



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
อะซีแนพริลลินโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

โดย ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
อะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

โดย ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG4580088

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย

(ชื่อโครงการ) อะซีแนพรีลินโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

Investigator : Kobchai Pattaragulwanit, Dr. rer. nat.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

(ชื่อนักวิจัย) : ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : kobchai@sc.chula.ac.th

Project Period : 2 years

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ : *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมในประเทศไทย เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ได้กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 เพื่อที่จะได้สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนได้ เพื่อพิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่สะสมได้เพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารสูตรต่ำที่มีอะซีแนพทิลีน สกัดสารมัธยันต์จากน้ำเลี้ยงโดยใช้เอธิลอะซีเตทและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี พิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรี (MS) และ/หรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) พบว่าสารมัธยันต์ที่สะสมจากสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก อะซีแนพทริโนนและกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ได้แยกและศึกษาลักษณะยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเขาเธอร์นาไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของสายพันธุ์ E11 และสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 กับตัวติดตาม Tn5 และ AE ตามลำดับ จากนั้นโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III พบกรอบอ่านรหัสเปิด 5 แห่งซึ่งคล้ายคลึงกับเป็นยีนที่ประมวลรหัสของโปรตีนตามลำดับจาก 5'→3' ดังต่อไปนี้ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (33%) ไฮดราเทส-อัลโดเลส (38%) 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (46%) โปรตีนที่คล้ายแอตดูซิน (38%) และดีไฮโดรจีเนส (46%) งานวิจัยนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่ได้เสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในแบคทีเรียตระกูล *Rhizobium* โดยอาศัยข้อมูลจากสารมัธยันต์ที่ได้แยกและพิสูจน์ลักษณะ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องพบว่าอะซีแนพทิลีนจะถูกย่อยสลายผ่านอะซีแนพทริโนน และกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งสารประกอบชนิดหลังจะถูกย่อยสลายต่อไปได้เป็นกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก

Keywords: *Rhizobium*, acenaphthylene degradation, intermediates, gene, 2,5-dihydroxybenzoic acid

Abstract : *Rhizobium* sp. strain CU-A1 is a potential acenaphthylene (ACN) degrading bacterium isolated from petroleum contaminated soil in Thailand. In order to study genes involving and intermediates from ACN degradation, transposon Tn5 mutagenesis was performed to obtain ACN degrading defective mutants. To identify accumulated intermediates, the mutant strains A53, B1 and B5 were cultured in minimal medium containing ACN. The intermediates were extracted from culture broth using ethyl acetate and purified by thin layer chromatography and silica gel column chromatography. The purified intermediates were identified by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance to be 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. In addition, genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of the strain E11 and CU-A1 with Tn5- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III-fragment was then cloned and sequenced. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for protein as following: ferredoxin reductase (33%), hydratase-aldolase (38%), 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase (46%), adducin like protein (38%), and dehydrogenase (46%). The ACN degradation pathway was also proposed.

Methodology: *Rhizobium* sp. CU-A1 was mutagenized by Transposon Tn5. Three mutants incapable of growing with ACN were used for isolation of intermediates and genes involving ACN degradation. Mutants were cultivated in carbon free medium containing ACN followed by extraction with ethyl acetate. Isolate intermediates was purified preparative TLC and silica gel column chromatography before subjected to identify by MS and NMR. Genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of strain E11 and CU-A1 with Tn5- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III-fragment was cloned and nucleotide sequences were determined.

Results and Discussion: Three intermediates were isolated and characterised as 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for ferredoxin reductase, hydratase-aldolase, 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, adducin like protein, and dehydrogenase. Base on this results, ACN may be degraded by strain CU-A1 via acenaphthenequinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid, respectively.

Future direction: The functional analysis of the isolated genes should be performed and some intermediates should be characterized in order to ensure the proposed ACN degradation pathways.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้ให้โอกาสและทุนเพื่อทำวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะตลอดการทำวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ คำแนะนำ และการแปรผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ด้วย MS และ NMR ขอขอบคุณโครงการเงินกู้ธนาคารเพื่อการพัฒนาแห่งเอเชีย (ADB) และโครงการ Thailand-Japan Technology Transfer Project (TJTTP) ที่ได้อนุเคราะห์เครื่อง HPLC เพื่อใช้วิเคราะห์สารมัยันต์และเครื่องมือในการทำวิจัยอื่นๆ และขอขอบคุณคณาจารย์และนักวิจัยของหน่วยวิจัย Bioremediation ทุกท่านที่ได้ให้ข้อคิดเห็น การสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆตลอดงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

บทนำ

ภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นพิษจากการแพร่กระจายของสารพิษปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมในปัจจุบันเกิดจากการขยายตัวของการผลิตในภาคอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของประชากร โดยสารเคมีบางชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตจัดเป็นสารมีพิษที่มีอันตรายสูง ซึ่งสามารถที่จะแพร่กระจายปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้จากการขาดความรู้และการควบคุมดูแลเอาใจใส่อย่างเคร่งครัดในการเก็บรักษา การนำไปใช้ในกระบวนการผลิต และการกำจัดกากของเสีย ทำให้สารพิษนั้นกระจายสู่สิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาปริมาณของเสียอันตรายที่มีผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรม และทุกกิจกรรมทั่วทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2535 พบว่ามีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 1 ล้านตัน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2544 จะมีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 2,813,980 ตันโดยเป็นของเสียอันตรายประเภทน้ำมัน (oil) ประมาณ 589,508 ตัน (สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2542) และเป็นของเสียอันตรายที่เกิดจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม 11,813 ตัน (บุญยงค์ โล่ห์วงศ์วัฒน์, 2540) โดยของเสียอันตรายประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมจะประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด และที่มีความสำคัญคือ สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) โดยมีวงอะโรมาติกเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยสาร PAHs มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรมหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันดิบ ถ่านหิน น้ำมันดำ จากถ่านหิน (coal tar) ครีโอโซท (creosote) ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม และเกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Volkering *et al.*, 1992) นอกจากนี้สาร PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการรั่วซึมของแหล่งน้ำมันตามธรรมชาติ ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด เป็นต้น (Cerniglia, 1992) สารประกอบ PAHs สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ ดิน แหล่งน้ำบนดิน และใต้ดินในปริมาณสูง (Fernandez *et al.*, 1992)

สารประกอบ PAHs จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเป็นพิษของสาร เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเป็นสารที่ทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Wilson & Jones, 1993) หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) จึงได้กำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิดดังแสดงในรูปที่ 1 ได้แก่ แนพทาลีน (naphthalene) อะซีแนพทีน (acenaphthene) อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ฟลูออรีน (fluorene) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) แอนทราซีน (anthracene) ฟลูออแรนทีน (fluoranthene), เบนซ์[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene), ไครซีน (chrysene), ไพรีน (pyrene) เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene) เบนโซ[เค]ฟลูออ

แรนธรีน (benzo[k]fluoranthene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[ah]anthracene) เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน (benzo[ghi]perylene) และอินดีโน-[1,2,3,ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3cd]pyrene) เป็นสารพิษที่มีความสำคัญในลำดับต้นๆ ที่จะต้องป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม (Wilson & Jones, 1993) ในประเทศไทย ได้มีการออกพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งกำหนดให้สารประกอบ PAHs มีสมบัติจัดอยู่ในประเภทวัตถุอันตรายประเภทที่ 7 คือ วัตถุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย, 2535)

อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene)

อะซีแนพทิลีนเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม อะซีแนพทิลีนเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดิบ น้ำมันดำจากถ่านหิน คาร์บอนหรี (Neurath, 1972) ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากถ่านหินและเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Alexander *et al.*, 1985; Radke, 1987) และยังพบได้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สารทนอมและรักษาเนื้อไม้ (Wilson & Jones, 1993) อะซีแนพทิลีนสามารถกระจายสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ พื้นดิน แหล่งน้ำใต้ดิน และแหล่งน้ำบนดินเนื่องจากการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม รวมทั้งการขนส่ง การดูแลเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว (Mattox & Humenick, 1980)

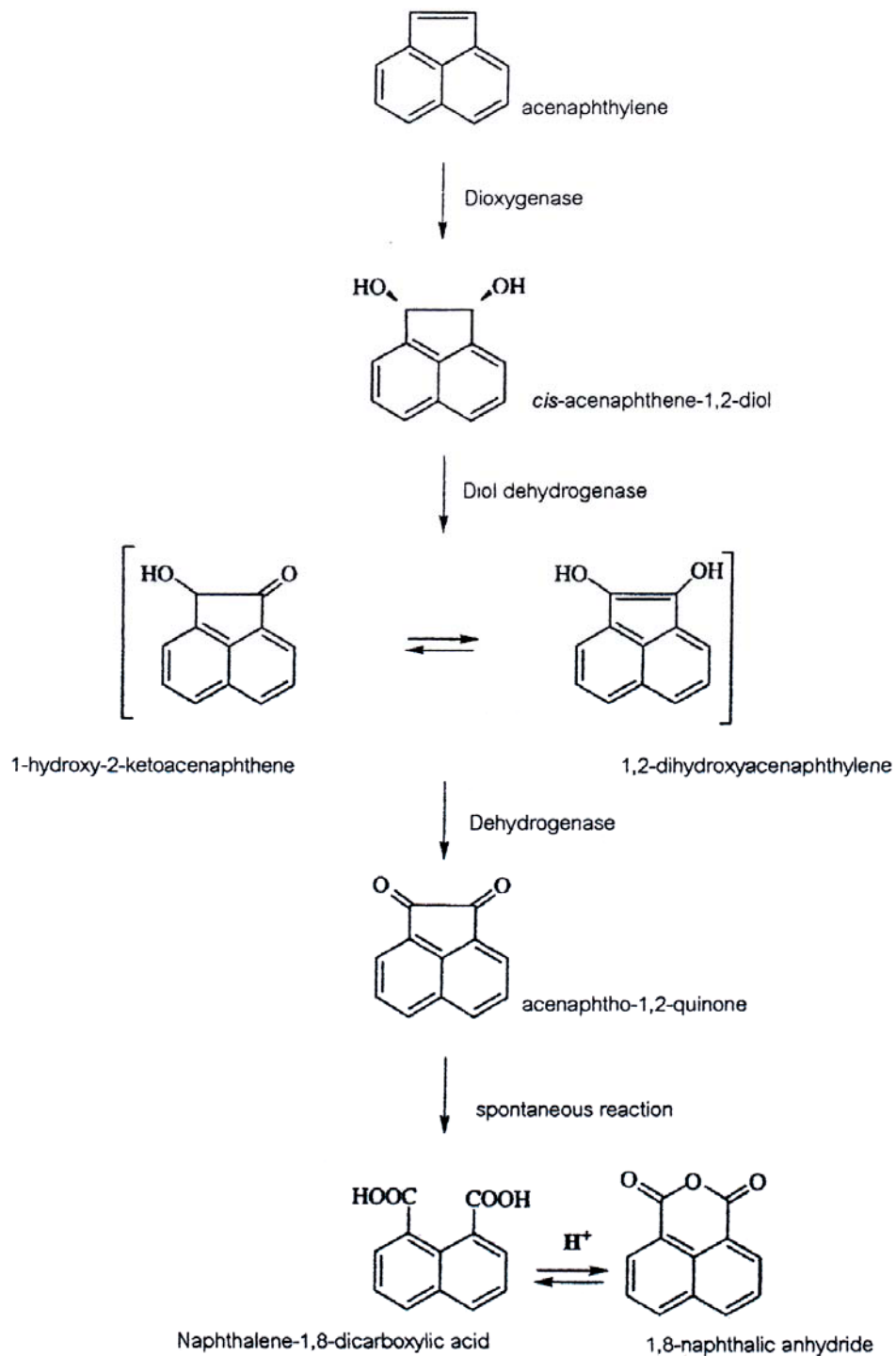
อะซีแนพทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่น เป็นสารที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงทำให้เกิดการตกค้างสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม และสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ด้วยการสะสมอยู่ในพืชที่ขึ้นบนดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน จากนั้นเข้าสู่สัตว์ผ่านทางห่วงโซ่อาหารและเข้าสู่มนุษย์ได้ในที่สุด แม้ว่าอะซีแนพทิลีนมีความเป็นพิษไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบ PAHs อื่นที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ แต่ได้มีรายงานว่าอะซีแนพทิลีนมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็ม ทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน (Lederer, 1985) แม้ยังไม่มีรายงานความเป็นพิษร้ายแรงในมนุษย์ แต่อะซีแนพทิลีนอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจได้ (Lederer, 1985) สารอนุพันธ์บางตัวของอะซีแนพทิลีนยังสามารถก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ได้ (LaVoie & Rice, 1988) เนื่องจากอะซีแนพทิลีนจัดเป็นสารอันตรายที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงทำให้มีความสนใจที่จะบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีน การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีนสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ อาทิการกรอง การทำให้แห้ง การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับ (Manahan, 1993) การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี (Cockson, 1995) การเผาที่อุณหภูมิสูงมาก (incineration) การฝังกลบ (landfill) และแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ เพื่อย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป

(Mueller *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้เปรียบกว่าการบำบัดด้วยวิธีอื่น เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee & Cutright, 1996) และไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิมเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน จึงสลายสารพิษบางชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) และได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson & Jones, 1993) หรือจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน of สาร PAHs ทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป กระบวนการบำบัดโดยวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพยังอาจทำได้โดยกระตุ้นจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ ให้มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ (biostimulation) หรือเติมจุลินทรีย์จากภายนอกที่มีสามารถย่อยสลายสาร PAHs ลงไปในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสาร PAHs (bioaugmentation) ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์นั้นเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาติดตาม เพื่อให้การบำบัดสาร PAHs นั้นเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

การย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยแบคทีเรีย

วิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้มีการศึกษาใน *Beijerinckia* sp. ที่ย่อยสลายไบฟีนิล (Schocken & Gibson, 1984) พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยอะซีแนพริลีนร่วมกับอะซีแนพริลีนแบบโคออกซิเดชัน ได้ศึกษาการออกซิไดซ์ของอะซีแนพริลีนจากการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสม พบว่าวิธีการย่อยสลายเริ่มจากปฏิกิริยาไดออกซิเจเนชันด้วยการเติมออกซิเจนเข้ายังส่วนวงไฮโดรเพนทีนของอะซีแนพริลีนได้เป็น ซิส-1,2-อะซีแนพริลีนไดออล 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพริลีน หรือ 1,2-อะซีแนพริลีนไดโอน และเมื่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซีแนพริลีนควิโนน ตามลำดับ จากผลวิจัยดังกล่าวยังไม่พบว่ามีกระบวนการแตกวงไฮโดรเพนทีนของอะซีแนพริลีน

Komatsu *et al.* (1993) ได้รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลาย อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเมื่อศึกษาสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อพบการสะสมของกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าสายพันธุ์นี้สามารถแตกวงไฮโดรเพนทีนในโครงสร้างของอะซีแนพริลีนได้ Selifonov *et al.* (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิเจเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพริลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไดออกซิเจเนส คล้ายกับกระบวนการที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นในแบคทีเรีย ได้เป็น ซิส-อะซีแนพริลีน-1,2-ไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพริลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพริลีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพริลีน-1,2-ควิโนน และ กรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ



