

การชี้บ่งยีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสของเชื้อ *Burkholderia cepacia* ที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไอธอน ซึ่งคัดแยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรม เขตคลองสาม กรุงเทพมหานคร เริ่มทำโดยทดลองสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษาดังกล่าวเพื่อหาว่ายีนอยู่บนพลาสมิดหรือไม่ แต่ไม่พบพลาสมิด ต่อมานำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาตรวจหายีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสด้วยเทคนิคปฏิกิริยาอูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สามารถย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไอธอน (*mpd*) ในเชื้อ *Plesiomonas* sp. M6 ที่เคยมีรายงานไว้ พบว่ายีนส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 989 bp เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ววิเคราะห์หาส่วนของ open reading frame (ORF) พบส่วนของ ORF ที่ไม่สมบูรณ์ขนาด 987 bp และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 329 ตัว จึงทดลองทำ PCR อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ชุดใหม่ที่ออกแบบจากบริเวณที่ไกลออกไปจากไพรเมอร์ชุดแรกเพื่อให้แน่ใจว่าจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมยีนที่สมบูรณ์ พบว่ายีนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 1404 bp พบส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์, ribosome binding site, รหัสเริ่มต้น และรหัสหยุด ที่ตำแหน่ง 31-80, 88-91, 103, และ 1098 ตามลำดับ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสที่สมบูรณ์อยู่บริเวณตำแหน่งที่ 103-1098 ในขณะเดียวกัน ได้ทำการตรวจหายีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสจาก genomic library ของเชื้อตัวนี้โดยใช้ยีนดีเอ็นเอขนาด 989 bp เป็นโพรบสำหรับเทคนิค Southern hybridization พบ hybridization signal บริเวณยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 kb บนดีเอ็นเอจีโนมที่ตัดด้วย *Pst*I จึงทำการโคลนยีนดีเอ็นเอดังกล่าวในดีเอ็นเอพาหะ pBluescriptII SK(+) แล้วคัดกรองรีคอมบิแนนท์โคลนที่มียีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสด้วยเทคนิค colony hybridization และ dot blot hybridization ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสที่สมบูรณ์ตรวจหาได้จากการทำ PCR และพบส่วน ORF ที่สมบูรณ์ขนาด 996 bp แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 331 ตัว ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้มีความเหมือนกับยีน *mpd* ของเชื้อ *Plesiomonas* sp. M6 คิดเป็น 99% และ 98% ตามลำดับ และเหมือนกับยีน organophosphate pesticide hydrolase ของ *Ochrobactrum* sp. mp-3 คิดเป็น 99% และ 99% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างจากยีน *opd* ของเชื้อ *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพียง 2% และ 10% ตามลำดับ แสดงว่ายีนเมทธิลพาราไอธอนไฮโดรเลสที่ได้อยู่ในกลุ่มของยีน *mpd* ซึ่งมีความแตกต่างจากยีนในกลุ่ม *opd*

K 44401204 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : METHYL PARATHION HYDROLASE GENE/ *Burkholderia cepacia*

SAOWALUCK WONGTHIANLAI : IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF METHYL PARATHION HYDROLASE GENE FROM *Burkholderia cepacia*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. JESDAWAN WICHITWECHKARN, ASST. PROF. PITTAYA LIEWSAREE AND ASST. PROF..KALYANEE JIRASRIPONGPUN. 120 pp. ISBN 974-464-644-6

The identification of methyl parathion hydrolase gene was studied in methyl parathion-degrading *Burkholderia cepacia* isolated from agricultural area at Talingchan, Bangkok. No plasmid was found after trying to isolate by various methods. A DNA fragment was identified for methyl parathion hydrolase gene by polymerase chain reaction (PCR) using the primers designed from nucleotide sequence of methyl parathion hydrolase gene (*mpd*) in *Plesiomonas* sp. strain M6 reported. The 989 bp amplified fragment was obtained and its nucleotide sequence was determined and found to contain an incomplete ORF of 987 bp encoding for 329 amino acids. PCR was performed again using a new set of primers designed from the sites further away from the previous ones to ensure the coverage of complete gene. The 1404 bp fragment was obtained and analyzed. Promoter-like sequence, ribosome binding site, start codon, and stop codon were found to locate at positions 31-80, 88-91, 103, and 1098, respectively. The region ranging from 103 to 1098 was found to contain the complete sequence of the methyl parathion hydrolase gene. Another approach was also performed at the same time to identify methyl parathion hydrolase gene from genomic library of this *Burkholderia cepacia*, using the 989 bp fragment as a probe for Southern hybridization. The genomic DNA digested by *Pst*I showed hybridization signal at around 2 kb fragments. These fragments were then cloned into pBluescriptII SK(+). The recombinant clones were screened for those containing methyl parathion hydrolase gene by colony hybridization and dot blot hybridization. The complete nucleotide sequence of methyl parathion hydrolase gene was obtained by PCR method and was found to contain a complete ORF of 996 bp in length, encoding for 331 amino acid residues. The nucleotide and amino acid sequences of this methyl parathion hydrolase gene are 99% and 98% homologous to those of *Plesiomonas* sp. strain M6, and are 99% and 99% homologous to those of *Ochrobactrum* sp. mp-3. However, the nucleotide and amino acid sequences of this methyl parathion hydrolase gene are only 2% and 10% homologous to *opd* gene of *Flavobacterium* sp. ATCC 27551. This indicate that methyl parathion hydrolase gene studied here belongs to *mpd* and not *opd* gene group