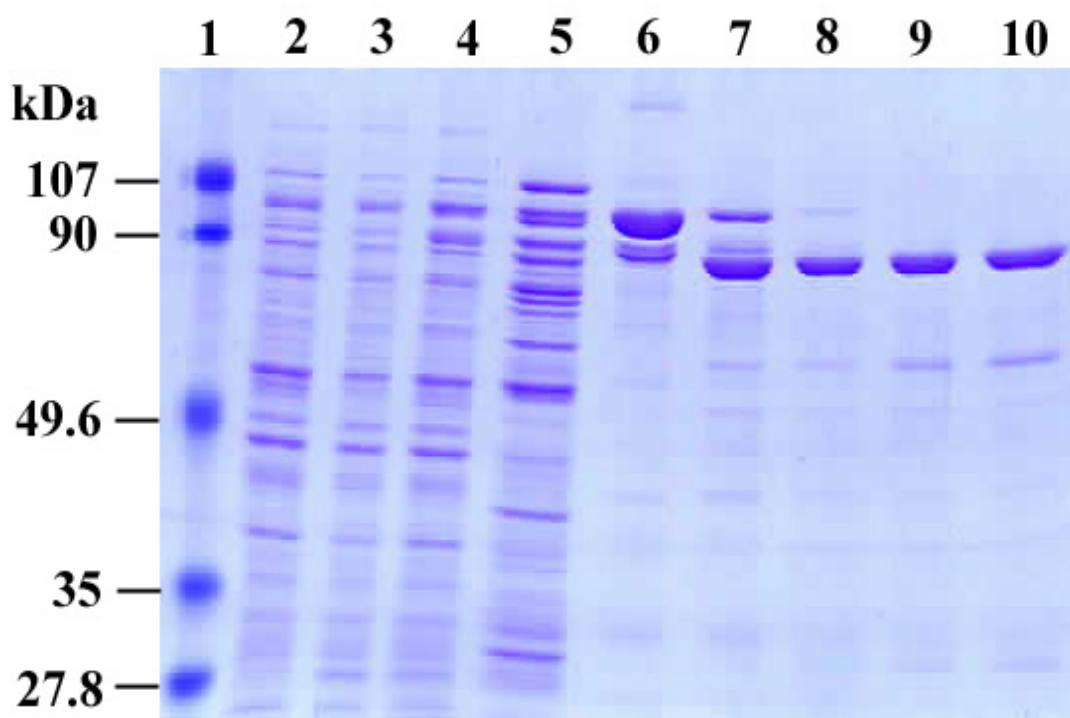
3.4.4 การตรวจสอบการแสดงออกของ *Bjdme2* มาลิเอนไชม์ยีนที่สมบูรณ์ของ *B. japonicum*