รูปที่ 1.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ PAO1 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996)

ดังแสดงในรูปที่ 1.1 จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการย่อยสลายกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก ต่อไปอีก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่มีคาร์บอนอะตอมใดที่ถูกนำไปใช้เพื่อไปเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์ ดังนั้นจึงยังไม่มี การเสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียที่สมบูรณ์

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 (Phaengthai *et al.*, 2000)

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในประเทศไทย สายพันธุ์ CU-A1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน กล่าวคือสามารถย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon free mineral medium ความเข้มข้น 0.6 กรัม/ลิตรจนหมดได้ในระยะเวลาเพียง 3 วัน นอกจากนี้ สายพันธุ์ CU-A1 ยังสามารถย่อยสลายแนฟธาลิน ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ได้ด้วย และสามารถย่อยสลายพีแนนทรีน ฟลูออรีนและอะซีแนฟธินแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับอะซีแนฟธิลีนอีกด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวจึงเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนฟธิลีนโดยวิธีทางชีวภาพ

แต่เนื่องจากได้เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดแม้สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ แต่อาจเกิดการสะสมของสารมัธยันต์ซึ่งคงทนต่อการถูกย่อยสลายไปเป็นสารอื่น (dead end metabolite) (Weissenfels *et al.*, 1990; Tongpim & Pickard, 1996) หรือเกิดสารมัธยันต์ที่เป็นพิษมากกว่าขึ้น (Calder & Lader, 1976; Rao, 1996) ยิ่งไปกว่านั้น จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานการย่อยสลายสารประกอบ PAHs หรืออื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Rhizobium* จึงไม่สามารถทราบได้ว่าเมื่อใช้เชื้อดังกล่าว ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนอะซีแนฟธิลีน จะก่อให้เกิดสารมัธยันต์หรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษกว่าหรือไม่

ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาสารมัธยันต์และ/หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารมัธยันต์ก่อนที่จะนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ในการบำบัดพื้นที่จริง นอกจากนี้ การวิจัยยังจะได้ศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนที่สมบูรณ์ ผลจากการวิจัยจะสามารถบอกถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 และจะช่วยทำนายสารมัธยันต์ที่จะเกิดขึ้นได้ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลเป็นชนิด molecular biology grade สารเคมีหรือตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ MS หรือ NMR เป็นระดับ HPLC grade หรือดีกว่า สารเคมีอื่นเป็นชนิด analytical grade หรือดีกว่า สารเคมีซื้อจากบริษัท Sigma, USA; Kanto Chemical, Japan; Merck, Germany; J.T.Baker, USA

3.2 แบคทีเรียและการเก็บรักษา

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรีย	จีโนมไทป์/ ฟิโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ JM109	<i>EndA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5α	<i>φ80dlacZΔM15, endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1	<i>RecA, Tra (IncP), (RP4-2-Tc::Mu::Km^r::Tn7), Sm^r</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน	Phaengthai <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ A18 A35 A49 A53 A8 B1 B5 D1 D2 E11 E32 G101 G12 G39 G531 G62 H1 J1	สายพันธุ์ถูกกลายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโพซอน Tn5 ซึ่งมีความผิดปกติในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน	สร้างในงานวิจัยนี้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่างๆ ดังนี้

3.1.1 *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB หรือ 2YT (Sambrook & Russell, 2001) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ กานามัยซิน (Km) 50 ไมโครกรัมต่อมล. และแอมพิซิลลิน (Am) 100 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C

3.1.2 *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) (Kasuga *et al.* 1997) วางผลึกอะซีแนพรีลินบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อผึ่งด้วยเทปกาวให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเติมสารละลายอะซีแนพรีลินในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 กรัมต่อลิตรหรือแหล่งคาร์บอนอื่นตามที่ระบุในวิธีการทดลอง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 วัน สำหรับสายพันธุ์กลายเลี้ยงเช่นเดียวกันแต่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อ มล.

3.1.3 *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ให้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว เป็นเวลา 3 วัน และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที สำหรับสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. เลี้ยงเช่นเดียวกันแต่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมล.

3.1.4 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลิเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ปี

3.2 พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนม	เอกสารอ้างอิง
pSUP2021	Tn5(Km ^r), Cm ^r , Tra ⁻ , Mob ⁺ , pBR325 replicon	Simon <i>et al.</i> , 1983
pBluescript KS(+/-)	Ap ^r , ϕ lac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-7Zf(+/-)	Ap ^r , ϕ lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-3Zf(+/-)	Ap ^r , ϕ lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pTEM	Ap ^r , Km ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI</i> จากดีเอ็นเอของสายพันธุ์ กลาย E11 ขนาดประมาณ 9.2 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pTEB	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>BamHI-EcoRI</i> จาก pTEM ขนาด ประมาณ 3.9 kb ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pWT	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>BamHI-HindIII</i> จากดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาด 4.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pES	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI-SalI</i> จาก pWT ขนาดประมาณ 1.8 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pWR	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI-HindIII</i> จาก pWT ขนาด ประมาณ 0.7 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pSW	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>SalI-EcoRI</i> จาก pWT ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้

3.3 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

ในกรณีที่ไม่มีการระบุเป็นอย่างอื่น เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ทุกขั้นตอนได้ดำเนินการตามวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ใน Sambrook & Russel (2001) หรือ Ausubel *et al.* (1999) ในกรณีที่ใช้ชุดทดสอบสำเร็จ (Kits) จะดำเนินการตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตที่ได้ระบุไว้ตามขั้นตอนต่างๆ

3.4 การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ 30°C และ 37°C ตามลำดับ เขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เติมหหัวเชื้อที่ไดลงในอาหารเหลว 2YT จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 สำหรับ *E. coli* จะเติมกานามัยซิน บ่มเชื้อดังกล่าวทั้งสองชนิดจนการเจริญเข้าสู่ช่วงต้นของระยะเอกซโปเนนเชียล โดยค่า OD_{600} จะอยู่ที่ประมาณ 0.4-0.6 ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วย 0.85% NaCl และแขวนลอยเซลล์ให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้ให้และ *Rhizobium* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้รับมาผสมให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกด้วยไมโครปิเปตให้เหลือส่วนน้ำใสประมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อแขวนลอยเซลล์

ทำคอนจูเกชันตามวิธีของ Sevaraj และ Iyer (1983) เริ่มจากเตรียมแผ่นกรอง Nitrocellulose ขนาด 0.45 μ m โดยฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave และอบแห้งที่ 50°C ก่อนใช้ วางแผ่นกรองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ปิเปิดส่วนผสมของเซลล์ลงบนแผ่นกรองและบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบแผ่นกรองมาบรรจุลงในหลอดไมโครพิวจ์ ล้างเซลล์ออกด้วย 0.85% NaCl 1 มล. นำเซลล์ที่แขวนลอยมาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วย 0.85% NaCl จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่ทำให้แข็งด้วย 1.5% Nobel agar เติมกรดโปรโตคาที่คูอิความเข้มข้นสุดท้าย 1.0 กรัม/ลิตร และกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 4 วัน

คำนวณค่าประสิทธิภาพของทรานสโพลิชันจากอัตราส่วนจำนวน *Rhizobium* ทรานสคอนจูเกนต์ต่อจำนวน *Rhizobium* ทั้งหมดที่ใช้ในการคอนจูเกชัน

3.5 ตรวจยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 แบบสุ่มโดยใช้เทคนิคไฮบริดเซชัน

3.5.1 การเตรียม TN5-DNA probe

สกัดพลาสมิด pSUP2021 จาก *E. coli* S17-1 โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดที่ได้ด้วย *Hind*III ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต (Promega, USA.) แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ตัดเจลที่มีขั้วดีเอ็นเอขนาด 3.4 kb ซึ่งมีส่วนของ ทรานสโปซอน Tn5 อยู่

แยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) ติดตามดีเอ็นเอติดตามทรานสโพซอน Tn5 ด้วย DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

3.5.2 Southern Hybridisation

สกัดดีเอ็นเอของทรานสคอนจูแกนที่ได้ในข้อ 3.4 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI (Promega, USA.) แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N+, Amersham, USA) ตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ไฮบริไดเซชันกับ TN5-DNA probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริไดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method) ตามที่วิธีที่ระบุในชุด DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

3.6 คัดแยก *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน

เก็บโคโลนีเดี่ยวของทรานสคอนจูแกนที่ขึ้นบนอาหารแข็งในข้อ 3.4 มาขีดบนอาหารดังนี้

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมกานามัยซิน (50 ไมโครกรัม/มล.) และกรดโปรโตคาที่คูอิก (1.0 กรัม/ลิตร) เพื่อเป็น master plate

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมกานามัยซิน (50 ไมโครกรัม/มล.) และวางผลึกอะซีแนพรีลินบนผาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฝักจานอาหารให้สนิทด้วยเทปกา

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนจานอาหารข้อ ข. โคโลนีที่ไม่เจริญหรือมีลักษณะการเจริญต่างไปจากสายพันธุ์เดิม ถือเป็นสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน นำโคโลนีของสายพันธุ์กลายที่ต้องการจาก master plate (ข้อ ก.) มายืนยันสายพันธุ์กลายโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลิน 0.6 กรัม/ลิตร พร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเจริญเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1

3.7 ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายที่มีขึ้นทรานสโพซอนสอดแทรกอยู่

ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน ตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยสกัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่ได้ในข้อ 3.6 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมม

เบรอน ไฮบริโดเซชันกับ TN5-DNA probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริโดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method)

3.8 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับ DNA-probe และโคลนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าในพลาสมิดเวกเตอร์

เลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลบวกกับ TN5-DNA probe จากนั้นสกัดดีเอ็นเอสายพันธุ์กลายดังกล่าวตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ตัดเจลให้ครอบคลุมบริเวณที่มีดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่เลือกที่ให้ผลบวกจากการไฮบริโดเซชันในข้อ 3.7 สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) หรือใช้วิธี electroelution ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เพื่อเป็น insert สำหรับ ligation

เตรียม pBLUESCRIPT KS (+/-) (Stratagene, USA) โดยตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่มีพลาสมิดด้วยเอธานอล ละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl pH 8.0 ก็จัดหมู่ฟอสเฟส (dephosphorylation) ตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เพื่อเป็นเวกเตอร์สำหรับ ligation

ไลगेชันชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase) (Promega, USA) ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.9 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.8 เข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ในดีเอ็นเอ

ทำ *Escherichia coli* DH5 α ให้เป็นคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Calcium chloride จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากไลเกชันที่ได้เข้าคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Heat shock คัดเลือกโคลนหรือโคโลนีของ *E. coli* DH5 α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่โดยเกลี่ยเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งมีกานามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มล. (เพื่อคัดเลือกยีนเครื่องหมายบน Tn5) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดและตรวจหาพลาสมิดที่มีชิ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับ TN5-DNA probe

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ หรือการสับโคลนและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรก สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์หาแผนการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยละเอียด รวมทั้งหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินโดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และรวมไปถึงการหาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็กรอบอ่านรหัสเปิดโดยเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1

3.11 หาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

3.11.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 โดย PCR

จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 ที่หาได้จากข้อ 3.10 ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้ง forward primer และ reverse primer เพื่อใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ 1.5 mM MgCl₂, 1X Taq DNA polymerase buffer, 1 μM forward primer & reverse primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega, USA), DNA Template 10 pg, H₂O จนถึง 50 μl โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ hot start 95 °C 3 นาที, denaturation 95 °C 1 นาที, annealing 53 °C 1 นาที, extension 72 °C 1 นาที ทำปฏิกิริยา 30 รอบ final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอีเลคโตรโฟรีซิส

3.11.2 ตัดฉากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้

ตัดฉากดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.11.1 โดยใช้วิธีในข้อ 3.5.1 และให้ชื่อว่า AE-Probe

3.11.3 หาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

หาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนบนโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน เช่นเดียวกับวิธีที่แสดงในข้อ 3.5.2 โดยสกัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน ไฮบริดเซชันกับ AE-probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method)

เลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกกับ AE-probe จากนั้นสกัดดีเอ็นเอสายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ตัดเจลให้ครอบคลุมบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกจากการไฮบริดเซชัน สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) หรือใช้วิธี electroelution ละลายดีเอ็นเอน้ำตาลปอดประจุลบในปริมาตรที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็น insert สำหรับ ligation

เตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ที่เหมาะสม (pBLUESCRIPT KS (+/-) (Stratagene, USA) หรือ pGEM-series (Promega, USA)) โดยตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกับที่ตัดโครโมโซมดีเอ็นเอ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่มีพลาสมิดด้วยเอทานอล ละลายพลาสมิดได้ใน Tris-HCl pH 8.0 ในกรณีที่ตัดด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียว กำจัดหมู่ฟอสเฟส (dephosphorylation) ตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปอดประจุลบในปริมาตรที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็น insert สำหรับ ligation ไกลเกชันชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase) (Promega, USA) ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ทำ *Escherichia coli* DH5 α ให้เป็นคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Calcium chloride จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากไลเกชันที่ได้เข้าคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ด้วยวิธี Blue/White selection บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดและตรวจหาพลาสมิดที่มีชิ้นทรานสโพซอนแทรกสอดอยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับ AE-probe หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank ตามวิธีในข้อ 3.10

3.12 การศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1

3.12.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

เลี้ยงสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก (1 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที 4 °C 10 นาที ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85% NaCl 3 ครั้ง แว่นลอยเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ถ่ายหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลีน (0.6 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 5 มล. และเติมกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 14 วันเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสม เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

3.12.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี *viable plate count*

เจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก (1 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มก.ต่อลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.12.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพรีลีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น

ปรับ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.12.1 ด้วย conc. HCl ให้เท่ากับ 2.0-3.0 จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วยการเติม Na_2SO_4 anhydrous จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วย evaporator จนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 0.5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 μm ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นต่อไป

3.12.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมสารมาตรฐานของอะซีแนพริลีน โดยละลายอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว CFMM ให้ได้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 มก.ต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตตามขั้นตอนในข้อ 3.12.3 นำชุดสารมาตรฐานและชุดทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนโดยวิธี HPLC ด้วยเครื่องเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น LC-3A ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm โดยใช้สารละลายตัวพา คือ เมธานอล 80% ในน้ำ และอัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นอะซีแนพริลีนจากพื้นที่ใต้กราฟ วิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานนี้

3.12.5 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จากข้อ 3.12.3 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8×8 ซม. (Merck, Germany) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 nm

3.13 การแยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายต่างๆ และให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.13.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

ดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.12.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1000 มล. ที่มีอะซีแนพริลีน (0.6 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มก.ต่อลิตร) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.12.1 เมื่อครบตามกำหนดเวลาที่เหมาะสม นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.12.3 จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.13.2 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC

นำสารละลายตัวอย่างในเมทานอลที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาจุดเป็นแนวลงบนแผ่น PLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 หน้า 1 มม. (Merck, Germany) โดยใช้ตัวทำละลายเป็น เฮกเซน : เอธิลอะซีเตต : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10:10:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 nm จากนั้นขีดแถบของซิลิกาเจลที่มีตัวอย่างที่ต้องการออก สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตปริมาตร 250 มล. แยกส่วนเอธิลอะซีเตตเก็บไว้ สกัดผงซิลิกาเจลด้วยเอธิลอะซีเตต 250 มล.อีกครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตตทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นกำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วยการเติม Na_2SO_4 anhydrous นำส่วนเอธิลอะซีเตตไประเหยแห้งด้วย evaporator จนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.4 หรือเก็บที่อุณหภูมิ $-20\ ^\circ\text{C}$

3.13.3 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์ โดยแขวนลอยซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063-0.2 มม. (Merck, USA) ปริมาณ 10 กรัม ลงในเฮกเซน บรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 30 ซม. หลังจากบรรจุ ล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 100 มล.

