



โครงการ การตัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของยีนประมวลรหัส
อะซีแนพธินไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุทัย ภิญญาคง และคณะ

เสร็จสิ้นโครงการเมื่อ มีนาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของยีนประมวลรหัส
อะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ.ดร.อรุณทัย ภิญญาคง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และได้รับการสนับสนุนทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ วิทยาศาสตร์จากหน่วยวิจัย Bioremediation ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ไพเราะ ปันพานิชการ ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำแนะนำที่มีประโยชน์ในงานวิจัยนี้ รองศาสตราจารย์สุเทพ ธานีวัน ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ใช้ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ขอขอบคุณ Prof. Dr Toshio Omori จาก Open Research Center Shibaura Institute of Technology Dr. Hiroshi Habe จาก National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) และ Dr. Atsushi Kouzuma จาก Biotechnology Research Center, The University of Tokyo ที่ร่วมให้ข้อคิดเห็นในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวกรรณิการ์ สายพิณ และนายกานต์ สมานวรวงศ์ ซึ่งร่วมงานวิจัยนี้ ทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: **MRG4980010**

ชื่อโครงการ การคัดแยกและศึกษาลักษณะสมบัติของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนส ใน *Sphingomonas* sp. SP2

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.อรุณทัย ภิญญาคง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : onruthai@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

Sphingomonas sp. SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน 16 ชนิดที่ถูกจัดเป็นสารมลพิษอันดับต้น แต่ไม่สามารถเจริญโดยใช้พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอนชนิดอื่นๆ ได้ โคลนที่มียีนที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์นี้ถูกคัดแยกได้โดยใช้ความสามารถในการออกซิไดซ์อินโดลเป็นอินดิโก ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองมีความเหมือนสูงที่สุดกับหน่วยย่อยแอลฟา (ArhA1) และบีตา (ArhA2) ของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. A4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ทั้งอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลินได้ การวิเคราะห์หน้าที่ของ *arhA1arhA2* ของสายพันธุ์ SP2 ในฐานะที่เป็นเทอร์มินัลอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสถูกยืนยันโดยการทำไบโอทรานส์ฟอร์เมชันและการแสดงออกใน *E. coli* การแทรกสอดเพื่อไม่ให้ทำงานได้ของยีน *arhA1* แสดงให้เห็นว่ายีนนี้มีความสำคัญสำหรับการย่อยอะซีแนพรีน การวิเคราะห์ RT-PCR และ real-time PCR ระบุว่าการทรานส์คริปชันของยีน *arhA1* ของสายพันธุ์ SP2 ถูกชักนำด้วยอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลิน นอกจากนี้ยีน *arhR*, *arhA3* และ *arhA4* ซึ่งประมวลรหัสโปรตีนควบคุม เพอร์ริดอกซิน และเพอร์ริดอกซินรีดักเทสของไดออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ก็ถูกแยกได้โดยวิธี PCR และ genome walking การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ของยีนเหล่านี้เหมือนกับยีนจากสายพันธุ์ A4 99-100% ซึ่งน่าสนใจว่า sphingomonads สองสายพันธุ์ซึ่งมีความแตกต่างในความจำเพาะต่อสับสเตรทมีเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่เหมือนกันมาก โครงสร้างของ ArhA1 จาก Sphingomonads ทั้งสองถูกทำนายและเปรียบเทียบโดยใช้ลำดับกรดอะมิโน และใช้โครงสร้างสามมิติของแนพธาลีนเป็นต้นแบบ ผลที่ได้พบว่าส่วนกรดอะมิโนที่แตกต่างของทั้งสองโปรตีน (Met261, Ser347 in ArhA1_{SP2} and Thr261, Gly347 in ArhA1_{A4}) อาจอยู่ในบริเวณทางเข้าจับของสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน

คำหลัก : อะซีแนพรีน, ออกซิจีเนส, *Sphingomonas* sp.

Abstract

Project Code : MRG4980010

Project Title : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACENAPHTHENE DIOXYGENASE GENES OF *Sphingomonas* sp. SP2

Investigator : Onruthai Pinyakong, Chulalongkorn University

Pairoh Pinphanichakarn, Chulalongkorn University

E-mail Address : onruthai@gmail.com

Project Period : 2 years

Sphingomonas sp. SP2 has been found to have ability to degrade acenaphthene, one of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons classified as priority pollutants, but it cannot grow on other PAHs. The clone containing genes encoding α and β subunits of terminal oxygenase of this strain was isolated by using the ability to oxidize indole to indigo. The amino acid sequences of both proteins exhibited highest homology (99%) to those of the α (ArhA1) and β (ArhA2) subunits of terminal oxygenase from *Sphingomonas* sp. A4, a strain capable of utilizing both acenaphthene and acenaphthylene. Functional analysis of *arhA1arhA2* of strain SP2 as terminal acenaphthene dioxygenase was confirmed by biotransformation and expression in *E. coli*. Insertion inactivation of the *arhA1* gene revealed that this gene is necessary for acenaphthene degradation. RT-PCR and real-time PCR analyses indicated that transcription of *arhA1* gene of strain SP2 was induced in the presence of acenaphthene and acenaphthylene. Furthermore, *arhR*, *arhA3* and *arhA4* genes encoding regulatory protein, ferredoxin and ferredoxin reductase of dioxygenase from strain SP2 were also identified by means of PCR and genome walking. Sequences analysis revealed that products of these genes have 98-99% homology to those from strain A4. It is interesting that these two sphingomonads which are different in their substrate specificity possess terminal oxygenase with high identical protein. Comparative structure prediction of ArhA1 from both sphingomonads was analyzed from their amino acid sequences by using known three-dimensional structure of naphthalene dioxygenase as a model. The result revealed that two different amino acid residues (Met261, Ser347 in ArhA1_{SP2} and Thr261, Gly347 in ArhA1_{A4}) might be located within active site-entrance region of enzyme and this might be one of the key factors causing these enzymes to have some difference in substrate specificity.

Keywords : acenaphthene, oxygenase, *Sphingomonas* sp.

รายงานสรุป

อะซีแนพธีน (acenaphthene) เป็นสารในกลุ่มพอลิไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) และถูกจัดเป็นสารก่อมลพิษในสิ่งแวดล้อม รวมถึงมีพิษต่อสิ่งมีชีวิต การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วย PAHs โดยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้ศักยภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอันตรายดังกล่าว เริ่มมีบทบาทมากขึ้นเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่มีผลกระทบข้างเคียงต่อสิ่งแวดล้อม และมีค่าใช้จ่ายต่ำ อย่างไรก็ตามความเข้าใจการทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอันตรายต่างๆ มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพ

ในปัจจุบันรายงานการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนมีน้อยมาก และส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Sphingomonad* มีรายงานการค้นพบยีนประมวลผลเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส (*arhA1A2*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนของ *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ 2004) ซึ่งสามารถใช้อะซีแนพธีนและอะซีแนพธีลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ต่อมามีการพบยีนประมวลผลเพอร์รีดอกซิน (*arhA3*) เพอร์รีดอกซิน รีดักเทส (*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) การทำงานของยีนประมวลผลหีสอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสในสายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ 2006)

เมื่อเร็วๆ นี้ กลุ่มวิจัยการบำบัดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะซีแนพธีนจากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในประเทศไทย ได้แก่ *Sphingomonas* sp. SP2 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพธีนแต่ไม่ย่อยอะซีแนพธีลีน (Saiphet และคณะ 2005) จึงมีการเปรียบเทียบยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 กับสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ยีนประมวลผลหีสหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 เป็นตัวติดตาม พบความแตกต่างคือสายพันธุ์ A4 ปรากฏ 2 แถบ (2.6 และ 5.0 กิโลเบส) แต่สายพันธุ์ SP2 ปรากฏเพียง 1 แถบ (5.0 กิโลเบส) แสดงว่าทั้งสองสายพันธุ์มียีนประมวลผลไดออกซิจีเนสที่คล้ายคลึงและแตกต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อการที่สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีลีน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการคัดแยกยีนประมวลผลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 เพื่อศึกษาลักษณะและหน้าที่และเปรียบเทียบดังกล่าวกับยีนของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลผลหีสอะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2
2. เพื่อทราบหน้าที่และความจำเพาะของเอนไซม์อะซีแนพธีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2

3. เพื่อทราบความแตกต่างของยีนและเอนไซม์อะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 ในเรื่องลำดับกรดอะมิโน โครงสร้าง ความจำเพาะเจาะจง ต่อ PAHs และการถูกชักนำให้แสดงออกโดยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีน

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การแยกยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนเทอมินอลไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2 ด้วยวิธี shotgun cloning โดยใช้ *E. coli* ที่มีเฟอรีดอกซินและเฟอรีดอกซินรีดักเทสของ *Sphingobium* sp. P2 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และใช้คุณสมบัติการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกของ เอนไซม์ไดออกซิจีเนสเป็นวิธีคัดเลือกโคลน
2. การอ่านลำดับเบสของยีนดีเอ็นเอแทรกสอดที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 และเปรียบเทียบกับ ยีนของ *Sphingomonas* sp. A4 และยีนของแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank
3. การทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีนหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส ของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบโครงสร้างและชนิดของกรดอะมิโนบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์
4. การตรวจสอบหน้าที่ของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 ในการทรานสฟอร์ม PAHs ได้แก่ อะซีแนพรีน อะซีแนพรีลีน โดยให้ รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่มียีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 แสดงออกใน *E. coli* ที่มีเฟอรีดอกซินและเฟอรีดอกซินรีดักเทสของ *Sphingobium* sp. P2 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย GC-MS เปรียบเทียบผลกับหน้าที่ของยีนประมวล รหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. A4 ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Pinyakong และคณะ 2004)
5. การเปรียบเทียบยีนประมวลผลเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม การแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ด้วยเทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชัน
6. การแยกยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม จาก *Sphingomonas* sp. SP2
7. การสับโคลนยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุมจาก โคลนที่ได้ในข้อที่ 6 และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนดังกล่าวเปรียบเทียบกับยีนของ *Sphingomonas* sp. A4 และยีนของแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank
8. การตรวจสอบการทำงานร่วมกันของเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส ที่ได้ในข้อ ที่ 7 กับเทอมินอลออกซิจีเนสที่ได้ในข้อที่ 1 โดยการให้ยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนดังกล่าว แสดงออกร่วมกันใน *E. coli* แล้วตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกของ เอนไซม์ไดออกซิจีเนส

9. การตรวจสอบหน้าที่และความจำเป็นของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนส ที่แยกได้ ในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของ *Sphingomonas* sp. SP2 โดยการทำให้ gene disruption แล้วตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของสายพันธุ์กลาย
10. การตรวจสอบและเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 ด้วยอะซีแนพรีน อะซีแนพรีลิน

ผลการทดลอง

การทดลองนี้คัดแยกยีนออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน โดยการคัดเลือกโคลนด้วยการติดตามการเปลี่ยนสีของอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) จากห้องสมุดดีเอ็นเอบางส่วน of *Sphingomonas* sp. SP2 ที่แสดงออกพร้อมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนประมวลรหัสเพอร์ริดอกซิน (*ahdA3*) และเพอร์ริดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของ *Sphingomonas* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) พบโคลนที่ให้ผลบวก (pPC1) ซึ่งบรรจุยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และจากการที่พบโคลนที่ให้ผลบวกแสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสจากยีนที่แยกได้สามารถทำงานร่วมกับเพอร์ริดอกซิน และเพอร์ริดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ P2 ซึ่งส่วนหนึ่งในงานวิจัยของ Demaneche และคณะ (2004) พบว่าการทำงานของเพอร์ริดอกซินและเพอร์ริดอกซินรีดักเทสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนส

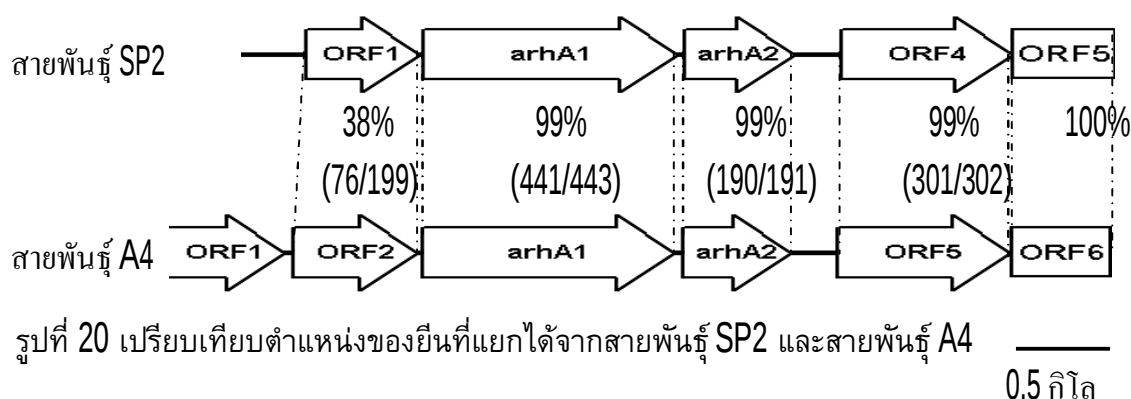
จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pPC1 ขนาด 4,624 bp พบ 4 ORFs ที่สมบูรณ์และ 1 ORF ที่ขาดบริเวณหยุดการถอดรหัส ซึ่ง *orf2* (*arhA1*) และ *orf3* (*arhA1*) ประมวลรหัสโปรตีนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 ถึง 99%

ORF1 คล้ายกับส่วนหนึ่งของไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 50% (99/195) และเหมือน ORF2 ของสายพันธุ์ A4 100% (76/76) เมื่อเทียบทั้ง ORF พบความเหมือน 38% (76/199) ซึ่งมีรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) เทียบกับฐานข้อมูลว่า ORF2 แยกเป็น 2 ส่วน ซึ่งคล้ายกับไฮดราเลส/แอลโดเลส (PhnE) ของ *Burkholderia* sp. RP007 65% (91/140) และไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 58% (35/60) จึงสรุปได้ว่า *orf1* ของสายพันธุ์ SP2 ประมวลรหัสโปรตีนแตกต่างกับ ORF2 ของสายพันธุ์ A4 ซึ่งเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสามารถพบความคล้ายกับไอโซเมอเรสจากสายพันธุ์ DBT1 ได้อย่างต่อเนื่อง

orf4 ประมวลรหัสโปรตีนที่มีความคล้ายกับ ORF5 ของสายพันธุ์ A4 99% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว และคล้ายกับไอโซเมอเรส (HbzF) ของ *P. alcaligenes* NCIMB 9867 52% จากวิถีบนของการย่อยสลายเนพทาลินโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. พบว่าหลังจากการแตกวงด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไตราโดอลไดออกซิจีเนส จะเกิดการออกซิไดซ์

ผลิตภัณฑ์ด้วยแอกติวิตีของไอโซเมอเรส (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) ทำนายได้ว่า ORF1 และ ORF4 อาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนหลังจากเกิดการแตกวงอะโรมาติก เนื่องจากมีความเหมือนกับไอโซเมอเรสจากฐานข้อมูลเพียงปานกลางเท่านั้น และที่เคยมีรายงานของสายพันธุ์ A4 ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของยีนไอโซเมอเรสทั้ง 2 ที่อยู่ใกล้กันจึงต้องศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

ORF5 เป็นช่วงการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ คือ ไม่พบบริเวณหยุดถอดรหัส เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *Ralstonia* sp. U2 เพียง 29 % (39/131) และคล้ายกับ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 100% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว จากรายงานของ Kouzuma และคณะ (2006) พบ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ที่สมบูรณ์และคล้ายกับเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *P. putida* NCIB9816-4 เพียง 18% และทางด้านปลายคาร์บอกซีไม่คล้ายกับ NahAa ซึ่งเป็นบริเวณ NAD-binding domain ทำให้ทำนายได้ว่า ORF นี้ไม่น่ามีหน้าที่เป็นเพอร์รีดอกซินรีดักเทส



การตรวจสอบความสำคัญของยีน *arhA1* ของสายพันธุ์ SP2 โดยการสร้างสายพันธุ์กลายที่ knock out การทำงานของยีน *arhA1* พบว่าสายพันธุ์กลายดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนได้ ดังนั้นยีน *arhA1* นี้จึงมีความสำคัญในการย่อยอะซีแนพรีนในสายพันธุ์ SP2

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสรหัสเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม ระหว่างสายพันธุ์ SP2 และ A4 โดยวิธีไฮบริดส์เซชันโดยโดยใช้ DNA ติดตามจากสายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ 2006) พบว่ายีนเหล่านี้ของทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำ gene walking เพื่อแยกยีนเหล่านี้จากสายพันธุ์ SP2 ซึ่งสามารถแยกยีนเหล่านี้ได้และพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับของสายพันธุ์ A4 ถึง 99-100% อย่างไรก็ตามยีน *arhA3* ของสายพันธุ์ SP2 สั้นกว่าของสายพันธุ์ A4 โดยขาดกรดอะมิโนบริเวณปลาย และเมื่อตรวจสอบการทำงานร่วมกันของยีนประมวลรหัส

รหัสเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสกับออกซิจีเนสพบว่าสามารถทำงานร่วมกันได้ โดยสามารถเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกได้

การเปรียบเทียบยีนที่แยกได้จากสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 สามารถสรุปได้ว่าการเรียงตัวของยีนทั้ง 2 สายพันธุ์เหมือนกัน และยังมีความเหมือนของลำดับอะมิโนในแต่ละยีนใกล้เคียงกันมาก เมื่อจัดกลุ่มหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 (ArhA1) พบว่าอยู่ในสาขาเดียวกับ *Sphingomonas* sp. A4 และมีความใกล้เคียงกันมาก แต่ทั้ง 2 มีการแตกสาขาจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่น ทำให้สรุปได้ว่าเป็น *arh* ของสายพันธุ์ A4 น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ SP2 ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้มียีน *arhA1A2* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาที่คล้ายกับของสายพันธุ์ A4 มาก และมีการเรียงตัวของยีนที่คล้ายกัน (รูปที่ 20) จึงเป็นการสนับสนุนข้อสรุปว่า *arh* น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน

จากการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของ *Sphingomonas* sp. SP2 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ขนาด 1,416 bp พบว่าสายพันธุ์ SP2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Novosphingobium* และสายพันธุ์ A4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Sphingobium* จึงเชื่อได้ว่าสายพันธุ์ SP2 ไม่ใช่สายพันธุ์ที่กลายจากสายพันธุ์ A4 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสแตกต่างกัน ซึ่งการที่ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่คล้ายกันมาก อาจเกิดจากการถ่ายโอนยีนเนื่องจากมีบรรพบุรุษใกล้เคียงกันทำให้สามารถถ่ายโอนยีนกันได้ หรืออาจเกิดจากการที่มีบรรพบุรุษที่มียีนในวิถีการย่อยสลาย PAHs คล้ายกันแต่เกิดการวิวัฒนาการแตกต่างกันทำให้เกิดการขาดหายหรือกลายพันธุ์บางตำแหน่งของยีน

เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 (ArhA1) กับหน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส พบบริเวณอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ($[2Fe-2S]$) ของหน่วยย่อยแอลฟามีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ CXHX₁₇CX₂H ซึ่งตรงกับตำแหน่ง Cys50 Cys67 His52 และ His70 และบริเวณที่ 2 คือบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His204, His209 และ Asp358 โดยรายงานบริเวณอนุรักษ์ของ แนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 มีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ($[2Fe-2S]$) ของหน่วยย่อยแอลฟาตรงกับตำแหน่ง Cys81 Cys101 His83 และ His104 ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนรอบบริเวณเร่งปฏิกิริยาครอบคลุमกรดอะมิโนลำดับที่ 159-378 โดยเรียกบริเวณดังกล่าวว่า “helix-grip fold” (Carredano และคณะ, 2000) และบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His208, His213 และ Asp 362 (Hegg และ Que 1997) รายงานการศึกษาโครงสร้างสร้าง 3

มิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสเพื่อยืนยันบริเวณเร่งปฏิกิริยา เช่น แนพทาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 (Kauppi และคณะ, 1998), PCB ไดออกซิจีเนส *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Suenaga และคณะ, 2002) และไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. CHY-1 (Jakoncic และคณะ, 2007)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ArhA1 กับฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือน ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 99% โดยต่างกัน 2 กรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 ซึ่งทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold ทำให้ความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวใน 2 สายพันธุ์ น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนสซึ่งทำให้สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีน แต่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีลินได้ ส่วนสายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิดได้ (Pinyakong และคณะ, 2004)

การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ใน *Escherichia coli* JM109 โดยยีน *arhA1* และ *arhA2* ของสายพันธุ์ SP2 (pPPA1A2) สามารถแสดงออกได้บนเวกเตอร์ pUC18 ใน *E.coli* JM109 โดยสามารถแสดงออกพร้อมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนที่ประมวลรหัสเฟอริดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอริดอกซิน รีดักเทส (*ahdA4*) ของสายพันธุ์ P2 ได้ (Pinyakong และคณะ, 2003b) และพบว่าเทอร์มินัล ออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 สามารถใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรทได้ แต่ไม่สามารถใช้อะซีแนพรีลินได้ ซึ่งรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) พบว่าสายพันธุ์ A4 สามารถใช้อะซีแนพรีน อะซีแนพรีลินได้ แสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ 2 สายพันธุ์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน

จากการทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม predictprotein สามารถทำนายได้ว่าการที่เทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และ A4 พบว่าบริเวณ catalytic domain ของทั้งสองโปรตีนมีความใกล้เคียงกันมาก โดยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างโปรตีนของสายพันธุ์ SP2 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 นั้นทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold โดยคาดว่าอยู่ที่บริเวณส่วนของโปรตีนที่เป็นทางผ่านของซับสเตรตเข้าสู่บริเวณ catalytic domain ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน

สำหรับการศึกษาการชักนำการแสดงออกของ *arhA1* จากทั้งสายพันธุ์ A4 และ SP2 พบว่า ยีน *arhA1* สามารถถูกชักนำได้ด้วยทั้งอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลิน ดังนั้นความแตกต่างของความจำเพาะต่อการย่อยสลายสารดังกล่าวในแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเอนไซม์ดังที่ได้อภิปรายด้านบน แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์

เนื้อหางานวิจัย

คำนำ

อะซีแนพรีน (acenaphthene) เป็นสารในกลุ่มพอลิไซคลิก อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วย วงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนเทน 1 วง เชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม พบอะซีแนพรีนเป็น องค์ประกอบในน้ำมันดินจากถ่านหิน และน้ำมันดิบจากปิโตรเลียม อะซีแนพรีนไม่ถูกจัดเป็น สารก่อมะเร็ง (IARC, 1999) แต่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในสัตว์เพศเมีย (U.S.EPA, 1989)

การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน PAHs โดยวิธีทางชีวภาพ (bioremediation) ซึ่งใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายมีบทบาทและเป็นที่ยอมรับมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายในการ ดำเนินการต่ำและสามารถกำจัดสารพิษที่ปนเปื้อนได้อย่างสมบูรณ์ ได้มีการศึกษาวิธีการย่อยสลาย PAHs โดยจุลินทรีย์ และการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PAHs เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและตรวจติดตามและการย่อยสลายให้มีประสิทธิภาพสูงสุด และยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยปรับปรุงสมบัติในระดับยีนของจุลินทรีย์นั้น และนำองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนในการย่อยสลายไปใช้ในการควบคุม หรือปรับภาวะให้เหมาะสม ต่อจุลินทรีย์ท้องถิ่นให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในปัจจุบัน sphingomonad เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการย่อยสลายสารแปลกปลอม (xenobiotics) หลายชนิดโดย *Sphingomonas* sp. เป็น แบคทีเรียแกรมลบที่พบได้ทุกแหล่งในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน น้ำ ตะกอนหรือบริเวณที่มีการ ปนเปื้อนสารพิษ ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม PAHs ซึ่งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลาย ฟีนานทรีน แนนทาลีน และไบฟีนิล (Supaka และคณะ, 2001) *Sphingomonas* sp. ยังสามารถย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ เช่น *Sphingomonas* sp. CHY-1 ซึ่งสามารถย่อยสลาย ไครซีน (Demaneche และคณะ, 2004) เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนน้อยมาก และ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad เช่น *Pseudomonas* sp. A4 (Komatsu และคณะ, 1993) (ในภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)) และ *Sphingomonas aromaticivoran* B0695 (Shi และคณะ, 2001) และถึงแม้มี รายงานว่า *Alcaligenes* sp. สามารถย่อยสลาย อะซีแนพรีนได้ (Selifonov และคณะ, 1993) แต่จนถึงปัจจุบันมีเพียงรายงานการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน ของสายพันธุ์ A4 เท่านั้น (Pinyakong และคณะ, 2004)

แบคทีเรียย่อยสลาย PAHs ในภาวะที่มีออกซิเจนโดยกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่ง เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มออกซิจีเนส (oxygenase) และดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งทำกิจกรรมในการเปลี่ยนโครงสร้างของ PAHs (transformation) ให้เกิด สารประกอบที่เป็นพิษลดลง โดยการทำให้โครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกเป็นสารมัธยันตร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายขึ้นโดยเอนไซม์อื่น จนเข้าสู่วัฏจักรกรดไทรคาร์บอกซิลิก

(Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป (Habe และ Omori, 2003)

พบว่ายีนประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลาย PAHs ของ *Sphingomonas* sp. มีการจัดเรียงตัวอยู่ห่างกันเนื่องจากถูกคั่นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลาย PAHs ต่างชนิดกัน และส่วนใหญ่ในหนึ่งสายพันธุ์มียีนในการย่อยสลาย PAHs หลายชุดเพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a) เช่น *Sphingobium yanoikuyae* B1 สามารถย่อยสลายไบฟีนิล ไซลีน และซาลิไซเลต (Gibson, 1999) และพบยีนเทอร์มินัลริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (terminal ring-hydroxylating dioxygenase) ถึง 5 ชุด (*bphA1*[a-e] และ *bphA2*[a-e]) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวกระจุกกระจาย แต่พบยีนเพอร์รีดอกซิน (*bphA3*) และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*bphA4*) เพียง 1 ชุด (Kim และ Zylstra, 1999) มีรายงานเกี่ยวกับ *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (ภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Novosphingomonas aromaticivorans* F199 (Takeuchi และคณะ, 2001) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs บนพลาสมิดขนาด 184 กิโลเบส ซึ่งมียีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้ง 5 ชุด เช่นเดียวกับในสายพันธุ์ B1 และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ดังกล่าวถึง 61-90% นอกจากนี้พบยีนชุดที่ 6 (*bphA1fA2f*) เรียงตัวอยู่ไกลจากยีนกลุ่มเดิม (Romine และคณะ, 1999) มีการทำนายว่าเป็นไบฟีนิล/แนพทาลีนไดออกซิจีเนสแต่ยังไม่มีการทดลองยืนยัน ต่อมาพบยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสทั้ง 5 ชุด (*ahdA1*[a-e] และ *ahdA2*[a-e]) ของ *Sphingomonas* sp. P2 และพบยีนเพอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) เพียงชุดเดียว จากการศึกษาหน้าที่ของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนส 3 ชุด (*ahdA1*[c-e] และ *ahdA2*[c-e]) ซึ่งแสดงออกใน *Escherichia coli* JM109 พบเอนไซม์ 3 ชนิด (*AhdA2cA1c*, *AhdA1dA2d* และ *AhdA1A2e*) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซาลิไซเลตซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ในวิถีการย่อยสลายฟีแนทรีนให้เป็นแคทีคอล เรียกว่าเอนไซม์ซาลิไซเลต 1-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งทั้ง 3 เอนไซม์ทำงานร่วมกับเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*AhdA3A4*) ชุดเดียวกัน (Pinyakong และคณะ, 2003b)

การศึกษาการย่อยสลายอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลีนของ *Sphingomonas* sp. A4 พบว่าสามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ได้ แต่ไม่สามารถใช้ PAHs ชนิดอื่น และมีการย่อยสลายอะซีแนพรีน โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ โดยกิจกรรมของไดออกซิจีเนสได้ 1-อะซีแนพรีนอลและ 1-อะซีแนพรีโนน (Komatsu และคณะ, 1993) ในปี 2004 เริ่มมีรายงานการแยกและศึกษาหน้าที่ของยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีนเป็นครั้งแรกใน *Sphingomonas* sp. A4 โดยพบยีน *arhA1* และ *arhA2* ซึ่งทำหน้าที่ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของไดออกซิจีเนส ตามลำดับ แต่ไม่พบยีนเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทสในยีนกลุ่มเดียวกัน (Pinyakong และคณะ, 2004) แสดงว่ายีนทั้ง 2 อาจอยู่ในบริเวณอื่น จึงมีการใช้พลาสมิด pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนเพอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของ *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) ในการตรวจสอบหน้าที่ของไดออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ A4 ใน *E.coli* พบว่าสามารถย่อยสลายอะซีแน

พรีน อะซีแนพรีลีน แนพธาลีน ฟีนแอนทรนีน แอนทราซีน และฟลูออแรนธรีน แต่ไม่ย่อยสลายไพรีน และในปี 2006 พบยีนเพอร์รีดอกซิน (*arhA3*) ยีนเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*arhA4*) และยีนควบคุม (*arhR*) ของวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีนในสายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดแยก *Sphingomonas* sp. SP2 ซึ่งมีความสามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้แต่ไม่สามารถใช้อะซีแนพรีลีนได้ (Saipheth และคณะ, 2006) จึงมีการศึกษาโดยใช้เทคนิคเซาเทิร์นไฮบริไดเซชัน (Southern hybridization) เปรียบเทียบระหว่าง DNA ทั้งหมดที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* อย่างสมบูรณ์ของสายพันธุ์ A4 กับสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ยีนไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 เป็นตัวติดตาม สามารถตรวจพบสัญญาณของยีนไดออกซิจีเนสในทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ให้สัญญาณแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ A4 ปรากฏ 2 แถบ ขนาดประมาณ 2.6 และ 5.0 กิโลเบส แต่สายพันธุ์ SP2 ปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาดประมาณ 5.0 กิโลเบส จึงคาดว่าทั้ง 2 สายพันธุ์น่าจะมียีนไดออกซิจีเนสที่คล้ายคลึงกัน เนื่องจากปรากฏแถบขนาด 5.0 กิโลเบส และสามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนได้เหมือนกัน จากการที่สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีลีน แต่สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถใช้อะซีแนพรีลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน การศึกษายีนของสายพันธุ์ SP2 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ A4 จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้จึงสนใจค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีนในสายพันธุ์ SP2 โดยมุ่งเน้นการคัดแยกยีนอะซีแนพรีนออกซิจีเนส เพื่อจัดกลุ่มและศึกษานำหน้าที่ของยีนดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสใน *Sphingomonas* sp. SP2
2. เพื่อทราบหน้าที่และความจำเพาะของเอนไซม์อะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2
3. เพื่อทราบความแตกต่างของยีนและเอนไซม์อะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 ในเรื่องลำดับกรดอะมิโน โครงสร้าง ความจำเพาะเจาะจงต่อ PAHs และการถูกชักนำให้แสดงออกโดยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีน

วิธีทดลอง

1. การคัดแยกยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2

ทำโดยวิธี shotgun cloning โดยการเพาะเลี้ยง *Sphingomonas* sp. SP2 ในอาหารเหลว LB 5 มล. 18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดจีโนมิก DNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) และสร้างห้องสมุด DNA (plasmid library) ของสายพันธุ์ SP2 โดยตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และทำอเล็กโทรพอเรซิส แล้วสกัด DNA จากอะ

กาโรสเจลด้วย EASYTRAP™ Ver.2 (บริษัท TAKARA BIO INC ประเทศญี่ปุ่น) โดยตัดส่วน DNA ขนาดประมาณ 4-6 กิโลเบสจากอะกาโรสเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Glass powder for Recovery of DNA EASYTRAP™ Ver.2 ตามวิธีที่ระบุในคู่มือกับพลาสติกเวกเตอร์ จากนั้นนำมาเชื่อมกับ pUC18 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสติกเวกเตอร์ ด้วย calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) ตามวิธีของ (Sambrook และ Russell, 2001) แล้ว และใช้ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีเฟอริดอกซินและเฟอริดอกซินรีดักเตสของ *Sphingobium* sp. P2 (pSA3A4) (Pinyakong และคณะ, 2003b) เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการทาสฟอว์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ตามวิธีของ (Sambrook และ Russell, 2001) และคัดเลือกโคลนสองขั้นตอนคือ คัดเลือกเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่ทาสฟอว์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) เข้มข้น 2 % ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ นำไปบ่มที่ 37°C 16-18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มียีนออกซิจีเนส จากห้องสมุด DNA ของสายพันธุ์ SP2 โดยเขี่ยเซลล์รีคอมบิแนนท์ที่มียีนสอดแทรกลงบนอาหารแข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน คลอแรมฟินิคอล และ IPTG บ่มที่ 30°C 12 ชั่วโมง แล้ววางอินโดลบบนฝาจานเลี้ยงเชื้อบ่มต่อที่ 30°C 24 ชั่วโมง ถ้าเซลล์รีคอมบิแนนท์มีส่วนของยีนที่สามารถผลิตออกซิจีเนส เซลล์สามารถผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกทำให้สีอินดิโก (Ensley และคณะ, 1983) ทำให้โคลนนี้ดังกล่าวเป็นสีอินดิโก

2. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA แทรกสอดที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 และเปรียบเทียบกับยีนของ *Sphingomonas* sp. A4 และยีนของแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank

ทำโดยหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้น DNA สอดแทรกในพลาสมิดที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI* *EcoRV* หรือ *BglII* เพื่อเตรียมสร้างโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เรียงต่อกันจนครบทั้งชิ้น DNA สอดแทรก โดยอาศัยเวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์พาหะในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ในแต่ละโคลน เพื่อนำมาต่อกันทำให้สามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของชิ้น DNA สอดแทรกในพลาสมิดที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 ได้ โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA สอดแทรก 7 โคลน ได้แก่ พลาสมิด pPC1, pHP9, pPE15, pPH16, pEP4, pPEv10 และ pEvB5 ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท MacroGen INC ประเทศเกาหลี ซึ่งใช้พลาสมิดเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา เป็น DNA ต้นแบบ และไพรเมอร์ M13F (Forward:

GTAAACGACGGCCAGT) และ M13R (Reverse: GCGGATAACAATTCACA CAGG) เข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automatic Sequencer รุ่น 3730XL

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA แทรกสอดที่ตัดแยกได้แล้วเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและกรดอะมิโนของเอนไซม์ของ *Sphingomonas* sp. A4 และของแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank และจัดกลุ่มไดออกซิจีเนสที่ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. SP2 โดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และสร้าง phylogenetic tree ด้วย PHYLIP software package version 3.572c

3. การทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบโครงสร้างและชนิดของกรดอะมิโนบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์

ทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม predictprotein (predictprotein.org) โดยใช้โครงสร้างสามมิติของหน่วยแอลฟาของเนพธาลีน เทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 เป็นต้นแบบ และเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของโปรตีนทั้งสามโดยใช้โปรแกรม DeepView Swiss-Pdbview แสดงผลของการเปรียบเทียบโครงสร้างโดยใช้โปรแกรม Pov-Ray version 3.6

4. การตรวจสอบหน้าที่ของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2

โดยสร้างพลาสมิดที่มียีนที่ผลิตไดออกซิจีเนสโดยเลือกตัดชิ้น DNA ที่ครอบคลุมยีน *arhA1* และ *arhA2* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ตัดที่ตำแหน่ง 505 และ *Pst*I ตัดที่ตำแหน่ง 3181 ดังแสดงในรูปที่ 4 ทำให้ได้ชิ้นสอดแทรกขนาด 2676 เบส และใช้เวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์แสดงออก โดยให้ชื่อพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ว่า pPPA1A2