USDA122

การตรวจสอบการแสดงออกของ pDME2 ซึ่งประกอบด้วย ยีน *Bjdme2* ที่บรรจุใน pET32a(+) เวกเตอร์ ใน *E. coli* BL21 และผลการตรวจสอบการทำให้มาลิเอนไชม์(DME)บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS – PAGE ที่แสดงในภาพที่ 21 สามารถอธิบายได้ดังนี้ เลนที่ 2 โปรตีนจาก *E. coli* BL21 แสดงว่าในเซลล์เจ้าบ้านนี้มีการสร้างโปรตีนต่าง ๆ มากมายดังปรากฏเป็นแถบต่าง ๆ ให้เห็น เลนที่ 2 โปรตีนจาก *E. coli* BL21 ที่มีเวกเตอร์ pET32a(+) ปรากฏผลเช่นเดียวกับเลนที่ 2 ในเลนที่ 4 โปรตีนจาก *E. coli* BL21 ที่มี pDME2 ผลปรากฏมีความคล้ายกับที่ปรากฏในเลนที่ 2 และ 3 ไม่สามารถบอกได้ว่า แถบโปรตีนใดเป็นโปรตีนที่เกิดจากการแสดงออกของ pDME2 เพื่อให้สามารถแยกโปรตีนที่เกิดจากการแสดงออกของ pDME2 จากโปรตีนที่มีอยู่ตามธรรมชาติในเซลล์ เจ้าบ้าน นำสารสกัดโปรตีนที่ได้จากจาก *E. coli* BL21 ที่มี pDME2 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap™ column (Pharmacia Biotech, U.S.A.) เพื่อกักเก็บฟิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่แสดงออกจาก pDME02 เชื่อมอยู่กับ histidine-tagged protein ไว้ในคอลัมน์ และปล่อยโปรตีนอื่น ๆ ผ่านคอลัมน์ออกไป เมื่อผ่านการล้างโปรตีนอื่น ๆ ที่อาจตกค้างอยู่ ออกแล้ว จึงทำการชะ ฟิวชั่นโปรตีน (fusion protein) ที่กักเก็บอยู่ในคอลัมน์ให้ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย 10 mM, 60 mM, 100 mM, 150 mM, 250 mM และ 500 mM imidazole-phosphate บัฟเฟอร์, pH 7.4 ผลที่ได้จากการชะด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 mM แสดงในเลนที่ 5 ซึ่งยังไม่สามารถชะเอาฟิวชั่นโปรตีนออกมาได้ แต่ปรากฏแถบโปรตีนอื่น ๆ ปะปนกันอยู่ ผลที่ได้จากการชะด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดต่อการชะฟิวชั่นโปรตีนออกจากคอลัมน์ ดังแสดงในเลนที่ 6 ปรากฏแถบของฟิวชั่นโปรตีนเป็นแถบที่แสดงความเข้มมากที่สุดอยู่บนสุด จากนั้นสารละลายฟิวชั่นโปรตีนที่ได้จากการชะด้วยบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM ถูกนำไปย่อยส่วนของ tag protein ออกด้วยเอนไซม์ enterokinase ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในเลนที่ 7 – 10 พบว่าเอนไซม์ enterokinase สามารถย่อย tag protein ออกจากโปรตีนที่ควบคุมโดย *Bjdme2* ได้สมบูรณ์เมื่อชั่วโมงที่ 48 และโปรตีนที่ควบคุมโดย *Bjdme2* นี้มีมวลโมเลกุล 83 kDa

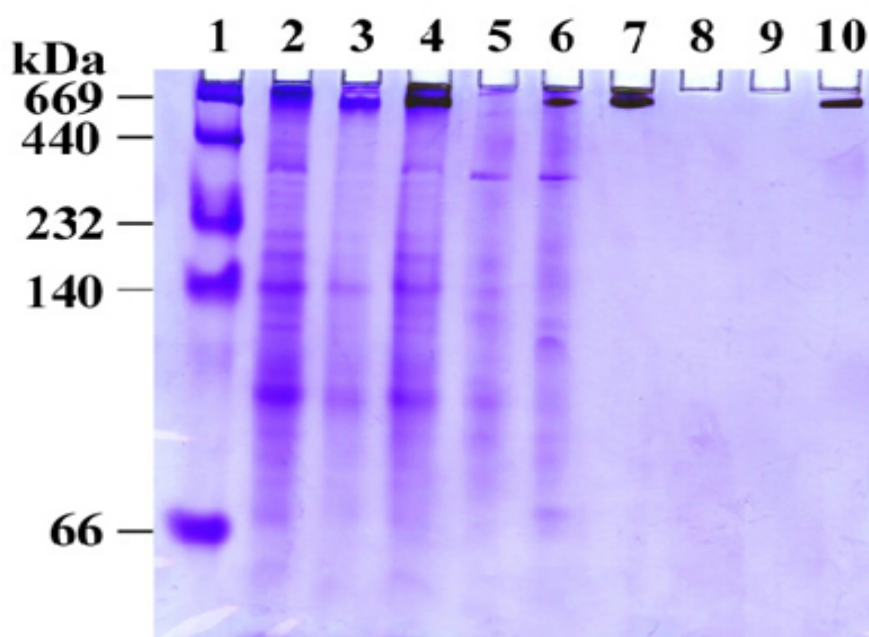
การตรวจสอบกิจกรรมของ DME ที่ได้จากการแสดงออกของ pDME 2 ในสภาวะธรรมชาติด้วยเทคนิค Native-PAGE ที่ผ่านการเชื่อมด้วยคูแมสซี บิลเลี่ยนบลู และการเชื่อมเพื่อตรวจสอบ

กิจกรรมของเอนไซม์ DME พบว่ามีขนาด 664 kDa ดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 10 และ 11 ซึ่งเป็นแถบของน้ำหนักรวมของโมเลกุลเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE



ภาพที่ 20 การตรวจสอบการแสดงออกของ pDME2 ซึ่งประกอบด้วยยีน *Bjdme2* ที่บรรจุใน pET32a(+) เวกเตอร์ ใน *E. coli* BL21 และผลการตรวจสอบการทำให้มาลิคเอนไซม์(DME)บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS – PAGE