เตรียมตัวอย่าง โดยนำส่วนสกัดที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาผสมกับซิลิกาเจล 3 กรัม จากนั้นระเหยแห้งด้วย evaporator เติมเฮกเซนปริมาตรเล็กน้อยลงไปละลาย แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตตลำดับส่วนละ 10% ใช้ตัวชะลำดับส่วนละ 100 มล. เก็บแต่ละลำดับส่วนที่ชะได้เพื่อนำไประเหยแห้งด้วย evaporator ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 0.5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด $0.2\ \mu\text{m}$ ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.4 หรือเก็บที่อุณหภูมิ $-20\ ^\circ\text{C}$

3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.14.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS)

นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MS ด้วยเทคนิค Electron Impact (EI) ที่ 70 eV เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลายเทียบกับสารมัธยันต์มาตรฐานต่างๆ

3.14.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

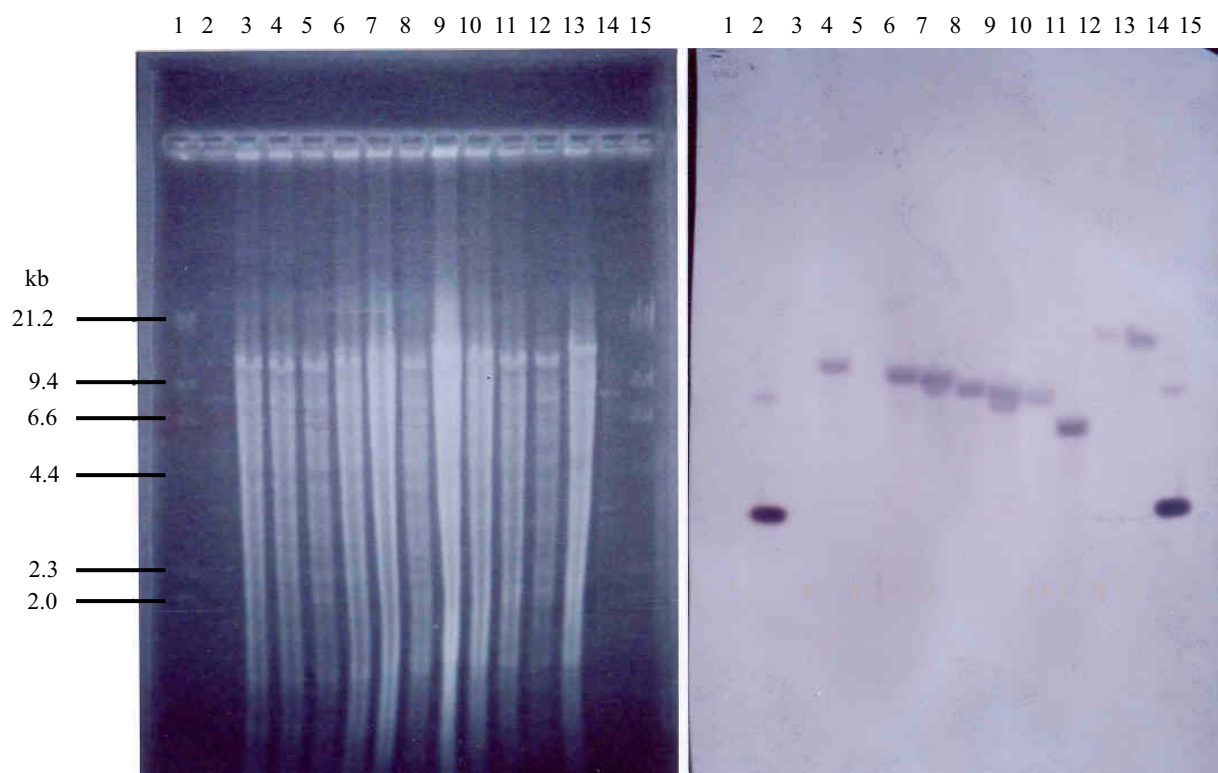
นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ที่ 200 MHz และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 50 MHz โดยใช้สัญญาณจากตัวทำละลายเป็นพีคอ้างอิง และรายงานผลเป็นค่าเคมีคัล ชิฟต์ในหน่วย พีพีเอ็ม (ppm)

การวิเคราะห์ทั้งสองส่วนนี้ทำโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำของ รศ.ดร.อมร เพชรสม

ผลการทดลอง

3.1 การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยเทคนิค Transposon mutagenesis

การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 ด้วยวิธีคอนจูเกชัน โดยใช้ *Escherichia coli* S17-1 ที่มี พลาสมิด pSUP2021 ซึ่งเป็น suicide plasmid ที่มีทรานสโปซอน Tn5 เป็นผู้ให้ (donor cell) และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นผู้รับ (recipient cell) พบว่าประสิทธิภาพของการทรานสโพลีชันเมื่อใช้ภาวะดังกล่าวคือ 4.75×10^{-5} เซลล์ต่อเซลล์ผู้รับ จากนั้นได้กลายพันธุ์สายพันธุ์ CU-A1 จนได้ทรานสคอนจูแกนท์จำนวนทั้งสิ้น 15,730 โคลน ตรวจยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 แบบสุ่มโดยใช้เทคนิคไฮบริโดเซชัน โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 เป็นตัวติดตาม พบว่าทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มเข้าไปในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.1



ก.

ข.

รูปที่ 3.1 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 Lambda DNA/*HindIII* marker

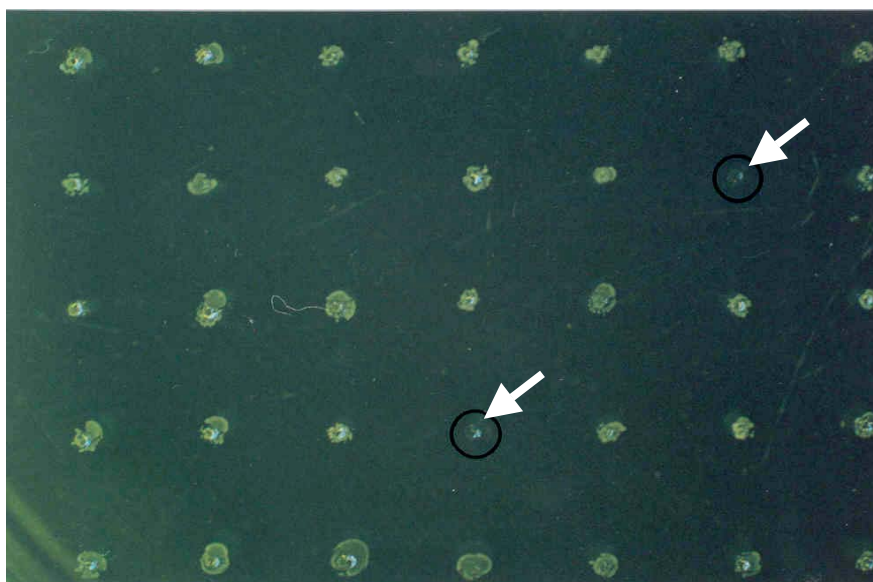
ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องวิ่งที่ 3 และ 5 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องวิ่งที่ 4 และ 6-13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. ทรานสคอนจูแกนท์ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

3.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอน

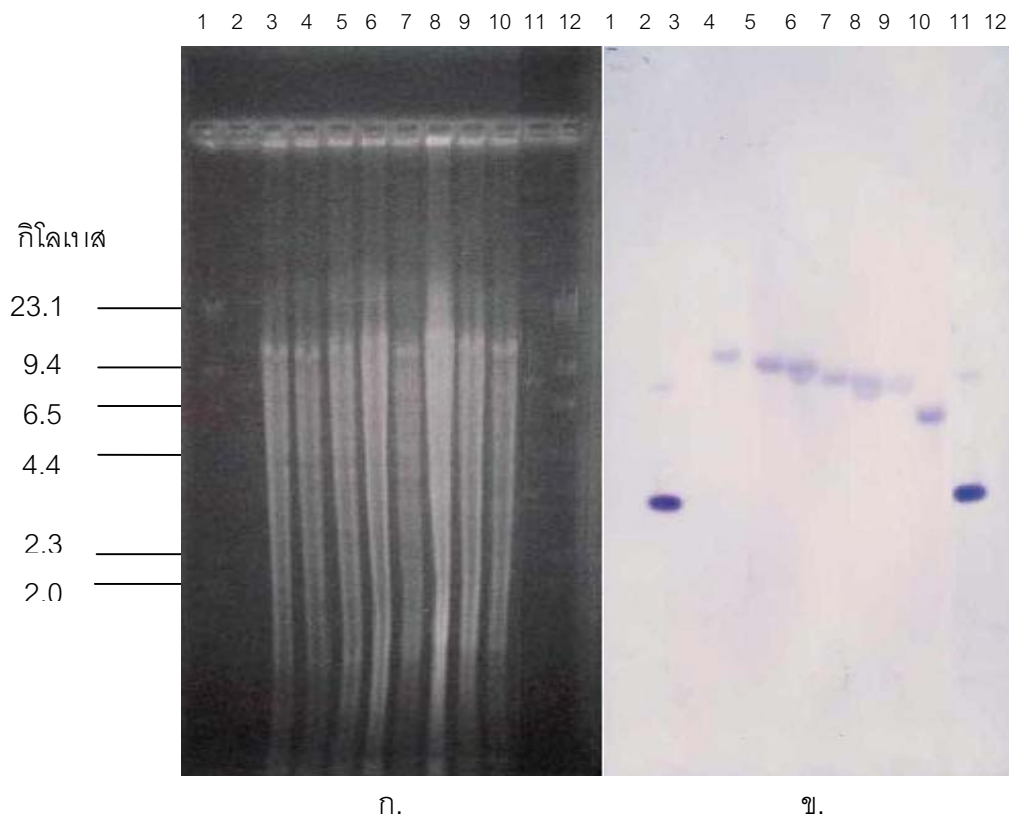
คัดเลือกสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยการขีดทราบนสคอนจูแกนตที่ได้จากข้อ 3.1 เลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหรือเจริญช้ากว่าสายพันธุ์ CU-A1 (รูปที่ 3.2) จากนั้น นำมายืนยันสายพันธุ์กลายโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีน 600 มก./ลิตร ที่ 30°C เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 18 สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในการใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนหรือมีรูปแบบการเจริญต่างไปจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือสายพันธุ์กลาย A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, G12, G39, G62, G101, G531, H1 และ J1



รูปที่ 3.2 ลักษณะการเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอน (ในวงกลมครี) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและให้อะซีแนพธิดีนในรูปไอระเหิด

3.3 ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายซึ่งมีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization)

ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายซึ่งมีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ โดยใช้ไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* กับ TN5-DNA probe ผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3.3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโพซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 12 Lambda DNA/*HindIII* marker

ช่องวิ่งที่ 2 และ 11 พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องวิ่งที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องวิ่งที่ 4-10 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้แก่ สายพันธุ์ A53, D1, E11, G12, G531, H1 และ J1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ตามลำดับ

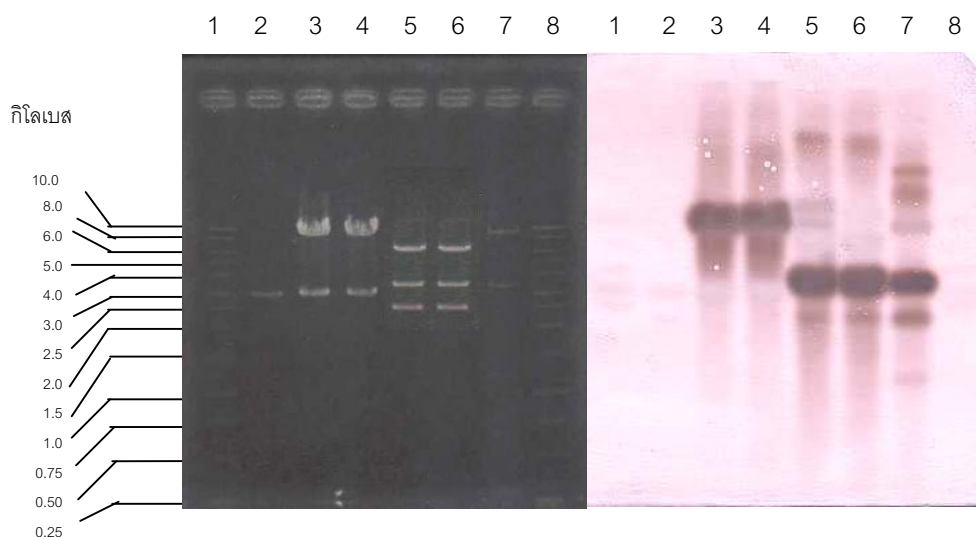
3.4 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามและโคลนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าใน พลาสมิดเวกเตอร์

ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และนำดีเอ็นเอไปแยกขนาดในอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.3 ตัดอะกาโรสเจลให้ครอบคลุมบริเวณประมาณ 9.0 – 10.0 kb ซึ่งเป็นบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตาม สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรส นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปใส่ในพลาสมิด pBLUESCRIPT KS (+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

3.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.4 เข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือก ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ในดีเอ็นเอ

นำของผสมปฏิกิริยาไลเกชันที่ได้จากข้อ 3.4 ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *Escherichia coli* DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการกระจายเชื้อบนอาหาร LB ที่มี กานามัยซิน (50 μ g/ml) เพื่อคัดเลือกยีนเครื่องหมายบน Tn5 นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) และตรวจหาพลาสมิดที่มีขึ้นทรานสโปซอนแทรกสอด อยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับตัวติดตามทรานสโปซอน Tn5

พลาสมิดที่ให้ผลบวก Dot blot hybridization เป็นพลาสมิดที่มีขึ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่ ตั้ง ชื่อพลาสมิดว่า pTEM ตรวจสอบยืนยันพลาสมิดดังกล่าวโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hind*III และ ไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามทรานสโปซอน Tn5 อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.4