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของ *E. coli* ที่มี recombinant oxygenase ที่สร้างขึ้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมและชุดทดลอง ซึ่งชุดควบคุม ได้แก่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pSA3A4 และชุดทดลอง ได้แก่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของชุดควบคุม ได้แก่ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pSA3A4 และชุดทดลอง ได้แก่ *E. coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 ซึ่งเตรียมหัวเชื้อโดยเชื้อลงในอาหารเหลว LB 95 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและคลอแรมฟินิคอล บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 37°C ประมาณ 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 แล้วเติม IPTG จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครโมลาร์ บ่มต่อที่เครื่องเขย่าที่ 30°C 200 รอบต่อนาที 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ ปลอดภัย ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C 8000 รอบต่อนาที 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน (Carbon Free Mineral Medium, CFMM) 50 มิลลิลิตร สุดท้ายละลายตะกอนด้วย CFMM ประมาณ 10 มิลลิลิตร (เจือจางจน OD₅₅₀ เท่ากับ 10)

ทดสอบกับสับสเตรท 7 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพรีน อะซีแนพรีลีน ฟีนานทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแนพทาลีน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มที่ 30°C 20 ชั่วโมง แล้วสกัดสาร PAHs ออกจากอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบสับสเตรทที่เหลื่อและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว ตามวิธีการของ Grifoll และคณะ (1992) และตรวจสอบสับสเตรทที่เหลื่อและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC GC-FID และ GC-MS

การวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC ทำโดยนำส่วนสกัดไประเหยแห้งแล้วละลายด้วยเฮกเซน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารที่สกัดได้ทั้งหมดจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 5-10 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8 × 8 ซม. โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสับสเตรทที่เหลื่อและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร

การวิเคราะห์โดยเทคนิค GC ทำโดยการกรองสารละลายที่เจือจางจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร และวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนิลเมทิลไซโลเซนเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น	80 °C				
อุณหภูมิขั้นที่ 1	25 °C ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 160 °C	hold	3 นาที	
อุณหภูมิขั้นที่ 2	3 °C ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 220 °C	hold	2 นาที	
อุณหภูมิขั้นที่ 3	40 °C ต่อนาที	จนอุณหภูมิ 300 °C	hold	7 นาที	

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

การวิเคราะห์สับสเตรทที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว โดยเทคนิค GC-MS ทำโดยนำส่วนสกัดไประเหยแห้งแล้วละลายด้วยเอทิลอะซีเตต 1 มิลลิลิตร ในการทดลองที่ใช้สับสเตรทเป็นอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลิน ส่วนสับสเตรทอีก 5 ชนิด ได้แก่ ฟิแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธรีน ไพรีน และ แนพทาลีนละลายตะกอนด้วย ไทรเมธิลซิลิไทรฟลูออโรเซทาไมด์ (MSTFA) 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 70°C 20 นาที จากนั้นเจือจางสารที่สกัดได้ทั้งหมดจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร วิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS โดยวิเคราะห์ด้วยชุดเครื่อง Gas Chromatography with Time of Flight Mass spectrometry ยี่ห้อ LECO รุ่น Pegasus III (บริษัทลีโกอินสตรูเมนต์ (ประเทศไทย) จำกัด) ใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนิลเมทิลไซโลเซนเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Mass spectrometry (MS) วิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น 80 °C

อุณหภูมิขั้นที่ 1 16 °C ต่อนาที จนอุณหภูมิ 240 °C hold 8 นาที

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที

5. การเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุมการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ด้วยเทคนิคเซาเทิร์นไฮบริไดเซชัน

การเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุมการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ DNA ติดตาม *arhA3* (ยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน) *arhA4* (ยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซินรีดักเทส) และ *arhR* (ยีนควบคุม) ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 ทำเซาเทิร์นไฮบริไดเซชันกับ DNA ของสายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 โดยการสกัด DNA ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* จากนั้นทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 0.9% บัฟเฟอร์ 1x TAE แล้วถ่าย DNA จากอะกาโรสเจลลงสู่ไนลอนเมมเบรนโดยวิธี capillary blotting ตามวิธีที่ระบุใน (Sambrook และ Russell, 2001)

การเตรียม DNA ติดตาม *arhA3* *arhA4* และ *arhR* ทำโดยการเพิ่มจำนวนส่วนของยีน *arhA3* *arhA4* และ *arhR* ตามลำดับจาก *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 โดยเทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ที่แสดงในตารางที่ 1 และความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1xบัฟเฟอร์ Taq DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย (New England Biolabs) สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้งสองด้านของสาย DNA แม่แบบ forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมล (ของแต่ละตัว) DNA

แม่แบบ ประมาณ 100 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมด มี ปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Initial denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที	} 35 รอบ
Denaturation step	อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 30 วินาที	
Annealing step	อุณหภูมิ 50°ซ เวลา 30 วินาที	
Extension step	อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 30 วินาที	
Final extension step	อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 6 นาที	

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนยีน *arhA3 arhA4* และ *arhR* จาก *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4

ชื่อไพรมเมอร์ (ตำแหน่งบนยีนของสาย พันธุ์ A4)	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
arha3f (15-34) arha3r (238-257)	5'-ggcaaaagttgagggcagttc 5'-ttgagcgggtatttcacatgg	243
arha4f (49-68) arha4r (915-934)	5'-agcgatatcgacttccatgc 5'-cgttctccttgagatacgcg	886
arharf (852-871) arharr (38-57)	5'-cgttctcgaatgcgtgtttc 5'-agccattgattgcaggatc	834

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 2% และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุใน คู่มือ และติดฉลาก DNA ติดตามด้วย Digoxigenin-dUTP ด้วยวิธี random labeling โดยใช้ชุด สำเร็จรูปการติดฉลากและติดตาม DNA DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit (Roche, Germany) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต

และทำไฮบริไดเซชัน DNA ของสายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ตามวิธีที่ระบุใน (Sambrook และ Russell, 2001)

6. การแยกยีนประมวลรหัสเฟอไรโดอกซิน เฟอไรโดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม จาก *Sphingomonas* sp. SP2 โดยใช้วิธี genome walking

การแยกยีน *arhA3* *arhA4* และ *arhR* จาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ใช้วิธี genome walking โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, Laboratories, Palo Alto, USA) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเพิ่มจำนวน *arhA3* บางส่วน (243 bp) ของสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ไพรเมอร์ *arhA3f* และ *arhA3r* (ตารางที่ 1) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *arhA3* ของสายพันธุ์ SP2 และออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ genome walking ดังตารางที่ 2 เพื่อให้สามารถแยกชิ้น DNA บริเวณข้างเคียงของผลิตภัณฑ์ PCR (*arhA3*) ที่ได้ทั้งทาง upstream และ downstream และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA บริเวณดังกล่าวจนทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน เพอร์รีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม ของ *Sphingomonas* sp. SP2

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทำ genome walking และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<i>arhA3fl</i>	5'- ATCTTTAATCTGGATGGAGAATTATTCGCG
<i>arhA3rl</i>	5'- TTGAGCGGTATTTACATGGAAATTCGGTG
<i>arhA3fll</i>	5'- GAGGAGGGGGTTATAGAGTGCCCGCTTC
<i>arhA3rll</i>	5'- CCGGTTCTCACATCGAAGCACCCGGAATG
<i>arhA4F1</i>	5'- GCCAGATGTCCTCGATTTGCGCTTCC
<i>arhA4R1</i>	5'- GGGCAAGCGCGTCATGGTCTTTTACG
<i>arhRR1</i>	5'- GCCTGCGTACCGGAAATATACACCACAG
<i>arhRH</i>	5'- CATGGCGTATTGTGTCTGG
<i>arhA4H</i>	5'- CCAGATGTCCTCGATTTC
<i>arhBA3A41</i>	5'- CACTACATCAATGGCGAG
<i>arhBA3AR1</i>	5'- CAGCCAAGGCGATTGTGC
<i>arhA3hy</i>	5'- ATCAATCGGTCATTAAGCGC
<i>arhRA3-2</i>	5'- TTCGCGACCAGCAATATTTG
<i>arhA4Rche</i>	5'-CCCGGTAATCTATGCTGCTC

7. การ subclone ยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ SP2 ตามวิธีในข้อที่ 6 เพิ่มจำนวนยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทสโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *arhA34FNN* (5'- ggatcctggataagggcggggtgag) ซึ่งมีบริเวณจดจำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่ปลาย 5' และ *arhA34RNN* (5'- aagctaaccgctcacagaaagc) ซึ่งมีบริเวณจดจำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ที่ปลาย

5' และทำ PCR เช่นเดียวกับข้อที่ 6 โดยใช้ High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรส 1% ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือขนาด 2118 bp ซึ่งมียีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*arhA3* และ *arhA4*) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วไลगेทกับพลาสมิด pSTV28 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เช่นเดียวกัน แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยใช้อาหารคัดเลือก 2xYT ที่มีคลอแรมฟินิคอล IPTG และ X-Gal คัดเลือกโคลนที่มีสีขาว ตรวจสอบพลาสมิดและ DNA แทรกสอด ตั้งชื่อพลาสมิดที่มี *arhA3* และ *arhA4* นี้ว่า pSarhA34SP

8. การตรวจสอบการทำงานร่วมกันของเฟอร์รีดอกซิน เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ที่ได้ในข้อที่ 7 กับเทอร์มินัลออกซิจีเนส

การตรวจสอบการทำงานร่วมกันของเฟอร์รีดอกซิน เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส ที่ได้ในข้อที่ 7 กับเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่ได้ในข้อที่ 4 โดยการให้ยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนดังกล่าวแสดงออกร่วมกันใน *E. coli* แล้วตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ทำโดยทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pPPA1A2 และ pSarhA34SP เข้าสู่ *E. coli* JM109 โดยใช้อาหารคัดเลือก 2xYT ที่มีแอมพิซิลิน คลอแรมฟินิคอล และ IPTG นำโคลนที่ได้ซึ่งดลบนอาหารชนิดเดียวกัน บ่มที่ 37°C ซ้ำมคืน แล้ววางอินโดลลงบนฝ่าจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มต่อซ้ำมคืน สังเกตการเปลี่ยนสีอินโดลเป็นอินดิโกของโคโลนี

9. การตรวจสอบหน้าที่และความจำเป็นของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสที่แยกได้ในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของ *Sphingomonas* sp. SP2

ในการตรวจสอบหน้าที่และความจำเป็นของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนส (*arhA1*) ที่แยกได้ ในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของ *Sphingomonas* sp. SP2 ทำโดยสร้างสายพันธุ์กลายของ SP2 ที่มียีนต้านทานเจนตามัยซินแทรกอยู่ในยีน *arhA1* ซึ่งเริ่มจากการตัดพลาสมิด pPPA1A2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RV และกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ ด้วย CIAP ตามวิธีของ (Sambrook และ Russell, 2001) จากนั้นไลगेทกับชิ้นยีนต้านทานเจนตามัยซิน (Gm^r) ขนาด 600 bp ซึ่งได้จากการตัดพลาสมิด pBSL202 (Alexeyev และคณะ 1995) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I และทำให้เป็นปลาย blunt จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 คัดเลือกด้วยอาหาร 2xYT ที่มีแอมพิซิลินและเจนตามัยซิน ได้โคลนให้ชื่อว่า pUPGA1 จากนั้นตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ได้ชิ้น DNA ที่มียีน *arhA1::Gm^r* และ *arhA2* แล้วเชื่อมกับ pKmobsacB (Schäfer และคณะ 1994) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I เช่นเดียวกันและถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟสตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ ด้วย CIAP แล้ว จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 คัดเลือกด้วยอาหาร 2xYT ที่มีกานา

มัยซินและเจนตามัยซิน ได้โคลนให้ชื่อว่า pKPGA1 จากนั้นทรานส์ฟอร์ม pKPGA1 เข้าสู่ *E. coli* S17-1 (λ -pir)

จากนั้นสร้างสายพันธุ์กลายของ SP2 ที่มียีนต้านทานเจนตามัยซินแทรกอยู่ในยีน *arhA1* โดยคอนจูเกต *E. coli* S17-1 (λ -pir) (pKPGA1) กับสายพันธุ์ SP2 (ซึ่งสามารถต้านทานแอมพิซิลินได้) โดยใช้วิธี filter mating คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้านทานเจนตามัยซิน และแอมพิซิลิน รวมทั้งเจริญได้ในซูโครส แต่ไวต่อกานามัยซิน ก็จะได้สายพันธุ์กลายของ SP2 ที่มียีนต้านทานเจนตามัยซินแทรกอยู่ในยีน *arhA1*

จากนั้นทำเซาเร็นไฮบริไดเซชันด้วย DNA ติดตาม *arhA1* กับ DNA ของสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์กลายเพื่อยืนยันการแทรกของยีนต้านทานเจนตามัยซินในยีน *arhA1* ของสายพันธุ์กลาย

แล้วทดสอบการย่อยสลายอะซีแนพรีนของสายพันธุ์กลายโดยสังเกตการสร้างโซนใส หลังจากการพ่นทับโคโลนีของสายพันธุ์ SP2DM1 ที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ LB ด้วยสารละลายอะซีแนพรีน

10. การตรวจสอบและเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนได้

ออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 ด้วยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีน

เพาะเลี้ยง *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 ในอาหารเหลว LB จนเจริญถึง exponential phase และปั่นเก็บเซลล์ และแขวนลอยเซลล์ใน CFMM ที่มีกลูโคส อะซีแนพรีน หรืออะซีแนพรีลีน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเขย่าที่ 30°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัด RNA ด้วยชุดสำเร็จรูป Aurum RNA extraction (BIO-RAD) และนำมาทำ reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAGEN OneStep RT-PCR โดยวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *arhA1* และ 16S rDNA ดังตารางที่ 3 และใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 400 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับ RT-PCR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
arhA1F	5'-CGCCGACTGAAAATTTTGT	497
arhA1R	5'-GTCGTCAGCTTCCCAGTAGC	
520F	5'-GTGCCAGCAGCCGCGG	580
1100R	5'-AGGGTTGCGCTCGTTG	

แล้วดำเนินการทำการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Reverse-transcription	ที่อุณหภูมิ	50 ⁰ ซ	15 นาที	} 30 รอบ
Hot start	ที่อุณหภูมิ	94 ⁰ ซ	2 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 ⁰ ซ	30 วินาที	
Annealing	ที่อุณหภูมิ	55 ⁰ ซ	30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 ⁰ ซ	30 วินาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ	72 ⁰ ซ	6 นาที	

นอกจากนี้ นำ RNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพซินไดออกซิจีเนสโดยเทคนิค real time PCR โดยการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ reverse primer arhA1qR หรือ 16SqR ปฏิบัติ reverse transcription ทำโดยใช้ชุดสำเร็จ iScript™ Select cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) โดยใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 300 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นเจือจางสารละลาย cDNA ที่ได้ด้วยน้ำปลอดเชื้อปลอดประจุ 10 เท่า ก่อนหน้าที่จะนำไปทำ PCR จากนั้นทำ real-time PCR ด้วย MiniOpticon real time PCR system (BIO-RAD) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป iQ™ SYBR Green Supermix (BIO-RAD) และโปรแกรมดังแสดงในตารางที่ 4 ด้วยวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตโดยใช้ปริมาณสุทธิ 20 µl ต่อปฏิกิริยา

ตารางที่ 4 โปรแกรมสำหรับ real time-PCR

ชื่อโปรแกรม	ลำดับนิวคลีโอไทด์
arhA1qF	5'-tctacggttcgcatctcaac
arhA1qR	5'-ctgccagatcttcaacgtgt
16SqF	5'-gtgagtgatgaaggccttag
16SqR	5'-ctttacgcccagtaattccg

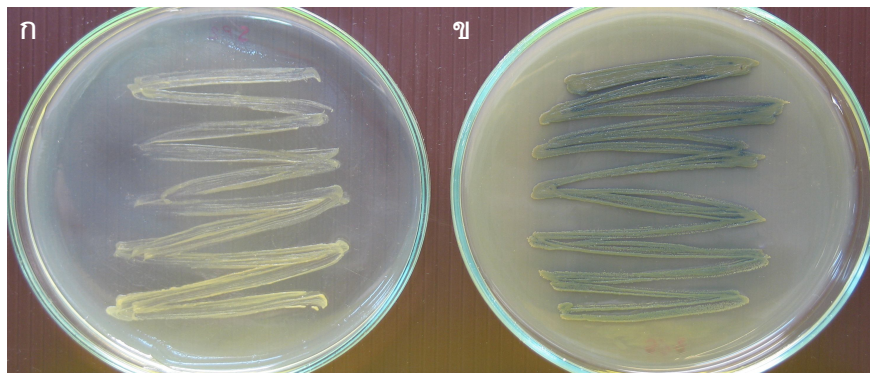
แล้วดำเนินการทำการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

95 ⁰ ซ	5 วินาที	} 40 รอบ
65 ⁰ ซ	5 วินาที	
55 ⁰ ซ	5 วินาที	
72 ⁰ ซ	30 วินาที	

ผลการทดลอง

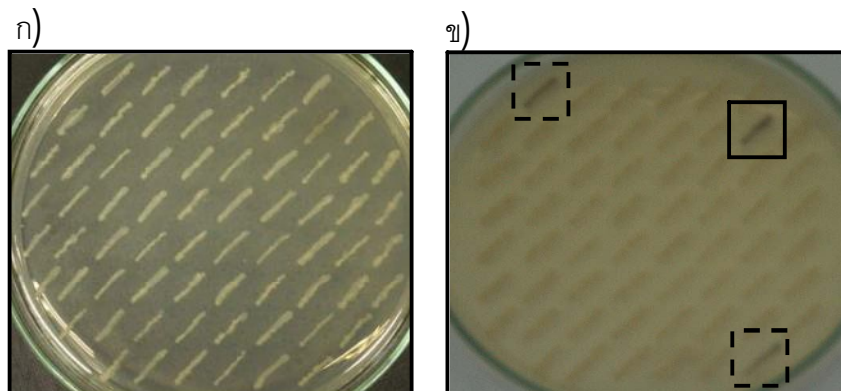
1. การคัดแยกยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนเทอร์มินัลไดออกซีจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2