เลนที่	ตัวอย่าง
1	โปรตีนมาตรฐาน
2	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21
3	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มีเวกเตอร์ pET32a(+)
4	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2
5	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 และผ่านการชะด้วย 100 mM imidazole
6	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 และผ่านการชะด้วย 200 mM imidazole
7-10	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 และผ่านการชะด้วย 200 mM imidazole และย่อยส่วนของ tag protein ออกด้วยเอนไซม์ enterokinase ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ



ภาพที่ 21 การตรวจสอบกิจกรรมของ DME ที่ได้จากการแสดงออกของ pDME 2 ในสภาวะธรรมชาติ ด้วยเทคนิค Native-PAGE ที่ผ่านการเชื่อมด้วยคูแมสซี บิลเลี่ยนบลู และการเชื่อมเพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ DME

เลนที่	ตัวอย่างโปรตีน
1	โปรตีนมาตรฐาน
2	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21
3	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มีเวกเตอร์ pET32a(+)
4	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2
5	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 10 mM imidazole
6	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 100 mM imidazole
7	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 200 mM imidazole
8	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 250 mM imidazole
9	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 500 mM imidazole
10	โปรตีนจาก <i>E. coli</i> BL21 ที่มี pDME2 ที่ผ่านการชะด้วย 200 mM imidazole และย่อยส่วนของ tag protein ออกด้วยเอนไซม์ enterokinase ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของ DME มาลิกเอนไซม์ในสารละลายที่สกัดได้จากการแสดงออกของยีน *Bjdme2* ที่บรรจุใน pET32a(+) เวกเตอร์ ใน *E. coli* BL21 และการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์มาลิก(DME)ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าสารสกัดโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 ไม่ปรากฏกิจกรรมของ DME มาลิกเอนไซม์ แต่พบกิจกรรมของ DME มาลิกเอนไซม์ในสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 ที่มี pDME2 อยู่ ทั้งก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ทั้งในสภาพที่มี NAD^+ และ NADP^+ เป็นโคแฟกเตอร์ ดังนั้นเอนไซม์ที่ควบคุมโดย *Bjdme2* จึงจัดเป็น NAD(P)^+ -dependent malic enzyme (NAD(P)^+ -ME, EC 1.1.1.39) ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ของออกซาโลอะซิเตตได้สามารถใช้ได้ทั้ง NAD^+ และ NADP^+ เป็นโคแฟกเตอร์

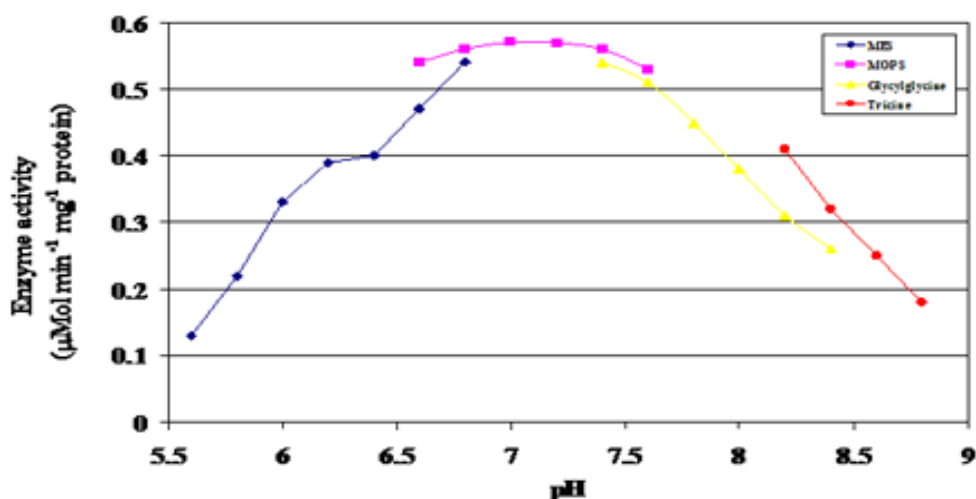
ตารางที่ 5 การแสดงออกของยีน *Bjdme2* ที่บรรจุใน pET32a(+) เวกเตอร์ ใน *E. coli* BL21 และการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์มาลิก(DME)ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ตัวอย่าง	โปรตีน (mg ml ⁻¹)	ปฏิกิริยาของเอนไซม์		
		(μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)		
		DME		MDH
		NAD ⁺	NADP ⁺	
<i>E. coli</i> BL21				
-Crude	3.284	0	0	0
-Purified	0.001	0	0	0
<i>E. coli</i> BL21 with pDME2				
-Crude	2.096	0.022	0.005	0
-Purified	0.075	0.316	0.044	0