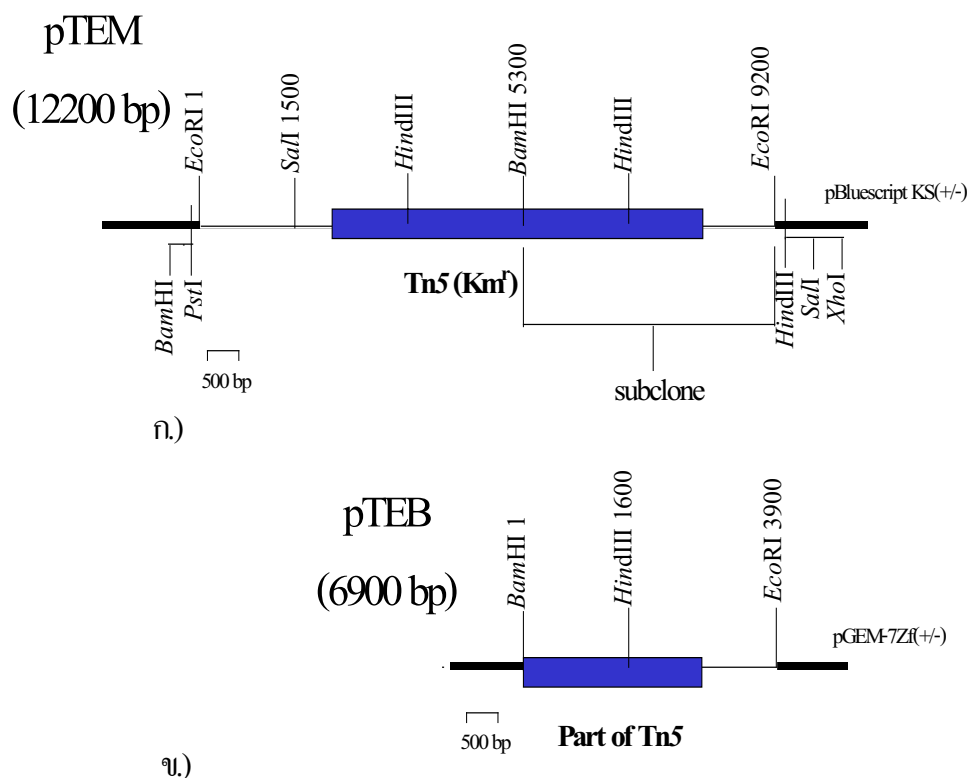


รูปที่ 3.4 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI หรือ *Hind*III

ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 8	1 kb DNA Ladder
ช่องวิ่งที่ 2	pBluescript KS(+/-) ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Eco</i> RI (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 3 และ 4	pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Eco</i> RI
ช่องวิ่งที่ 5 และ 6	pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Hind</i> III
ช่องวิ่งที่ 7	pSUP2021 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Hind</i> III (ตัวควบคุมผลบวก)

จากรูปแสดงให้เห็นว่า pTEM (รูปที่ 3.4 ก) มีชิ้นทรานสโปซอน Tn5 เมื่อตัดด้วย *Hind*III จะให้ผลบวกขนาดประมาณ 3.4 kb เช่นเดียวกับ pSUP2021 และเมื่อตัดด้วย *Eco*RI จะให้ผลบวกขนาดประมาณ 9.2 kb pTEM ที่ได้นั้นยังไม่สามารถนำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ได้เนื่องจากไพรเมอร์ TN5-OE ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะต่อทั้งปลาย 5' และ 3' ของทรานสโปซอน Tn5 ดังนั้นจึงได้ทำการสับโคลน (subcloning) pTEM เพื่อตัดแบ่งครึ่งทรานสโปซอน Tn5 ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก โดยตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส สับโคลนเข้า pGEM-7Zf(+/-) ให้ชื่อพลาสมิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า pTEB (รูปที่ 3.5 ข)



รูปที่ 3.5 แผนที่เรสทริกชันของ (ก) พลาสมิด pTEM และ (ข) pTEB

3.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินจากริคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn5 (TN5-OE: 5'-GGTTCGTTTCAGGACGCTAC-3') ซึ่งมีทิศทางออกจากทรานสโปซอน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คือบริเวณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน ซึ่งเมื่อทรานสโปซอนเข้าไปแทรกอยู่ จะทำให้การย่อยสลายอะซีแนพรีลินบกพร่องไป ได้แสดงลำดับนิว

คลัสเตอร์ที่ได้แสดงในรูปที่ 3.6 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบความเหมือนโดยใช้โปรแกรม BlastX version 2.2.1 (Altschul et al., 1997) ซึ่งจะแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นลำดับกรดอะมิโนไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว มีความเหมือนกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไฮดรอะเลส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ถอดรหัสมาจากยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

	10	20	30	40	50
5'	TTGTGTATAA	GAGTCAG	GAA	TAGGCTCGTT	CGCCAGCCG
	60	70	80	90	100
	TCAGCGTATG	GATGGCGTCC	TGGTTCGCGG	CTTCGATCGC	TCTCATCAGG
	PHNF primer →				
	110	120	130	140	150
	GCGATTGCAG	GCGCAGGGTT	CATGCCGGAG	GCCGTTGCCC	AGCAGGCCCGT
	160	170	180	190	200
	CGTCGTATTG	GGCGCGATGG	CGAAGAAGTC	CTGCACGACC	ATTTTCGTTTCG
	210	220	230	240	250
	GCATGAAATT	GATCCGCCCG	CCCGTCGCCG	CGATCAGTTC	CTTCAGTCCC
	260	270	280	290	300
	TGCGTACGGG	AATACTTCGC	CGAAGTCACG	GTGGGAGCCG	CCTGCGCCAC
	310	320	330	340	350
	TGCCGACCAG	AACTCAAGCG	GAAAGGAGAA	GCGGAAGGCG	CGCGCATTAN
	360	370	380	390	400
	CGTAAGCCAT	GATCGCAAGA	TCGGGGGAACA	GTTCTGAAAT	TCCCCGCGTAA
	410	420	430	440	450
	TAATCGACGG	CCATCCGTGT	CGTCACCGGC	TGCCACATCG	GCAACCCAC
	460	470	480	490	500
	AGCGTCGCGT	CTGCGCCCTG	TTCACGAATA	AACGTCAGTC	GGCGCACGAC
	← PHNR primer				
	510	520			
	CTCATGGCCG	CCTGGCGGTC	GCACCCAC	3'	

รูปที่ 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณที่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 ส่วนที่เป็นตัวอักษรหนาแสดงถึงส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรปกติแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการทำดีเอ็นเอติดตาม AE และลูกศรแสดงถึงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

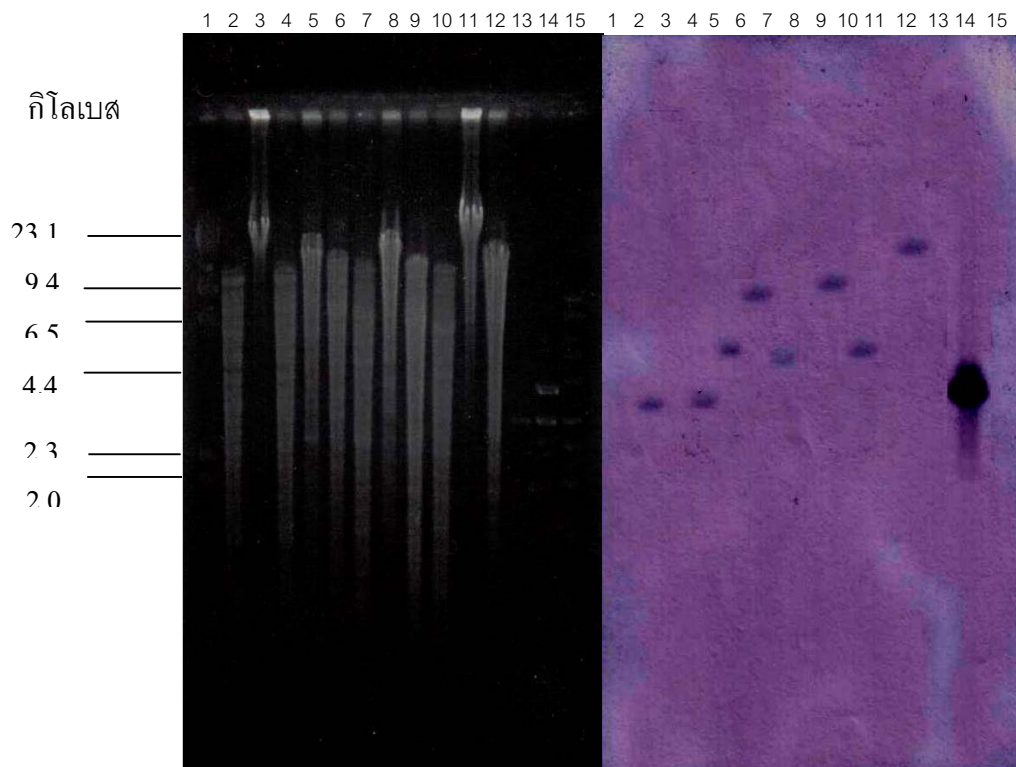
3.7 การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ในข้อ 3.6 แสดงให้เห็นว่าลำดับดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับ Tn5 น่าจะเป็นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินจริง จึงจะทำ DNA-probe จากบริเวณนี้ โดยออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวสองสายได้แก่ forward primer ตั้งชื่อว่า PHNF (5'-TGATGGCGTCCTGGTTC-3') และ reverse primer ตั้งชื่อว่า PHNR (5'-CTGACGTTTATTCGTGAAC-3') เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pTEB เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้จะมีขนาด 430 bp ติดตามผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวด้วย Digoxigenin-dUTP (Roche, Germany) โดยวิธี Random labelling เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า AE-probe

3.8 หาคำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

แยกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ ถ่ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นไนลอน เมมเบรนด้วยวิธี Southern transfer และไฮบริไดซ์กับ AE-probe ในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์เป็นดังที่ได้แสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ

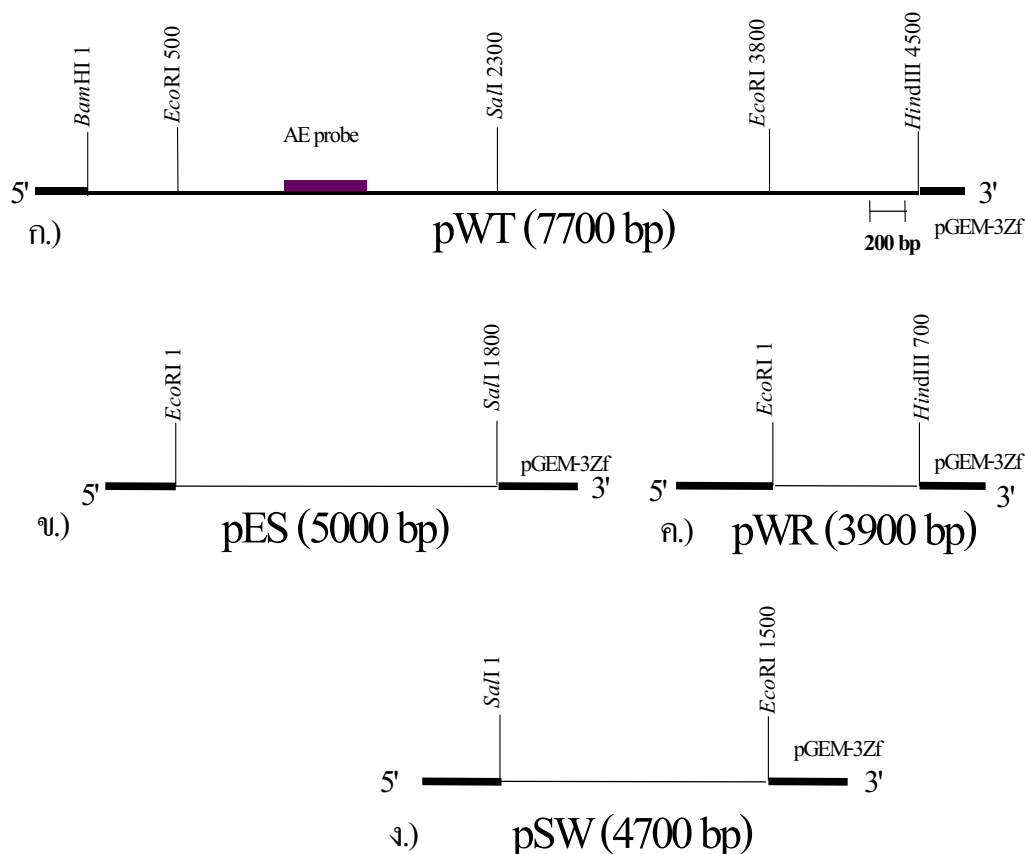
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วย AE-Probe

- | | |
|----------------------|--|
| ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 | Lambda DNA/ <i>Hind</i> III marker และ 1 kb DNA ladder ตามลำดับ |
| ช่องวิ่งที่ 2-12 | ดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ คือ <i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> II, <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> II, <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III, <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Bgl</i> II/ <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I และ <i>Xho</i> I ตามลำดับ |
| ช่องวิ่งที่ 13 | pGEM-7Zf(+/-) ตัดด้วยเอนไซม์ restriction <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI (ตัวควบคุมผลลบ) |
| ช่องวิ่งที่ 14 | pTEB ตัดด้วยเอนไซม์ restriction <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI (ตัวควบคุมผลบวก) |

พบว่าดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ ให้สัญญาณจากการไฮบริดกับ AE-Probe ในขณะที่พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลลบ) ไม่ให้สัญญาณการไฮบริดและพลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส

3.9 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน

ผลไฮบริดเซชันในข้อ 3.8 ทำให้ทราบตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์ CU-A1 จึงได้คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI/HindIII* (ช่องวิ่งที่ 7) และให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม AE ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบสเพื่อการโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 คัดเลือก *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Blue/White selection, Dot blot hybridization และ Southern hybridization ด้วย AE-Probe ตามลำดับ ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pWT (รูปที่ 3.8 ก) จากนั้นสืบโคลน pWT เพื่อให้ได้พลาสมิดต่างๆ คือ pES pWR และ pSW ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ข ค และ ง ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 ก.) ภาพแสดงแผนที่เอนไซม์ restriction ของพลาสมิด pWT และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม AE ในบริเวณขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสืบโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pES (ข.) pWR (ค.) และ pSW (ง.)