สร้างห้องสมุด DNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 จากชิ้น DNA ขนาด 4-6 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ด้วยวิธีการสร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยหลักการโคลนแบบ Shot-gun และคัดเลือกโคลนโดยใช้สมบัติการเปลี่ยนสีอินโดลให้เป็นอินดิโกตามวิธีของ Ensley และคณะ (1983) ทั้งนี้ได้ทำการทดลองยืนยันการทำงานของออกซีจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกในเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อน โดยผลที่ได้พบว่า *Sphingomonas* sp. SP2 สามารถเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกได้ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นจึงสามารถใช้สมบัติการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกของออกซีจีเนสมาใช้ในการคัดเลือกโคลนที่บรรจุยีนออกซีจีเนสจากสร้างห้องสมุด DNA ของ *Sphingomonas* sp. SP2 ได้ โดยในการสร้างห้องสมุด DNA ได้ให้แสดงออกร่วมกับพลาสมิด pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนประมวลผลเพอร์ริดอกซินและเพอร์ริดอกซินรีดักเตสของสายพันธุ์ P2 เพื่อช่วยให้ออกซีจีเนสสามารถทำงานได้สมบูรณ์



รูป 1 ภาพ ก) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่ไม่ได้วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ และ ภาพ ข) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ

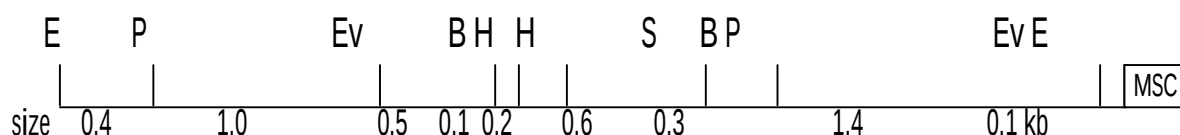
ผลการทดลองพบโคลนจากห้องสมุด DNA ที่ให้ผลบวก 1 โคลน จากการคัดเลือกโคลนทั้งหมดประมาณ 1,000 โคลน ดังแสดงในรูปที่ 2 และให้ชื่อโคลนนี้ว่า โคลน pPC1



รูป 2 ภาพ ก) ห้องสมุด DNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ก่อนวางอินโดล และ ภาพ ข) ห้องสมุด DNA ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 หลังวางอินโดล โดยโคลนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมเส้นประ (▨) แสดงโคลนควบคุมผลบวก (*E.coli* JM109 ที่มี pUArhA1A2 (Pinyakong และคณะ 2004) และ pSA3A4) และโคลนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมเส้นทึบ (▩) แสดงโคลนจากห้องสมุด DNA ที่ให้ผลบวก

2. การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA แทรกสอดที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 และ เปรียบเทียบกับยีนของ *Sphingomonas* sp. A4 และยีนของแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank

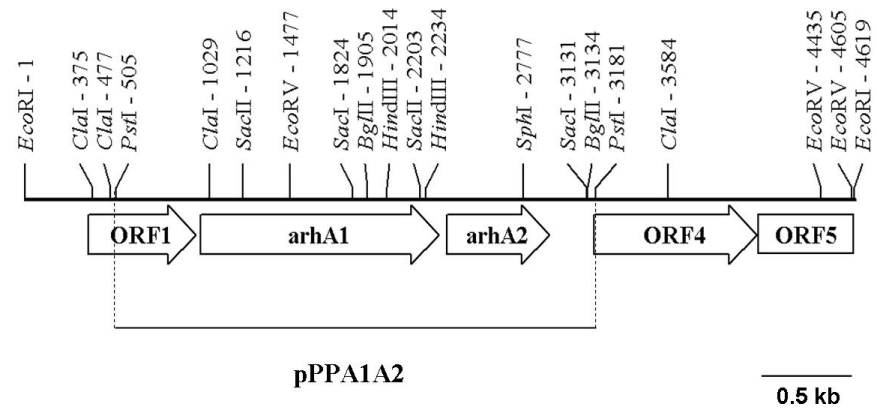
หาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้น DNA สอดแทรกพลาสมิด pPC1 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI*, *EcoRV* หรือ *BglII* ซึ่งทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด และตรวจสอบขนาดชิ้น DNA ที่ตัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทำให้สามารถเขียนแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะได้ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของ DNA สอดแทรกในพลาสมิด pPC1 โดย E = *EcoRI*, P = *PstI*, Ev = *EcoRV*, B = *BglII*, H = *HindIII*, S = *SphI* และ MSC = multiple cloning sites

ทำการสับโคลนใน pUC18 โดยให้บริเวณรวมของ DNA สอดแทรกทุกโคลนครอบคลุมทั้งชิ้น DNA สอดแทรกของ pPC1 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (Forward: GTAAAACGACGGCCAGT) และ M13R (Reverse: GCGGATAACAATTCACACAGG)

จากการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac version 2.05 พบว่า DNA สอดแทรกของพลาสมิด pPC1 มีขนาด 4,624 เบส และวิเคราะห์ช่วงการแสดงออกของยีน (ORF) พบว่ามี 4 ORFs ที่สมบูรณ์ และ 1 ORF ที่พบบางส่วนโดยไม่พบบริเวณหยุดการแสดงออก ดังแสดงในรูปที่ 4 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับข้อมูลของยีนที่มีใน database GenBank DDBJ และ EMBL สามารถทำนายหน้าที่ของยีนและโปรตีนผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 4 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ และช่วงการแสดงออกของยีนบน pPC1

ตารางที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับการดะมิโนกับลำดับการดะมิโนจากฐานข้อมูล (BlastP)

ORF no. (gene name)	nucleotide no.	Homolog	Source				% a. a identity
			gene name	microorganism	No. of a. a. of relative	accession no.	
ORF1	353-950	isomerase	<i>dbtD</i>	<i>Burkholderia</i> sp. DBT1	207	AAK62352	94/189 (49%)
		putative isomerase	<i>orf8</i>	<i>Burkholderia</i> sp. DBT1	196	AAK96187	99/195 (50%)
		isomerase	<i>phnD</i>	<i>Burkholderia</i> sp. RP007	196	AAD09871	97/189 (51%)
		putative 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	<i>nahD</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. P2	197	BAC65425	89/195 (45%)
<i>arhA1</i>	977-2306	large subunit of PAH-dioxygenase	<i>arhA1</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A4	443	BAE93949	441/443 (99%)
		dioxygenase alpha subunit	<i>phnAc</i>	<i>Burkholderia</i> sp. RP007	450	AAD09872	248/439 (56%)
		dioxygenase alpha subunit	<i>dbtAc</i>	<i>Burkholderia</i> sp. DBT1	455	AAK62353	238/445 (53%)
		ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit	<i>phnA1a</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	454	CAG17576	196/436 (44%)
		large subunit of PAH-dioxygenase	<i>ahdA1a</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. P2	448	BAC65448	177/434 (40%)

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BlastP)

ORF no. (gene name)	nucleotide no.	Homolog	Source				% a.a identity
			gene name	microorganism	No. of a.a. of relative	accession no.	
<i>arhA2</i>	2349-2922	small subunit of PAH-dioxygenase	<i>arhA2</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A4	191	BAE93950	190/191 (99%)
		dioxygenase beta subunit	<i>phnA4d</i>	<i>Burkholderia</i> sp. RP007	195	AAD09873	83/179 (46%)
		iron-sulfur-protein beta subunit	<i>dntA4d</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> R34	194	AAL50020	68/168 (40%)
		ring-hydroxylating dioxygenase beta subunit	<i>phnA2a</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. CHY-1	174	CAG17577	54/165 (32%)
ORF4	3169-4075	hypothetical protein	<i>orf5</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A4	306	BAE93951	301/302 (99%)
		putative maleylpyruvate isomerase	<i>hbxF</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIMB 9867	287	ABD64512	148/284 (52%)
^a ORF5	4085-4621	hypothetical protein	<i>orf6</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. A4	367	BAE93952	180/180 (100%)
		ferredoxin reductase	<i>nagAa</i>	<i>Ralstonia</i> sp. U2	328	AAD12606	39/131 (29%)

^a พบบางส่วนของ ORF โดยไม่พบส่วนปลายของยีนรวมทั้งโคดอนหยุด

จากตารางที่ 5 แสดงผลการทำนายหน้าที่ของโปรตีนที่ประมวลผลจากทั้ง 5 ORFs โดยเทียบกับฐานข้อมูล พบ ORFs 2 และ 3 ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟา และบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 (GenBank Accession No. BAE93949 และ BAE93950 ตามลำดับ) ถึง 99% โดย ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ A4 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 เป็น Thr261 และ Gly347 และ ArhA2 ของสายพันธุ์ SP2 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ A4 ที่ตำแหน่ง Ala92 ซึ่ง ArhA2 ของสายพันธุ์ A4 เป็น Val92

ORF1 ประมวลรหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่คล้ายไอโซเมอเรสในฐานข้อมูล ถึง 45-50 % โดยมีความคล้ายกับส่วนหนึ่งของไอโซเมอเรส (ORF8) จาก *Burkholderia* sp. DBT1 (GenBank Accession No. AAK96187) 50 %

ORF4 ประมวลรหัสโปรตีนที่มีความคล้ายกับ ORF5 ของสายพันธุ์ A4 (GenBank Accession No. BAE93951) 99% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว และคล้ายกับไอโซเมอเรส (Hbzf) ของ *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867 (GenBank Accession No. ABD64512) 52%

ORF5 เป็นช่วงการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ คือ พบบริเวณเริ่มต้นการแปลรหัสทางพันธุกรรม แต่ไม่พบบริเวณหยุดแปลรหัส เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลพบว่า คล้ายกับ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 (GenBank Accession No. BAE93952) ถึง 100% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว และคล้ายกับเฟอริดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *Ralstonia* sp. U2 (GenBank Accession No. AAD12606) เพียง 29 %

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่พบช่วงการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเฟอริดอกซินและเฟอริดอกซินรีดักเทสที่สมบูรณ์ แสดงว่ายีนทั้ง 2 อาจอยู่ห่างออกไปจากยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนส

จากนั้นวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนส (ArhA1) ของสายพันธุ์ SP2 ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 โดยเทียบกับหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่เคยมีรายงาน เพื่อตรวจสอบบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์ พบบริเวณอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ([2Fe-2S]) ของหน่วยย่อยแอลฟา มีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ CXHX₁₇CX₂H ซึ่งตรงกับตำแหน่ง Cys50-X-His52-X₁₇-Cys67-X₂-His70 ของ ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 และบริเวณที่ 2 คือบริเวณ

อนุรักษของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His204, His209 และ Asp 358 ของ ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 ดังแสดงในรูปที่ 5

การทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package เพื่อจัดกลุ่มออกซิจีเนสที่ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. SP2 ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกมีลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสต่างกันโดยแยกเป็นคณะกลุ่ม และ ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 และ A4 มีความใกล้เคียงกันมากและจัดอยู่ในกลุ่มหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีการแตกสาขาจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่น ได้แก่ ยีนกลุ่ม *nah* และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนพธาซีน และยีนกลุ่ม *phn* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนทรีน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสของทั้ง 2 สายพันธุ์ น่าจะเป็นตัวแทนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสกลุ่มใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน

ก)

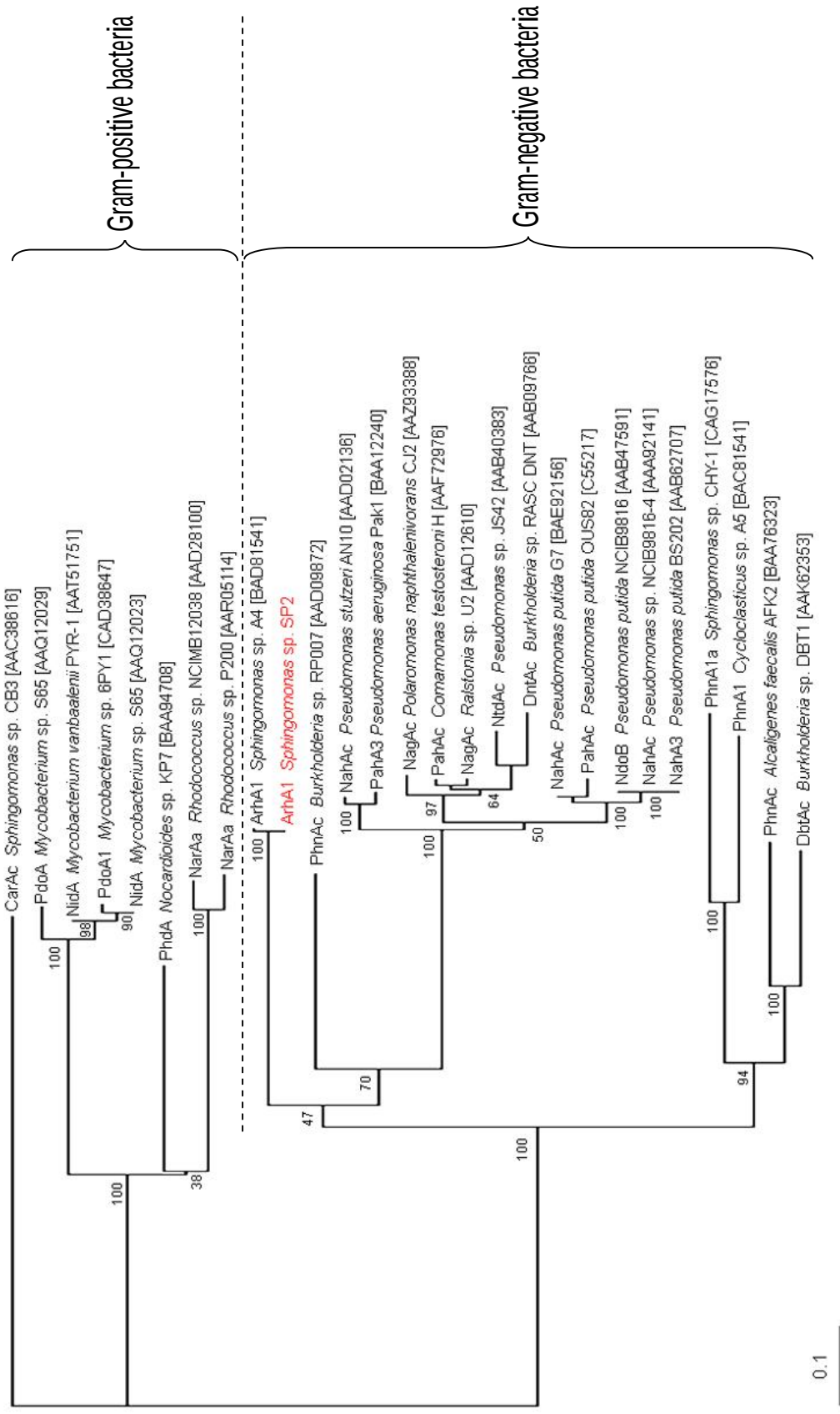
		50	52		67	70
ArhA1_SP2	VTAKMGEDEVLVVRQEDGT VKAFLNV	C	R	H	RGARVCPVEAGNRRAFV	C NY H GWSYAADGSL
ArhA1_A4	VTAKMGEDEVLVVRQEDGT VKAFLNV	C	R	H	RGARVCPVEAGNRRAFV	C NY H GWSYAADGSL
PahAc_H	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NagAc_U2	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NagAc_CJ2	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NtdAc_JS42	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C GY H GWGFGSNGEL
DntAc_DNT	VKAKMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTI VDAEAGNAKGFV	C GY H GWGFGSNGEL
NahAc_G7	VTAKMGIDEVI VSRQSDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
PahAc_OUS82	VTAKMGIDEVI VSRQSDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NdoB_NCIB9816	VTAKMGIDEVI VSRQNDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NahAc_NCIB9816-4	VTAKMGIDEVI VSRQNDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NahA3_BS202	VTAKMGIDEVI VSRQNDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
NahAc_AN10	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
PahA3_PaK1	VTAKMGVDEVI VSRQNDGSIRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C SY H GWGFGSNGEL
PhnAc_RP007	VTTTRMGTD EVI VMRQKDNSIKAF LNV	C	R	H	RGARLC AVEAGNARGFA	C NY H GWAYGADGSL
	*.:** ***: * **.*.:**.*	*	*	*	** : .**** :.*	*.* **.*.:**.*

ข)

		204	209		358
ArhA1_SP2	EASGGVELIGPPARSIVHCNWKAPTENFVGDAY	H	IGWT	H	ASSL... AGYWEAD D NDNMES
ArhA1_A4	EASGGVELIGPPARSIVHCNWKAPTENFVGDAY	H	IGWT	H	ASSL... AGYWEAD D NDNMES
PahAc_H	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	AASL... AGFWESD D NDNMET
NagAc_U2	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NagAc_CJ2	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPSENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NtdAc_JS42	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDIY	H	VGWT	H	AAAL... AGFWESD D NENMET
DntAc_DNT	KHSGGLELVGPPAKVVVKGNWKVFAENFVGDIY	H	IGWT	H	ASIL... AGYWEAD D NDNMV-
NahAc_G7	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
PahAc_OUS82	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NdoB_NCIB9816	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NahAc_NCIB9816-4	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NahA3_BS202	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
NahAc_AN10	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
PahA3_PaK1	KHSGGLELVGPPGKVVI KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL... AGFWESD D NDNMET
PhnAc_RP007	EAGGGIELVGPPARCFIEANWKAPSENFVGDAY	H	VGWT	H	ASAL... AGYWEAD D NDNMES
	:.***:***:***.: .. ** * :***.*** *	*	***	*	*: * **.*.:**.*

รูปที่ 5 การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน และบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ของหน่วยย่อยแอลฟา ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ $[2Fe-2S]$ ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