3.4.5 การตรวจหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไซม์

จากศึกษาหาสถานะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DME มาลิกเอนไซม์ โดยใช้ 50 mM MES (pH 5.6-6.8), 50 mM MOPS (pH 6.6-7.6), 50 mM Glycylglycine

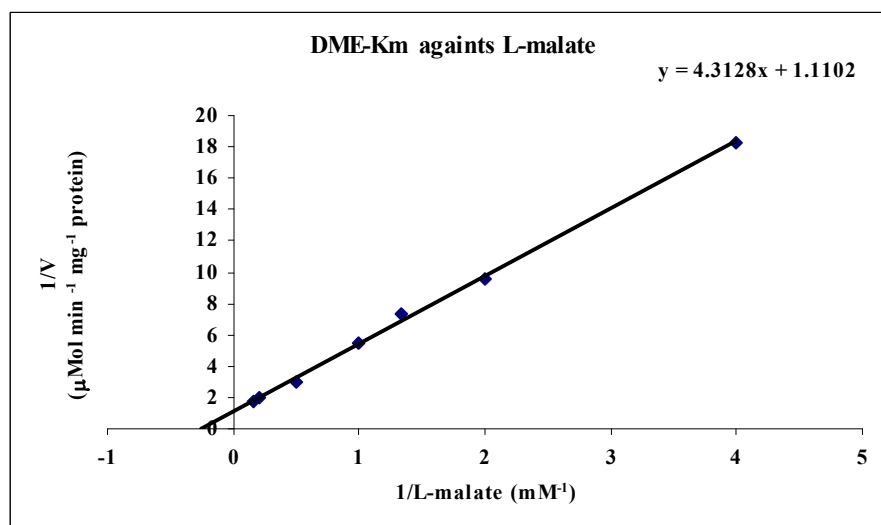
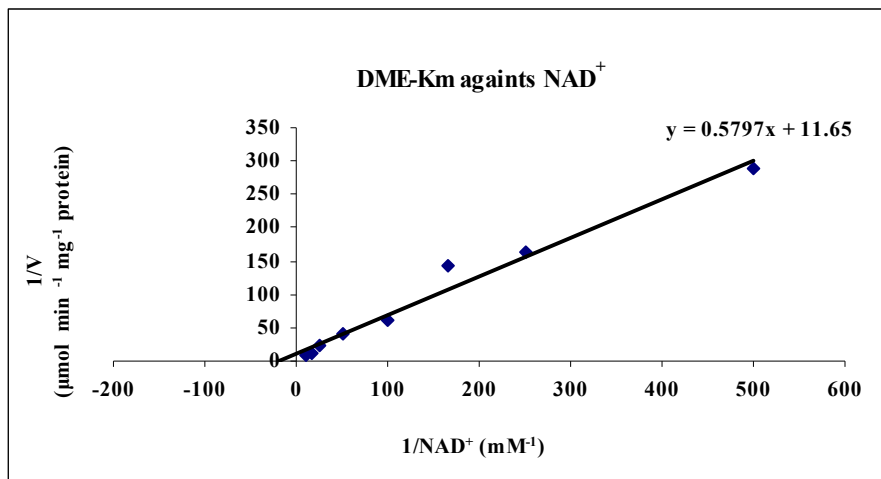
(pH 7.4-8.4) และ 50 mM Tricine (pH 8.2-8.8) พบว่าสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ DME มาลิกเอนไซม์นี้คือ pH 7.0 ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 การตรวจสอบสภาวะความเป็นกรด-ด่าง(pH) ที่เหมาะสมกับการทำงานของ DME จาก *B. japonicum* USDA122

3.4.6 การวิเคราะห์ไโคเนติกส์ของ DME มาลิกเอนไซม์

ค่า K_m ของ DME ต่อ L-malate และ NAD^+ คำนวณด้วย Lineweaver-Burks plot โดยใช้ NAD^+ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.002 mM ถึง 0.1 mM ที่ความเข้มข้นของ L-malate คงที่ที่ค่าใดค่าหนึ่งจาก 0.25 mM ถึง 5 mM. นำค่าที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟด้วย Lineweaver-Burk plots เพื่อหาค่า K_m ของ DME ต่อ L-malate และ NAD^+ พบว่า ค่า K_m ของ DME ต่อ L-malate และ NAD^+ คือ 4.0 mM และ 0.05 mM ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ผลการศึกษาโคเนติกส์ของ DME จาก *B. japonicum* USDA122 ด้วยวิธี Line