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพติลินจากพลาสมิด pWT

เริ่มหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนที่ทราบแล้ว (รูปที่ 5) หรือใช้ universal forward/reverse primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของเวกเตอร์ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดำเนินการโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกใน pWT ดังที่แสดงในรูปที่ 3.9

ORF1 →

```
1 5'GGATCCTGCCATTTTTCGGCGGGCGACTGCACACGATTTCCGGGTCCGACAGGTCCGGT
1  D P A I A S A G D C T R A P G P T G P V

61 GCGGCTGGAAACTGGATGCACGCACTCGACCACGGCACAGTGGCCGGGGCAAATGCAGC
21  R L E N W M H A L D H G T V A G A N A A
flavin binding fold

121 CGGTGGAGACATTGCCTACGAAGCAAAACCCCTCCTTCTGGTCTGAACAATACGATCTTTA
41  G G D I A Y E A K P S F W S E Q Y D L Y

181 CATTACAGGTATCGGCTGGCCGGACCCGGACGCTAGCCGGGTGACACGCCCGCTGGACGG
61  I Q G I G W P D P D A S R V T R P L D G

241 CAACCGGGCACTGGTGGTCGAGATGAAGAACGGACTGATCCAGAGCGCGCTCGGCATCAA
81  N R A L V V E M K N G L I Q S A L G I N

301 TGTGTGCGGTGATATTGCGGCGATACGACGGCTGATCGACCGGCGGATCGAGGTGATCC
101 V S R D I A A I R R L I D R R I E V D P

361 CGTGGCTGTGCGAGACCCCTGAACGCCCTTTCGCGGATATGCTGAAGCAGAAAGTCTGAGA
121 V A V A D P E R P F A D M L K Q K V *

421 CAGGACCAACCCTATGCACGGACAGCCCTGCGCTGGGCGGACTGGATAACACGGCAATAG

481 AATTCAGTTTTACAGAATTCATTTCTTTATTACAGAATTTATTTGCCACATACATCGATG

541 CCGCCTATAGTGATCACGCGGTGCGAGTGCTGGAGGGGAAGAACAGGCATCCGTCATCTC

601 GACACGGCCTTGCGGGCATTGACGATTGTACAAGGCGGGGAGTGAAAAGCGCTTCGCTTG

661 CAGCCGGAACCTGGAGGAGACACCTGGCACTTCCTTGATGACGCAACCGCAGACACACCAT

721 TCCCGGCAATGATCACCCCTTAAAGGGCGGAGCCGAAAGCTCGATTGACGTTCTTGACGT

RBS
781 CCATTGCAAGCGCTCCGGACGACCTGTTGTCGTGGGCGCTTTTTATTTTCGAAGAAAGGTT

ORF2 (acnE) →
841 GAAGACCATGCTCACTGCTGCCGACATCCATGGGATGTACGCCATCATCGCGACCCCGGC
1  M L T A A D I H G M Y A I I A T P A

901 GAAACCCCATGCCGGAAGACTGGACGCCAAGGACACCGTTGATCTTGCCGAAACCGAGCG
19  K P H A G R L D A K D T V D L A E T E R

961 GTTGATCAACAAGCTGATCCTTGACGGTTGCGACGGCCTGATCATTACCGGTACGACGGG
39  L I N K L I L D G C D G L I I T G T T G
(มีต่อหน้าถัดไป)
```


1021 CGAGTGC GCAACGCTGTCCGAGAGCGACTACCGGGCATTTCGTGGACTGCGCACTTTCCAC
59 E C A T L S E S D Y R A F V D C A L S T

1081 CGTCAACCGGCGCATTCCCACCATCGTGGGTGCGACCGCCATGGGCGGCCATGAGGTCGT
79 V N R R I P T I V G A T A M G G H E V V

1141 GCGCCGACTGACGTTTATTTCGTGAACAGGGCGCAGACGCGACGCTGCTGGGGTTGCCGAT
99 R R L T A I R E Q G A D A T L L G L P M

1201 GTGGCAGCCGGTGACGACACGGATGGCCGTCGATTATTACGCGGGAATTTCAGAACTGTT
119 W Q P V T T R M A V D Y Y A G I S E L F

1261 CCCC GATCTTGCGATCATGGCTTACGCTAATGCGCGCGCCTTCCGCTTCTCCTTTCCGCT
139 P D L A I M A Y A N A R A F R F S A P L

1321 TGAGTTCTGGTCGGCAGTGGCGCAGGCGGCTCCCACCGTGACTTCGGCGAAGTATTCCCG
159 E F W S A V A Q A A P T V T S A K Y S R

1381 TACGCAGGGACTGAAGGAACTGATCGCGGCGACGGGCGGGCGGATCAATTTTCATGCCGAA
179 T Q G L K E L I A A T G G R I N F M P N

1441 CGAAATGGTCGTGCAGGACTTCTTCGCCATCGCGCCCAATACGACGACGGCCTGCTGGGC
199 E M V V Q D F F A I A P N T T T A C W A

1501 AACGGCCTCCGGCATGAACCCTGCGCCTGCAATCGCCCTGATGAGAGCGATCGAAGCCCC
219 T A S G M N P A P A I A L M R A I E A R

1561 GAACCAGGACGCCATCCATACGCTGACGGCGGCCATCGGCTGGGCGAACGAGCCTATTCA
239 N Q D A I H T L T A A I G W A N E P I Q

1621 GCCCATGCTGGCCGATGCCGATCTGTTTGC GCAATACAATATCCAGATGGAAAAGACGCG
259 P M L A D A D L A A Q Y N I Q M E K T R

1681 GATCAATGCCGCCGGTTACAGCCAGTGC GGCCCCGTGAGACCCCCCTATCAGGACTTCCC
279 I N A A G Y S Q C G P V R P P Y Q D F P

1741 GGAAGATTATGCCGCGCAGGCCCCGTGAATGCGGCCAGCGCTGGCACCGCATCTGCGATGC
299 E D Y A A Q A R E C G Q R W H R I C D A

1801 CTATGCGGGGAATTTCAAGTTCAAGGACCACCCCTGGGAGACAGCGGGCGAACGGACGGC
319 Y A G N F K F K D H P W E T A G E R T A

1861 CTGAAACGGCAGCCGCGCCACTGCGCGCGGCGCCTTTATGCACAGCCAACTATCTGGAG
339 *

RBS

ORF3 (acnK) →

1921 TAGGTCGATGGGATACATCACGACAGCAGACCGCATGCTGATTGGCGGCGAGCTGGTGA
1 M G Y I T T A D R M L I G G E L V E

1981 AAGCACGAGCGGCGCCTGGGAAGAAACATTCAATCCAGCCGATGAAACCGCAATCGGGCG
19 S T S G A W E E T F N P A D E T A I G R

2041 CGTTTCTGCCGGGACAAGGGAGGATGTGGACCGCGCCGTTGCCGCGAGCCAGGCGGCATG
39 V P A G T R E D V D R A V A A A Q A A W

2101 GCCCGCATGGGCGAGCAAAACACCGAAGGAACGCGGCGAAACCATGCGCGCCTTCGGTGA
59 P A W A S K T P K E R G E T M R A F G E

2161 GAAAATCCGCGCCCGCGCCACGGAATCCTTCATGTCGAGGTTGCCGACACCGGCAACAC
79 K I R A R A T E I L H V E V A D T G N T

2221 CATCACGCCGATGCGCGGAGATGTGCGCCATGCCGTCGACAGTCTCAATTACTATGCCG
99 I T P M R G D V G H A V D S L N Y Y A G

(มีต่อหน้าถัดไป)

2281 CATAGCCACGAATTGAAGGGAGAAACGATACCGGCAACCCCGGATCATCTTCACCTGAC
 119 I A H E L K G E T I P A T P D H L H L T

 2341 CATTGCGAGCCCTACGGCGTCGTGGCGCGGATCGTGCCGTTCAACCACCCCTTGATGTT
 139 I R E P Y G V V A R I V P F N H P L M A

 2401 TGCAGTGGCCAGAACAGCCGCCGCCCTTGCCGCCGGCAACGCCGTCATCGTGAAGCCGCC
 159 A V A R T A A A L A A G N A V I V K P P

 2461 GGAAACCAGCCCGCTATCGGCGATGGTGCTGGCGGAAATCGCCCGGAGGCGCTGCCGCC
 179 E T S P L S A M V L A E I A R E A L P P

 2521 CGGGGTGTTCAACATCGTGACCGGAACAGGCCCTTCGGTTGGTGAAGCCATCGTGCGGCA
 199 G V F N I V T G T G P S V G E A I V R H

 2581 CCCGAAATCAAGCGCATCGCGTTTCATTGGATCGGCAGCCACCGGCCGCGCCATCCAGAG
 219 P E I K R I A **F I G S A A T G** R A I Q R
 NAD⁺ binding fold

 2641 GACTGCGGCAGAGGTGAGCGTCAAGCATGTGACACTGGAGCTTGGCGGCAAGAACCCGAT
 239 T A A E V S V K H V T **L E L G G K N P** M
 Active site of aldehyde dehydrogenase

 2701 GATCGTTTTTCCCGACAATGATCCGGACGAGATTGCGCAAGCCGCGGTCAAGGGAATGAA
 259 I V A P D N D P D E I A Q A A V K G M N

 2761 TTTACCTGGCAGGGCCAGTCCTGCGGCTCGACAAGCCGGTTGATGGTCCACGAAGACCT
 279 F T W Q G Q S C G S T S R L M V H E D L

 2821 TTACGATGCCGTGCTTGAGCGTGTGGCAAACATCGTTGCCAGCCTGCGTGTCGGCGACCC
 299 Y D A V L E R V A N I V A S L R V G D P

 2881 GATGCGGACGACAGCGACATGGGACCGATCAACTCCGCCGGGCAGTATCGCAAGGTCAT
 319 M R D D S D M G P I N S A G Q Y R K V M

 2941 GGGCTATATCGAAAGCGGCAACGCCGAAGGCGCCCGGCTTGTGACAGGCGGCAACCGGCC
 339 G Y I E S G N A E G A R L V T G G N R P

 3001 GGATGGTCAAGCCTTCGCCAAGGGTTACTGGGTGAGACCCACCGTCTTTGCCGATGTCGA
 359 D G Q A F A K G Y W V R P T V A A D V D

 3061 TCCACATATGCGCATCTGGCGGGAAGAGATTTTGGACCGGTTCTCTCCGTCAGCAAATG
 379 P H M R I W R E E I A G P V L S V S K W

 3121 GCACTCCGTCGATGAGGCGATCCGGCTTGCGAACGGTGTCGAATATGGCCTGACGGCGTC
 399 H S V D E A I R L A N G V E Y G L T A S

 3181 GATCTGGACAAAGGATATCAAGAACGCGCTCAACACGGCACGTGCGATCGACGCTGGCCA
 419 I W T K D I K N A L N T A R R I D A G H

 3241 TATCTGGATCAACGGTGTTGGCCCGCATTACCTCGGCGTGCCCTATGGCGGCATGAAGAA
 439 I W I N G V G P H Y L G V P Y G G M K N

 3301 CAGCGGCGTCGGGCGCGAAGAGGGCATCGAGGAGATGCTGAGCTACACCGAAACCAAGGT
 459 S G V G R E E G I E E M L S Y T E T K V

 3361 TCTCAATATCGTCCTG**TGA**CACCTAAAGCAGTTCATCAAAATTGGAAACCGGTTTTGCT
 479 L N I V L *****

 3421 GGAATTTTGTA AAAACAAAGAGATGGAGCATATCCGCAAGCGGGAGGCGCACCGGAAAT

(มีต่อหน้าถัดไป)

ORF4 →

1 RBS M P D H I K Q T I S E A
3481 GCTCCGGAATGCAGGGAGTTCATACCATGCTGACCACATCAAACAGACCATCAGCGAGG

13 D L R A A G A S E P L P D P A L I A D L
3541 CGGATCTGAGGGCTGCGGGCTTTTCCGAACCGCTTCCCGACCCGGCCCTGATCGCTGATC

33 V A A N H I L F D Q G V V D A F G H V S
3601 TCGTCGCGGCCAATCATATCCTGTTTCGATCAGGGCGTGGTCGATGCGTTCGGGCATGTCA

53 V R H D K Q Q D R Y L L A R N M A P G Q
3661 GCGTCCGTCACGACAAACAGCAGGACCGCTACCTTCTGGCGCGCAACATGGCACCGGGTC

73 V S A D D I I E F T F D G E A V N G R E
3721 AGGTGAGCGCCGACGACATCATCGAATTCACCTTCGATGGCGAGGCGGTGAATGGCCGGG

93 R R V Y L E R F I H A E L Y R A R P D V
3781 AGCGGCGCGTCTATCTCGAACGGTTCATCCATGCGGAACTCTACCGCGCAAGGCCGGATG

113 I A V V H S H S H S I L P L T I S K S V
3841 TGATCGCTGTCGTTACAGCCATTTCGATTCCATTCTGCCGCTGACCATCTCCAAATCGG

133 R L R S V A H M A G F I G Q D A P L F E
3901 TGCGCCTGCGCTCCGTTTTTCATATGGCCGGTTTCATCGGTGAGGACGCACCGCTTTTCG

153 I R D H G G P A T D L L I S N S E L G H
3961 AGATTGCGGATCATGGCGGACCGGCAACCGACCTGCTGATCAGCAACAGCGAACTGGGCC

173 A L A A C C G E R N I V L M R G H G S T
4021 ACGCGCTGGCCCGTGCTGCGGAGAGCGGAACATCGTGCTGATGCGCGGACATGGTTCGA

193 V V A D S L P R A V Y R A V Y A E L N A
4081 CCGTCGTCGCCGATTCCCTGCCAAGAGCCGTTTACCGTGCCGCTCTACGCGGAACTGAATG

213 R Y Q C D A I G L G D V E Y L T E A E C
4141 CACGCTACCAGTGTGACGCCATCGGGCTGGGCGATGTGCAATATCTGACCGAAGCCGAAT

233 E T S V R N V E A Q W H R P W A L W K E
4201 GCGAAACCAGCGTCAGAAACGTGGAGGCGCAGTGGCACCGTCCTTGGGCGCTGTGGAAGG

253 Q A A E R R A G *
4261 AGCAGGCAGCCGAACGCCGTGCCGGAATGATGGCAGCCATCATCGTGCCGCGCGCAGGCG

RBS ORF5 →

4321 CGCGATAACAATTCAAGCAACATGAGAGGACATCATGGTAATCGTCTGGATGAAAAAGT
1 M G N R L D E K V

4381 GTGCGTCATACCGGCGCGGCGCAAGGGATAGGACAGGGCTGCGCACTCGAAATGGCGGT
10 C V I T G A A Q G I G Q G C A L E M A V

4441 TCAGGGCGGCAGGATCGTTGTCACTGACCGCAATGTCGCTGGCGGCGAGGAAACCGTTTCG
30 Q G G R I V V S D R N V A G G E E T V R

4501 GCAAAATCGTCGAGCTGGGCGGTGAGGCAATCTTCGTTGCCTGTGACGTGCGGAACCGCGA
50 Q I V E L G G E A I F V A C D V R N R D

4561 TGATCTCGAAGCTT 3'
70 D L E A

รูปที่ 3.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp ลูกศรแสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน ตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย * แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาแสดงบริเวณที่เป็น putative ribosome binding site (RBS) กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดเดียวกันแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงินและกรดอะมิโนที่อยู่ต่างกรอบอ่านรหัสเปิดแสดงด้วยอักษรสีแดง กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมิด pWT ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 4574 bp ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.9 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank ได้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 138 ของ ORF1 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) เท่ากับ 33% ORF1 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่กรดอะมิโนตัวแรกของ ORF