(ArhA1_A4: ArhA1 [BAD34447] จาก *Sphingomonas* sp. A4, PahAc_H: PahAc [AAF72976] จาก *Comamonas testosteroni* H, NagAc_U2: NagAc [AAD12610] จาก *Ralstonia* sp. U2, NagAc_CJ2: NagAc [AAZ93388] จาก *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, NtdAc_JS42: NtdAc [AAB40383] จาก *Pseudomonas* sp. JS42, DntAc_DNT: DntAc [AAB09766] จาก *Burkholderia* sp. DNT, NahAc_G7: NahAc [BAE92156] จาก *Pseudomonas putida* G7, PahAc_OUS82: PahAc [C55217] จาก *Pseudomonas putida* OUS82, NdoB_NCIB9816: NdoB [AAB47591] จาก *Pseudomonas putida* NCIB9816-4, NahAc_NCIB9816-4: NahAc [AAA92141] จาก *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4, NahA3_BS202: NahA3 [AAB62707] จาก *Pseudomonas putida* BS202, NahAc_AN10: NahAc [AAD02136] จาก *Pseudomonas stutzeri* AN10, PahA3_PaK1: PahA3 [BAA12240] จาก *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 และ PhnAc_RP007: PhnAc [AAD09872] : จาก *Burkholderia* sp. RP007)

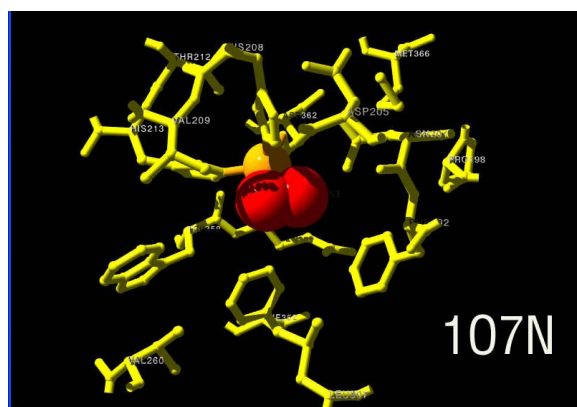
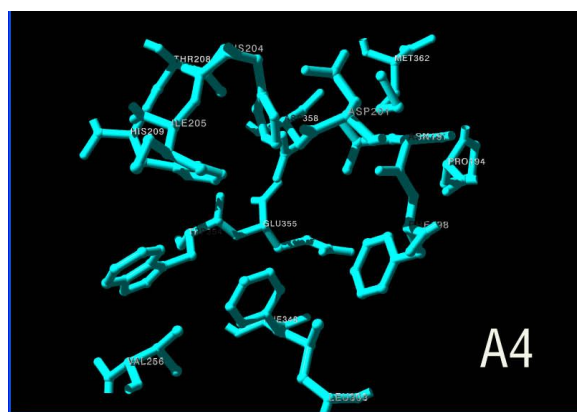
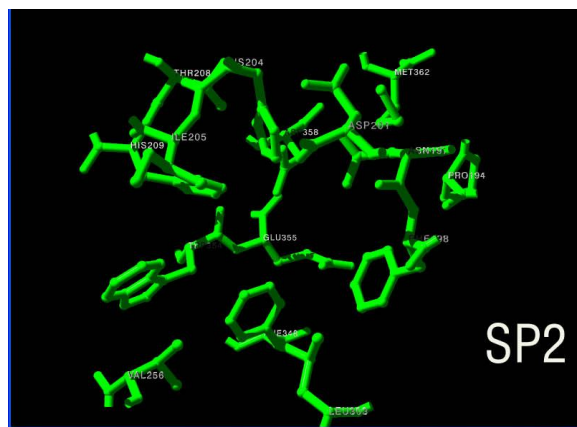


รูปที่ 6 Phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิเนส ทั้งหมด 27 หน่วยย่อย โดยใช้หน่วยย่อยแอลฟา CarAc ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ CB3 เป็น out-group, scale bar: 0.1; percent divergence และตัวเลขที่สาขาย่อยกิ่งการนับที่ให้ผลข้างต้นทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap

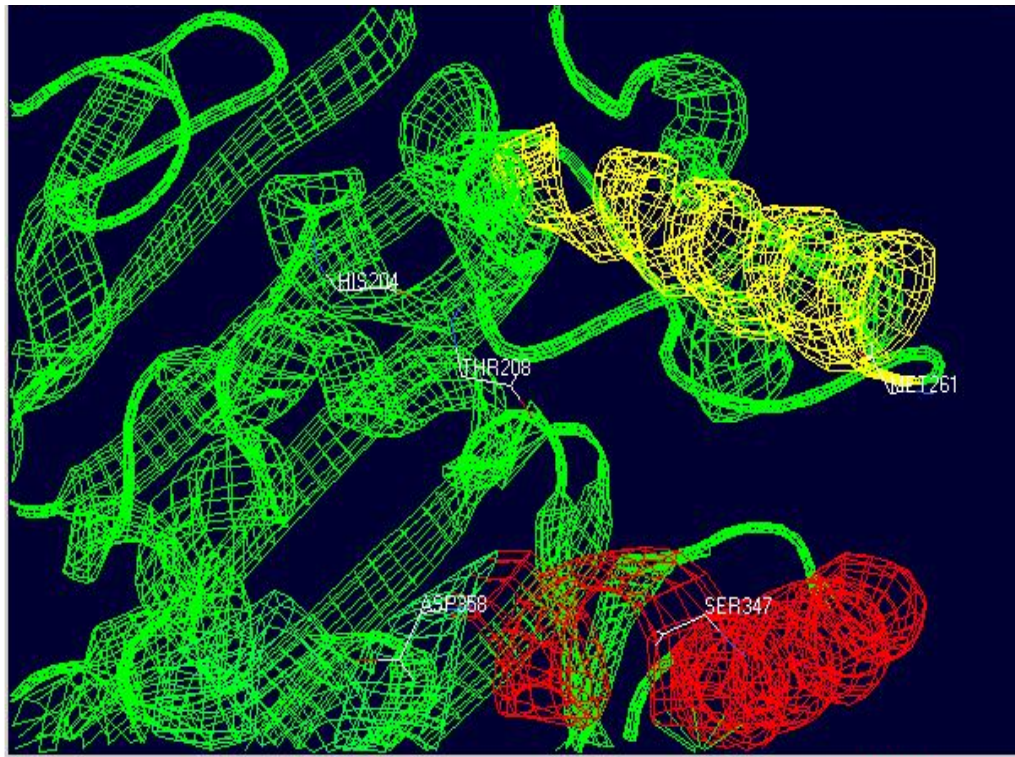
4. การทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบโครงสร้างและชนิดของกรดอะมิโนบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์

จากทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ

Sphingomonas sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม predictprotein (predictprotein.org) โดยใช้โครงสร้างสามมิติของหน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาลีน เทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 เป็นต้นแบบ และเปรียบเทียบ โครงสร้างสามมิติของโปรตีนทั้งสามโดยใช้โปรแกรม DeepView Swiss-Pdbview พบว่าบริเวณ catalytic domain ของทั้งสามโปรตีนมีความใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยกรดอะมิโน ที่แตกต่างกันระหว่างโปรตีนของสายพันธุ์ SP2 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 นั้นทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold โดย คาดว่าอยู่ที่บริเวณส่วนของโปรตีนที่เป็นทางผ่านของซับสเตรตเข้าสู่บริเวณ catalytic domain ดัง แสดงในรูปที่ 8 เนื่องจากตำแหน่ง Met261 ซึ่งในสายพันธุ์ A4 เป็น Thr261 มีโครงสร้างหมู่ข้าง ที่แตกต่างกันโดย Met ขนาดใหญ่กว่าและมีอะตอมซัลเฟอร์ในโมเลกุล อาจทำให้เกิดการบดบัง บริเวณทางเข้าจับของซับสเตรต และตำแหน่ง Ser347 ซึ่งในสายพันธุ์ A4 เป็น Gly347 โดยทั้ง 2 ชนิดมีหมู่ข้างขนาดเล็กคล้ายกัน ต่างกันที่ Ser มีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้ความมีขั้วมากกว่า Gly ทำให้ความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวใน 2 สายพันธุ์ น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของ เทอร์มินัลไดออกซิจีเนสซึ่งทำให้สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพทีนแต่ไม่สามารถ ย่อยสลายอะซีแนพทีนได้ ส่วนสายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิดได้



รูปที่ 7 เปรียบเทียบบริเวณ catalytic domain ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 (SP2) *Sphingomonas* sp. A4 (A4) และ *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (107N)



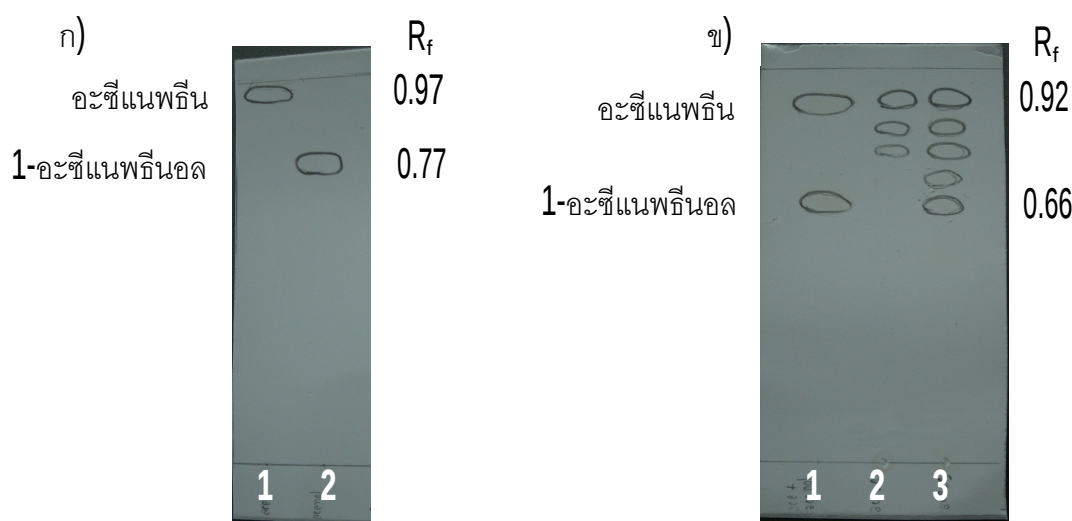
รูปที่ 8 บริเวณที่คาดว่าเป็นทางเข้าของสับสเตรทไปสู่ catalytic domain ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2

5. การตรวจสอบหน้าที่ของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2

สร้างเวกเตอร์การแสดงออกเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน *arhA1* และ *arhA2* โดยเลือกตัดชิ้น DNA ที่ครอบคลุมยีน *arhA1* และ *arhA2* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ตัดที่พลาสมิด pPC1 ตำแหน่ง 505 และ *Pst*I ตัดที่ตำแหน่ง 3,181 ดังแสดงในรูปที่ 4 ทำให้ได้ชิ้นสอดแทรกขนาด 2,676 เบส และใช้เวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์แสดงออก โดยให้ชื่อพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ว่า pPPA1A2

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ โดยทดสอบกับ สับสเตรท 2 ชนิด ในเบื้องต้น ได้แก่ อะซีแนพรีน และ อะซีแนพรีนอล และตรวจสอบสับสเตรทที่ เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC GC-FID และ GC-MS

การวิเคราะห์สับสเตรทที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค TLC ด้วยระบบตัวทำละลาย โทลูอิน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อ ปริมาตรต่อปริมาตร) พบความแตกต่างของแถบที่ปรากฏในชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้อะซีแนพรีน เป็นสับสเตรทเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 9

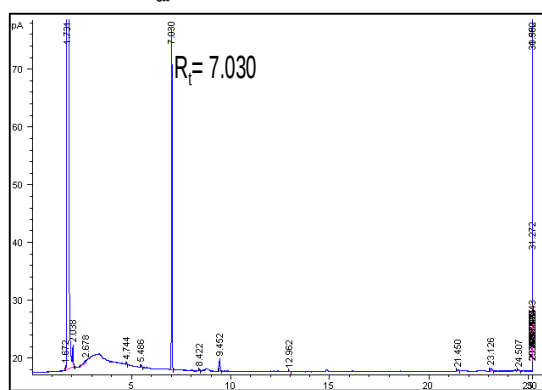


รูปที่ 9 TLC โครมาโตแกรม ภาพ ก) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพรีน ช่องที่ 2 แสดงสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพรีนอล ภาพ ข) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพรีนและ 1-อะซีแนพรีนอล ช่องที่ 2 สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรท และช่องที่ 3 สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรท

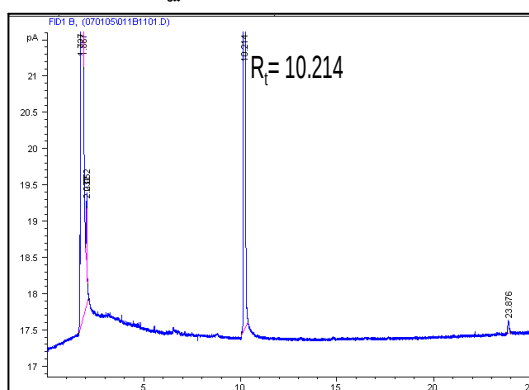
จากรูปที่ 9 ภาพ ข พบว่าค่า R_f ของสารชนิดหนึ่งที่ได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรทเท่ากับค่า R_f ของสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพรีนอล ($R_f = 0.66$) จึงสามารถทำนายว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็น 1-อะซีแนพรีนอล

การวิเคราะห์สับสเตรทที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค GC-FID ปรากฏพีคที่สารผลิตภัณฑ์ในชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 10 และเมื่อใช้สับสเตรทเป็นอะซีแนพรีลีน ไม่พบความแตกต่างของพีคจากชุดควบคุมและชุดทดลอง

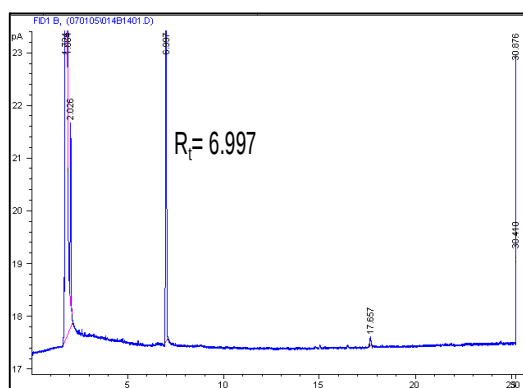
ก) สารมาตรฐานอะซีแนพรีน



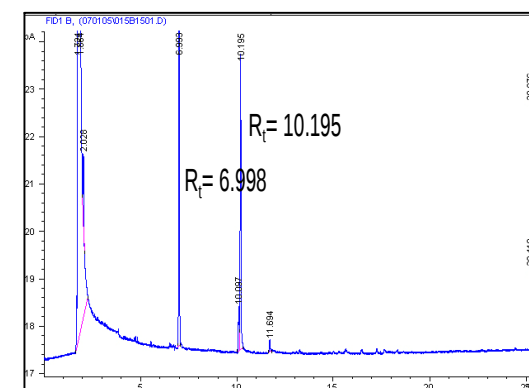
ข) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพรีนอล



ค) อะซีแนพรีนชุดควบคุม



ง) อะซีแนพรีนชุดทดลอง



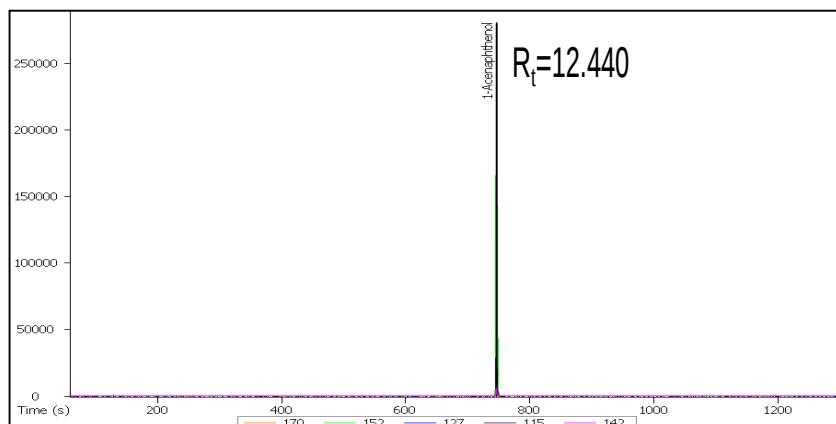
รูปที่ 10 GC-FID โครมาโตแกรม แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพรีนและ 1-อะซีแนพรีนอล และสารที่สกัดได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรท

จากรูปที่ 10 พบว่าค่า Retention Time (RT) ของผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรท มีค่า 10.195 นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ RT ของสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพรีนอล ($RT=10.214$ นาที) จึงสามารถทำนายว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็น 1-อะซีแนพรีน

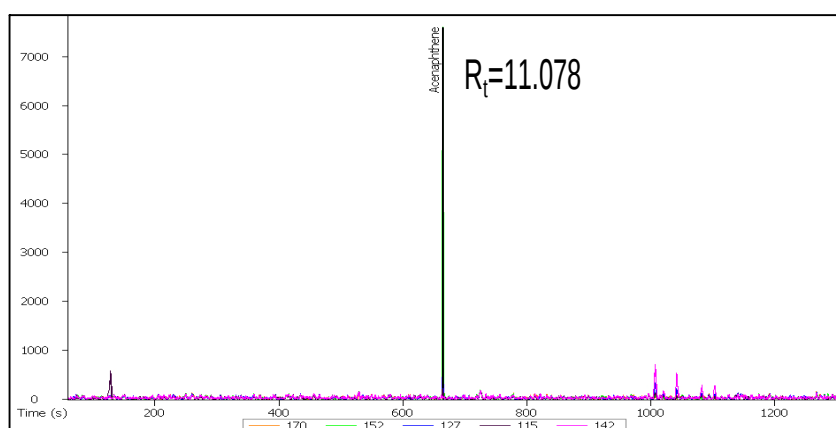
นอล และเมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของสับสเตรทพบว่าการลดลงของอะซีแนพรีนถึง 63% ทำให้สรุปได้ว่า *E. coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพรีนได้ และไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพรีลิน เนื่องจากพบเพียงพีคของสับสเตรทเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC อย่างไรก็ตามเทคนิค GC-FID นอกจากนี้ได้ทำการทดลองเพื่อทำนายโครงสร้างจากน้ำหนักโมเลกุล เพื่อยืนยันชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค GC-MS