Weaver Burk plots

4. เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันทโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส. ภาควิชาจุลชีววิทยา
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith J, and Struhl K 1987a. Media preparation and bacteriological tools. *In* Current protocols in molecular biology: volume 1, Ed. K Janssen, p.1.1.3, Greene publishing associates and Wiley-interscience, New York
- Ausubel FM, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J. Smith and K. Struhl. 1987b: Analysis of DNA sequences by blotting and hybridization. *In* Current protocols in molecular biology: volume 1, Ed. K Janssen, p. 2.9.1-2.9.15, Greene publishing associates and Wiley-interscience, New York
- Bernaerts and Deley. 1963,: Nature 197., 406-7.
- Bradford MM 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- Brosius J, Palmer JL, Kennedy JP, and Noller HF 1978: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4801-4805
- Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E. 1975.: Bergey's manual of determinative bacteriology., 261-267.
- Chen F, Okabe Y, Osano K, and Tajima S 1997: Purification and characterization of the NADP-malic enzyme from *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61,384-386
- Chen F, Okabe Y, Osano K, and Tajima S 1998: Purification and characterization of an NAD-malic enzyme from *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64, 4073-4075

- Driscoll BT and Finan TM 1996a: NADP⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium* Mitsch MJ, Voegel e RT, Cowie A, Osteras M, and Finan TM 1998: Chimeric structure of the NAD(P⁺)-and NADP⁺-dependent malic enzymes of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *J. Biol. Chem.*, 273, 9330-9336
- Driscoll BT and Finan TM 1996b: NADP⁺-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, **178**, 2224-2231
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Small scale preparation of plasmid DNA *In* Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, p1.25-1.32, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sinsuwongwat, S., A. Kodera, T. Kaneko, H. Tabata, M. Nomura and S. Tajima. 2002a. Cloning and Characterization of a NADP-Malic Enzyme Gene from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Soil Science and Plant Nutrition* 2002 48(5):711-717.
- Sinsuwongwat, S., A. Nuntagij, A. Shutsrirung, M. Nomura and T. Shigeyuki. 2002b. Characterization of Rhizobia in Thailand and distribution of malic enzymes. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 48(5): 719-727
- Spaink HP, Kondorosi A, and Hooykaas PJJ 1998: Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae *In* The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. p. 1-24, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Stevenson FJ. 1982: Nitrogen in agriculture soils. *Agronomy* Vol. 22. Am. Soc. Agron., Madison. Wisconsin.
- Vopegale RT, Mitsch MJ and Finan TM 1999: Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim. Biophys. Acta.* 1432, 275-285
- Weisburge WG, Burns SM, Pelletier DA, and Lane DJ 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 697-703

5. ภาคผนวก

5.1 การไปเนอผลงาน

1. การประมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เรื่อง Cloning and characterization of the NAD⁺-malicenzyme gene from *B. japonicum* USDA122. หน้า 198, วันที่ 14 - 16 มกราคม 2548 (โปสเตอร์)
2. การประมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. เรื่อง Cloning and characterization of the NAD⁺-malicenzyme gene from *B. japonicum* USDA122. หน้า 13, วันที่ 13 - 15 ตุลาคม 2548 (นำเสนอ)

5.2 การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิจัยอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

คณะผู้วิจัยได้เชื่อมโยงข้อมูลและดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการโคลนยีน *dme* ใน *B. japonicum* กับนักวิจัยในประเทศญี่ปุ่น เพื่อประกอบการตีพิมพ์บทความในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ในนาม Tan Van Dao, Mika Nomura, Rie Hamaguchi, Kensuke Kato, Manabu Itakura, Kiwamu minamisawa, Suphawat Sinsuwongwat, Hoa Thi-Phuong Le, Takakazu Kaneko, Satoshi Tabata และ Shigeyuki Tajima เรื่อง NAD-Malic enzyme affects nitrogenfixing activity of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 bacteroids in soybean nodules. ใน *Microbes and environments*. Vol. 23 No. 3 หน้า 215 – 220 ปี 2008