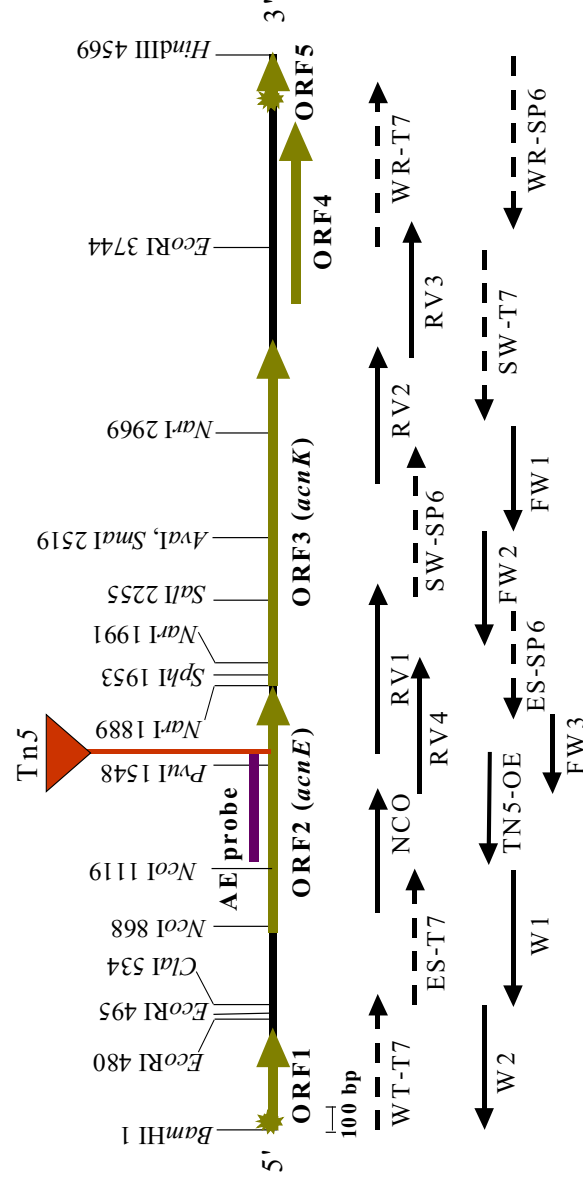
2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 338 ของ ORF2 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือนกับไฮเดรราเทส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% ให้ชื่อ ORF2 ว่า *acnE*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 483 ของ ORF3 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% ให้ชื่อ ORF3 ว่า *acnK*

4. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 260 ของ ORF4 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายแอดดูซิน (similar to adducin) ที่ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *MesoRhizobium loti* (Kaneko และคณะ, 2000) เท่ากับ 38% ORF4 อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5

5. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 73 ของ ORF5 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 43% ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัสที่ตำแหน่ง สุดท้ายของ ORF

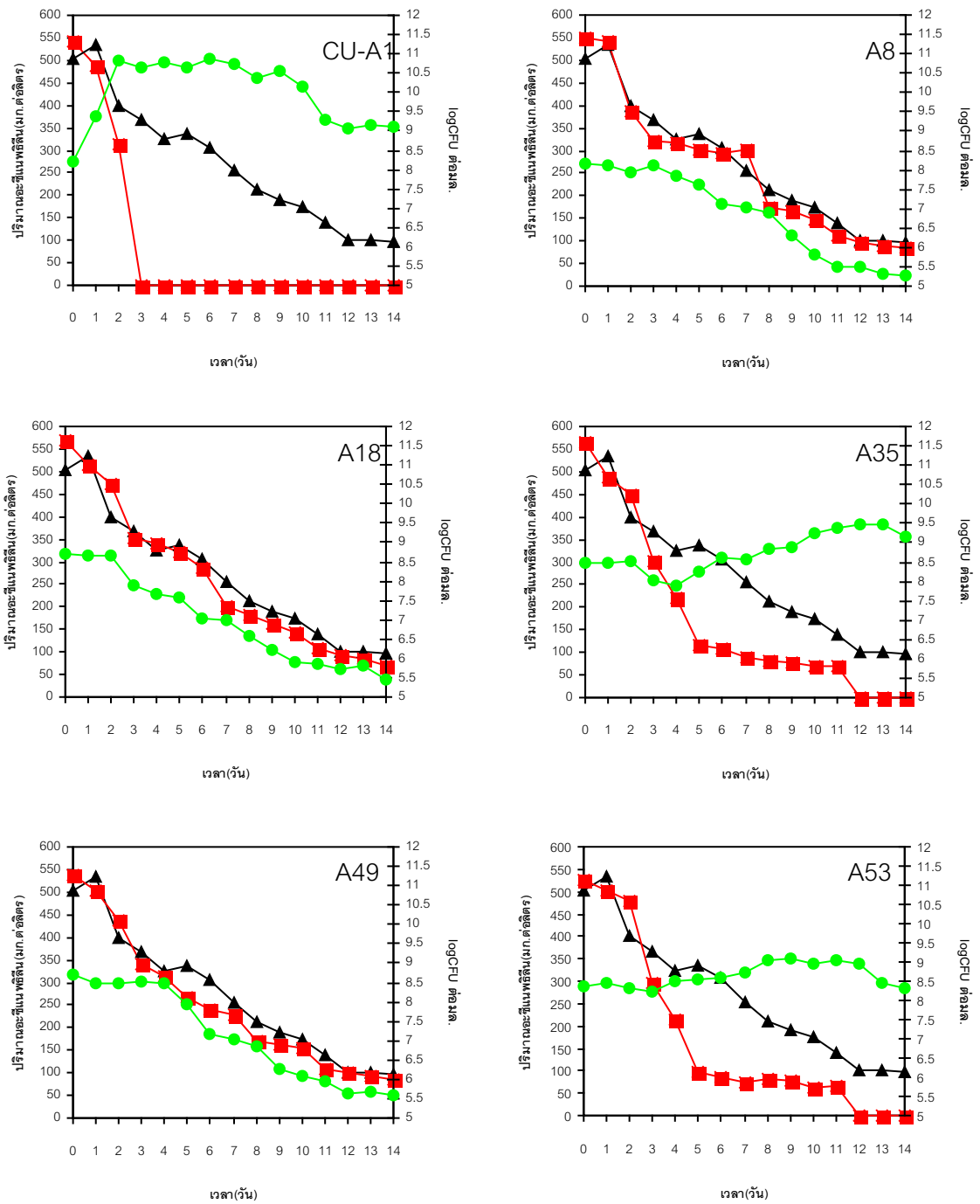
นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็ตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.10 จากรูปนอกจากจะแสดงบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT โดยสมบูรณ์แล้วยังได้แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่เป็น ORF ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและแสดงตำแหน่งที่ทรานสโพซอน Tn5 แทรกสอดในสายพันธุ์กลาย E11 ด้วย



รูปที่ 3.10 แผนที่เรสทริกชันของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม AE ตำแหน่งสอดแทรกของทรานสโปซอนในสายพันธุ์กลาย E11 และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตัวต่างๆตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย ➡ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ ➡ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย 🌟 แสดง ORF ที่ยังไม่สมบูรณ์

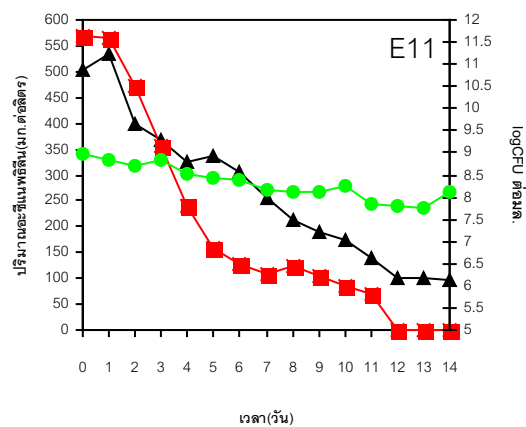
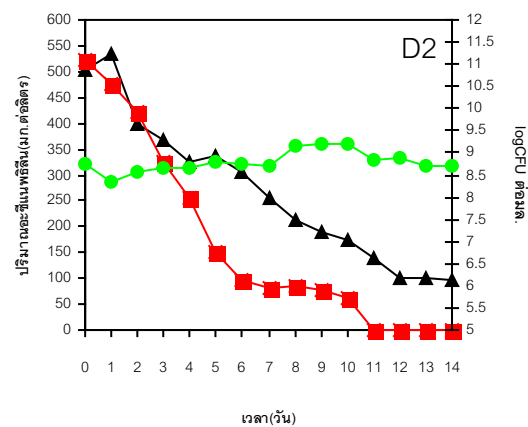
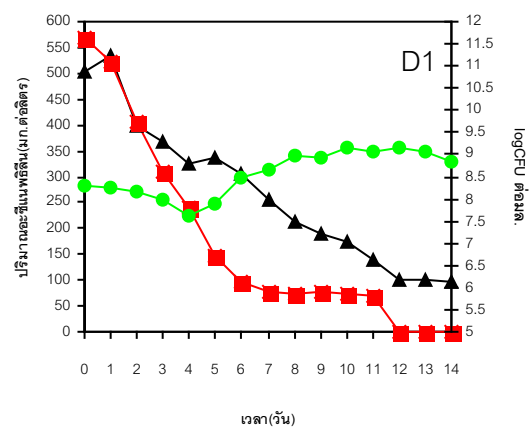
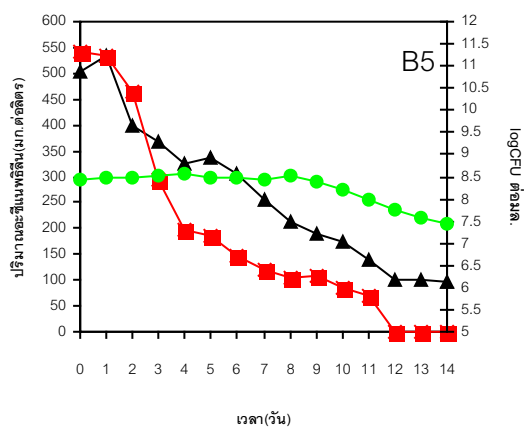
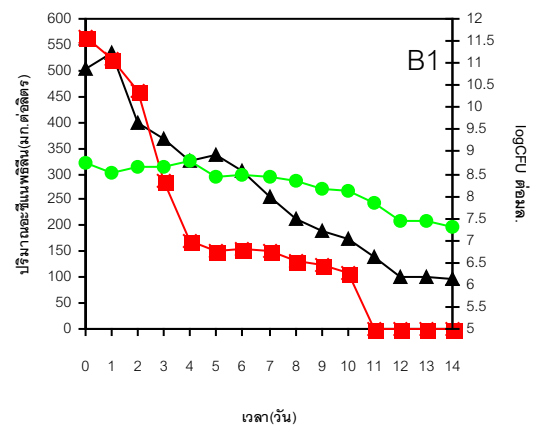
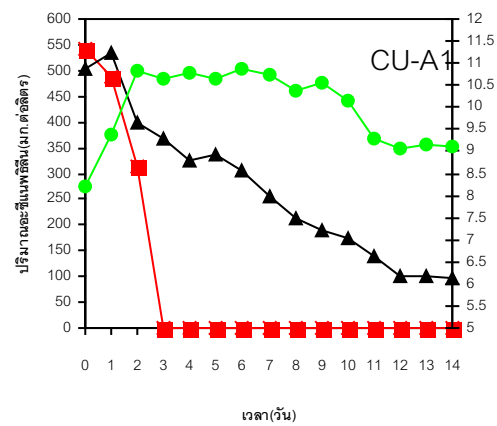
3.11 วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 นำสายพันธุ์กลายทั้งหมด 18 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีน ความเข้มข้น 600 มก./ลิตร เป็นเวลา 14 วัน หาปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทและวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนด้วย HPLC วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count พบว่าสายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนจนถึงระดับที่ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่ได้ด้วย HPLC ภายในระยะเวลา 3 วัน ของการเลี้ยงเชื้อและเชื้อมีการเจริญที่สัมพันธ์กับปริมาณอะซีแนพริลีนที่ลดลง ในขณะที่สายพันธุ์กลายแต่ละชนิดมีรูปแบบในการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีนแตกต่างกันไปจากสายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.11ก ถึง 3.11ง



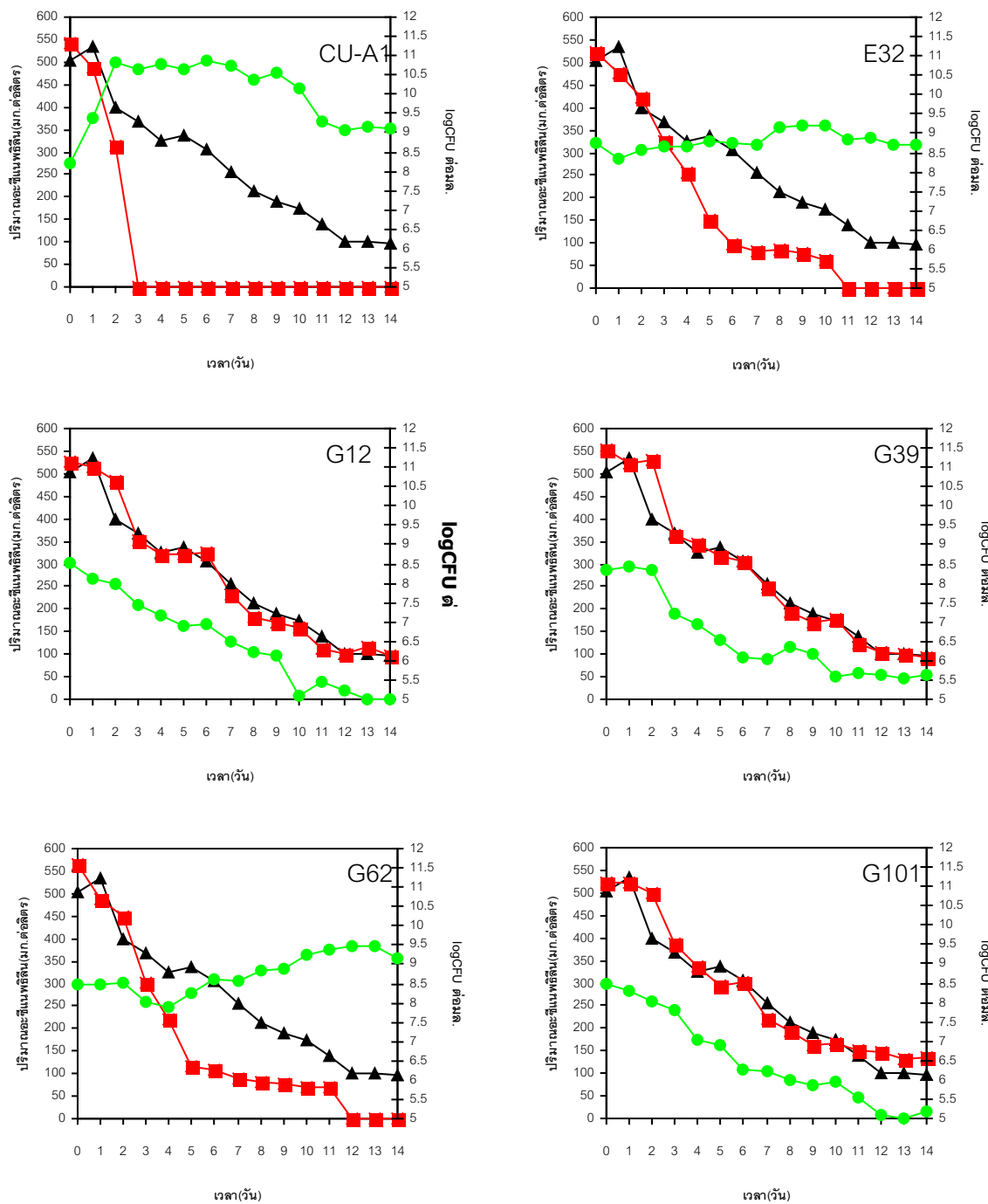
- ▲ ปริมาณอะซีแนพรีลินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพรีลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 3.11 ก. การเจริญของสายพันธุ์กลาย A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