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพรีนเป็นสับสเตรทปรากฏ 2 พีค ดังแสดงในรูป 11 คือ พีคแรกเป็นอะซีแนพรีนที่เหลืออยู่ และพีคที่สองเป็น 1-อะซีแนพรีนอล ($R_T = 12.418$) เนื่องจากมีรูปแบบแมสสเปกตรัม คือ 63, 115, 152, 169 เหมือนกับสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพรีนอลซึ่งมีรูปแบบแมสสเปกตรัม 50, 63, 115, 152, 169 ดังแสดงในรูปที่ 10 จึงสรุปได้ว่าการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพรีน โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพรีนได้เป็น 1-อะซีแนพรีนอล

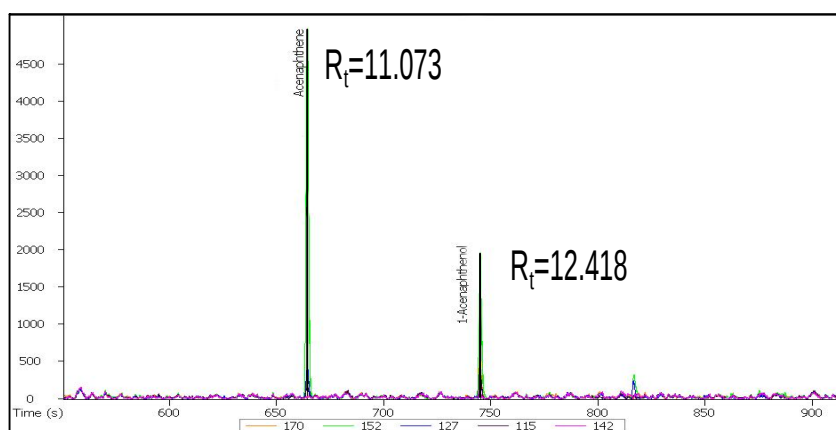
ก)



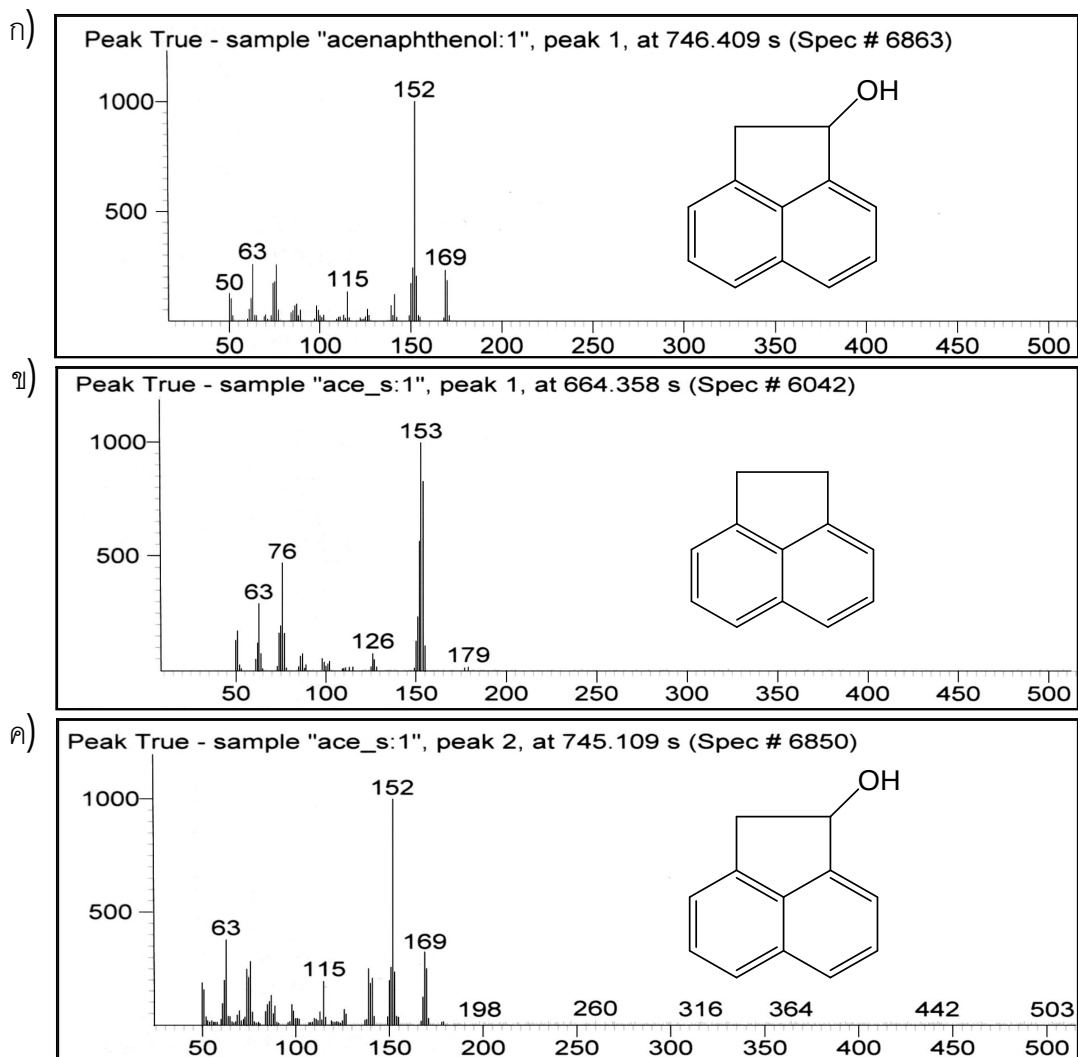
ข)



ค)



รูปที่ 11 GC-MS โครมาโตแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพทีนอล ข) สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพทีนเป็นสับสเตรท ค) สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพทีนเป็นสับสเตรท



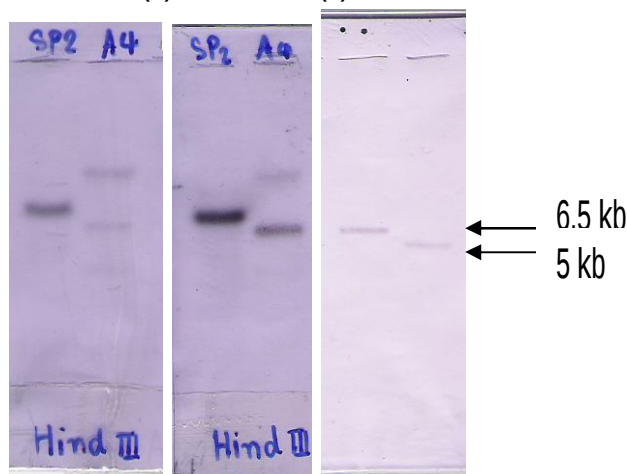
รูปที่ 12 Mass spectral GC-MS โครมาโตแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนฟทีนอล ข) สารจากพีคที่ 1 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนฟทีนเป็นสับสเตรท (ภาพ 11ค) ค) สารจากพีคที่ 2 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนฟทีนเป็นสับสเตรท (ภาพ 11ค)

6. การเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเตส และยีนควบคุมการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนฟทีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ด้วยเทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชัน

เปรียบเทียบยีนประมวลผลเฟอรีดอกซิน เฟอรีดอกซินรีดักเตส และยีนควบคุมการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนฟทีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 โดยใช้ DNA ติดตาม *arhA3* (ยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซิน) *arhA4* (ยีนประมวลรหัสเฟอรีดอกซินรีดักเตส) และ *arhR* (ยีนควบคุม) ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 ทำเซาเธิร์นไฮบริไดเซชันกับ DNA ของสายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ที่ได้ตัดด้วย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณของทั้งสามยีนในสายพันธุ์ SP2 โดยประมาณได้ว่าทั้งสามยีนอยู่บนชิ้น DNA/*HindIII* ชิ้นเดียวกันขนาดประมาณ 6.5 kb โดยในสายพันธุ์ A4 นั้นยีนทั้งสามก็อยู่บนชิ้น DNA/*HindIII* ชิ้นเดียวกันขนาดประมาณ 5 kb

(a) SP2 A4 (b) SP2 A4 (c) SP2 A4



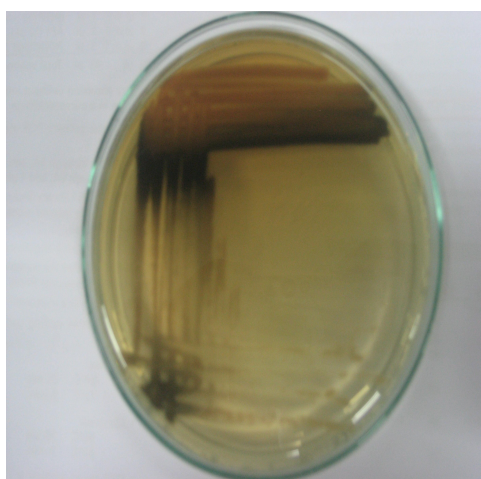
รูปที่ 13 เซาเร็นไฮบริดเซชันโดยโพรบ *arhA3* (a), *arhA4*, (b) *arhR* (c) กับ DNA/*HindIII* ของสายพันธุ์ A4 และ SP2

7. การแยกยีนประมวลรหัสเฟอรรีดอกซิน เฟอรรีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม จาก *Sphingomonas* sp. SP2 โดยใช้วิธี genome walking

จากผลการทดลองในข้อที่ 6 ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arhA3* *arhA4* และ *arhR* ระหว่างสายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 มีความคล้ายคลึงกัน ในการแยกยีนทั้งสามจากสายพันธุ์ SP2 จึงใช้วิธี genome walking โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech. Laboratories, Palo Alto, USA) โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวน *arhA3* บางส่วนของสายพันธุ์ SP2 (243 bp) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arhA3* ของสายพันธุ์ A4 จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arhA3* ของสายพันธุ์ SP2 และออกแบบไพรเมอร์สำหรับทำ genome walking เพื่อให้สามารถแยกชิ้น DNA บริเวณข้างเคียงกับชิ้น PCR (*arhA3*) ที่ได้ทั้งทาง upstream และ downstream ผลการทดลองทำให้ได้ชิ้น DNA บริเวณข้างเคียงกับชิ้น PCR (*arhA3*) สองชิ้นขนาดชิ้นละประมาณ 2 kb ซึ่งมี *arhA4* และ *arhR* ตามลำดับ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA ที่ได้และเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพบว่า ArhA3 ของสายพันธุ์ SP2 (ArhA3_{SP2}) มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับ ArhA3 ของสายพันธุ์ A4 (ArhA3_{A4}) 100% อย่างไรก็ตาม ทั้งสองโปรตีนมีขนาดไม่เท่ากันคือ ArhA3_{SP2} มีขนาด 105 กรดอะมิโน ในขณะที่ ArhA3_{A4} มีขนาด 109 กรดอะมิโน ซึ่ง ArhA3_{SP2} ขาดกรดอะมิโนในส่วนปลายของ ArhA3_{A4} ส่วน ArhA4 และ ArhR ของสายพันธุ์ SP2 (ArhA4_{SP2} และ ArhR_{SP2}) มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ ArhA4 และ ArhR ของสายพันธุ์ A4 (ArhA4_{A4} และ ArhR_{A4}) ถึง 99% ตามลำดับ

8. การสับโคลนยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส และการตรวจสอบการทำงานร่วมกันของเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส ที่ได้ในข้อที่ 7 กับเทอร์มินัลออกซิจีเนส

ทำการสับโคลนยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส ใส่ในพลาสมิด pSTV28 แล้วทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 ตั้งชื่อพลาสมิดที่มี *arhA3* (ยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน) และ *arhA4* (ยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซินรีดักเทส) นี้ว่า pSarhA34SP แล้วตรวจสอบการทำงานร่วมกันของเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทสกับเทอร์มินัลออกซิจีเนส (*arhA1 arhA2*) โดยการให้ยีนที่ประมวลรหัสโปรตีนดังกล่าวแสดงออกพร้อมกันใน *E. coli* แล้วตรวจสอบความสามารถในการเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกของเอนไซม์ไดออกซิจีเนส ซึ่งทำโดยทรานส์ฟอร์มพลาสมิด pPPA1A2 และ pSarhA34SP เข้าสู่ *E. coli* JM109 แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนสีอินโดลเป็นอินดิโกของโคโลนี พบว่า *E. coli* ที่มี pPPA1A2 และ pSarhA34SP สามารถเปลี่ยนสีอินโดลเป็นอินดิโกได้ดังแสดงในรูปที่ 14 ดังนั้นแสดงว่าส่วนประกอบเหล่านี้สามารถทำงานร่วมกันและทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ไดออกซิจีเนสได้



รูปที่ 14 การเปลี่ยนสีอินโดลเป็นอินดิโกของ *E. coli* JM109 (pPPA1A2) (pSarhA34SP)

10. การตรวจสอบหน้าที่และความจำเป็นของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสที่แยกได้ในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของ *Sphingomonas* sp. SP2

ในการตรวจสอบหน้าที่และความจำเป็นของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนส (*arhA1*) ที่แยกได้ ในการย่อยสลายอะซีแนพรีนของ *Sphingomonas* sp. SP2 ได้สร้างสายพันธุ์กลายของ SP2 ที่มียีนต้านทานเจนตามัยซินในยีน *arhA1* และได้ให้ชื่อว่า SP2DM1

การทำเซาเริร์นไฮบริไดเซชันด้วย DNA ติดตาม *arhA1* กับ DNA ของสายพันธุ์ SP2 และ SP2DM1 ยืนยันการแทรกของยีนต้านทานเจนตามัยซินในยีน *arhA1* ดังรูปที่ 15

ก ข



รูปที่ 15 เซาเริร์นไฮบริไดเซชัน DNA/EcoRI ของสายพันธุ์ SP2DM1 (ก) และ สายพันธุ์ SP2 (ข) ด้วย DNA ติดตาม *arhA1*

เมื่อทดสอบการสร้างบริเวณใสหลังจากการพันทาบโคโลนีของสายพันธุ์ SP2DM1 ที่ เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อ LB ด้วยสารละลายอะซีแนพรีน พบว่าสายพันธุ์กลายดังกล่าวไม่สามารถ สร้างบริเวณใสได้ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม (SP2) สามารถสร้างบริเวณใสได้ดังแสดงในรูปที่ 16 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีน *arhA1* มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน ในสายพันธุ์ SP2

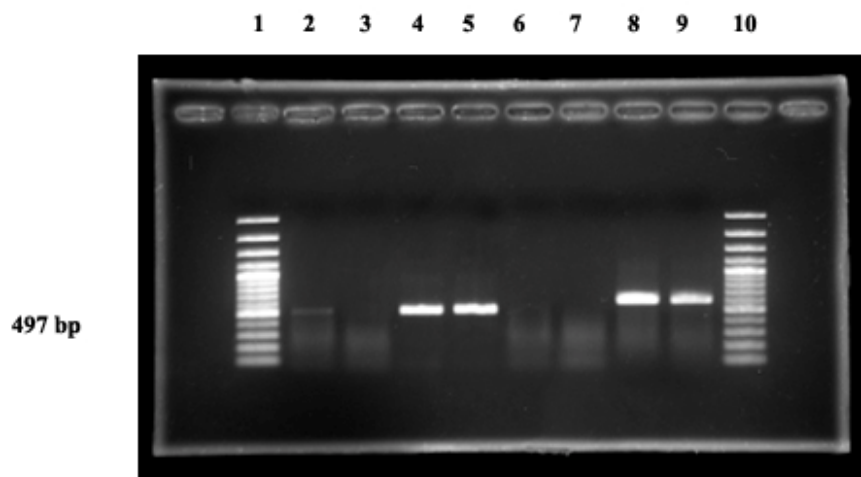
ก ข



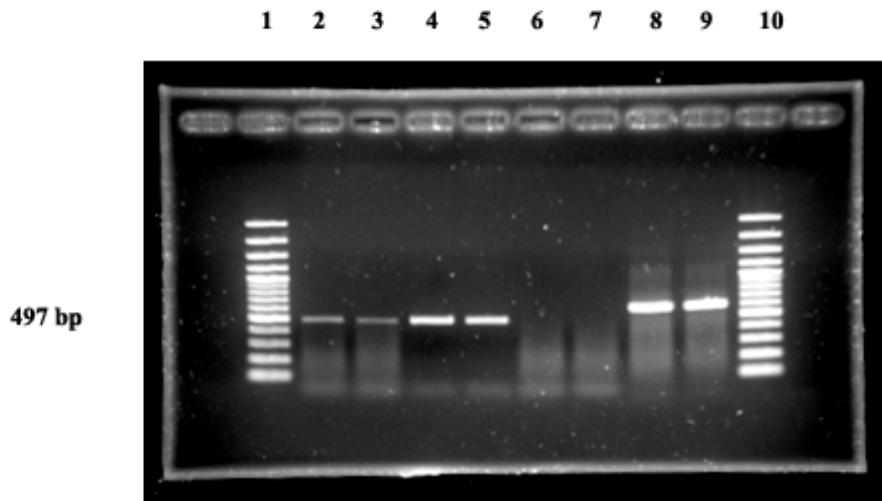
รูปที่ 16 การทดสอบการสร้างโซนใสเมื่อพันทาบโคโลนีของสายพันธุ์ SP2DM1 (ก) และ SP2 (ข) ที่เจริญบน จานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ด้วยสารละลายอะซีแนพรีน

11. การตรวจสอบและเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 ด้วยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีน