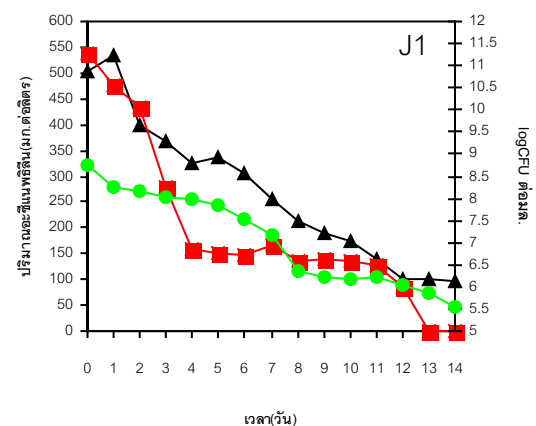
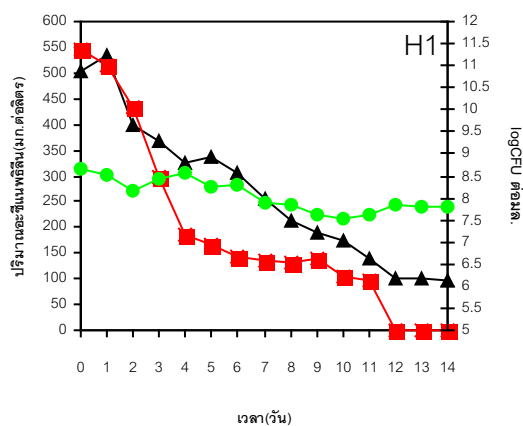
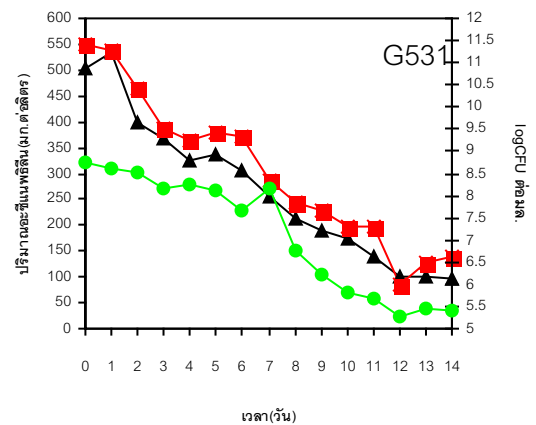
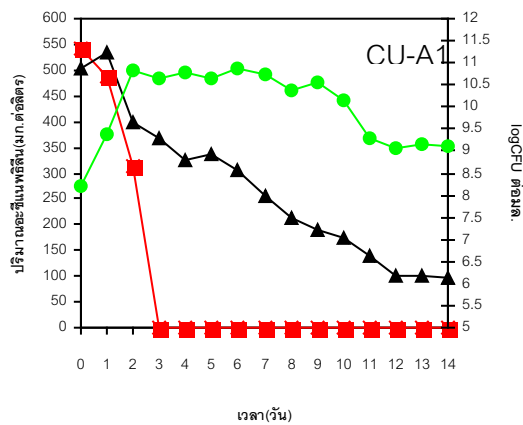
- ▲ ปริมาณอะซิแนฟิธินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซิแนฟิธินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 3.11 ข. การเจริญของสายพันธุ์กลาย B1, B5, D1, D2 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซิแนฟิธินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



- ▲ ปริมาณอะซีแนฟิธินในชุดควบคุมที่ไม่ได้มีเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนฟิธินในชุดทดลองที่ได้มีเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ได้มีเชื้อ

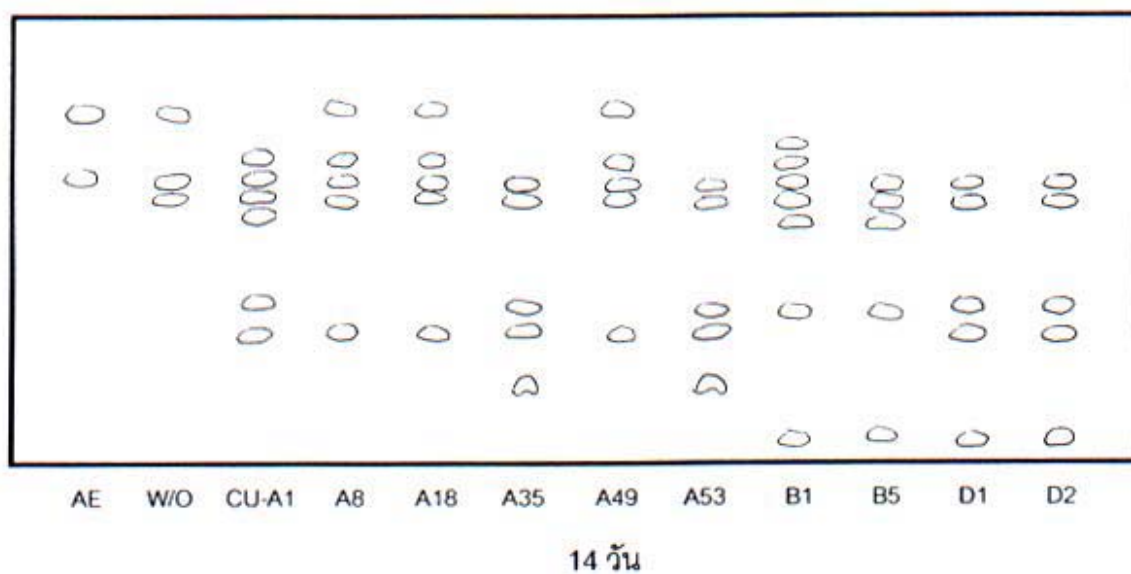
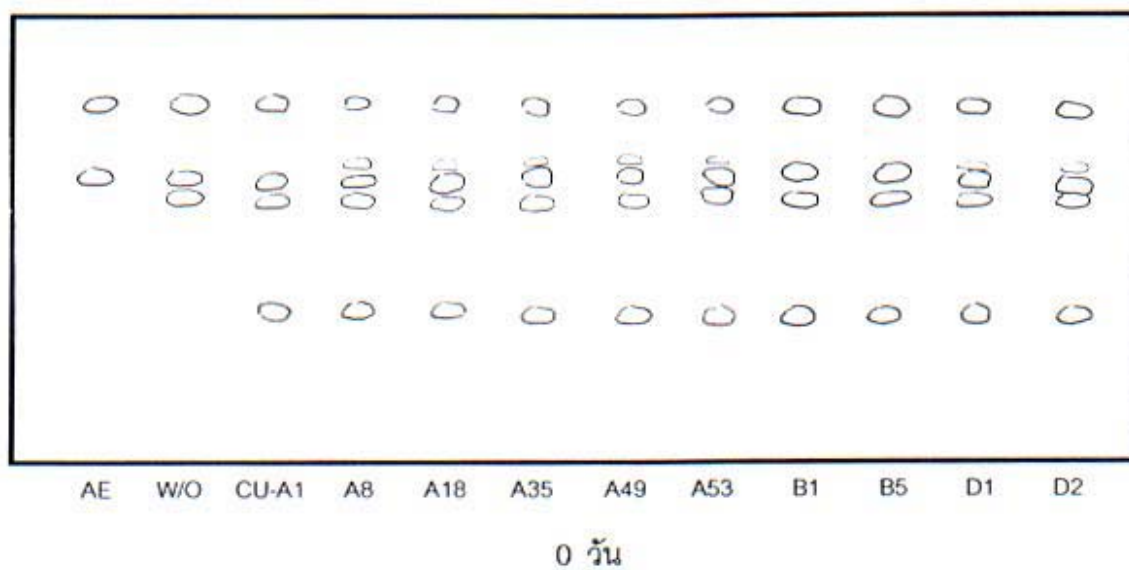
รูปที่ 3.11 ค. การเจริญของสายพันธุ์กล้วย E32, G12, G39, G62 และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนฟิธินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



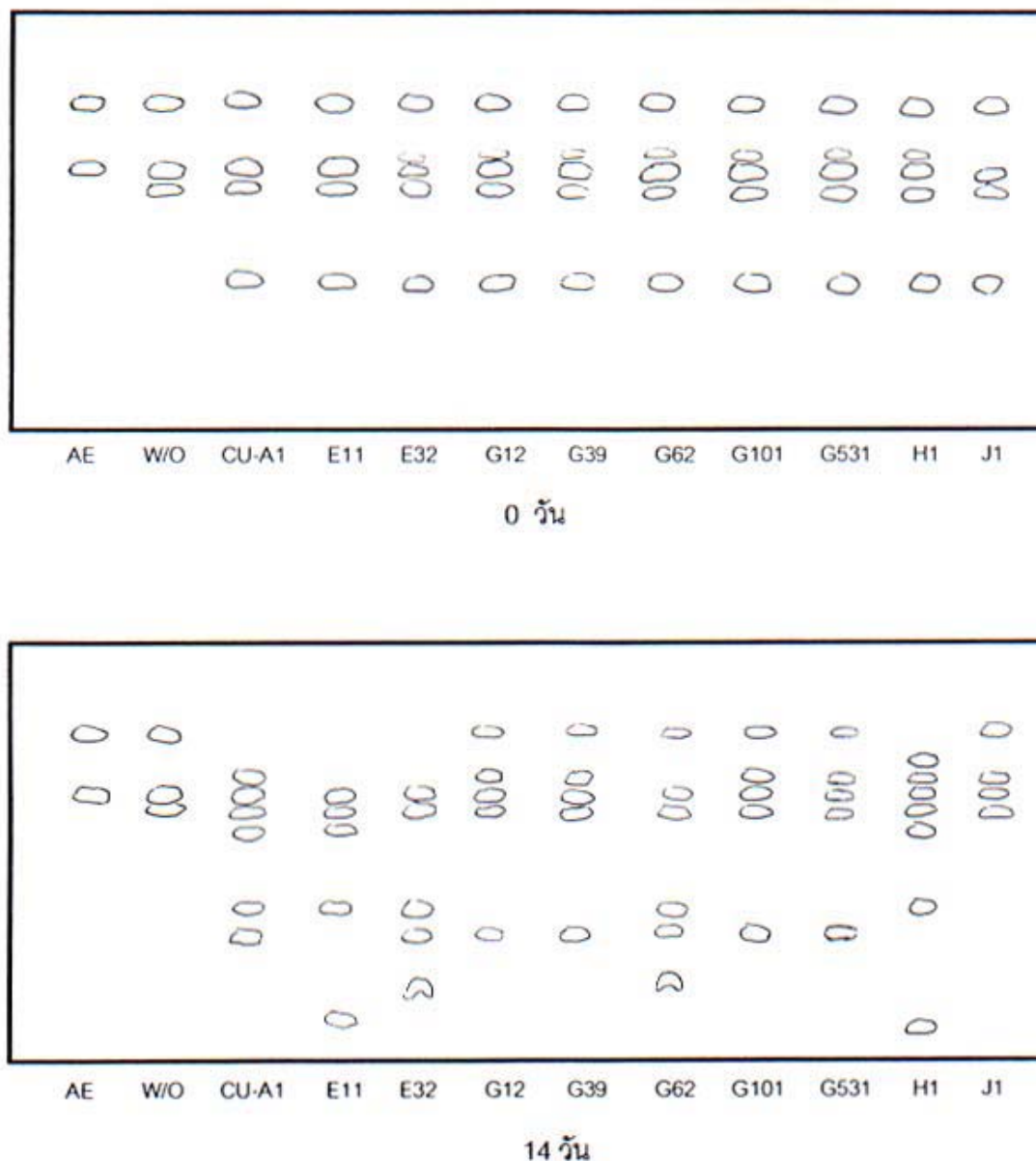
- ▲ ปริมาณอะซีแนพริลินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 3.11 ง. การเจริญของสายพันธุ์กล้วย G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

นำส่วนสกัดเอธิลอะซีเตทที่ได้ข้างต้น มาวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ โทลูอีน:1,4-ไดออกเซน:กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมโดยสายพันธุ์ CU-A1 กับสายพันธุ์กล้วยแต่ละชนิด หลังเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.12 ก. และ ข. พบว่าแต่ละสายพันธุ์กล้วยมีการสะสมสารมัธยันต์ที่ค่อนข้างแตกต่างกัน และพบว่ามีสารมัธยันต์หลายชนิดที่แตกต่างจากชนิดที่สะสมโดย *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 3.12 ก. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธินในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิน ความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนพธิน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

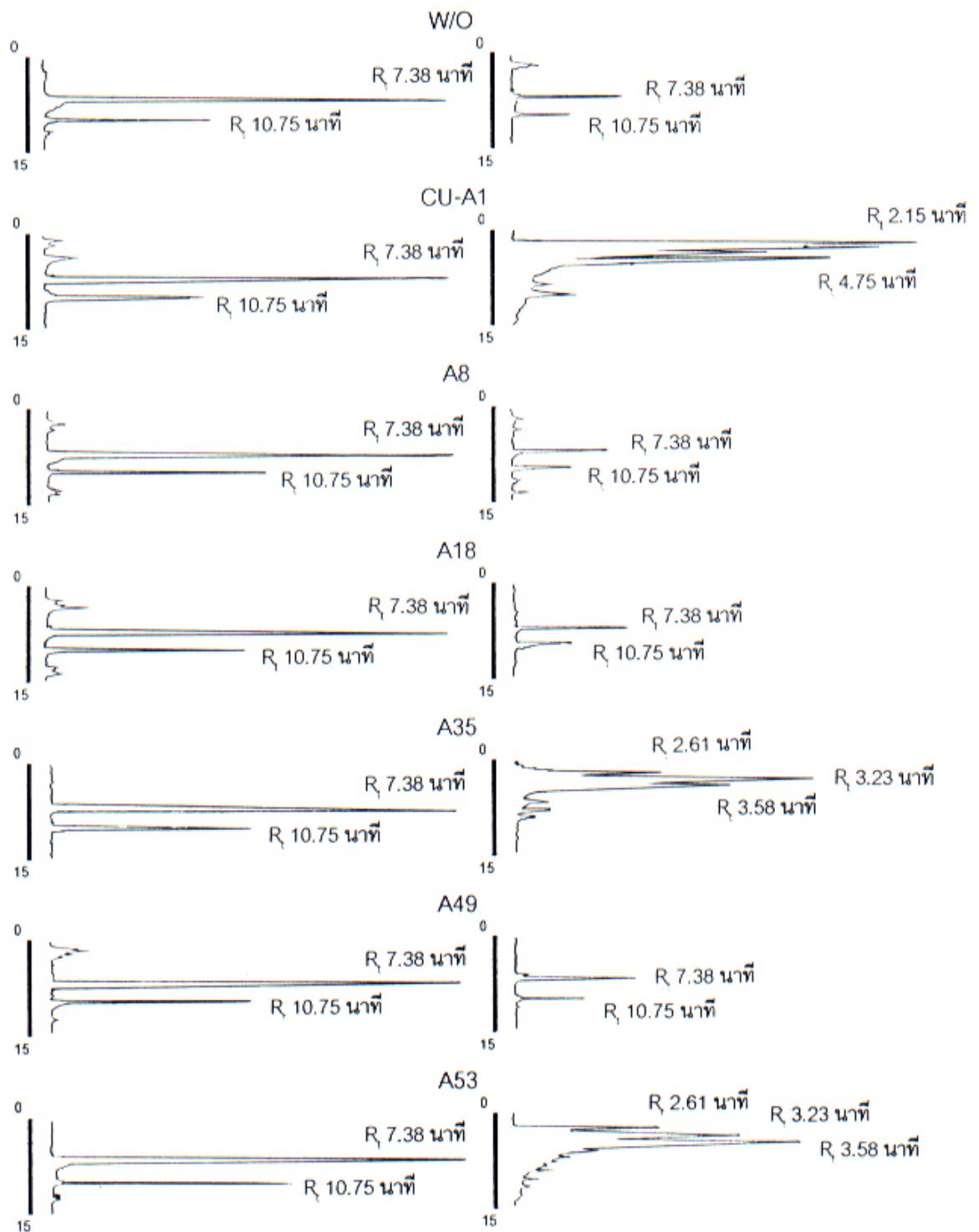


รูปที่ 3.12 ข. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. E11, E32, H1, J1, G12, G39, G62, G101 และ G531 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟทาลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนฟทาลีน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดยสายพันธุ์กลาย ที่เวลา 0 ถึง 14 วัน (ไม่แสดงข้อมูล) เปรียบเทียบ HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดยสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ CU-A1 ในวันที่ 14 ดังแสดงในรูปที่ 3.13 ก. ถึง 3.13 ค. พบว่าสายพันธุ์ CU-A1 ย่อยอะซีแนฟทาลีนแล้วปรากฏ peak ของสารมัธยันต์หลายชนิด ขณะที่สายพันธุ์กลายหลายสายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ A35, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, H1, J1 และ G62 สะสมสารมัธยันต์ที่ปรากฏยอดที่ค่า retention time ต่างจากที่พบในสายพันธุ์เดิม

วันที่ 0

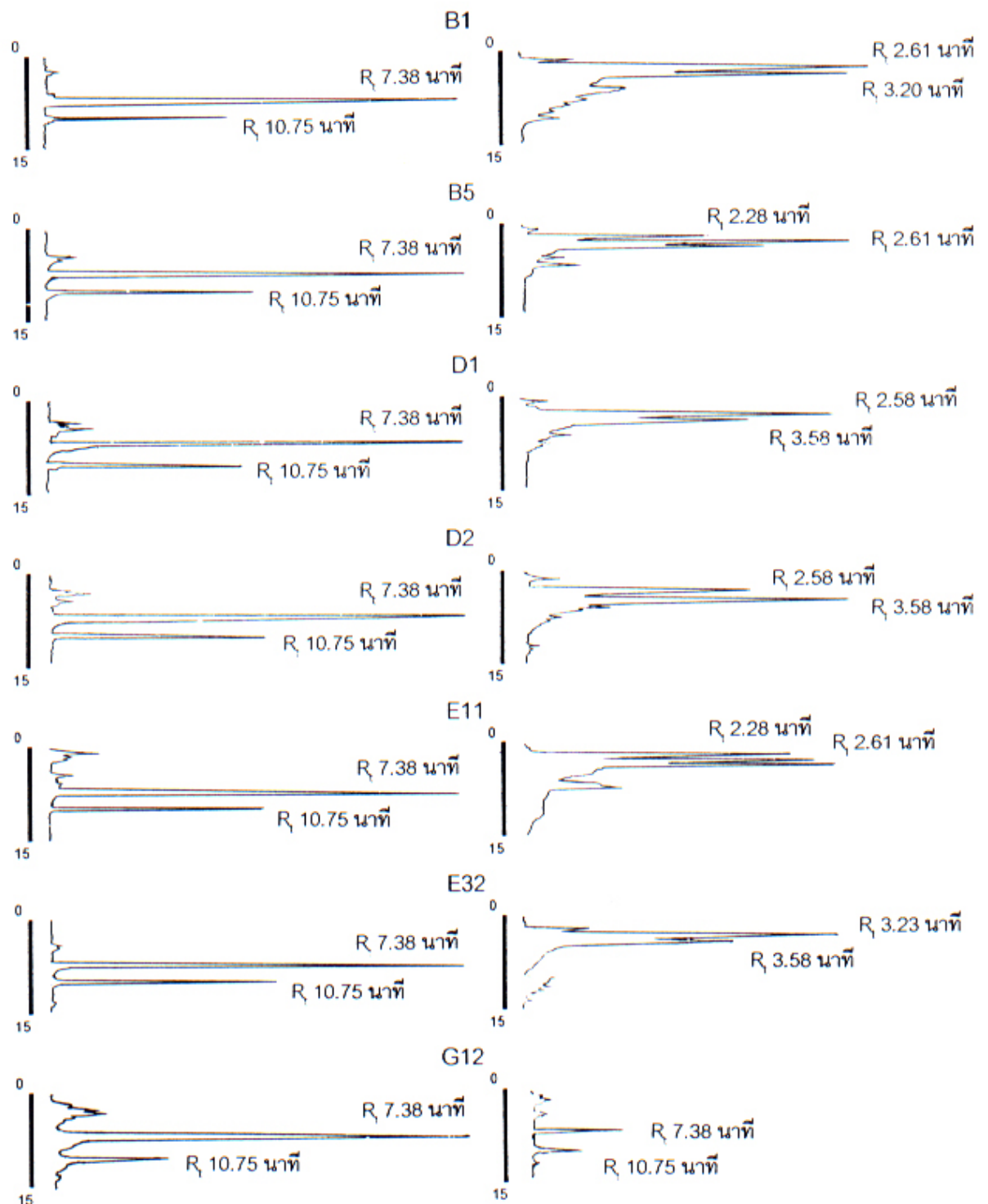
วันที่ 14



รูปที่ 3.13 ก. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพทิลีน)

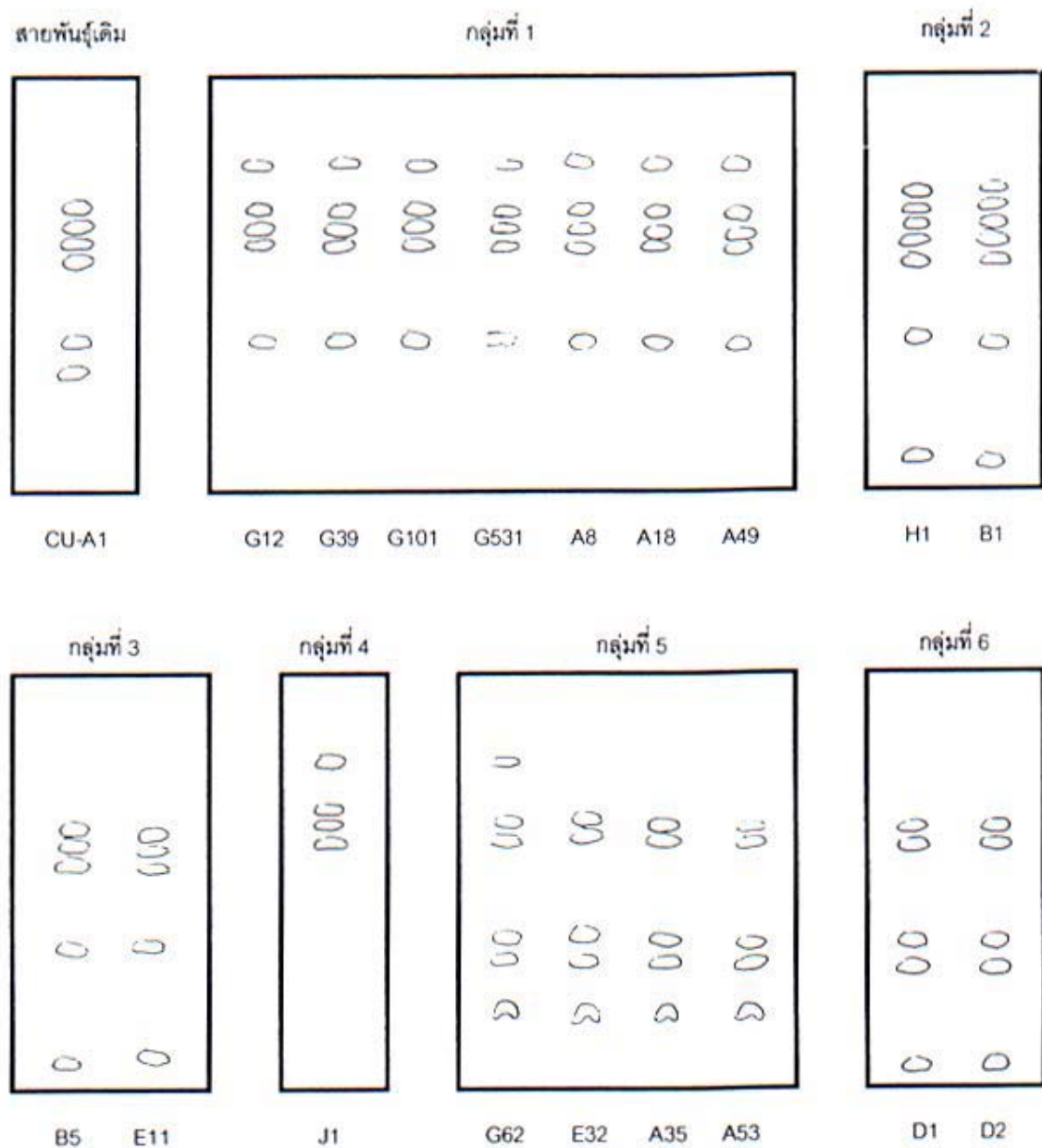
วันที่ 0

วันที่ 14



รูปที่ 3.13 ข. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. B1, B5, D1, D5, E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟทาลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนฟทาลีน)

จากรูปแบบการเจริญและความสามารถของสายพันธุ์กลายทั้ง 18 สายพันธุ์ในการออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนไปเป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM สามารถจำแนกสายพันธุ์กลายทั้งหมดออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามรูปแบบของการเจริญและผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมโดยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลาย 18 สายพันธุ์ ตามรูปแบบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในวันที่ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. ตามรูปแบบการเจริญและการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพติลิน

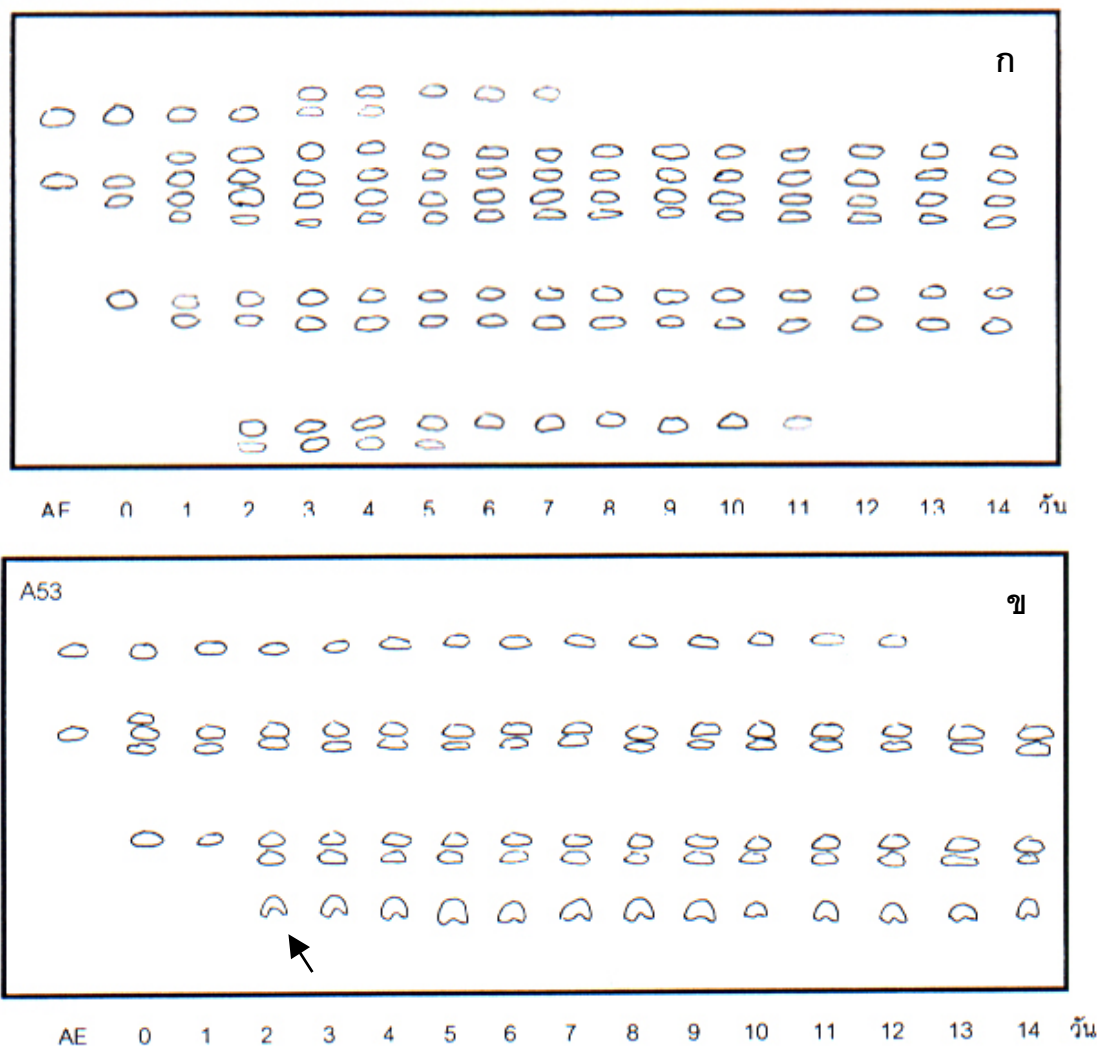
กลุ่มที่	สายพันธุ์กลายของ <i>Rhizobium</i> sp.	ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีอะซีแนพติลินเป็นแหล่งคาร์บอน ในเวลา 14 วัน
1	G12, G39, G101, G531, A8, A18, A49	เจริญไม่ได้
2	H1, B1	เจริญไม่ได้
3	B5, E11	เจริญไม่ได้
4	J1	เจริญไม่ได้
5	G62, E32, A35, A53	เจริญได้ช้า
6	D1, D2	เจริญได้ช้า

3.12 แยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพติลินโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในขั้นตอนนี้ จะทำการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพติลินโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยได้เลือกสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 5, 2 และ 3 ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามลำดับซึ่งสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ชนิดนี้ สะสมสารมัธยันต์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1 ในปริมาณค่อนข้างสูง การแยกสารมัธยันต์ทำได้โดยเลี้ยงสายพันธุ์กลายดังกล่าวในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพติลินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 14 วัน สกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์ตามวิธีในข้อ 3.11 จากนั้นทำสารมัธยันต์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี พิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปคโตรเมทรี (MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.12.1 การแยกสารมัธยันต์ A53

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอะซีแนพติลินเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพติลินดังแสดงในรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.15 TLC โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ CU-A1 (ก) และ A53 (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 ถึง 14 วัน (AE คืออะซีแนพธิลีน) ลูกศรแสดงสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1

จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 ดังแสดงโดยลูกศรในรูปที่ 3.15 ข และไม่พบว่าการสะสมเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ A53 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.16 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยอะซีแนพธิลีนเป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เฮกซะอีเตทในเฮกเซน เพิ่มความเข้มข้นของเฮกซะอีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