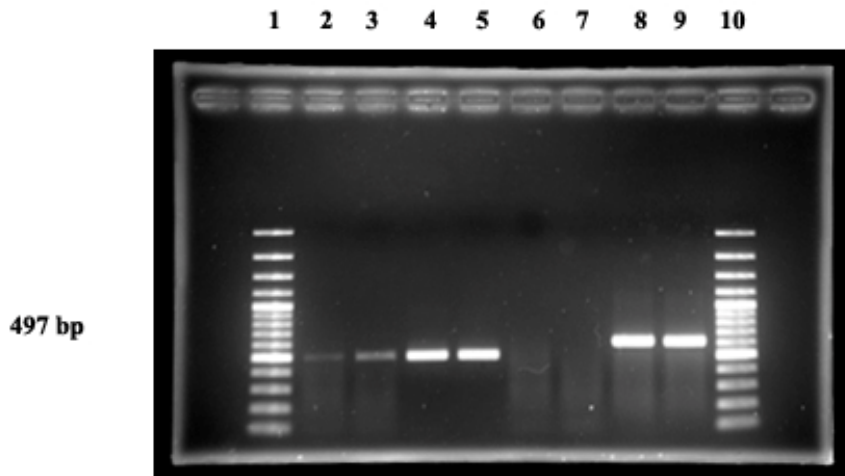
การตรวจสอบและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนประมวลรหัสอะซีแนพรีนไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 เมื่อถูกชักนำด้วยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีนโดยวิธี RT-PCR และ real time PCR โดยใช้ตัวอย่าง RNA ที่สกัดจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส อะซีแนพรีน อะซีแนพรีลีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การถอดรหัสของ *arhA1* พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้คู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *arhA1* ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ตรงตามขนาดที่คาดหมายคือ 497 เบส (ช่องวิ่งที่ 2-3) โดยปฏิกิริยาควบคุมผลลบของ RT-PCR ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทส (ช่องวิ่งที่ 6-7) ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ PCR และปฏิกิริยาควบคุมมาตรฐานในการทดลองโดยใช้คู่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rDNA ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดตรงตามที่คาดหมายคือ 580 เบส (ช่องวิ่งที่ 8-9) โดยความเข้มใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ A4 และสายพันธุ์ SP2 มีการแสดงออกของ *arhA1* ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันเมื่อชักนำด้วยอะซีแนพรีน และอะซีแนพรีลีน ดังรูปที่ 17-19 และผลการทดลอง real time PCR ก็ให้ผลสอดคล้องกัน



- รูปที่ 17 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆเพื่อการตรวจสอบการถอดรหัสของ *arhA1* ที่ชักนำกลูโคสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- ช่องวิ่งที่ 1 และ 10 คือ 100 bp DNA ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ A4
- ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ SP2
- ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ A4 เป็นแม่แบบ
- ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ SP2 เป็นแม่แบบ
- ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ A4 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*
- ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ SP2 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*
- ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ A4 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R
- ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ SP2 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R



- รูปที่ 18 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆเพื่อตรวจสอบการถอดรหัสของ *arhA1* ที่ชักนำด้วยอะซีแนพรีนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- ช่องวิ่งที่ 1 และ 10 คือ 100 bp DNA ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ A4
- ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ SP2
- ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ A4 เป็นแม่แบบ
- ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ SP2 เป็นแม่แบบ
- ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ A4 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*
- ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ SP2 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*
- ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ A4 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R
- ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ SP2 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R



รูปที่ 19 อะกาโรสเจลแสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ต่างๆเพื่อตรวจสอบการถอดรหัสของ *arhA1* ที่ชักนำด้วยอะซีแนฟลิซินเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่องวิ่งที่ 1 และ 10 คือ 100 bp DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ A4

ช่องวิ่งที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* เพื่อติดตามการแสดงออกของ *arhA1* ในสายพันธุ์ SP2

ช่องวิ่งที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ A4 เป็นแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 5 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลบวกเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R* โดยใช้ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ SP2 เป็นแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 6 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ A4 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*

ช่องวิ่งที่ 7 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมผลลบของสายพันธุ์ SP2 ที่ไม่มีการเติมรีเวอร์สทรานสคริปเทสเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *arhA1F* และ *arhA1R*

ช่องวิ่งที่ 8 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ A4 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R

ช่องวิ่งที่ 9 คือ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากปฏิกิริยาควนตัมมาตรฐานในการทดลองของสายพันธุ์ SP2 เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S RNA คือ 520F และ 1100R

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้คัดแยกยีนออกซิจีเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน โดยการคัดเลือกโคลนด้วยการติดตามการเปลี่ยนสีของอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) จากห้องสมุดดีเอ็นเอบางส่วนของ *Sphingomonas* sp. SP2 ที่แสดงออกพร้อมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนประมวลรหัสเพอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของ *Sphingomonas* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) พบโคลนที่ให้ผลบวก (pPC1) ซึ่งบรรจุยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และจากการที่พบโคลนที่ให้ผลบวกแสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสจากยีนที่แยกได้สามารถทำงานร่วมกับเพอร์รีดอกซิน และเพอร์รีดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ P2 ซึ่งส่วนหนึ่งในงานวิจัยของ Demaneche และคณะ (2004) พบว่าการทำงานของเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนส

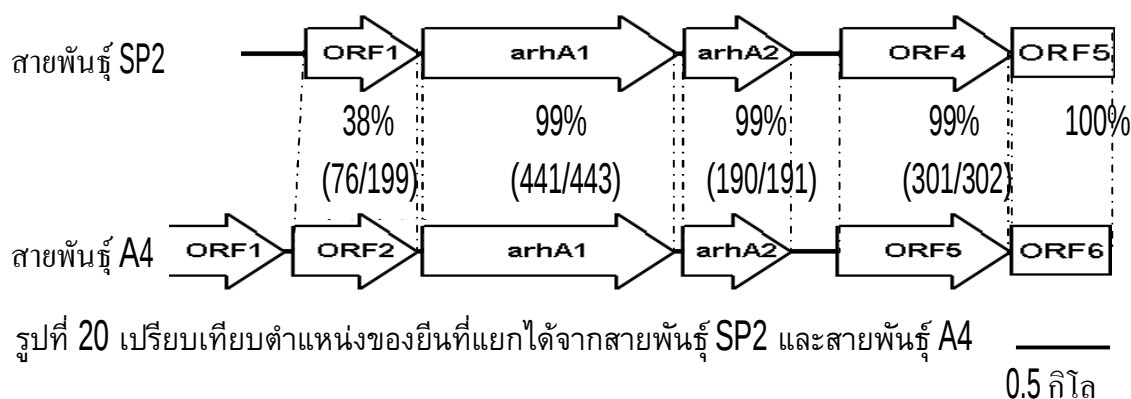
จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอแทรกสอดใน pPC1 ขนาด 4,624 bp พบ 4 ORFs ที่สมบูรณ์และ 1 ORF ที่ขาดบริเวณหยุดการถอดรหัส ซึ่ง *orf2* (*arhA1*) และ *orf3* (*arhA1*) ประมวลรหัสโปรตีนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 ถึง 99%

ORF1 คล้ายกับส่วนหนึ่งของไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 50% (99/195) และเหมือน ORF2 ของสายพันธุ์ A4 100% (76/76) เมื่อเทียบทั้ง ORF พบความเหมือน 38% (76/199) ซึ่งมีรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) เทียบกับฐานข้อมูลว่า ORF2 แยกเป็น 2 ส่วน ซึ่งคล้ายกับไฮดราเลส/แอลโดเลส (PhnE) ของ *Burkholderia* sp. RP007 65% (91/140) และไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 58% (35/60) จึงสรุปได้ว่า *orf1* ของสายพันธุ์ SP2 ประมวลรหัสโปรตีนแตกต่างกับ ORF2 ของสายพันธุ์ A4 ซึ่งเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสามารถพบความคล้ายกับไอโซเมอเรสจากสายพันธุ์ DBT1 ได้อย่างต่อเนื่อง

orf4 ประมวลรหัสโปรตีนที่มีความคล้ายกับ ORF5 ของสายพันธุ์ A4 99% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว และคล้ายกับไอโซเมอเรส (HbzF) ของ *P. alcaligenes* NCIMB 9867 52% จากวิถีบนของการย่อยสลายเนพธาลินโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. พบว่าหลังจากการแตกวงด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ไตราโดอลไดออกซิจีเนส จะเกิดการออกซิไดซ์ผลิตภัณฑ์ด้วยแอคติวิตีของไอโซเมอเรส (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) ทำนายได้ว่า ORF1 และ ORF4 อาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนหลังจากเกิดการแตกวงอะโรมาติก เนื่องจากมีความเหมือนกับไอโซเมอเรสจากฐานข้อมูลเพียงปานกลางเท่านั้น และที่เคยมีรายงานของสายพันธุ์ A4 ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของยีนไอโซเมอเรสทั้ง 2 ที่อยู่ใกล้กันจึงต้องศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

ORF5 เป็นช่วงการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ คือ ไม่พบบริเวณหยุดการถอดรหัส เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *Ralstonia* sp. U2 เพียง 29 % (39/131) และคล้ายกับ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 100% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุ

หน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว จากรายงานของ Kouzuma และคณะ (2006) พบ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ที่สมบูรณ์และคล้ายกับเพอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *P.putida* NCIB9816-4 เพียง 18% และทางด้านปลายคาร์บอกซีไม่คล้ายกับ NahAa ซึ่งเป็นบริเวณ NAD-binding domain ทำให้ทำนายได้ว่า ORF นี้ไม่น่ามีหน้าที่เป็นเพอร์รีดอกซินรีดักเทส



การตรวจสอบความสำคัญของยีน *arhA1* ของสายพันธุ์ SP2 โดยการสร้างสายพันธุ์กลายที่ knock out การทำงานของยีน *arhA1* พบว่าสายพันธุ์กลายดังกล่าวไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีนได้ ดังนั้นยีน *arhA1* นี้จึงมีความสำคัญในการย่อยอะซีแนพรีนในสายพันธุ์ SP2

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบยีนประมวลรหัสสำหรับเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทส และยีนควบคุม ระหว่างสายพันธุ์ SP2 และ A4 โดยวิธีไฮบริดไลส์เซชันโดยใช้ DNA ติดจากสายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ 2006) พบว่ายีนเหล่านี้ของทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำ gene walking เพื่อแยกยีนเหล่านี้จากสายพันธุ์ SP2 ซึ่งสามารถแยกยีนเหล่านี้ได้และพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับของสายพันธุ์ A4 ถึง 99-100% อย่างไรก็ตามยีน *arhA3* ของสายพันธุ์ SP2 สั้นกว่าของสายพันธุ์ A4 โดยขาดกรดอะมิโนบริเวณปลาย และเมื่อตรวจสอบการทำงานร่วมกันของยีนประมวลรหัสสำหรับเพอร์รีดอกซินและเพอร์รีดอกซินรีดักเทสกับออกซิจีเนสพบว่าสามารถทำงานร่วมกันได้ โดยสามารถเปลี่ยนอินโดลให้เป็นอินดิโกได้

การเปรียบเทียบยีนที่แยกได้จากสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 สามารถสรุปได้ว่าการเรียงตัวของยีนทั้ง 2 สายพันธุ์เหมือนกัน และยังมี ความเหมือนของลำดับอะมิโนในแต่ละยีนใกล้เคียงกันมาก เมื่อจัดกลุ่มหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 (*ArhA1*) พบว่าอยู่ในสาขาเดียวกับ *Sphingomonas* sp. A4 และมีความใกล้เคียงกันมาก แต่ทั้ง 2 มีการแตกสาขาจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่น เช่น ยีนกลุ่ม *nah* และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลิน และยีนกลุ่ม *phn* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีนานทริน จากรายงานว่าส่วนใหญ่แบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันทางสายพันธุ์จะสามารถย่อย

สลาย PAHs ที่คล้ายกัน และมีลักษณะยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคล้ายกัน เช่น การจัดเรียงตัวของยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของหน่วยย่อยแอลฟาที่ประมวลผลจากยีนดังกล่าว เช่น

แบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad ได้แก่ *nbo* ของ *P. putida* NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988), *nah* ของ *P. putida* G7 และสายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993), *dox* ของ *Pseudomonas* sp. C18 (Denome และคณะ, 1993) และ *pah* ของ *P. aeruginosa* OUS82 และสายพันธุ์ Pak1 (Takizawa และคณะ, 1999) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายเนฟทาไลน์ และมียีนในกลุ่ม *nah* และกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟทาไลน์ ซึ่งการจัดเรียงตัวของยีนที่คล้ายกัน (Habe และ Omori, 2003) ทำให้สามารถจัดว่าเป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายเนฟทาไลน์

Mycobacterium sp. ได้แก่ *nid* ของ *M. vabaalenii* PYR-1 (Khan และคณะ, 2001), *pdo* ของ *Mycobacterium* sp. 6PY1 (Krivobok และคณะ, 2003) และ *nid* ของ *Mycobacterium* sp. S65 (Sho และคณะ, 2004) ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายไพรีน และมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนที่คล้ายกัน

กลุ่ม sphingomonad ได้แก่ *bph* ของ *Sphingobium yanoikuyae* B1 (Kim และ Zylstra, 1999) และ *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Romine และคณะ, 1999) และ *ahd* ของ *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) ซึ่งสามารถย่อยสลายไบฟีนิลและพีแนทรีน และมีการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลและพีแนทรีนที่คล้ายกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a)

รายงานของ Pinyakong และคณะในปี 2004 แยกยีนประมวลผลเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีน (*arhA1A2*) จาก *Sphingomonas* sp. A4 ซึ่งจัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่ม sphingomonad แต่ยีนที่แยกได้ประมวลผลเอนไซม์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลและพีแนทรีนดังรายงานข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่ายีน *arh* ของสายพันธุ์ A4 น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทีน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ SP2 ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟทีนได้มียีน *arhA1A2* ประมวลผลหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาที่คล้ายกับของสายพันธุ์ A4 มาก และมีการเรียงตัวของยีนที่คล้ายกัน (รูปที่ 20) จึงเป็นการสนับสนุนข้อสรุปว่า *arh* น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทีน

จากการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของ *Sphingomonas* sp. SP2 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ขนาด 1,416 bp พบว่าสายพันธุ์ SP2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Novosphingobium* และสายพันธุ์ A4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Sphingobium* จึงเชื่อได้ว่าสายพันธุ์ SP2 ไม่ใช่สายพันธุ์ที่กลายจากสายพันธุ์ A4 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสแตกต่างกัน ซึ่งการที่ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่คล้ายกันมาก อาจเกิดจากการถ่ายโอนยีนเนื่องจากมีบรรพบุรุษใกล้เคียงกันทำให้

สามารถถ่ายโอนยีนกันได้ หรืออาจเกิดจากการที่มีบรรพบุรุษที่มียีนในวิธีการย่อยสลาย PAHs คล้ายกันแต่เกิดการวิวัฒนาการแตกต่างกันทำให้เกิดการขาดหายหรือกลายพันธุ์บางตำแหน่งของยีน เช่น ในรายงานของ Kulakov และคณะ (2005) วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาซีนจาก 5 สายพันธุ์ คือ *Rhodococcus* sp สายพันธุ์ NCIMB12038, P200, P400, I24 และ CIR2 โดยตั้งสมมติฐานว่าทั้ง 5 สายพันธุ์มีบรรพบุรุษร่วมกัน และเมื่อเกิดการสูญหายของยีนในวิธีการย่อยสลายเนฟธาซีนบางส่วนแตกต่างกันทำให้แยกเป็น 2 กลุ่มบรรพบุรุษได้แก่ กลุ่ม 1 สายพันธุ์ P400 และ I24 และกลุ่ม 2 สายพันธุ์ NCIMB12038 และ CIR2 เมื่อเกิดการถ่ายโอนยีนกันระหว่างกลุ่มบรรพบุรุษทำให้เกิดสายพันธุ์ P200

เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 (ArhA1) กับหน่วยย่อยแอลฟาของเนฟธาซีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส พบบริเวณอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ($[2Fe-2S]$) ของหน่วยย่อยแอลฟามีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ CXHX₁₇CX₂H ซึ่งตรงกับตำแหน่ง Cys50 Cys67 His52 และ His70 และบริเวณที่ 2 คือบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His204, His209 และ Asp358 โดยรายงานบริเวณอนุรักษ์ของ เนฟธาซีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 มีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ($[2Fe-2S]$) ของหน่วยย่อยแอลฟาตรงกับตำแหน่ง Cys81 Cys101 His83 และ His104 ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนรอบบริเวณเร่งปฏิกิริยาครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 159-378 โดยเรียกบริเวณดังกล่าวว่า “helix-grip fold” (Carredano และคณะ, 2000) และบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His208, His213 และ Asp 362 (Hegg และ Que 1997) รายงานการศึกษาโครงสร้างสร้าง 3 มิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสเพื่อยืนยันบริเวณเร่งปฏิกิริยา เช่น เนฟธาซีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 (Kauppi และคณะ, 1998), PCB ไดออกซิจีเนส *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Suenaga และคณะ, 2002) และไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. CHY-1 (Jakoncic และคณะ, 2007)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ArhA1 กับฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือน ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 99% โดยต่างกัน 2 กรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 ซึ่งทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold ทำให้ความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวใน 2 สายพันธุ์ น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนสซึ่งทำให้สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนฟริน แต่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนฟรินได้ ส่วนสายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิดได้ (Pinyakong และคณะ, 2004)

การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ใน *Escherichia coli* JM109 โดยยีน *arhA1* และ *arhA2* ของ

สายพันธุ์ SP2 (pPPA1A2) สามารถแสดงออกได้บนเวกเตอร์ pUC18 ใน *E.coli* JM109 โดยสามารถแสดงออกพร้อมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนที่ประมวลรหัสเฟอรีรีดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอรีรีดอกซิน รีดักเทส (*ahdA4*) ของสายพันธุ์ P2 ได้ (Pinyakong และคณะ, 2003b) และพบว่าเทอร์มินัล ออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 สามารถใช้อะซิแนพรีนเป็นสับสเตรทได้ แต่ไม่สามารถใช้อะซิแนพรีลินได้ ซึ่งรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) พบว่าสายพันธุ์ A4 สามารถใช้อะซิแนพรีน อะซิแนพรีลินได้ แสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ 2 สายพันธุ์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน โดยมีรายงานการแทนที่กรดอะมิโนบริเวณเร่งเพื่อศึกษาความจำเพาะของบริเวณเร่งต่อสับสเตรทในการเกิดผลิตภัณฑ์ (substrate specificity) รวมถึงตำแหน่งในการเร่งปฏิกิริยาบนสับสเตรท (stereochemistry) เช่น ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลบนสารผลิตภัณฑ์ (regiospecificity) และทิศทางการหมุนของโมเลกุลสารผลิตภัณฑ์ (enantiomer) เช่น

Parales และคณะ (2000) ศึกษาสายพันธุ์กลาย Asn201Gln, Asn201Ser, Phe202Val, Val260Ala, Val260Leu, Trp316Ala, Thr351Arg, Thr351Ser, Thr351Asn, Phe352Val, Phe352Leu และ Met366Trp ของหน่วยย่อยแอลฟาของแนพทาไลน์ไดออกซิจีเนส (Ndo) จาก *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 ในการย่อยสลายไบฟีนิล แนพทาไลน์และฟิแนนทรีน เมื่อแทนที่ตำแหน่ง 201, 202, 260, 316, 351 และ 366 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์หลักเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ไบฟีนิลและแนพทาไลน์เป็นสับสเตรท และสายพันธุ์กลาย Thr351Arg ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รอง (1,2-ไดไฮโดรไดออล) มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ฟิแนนทรีนเป็นสับสเตรท การแทนที่ตำแหน่งที่ Phe352 พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากสายพันธุ์กลาย Phe352Val และ Phe352Leu มี regiospecificity เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งผลิตภัณฑ์หลักคือ ไบฟีนิล-2,3-ไดไฮโดรไดออล แต่สายพันธุ์กลายมีผลิตภัณฑ์หลักเป็นไบฟีนิล-3,4-ไดไฮโดรไดออล และสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถย่อยสลายฟิแนนทรีนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,4-ไดไฮโดรไดออล แต่สายพันธุ์กลาย Phe352Val มีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 1,2-ไดไฮโดรไดออล ส่วนสายพันธุ์กลาย Phe352Leu ยังมีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,4-ไดไฮโดรไดออล แต่อัตราส่วนลดลงและพบผลิตภัณฑ์ใหม่ คือ 9,10-ไดไฮโดรไดออล ทำให้ทราบว่าตำแหน่ง 352 มีความสำคัญต่อตำแหน่งในการเร่งปฏิกิริยาบนสับสเตรท

Pollmann และคณะ (2003) ศึกษาการแทนที่ Leu366 และ Leu272 ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทรากลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนส (TecA) จาก *Ralstonia* sp. PS12 โดยสร้างสายพันธุ์กลาย Phe366Tyr, Phe366Trp, Phe366Leu, Leu272Trp และ Leu272Phe พบว่าตำแหน่ง 366 เมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนขนาดใหญ่ไม่พบการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากขนาดของหมู่ข้างไปบดบังบริเวณเข้าจับของสับสเตรท และเมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนขนาดเล็กพบว่าการเปลี่ยนแปลง regiospecificity ของผลิตภัณฑ์หลักเมื่อใช้ 2,5-ไดคลอโรโทลูอินเป็นสับสเตรท คือ TecAB ของสายพันธุ์ PS12 มีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,6-ไดคลอโร-4-เมธิลแคทิคอล (81%) แต่สายพันธุ์กลาย Phe366Leu ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น 2,5-ไดคลอโรดีเบนซิล

แอลกอฮอล์ (54%) เนื่องจากขนาดของบริเวณ binding pocket เปลี่ยนแปลงทำให้การหมุนของ สับสเตรทใน pocket ไม่แน่นอน จึงได้ผลิตภัณฑ์หลักแตกต่างกัน จากการแทนที่ตำแหน่ง 272 ด้วยกรดอะมิโนขนาดใหญ่ ไม่พบความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 272 จึงไม่มีผลต่อบริเวณที่สับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยา

Keenan และคณะ (2004) ศึกษาการแทนที่ Val350 ด้วย Phe ในหน่วยย่อยแอลฟา ของ 2,4-ไดไนโตรโทลูอินไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia cepacia* R34 พบว่าการเพิ่มขึ้น ของผลิตภัณฑ์เมื่อใช้ *ออโร-ไนโตรฟินอล เมตา-ไนโตรฟินอล* และ*ออโร-เมทอโรซินฟินอล* เป็น สับสเตรท และสามารถให้สับสเตรทได้หลายชนิดขึ้น ได้แก่ *เมตา-เมทอโรซินฟินอล ออโร-ครี ซอล* และ*เมตา-ครีซอล* (สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถใช้ได้) เนื่องจากหมู่ข้างของตำแหน่ง 350 ในสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเกิดพันธะกับ ion-binding active site (Asp360, His206 และ His211) แต่ ในสายพันธุ์กลายพบว่าหมู่ข้างของ Phe ทำให้ระยะของ His206 และ His211 ในการเกิดพันธะ สิ้นลง แต่ความยาวของพันธะมีผลต่อ active-side ไม่มากเท่าขนาดของหมู่ข้าง Phe ที่ยื่นเข้าสู่ บริเวณเข้าจับของ สับสเตรท ทำให้สามารถใช้สับสเตรทขนาดเล็กได้เพิ่มขึ้น

Suenaga และคณะ (2002) สร้างสายพันธุ์กลาย Ile335Phe และ Thr376Asn ของ หน่วยย่อยแอลฟาของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก (BphA1) *P. pseudoalcaligenes* KF707 ให้ เหมือนกับ BphA1 ของสายพันธุ์ LB400 พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากสายพันธุ์กลายทั้ง 2 มี regiospecificity เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ สายพันธุ์ KF707 สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 5 และ 6 บนสับสเตรท 2,2'-ไดคลอโรดีไบฟีนิล แต่สายพันธุ์กลายทั้ง 2 เติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ ตำแหน่ง 2 และ 3 เหมือนสายพันธุ์ LB400 และในปี 2005 ศึกษาการแทนที่ Thr376 ด้วย Gln, Tyr, Gly, Ser, Asp, Lys, Asn, Val และ Phe ซึ่งแทนโครงสร้างในแบบต่างๆ เช่น ขนาดใหญ่ ขึ้น (Gln และ Tyr) ขนาดเล็กลงขึ้น (Gly และ Ser) หมู่ข้างเป็นกรด (Asp) หมู่ข้างเบส (Lys) และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic; Val และ Phe) เมื่อใช้ไบฟีนิล 4-เมทิลไบฟีนิล และ ไดฟีนิลเมทเรนเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อแทนที่ด้วย Gln, Tyr, Gly และ Ser การทำงานของ เอนไซม์ลดลง เนื่องจากขนาดของกรดอะมิโนตำแหน่ง 376 มีผลต่อ binding-pocket ซึ่งเป็น บริเวณเข้าจับของสับสเตรทคือ เมื่อกรดอะมิโนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะบดบังบริเวณเข้าจับ แต่ถ่า กรดอะมิโนมีขนาดเล็กลงจะทำให้สับสเตรทหลุดจากบริเวณจับได้ง่ายขึ้น เมื่อแทนที่ด้วย Asp หรือ Lys พบการทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากความเป็นกรดเบส อาจมีผลต่อรูปร่างของ binding-pocket และเมื่อแทนที่ด้วย Val และ Phe พบการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เนื่องจากบริเวณเข้าจับของ สับสเตรทมักประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำทำให้ binding-pocket มี hydrophobicity สูง จึงมีความเสถียรภาพมากขึ้นเมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิ โนที่ไม่ชอบน้ำ จากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโนแทนที่ในเชิง 3 มิติ ของสาย พันธุ์กลาย Thr376Phe และ Ile335Phe ร่วมกับ Thr376Asn ด้วยโปรแกรม MOE software พบว่าตำแหน่ง 376 นั้นอยู่ใกล้กับ His233 และ His239 มากกว่า Ile335 แต่ไม่ปฏิสัมพันธ์ โดยตรงกับสับสเตรท และในสายพันธุ์ดั้งเดิมเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Asn373 กับ Thr376

แต่ในสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีผลต่อการเข้าจับของสับสเตรทและเสถียรภาพของเอนไซม์

จากรายงานข้างต้นและจากการทำนายโครงสร้างสามมิติของหน่วยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 และ *Sphingomonas* sp. A4 จากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม predictprotein สามารถทำนายได้ว่าการที่เทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และ A4 พบว่าบริเวณ catalytic domain ของทั้งสองโปรตีนมีความใกล้เคียงกันมาก โดยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่างโปรตีนของสายพันธุ์ SP2 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 นั้นทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold โดยคาดว่าอยู่ที่บริเวณส่วนของโปรตีนที่เป็นทางผ่านของซับสเตรทเข้าสู่บริเวณ catalytic domain ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน

สำหรับการศึกษาการชักนำการแสดงออกของ *arhA1* จากทั้งสายพันธุ์ A4 และ SP2 พบว่า ยีน *arhA1* สามารถถูกชักนำได้ด้วยทั้งอะซีแนพรีนและอะซีแนพรีลีน ดังนั้นความแตกต่างของความจำเพาะต่อการย่อยสลายสารดังกล่าวในแบคทีเรียสองสายพันธุ์นี้น่าจะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเอนไซม์ดังที่ได้อภิปรายด้านบน แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยที่น่าสนใจและมีประโยชน์ เช่น

1. การศึกษาการแทนที่ลำดับอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่งและตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งใน ArhA1_{SP2} ด้วย Thr261 และ Gly347 ให้เหมือนกับหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เพื่อยืนยันคำทำนายดังกล่าวข้างต้น ซึ่งข้อมูลที่จะได้รับจะเป็นข้อมูลสำคัญเกี่ยวข้องกับการศึกษาสำคัญของเอนไซม์ที่มีผลต่อความจำเพาะต่อสับสเตรท และเป็นข้อมูลสำหรับปรับปรุงเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพต่อไปได้
2. การทำ protein engineering ปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ออกซิจีเนส
3. การศึกษายีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีนในแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ เช่น orf 5 ของสายพันธุ์ SP2 ซึ่งพบว่ามีคล้ายคลึงกับ NagAa (เพอร์ริออกซิน รีดักเทส) จาก *Ralstonia* sp. U2 แต่ไม่มี NADH-binding motif ที่บริเวณปลาย 3' ซึ่งจากรายงานการวิจัยอื่นๆ พบว่า ThnY ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเพอร์ริออกซิน รีดักเทส แต่ไม่มี NADH-binding motif มีบทบาทสำคัญบางอย่างในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย tetraline ใน *Sphingomonas* (Martinez-Perez และคณะ 2004) ดังนั้นการศึกษา orf 5 ของ *Sphingomonas* sp. SP2 จึงมีความน่าสนใจซึ่งอาจทำให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการย่อยสลายสารอะโรมาติกโดย *Sphingomonas* ได้

- Ausubel FM, Brent RE, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1999. **Current protocol in molecular biology**. New York, John Wiley and Sons.
- Carredano E, Karlsson A, Kauppi B, Choudhury D, Parales RE, Parales JV, Lee K, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. 2000. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. **J Mol Biol** 296:701-12.
- Davies JI, Evans WC. 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads the ring-fission mechanism. **Biochem J** 91:251-61.
- Demaneche S, Meyer C, Micoud J, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. 2004. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl Environ Microbiol** 70:6714-25.
- Denome SA, Stanley DC, Olson ES, Young KD. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. **J Bacteriol** 175:6890-901.
- Ensley BD, Gibson DT. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. **J Bacteriol** 155:505-11.
- Gibson DT. 1999. *Beijerinckia* sp. strain B1: a strain by any other name. **J Ind Microbiol Biotechnol** 23:284-93.
- Habe H, Omori T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Biosci Biotechnol Biochem** 67:225-43.
- Hegg EL, Que L, Jr. 1997. The 2-His-1-carboxylate facial triad-an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. **Eur J Biochem** 250:625-9.
- IARC. 1999. Overall Evaluations of Carcinogenicity of Humans. International Agency for Research on Cancer. <http://193.51.164.11/monoeval/erthall.html>. Last updated: 20 January 1999.
- Jakoncic J, Jouanneau Y, Meyer C, Stojanoff V. 2007. The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. **Biochem Biophys Res Commun** 352:861-6.
- Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. **Structure** 6:571-86.

- Keenan BG, Leungsakul T, Smets BF, Wood TK. 2004. Saturation mutagenesis of *Burkholderia cepacia* R34 2,4-dinitrotoluene dioxygenase at DntAc valine 350 for synthesizing nitrohydroquinone, methylhydroquinone, and methoxyhydroquinone. **Appl Environ Microbiol** 70:3222-31.
- Khan AA, Wang RF, Cao WW, Doerge DR, Wennerstrom D, Cerniglia CE. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Appl Environ Microbiol** 67:3577-85.
- Kim E, Zylstra GJ. 1999. Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. **J Ind Microbiol Biotechnol** 23:294-302.
- Komatsu T, Omori T, Kodama T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. **Biosci Biotechnol Biochem** 57:864-865.
- Kouzuma A, Pinyakong O, Nojiri H, Omori T, Yamane H, Habe H. 2006. Functional and transcriptional analyses of the initial oxygenase genes for acenaphthene degradation from *Sphingomonas* sp. strain A4. **Microbiology** 152:2455-67.
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. 2003. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. **J Bacteriol** 185:3828-41.
- Kurkela S, Lehvaslaiho H, Palva ET, Teeri TH. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. **Gene** 73:355-62.
- Kulakov LA, Chen S, Allen CC, Larkin MJ. 2005. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene. **Appl Environ Microbiol** 71:1754-64.
- Martínez-Pérez O, Moreno-Ruiz E, Floriano B, Santero E. 2004. Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of the operons. **Appl Environ Microbiol** 186: 6101-6109.
- Parales RE, Lee K, Resnick SM, Jiang H, Lessner DJ, Gibson DT. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. **J Bacteriol** 182:1641-9.

- Pinyakong O, Habe H, Omori T. 2003a. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **J Gen Appl Microbiol** 49:1-19.
- Pinyakong O, Habe H, Yoshida T, Nojiri H, Omori T. 2003b. Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. **Biochem Biophys Res Commun** 301:350-7.
- Pinyakong O, Habe H, Kouzuma A, Nojiri H, Yamane H, Omori T. 2004. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. **FEMS Microbiol Lett** 238:297-305.
- Pollmann K, Wray V, Hecht HJ, Pieper DH. 2003. Rational engineering of the regioselectivity of TecA tetrachlorobenzene dioxygenase for the transformation of chlorinated toluenes. **Microbiology** 149:903-13.
- Romine MF, Stillwell LC, Wong KK, Thurston SJ, Sisk EC, Sensen C, Gaasterland T, Fredrickson JK, Saffer JD. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. **J Bacteriol** 181:1585-602.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Selifonov SA, Slepchenkin AV, Adamin VM, Grechkina GM, Starovoitov II. 1993. Acenaphthene catabolism by strains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus*. **Microbiology (English translation of Mikrobiologiya)** 62:85-91.
- Shi T, Fredrickson JK, Balkwill DL. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* strains isolated from the terrestrial subsurface. **J Ind Microbiol Biotechnol** 26:283-9.
- Sho M, Hamel C, Greer CW. 2004. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65. **FEMS Microbiol Ecol** 48:209-20.
- Simon MJ, Osslund TD, Saunders R, Ensley BD, Suggs S, Harcourt A, Suen WC, Cruden DL, Gibson DT, Zylstra GJ. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. **Gene** 127:31-7.
- Suenaga H, Watanabe T, Sato M, Ngadiman, Furukawa K. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering. **J Bacteriol** 184:3682-8.

- Supaka N, Pinphanichakarn P, Pattaragulwanit K, Thaniyavarn S, Omori T, Junthongjin TK. 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthrene and pyrene via cometabolism. **Science Asia** 27:21-28.
- Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **Int J Syst Evol Microbiol** 51:1405-17.
- Takizawa N, Iida T, Sawada T, Yamauchi K, Wang YW, Fukuda M, Kiyohara H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. **J Biosci Bioeng** 87:721-31.
- U.S.EPA. 1989. **Mouse Oral Subchronic Toxicity Study with Acenaphthene**. Washington, DC, 89 pp.
- Yen KM, Gunsalus IC. 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. **Proc Natl Acad Sci USA** 79:874-8.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Pinyakong, O., Saipin, K., Thaniyavarn, S., and Pinphanichakarn, P. (2007) Identification and functional analysis of acenaphthene dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain SP2. American Society for Microbiology General 107th meeting. Canada. May 21-25.

ภาคผนวก

บทคัดย่อ

Pinyakong, O., Saipin, K., Thaniyavarn, S., and Pinphanichakarn, P. (2007) Identification and functional analysis of acenaphthene dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain SP2. American Society for Microbiology General 107th meeting. Canada. May 21-25.

Identification and Functional Analysis of Acenaphthene Dioxygenase from
Sphingomonas sp. Strain SP2

Onruthai Pinyakong¹, Krongkarn Saipin², Suthep Thaniyavarn^{1,2}, and Pairon
Pinphanichakarn¹

¹ Department of Microbiology, ² Department of Biotechnology
Faculty of Science Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

Acenaphthene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) consisting of naphthalene with an ethylene bridge connecting positions 1 and 8. Due to their toxic properties, acenaphthene and other fifteen PAHs have been designated to be priority pollutants by The U.S. Environmental Protection Agency. *Sphingomonas* sp. SP2 has been found to have ability to degrade acenaphthene but it cannot grow on other PAHs. The clone containing genes encoding large and small subunits of terminal oxygenase of this strain was isolated by using the ability to oxidize indole to indigo. The amino acid sequences of both proteins exhibited highest identity (99%) to those of the large (ArhA1) and small (ArhA2) subunits of terminal oxygenase from *Sphingomonas* sp. A4, a strain capable of utilizing both acenaphthene and acenaphthylene. Functional analysis of *arhA1arhA2* of strain SP2 as terminal acenaphthene dioxygenase was confirmed by biotransformation and expression in *E. coli*. Furthermore, insertion inactivation of the *arhA1* gene revealed that this gene is necessary for acenaphthene degradation. This study suggests that sphingomonads utilizing acenaphthene might possess a unique group of catalytic genes which are different from those of other aromatic hydrocarbon degradation. It is also interesting that these two sphingomonads which are different in their substrate specificity possess terminal oxygenase with high identical protein. Comparative structure prediction of ArhA1 from both sphingomonads is being analyzed from their amino acid sequences by using known three-dimensional structure of naphthalene dioxygenase as a model.