

บทที่ 4

ผลการทดลอง

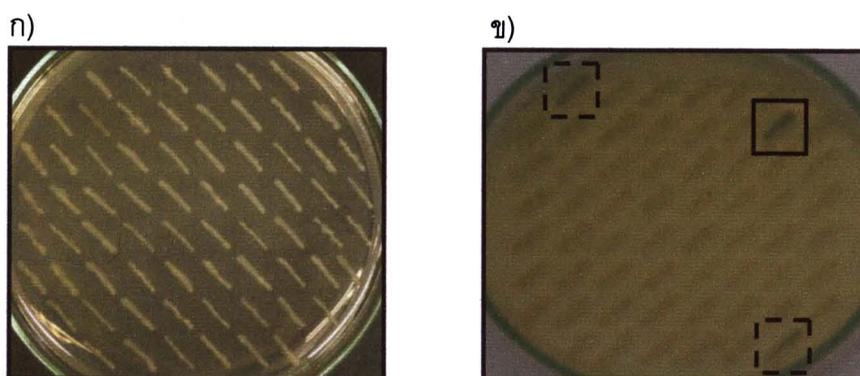
4.1 แยกยีนอะซีแนพทีนออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2

4.1.1 การคัดเลือกโคลนที่มียีนออกซิจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอ

สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 จากชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4-6 กิโลเบส ที่ตัดด้วย *EcoRI* ด้วยวิธีการสร้างห้องสมุดยีนบางส่วน (partial gene library) โดยหลักการโคลนแบบ Shot-gun และคัดเลือกโคลนโดยใช้วิธีของ Ensley และคณะ (1983) ทั้งนี้ได้ทำการทดลองยืนยันการทำงานของออกซิจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกในเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อน โดยผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4.1 ดังนั้นจึงสามารถใช้สมบัติการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกของออกซิจีเนส มาใช้ในการคัดเลือกโคลนที่บรรจุยีนออกซิจีเนสจากสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอได้ โดยในการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอได้เพิ่มพลาสมิด pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนประมวลผลเฟอร์ริดอกซินและเฟอร์ริดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ P2 เพื่อช่วยให้ออกซิจีเนสสามารถทำงานได้สมบูรณ์

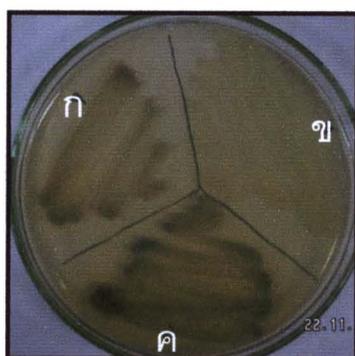


รูป 4.1 ภาพ ก) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่ไม่ได้วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ และ ภาพ ข) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ



รูป 4.2 ภาพ ก) ห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ก่อนวางอินโดล และ ภาพ ข) ห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 หลังวางอินโดล โดยโคลนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมเส้นประ (□) แสดงโคลนควบคุมผลบวก (*E.coli* JM109 ที่มี pUArhA1A2 และ pSA3A4) และโคลนที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมเส้นทึบ (□) แสดงโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอที่ให้ผลบวก

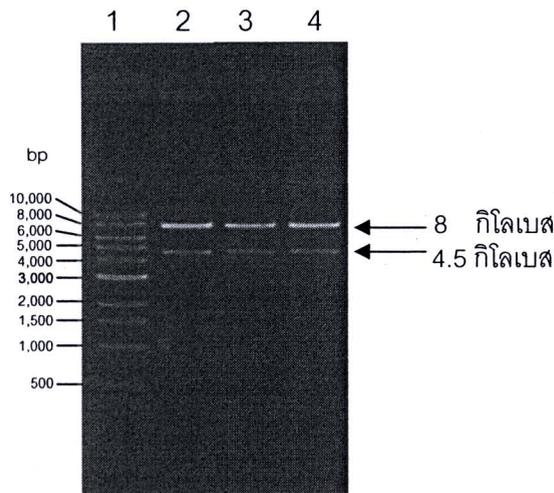
ผลการทดลองพบโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอที่ให้ผลบวก 1 โคลน จากการคัดเลือกโคลน ทั้งหมด 2,078 โคลน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และนำโคลนที่ให้ผลบวกมาทำการเกลี่ยบนอาหารแข็ง เพื่อตรวจสอบการทำงานของออกซิจีเนสในการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกอีกครั้ง โดยโคลนควบคุมผลบวกคือ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มี pUArhA1A2 (บรรจุยีนเทอร์มินัลไดออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4) และ pSA3A4 โคลนควบคุมผลลบคือ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มี pUC18 และ pSA3A4 ดังแสดงผลในรูปที่ 4.3 และให้ชื่อโคลนนี้ว่า โคลน pPC1



รูปที่ 4.3 ก) แสดงโคลนควบคุมผลบวก (*E.coli* JM109 ที่มี pUArhA1A2 และ pSA3A4) ข) แสดงโคลนควบคุมผลลบ (*E.coli* JM109 ที่มี pUC18 และ pSA3A4) และ ค) แสดงโคลน pPC1 เมื่อวางอินโดล

4.1.2 การแยกพลาสมิด pPC1 จากพลาสมิดผสม

ทำการแยกพลาสมิด pPC1 ออกจากพลาสมิดผสมระหว่าง pPC1 และ pSA3A4 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Xba*I หรือ *Kpn*I และตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.9% อะกาโรสเจล ซึ่งแยกภายใต้บัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิดผสมระหว่าง pPC1 และ pSA3A4 ตัดด้วย *Bam*HI ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *Xba*I และช่องวิ่งที่ 4: ตัดด้วย *Kpn*I

จากรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อตัดด้วยทั้ง 3 เอนไซม์ให้ผลเหมือนกัน คือ ปรากฏแถบ 2 แถบที่ขนาดประมาณ 4.5 และ 8 กิโลเบส จากที่ทราบว่า pSA3A4 มีขนาด 4.5 กิโลเบส และ pPC1 ซึ่งมีเวกเตอร์พาหะขนาด 2.68 กิโลเบส จึงสามารถทำนายขนาดดีเอ็นเอสอดแทรกได้ประมาณ 5 กิโลเบส

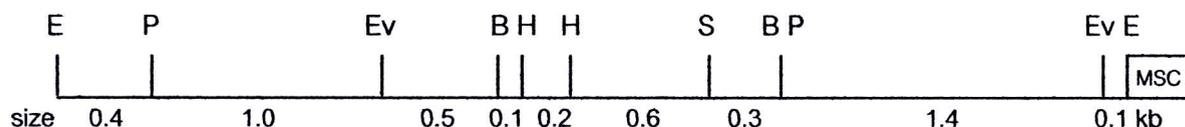
ทำการแยก pPC1 โดยคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 8 กิโลเบสจากเจล และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด EASYTRAP™ Ver.2 จากนั้นทำการเชื่อมพลาสมิดดังกล่าวด้วย T4-DNA ligase และเพิ่มปริมาณ pPC1 โดยการถ่ายโอนเข้าสู่ *E.coli* JM109 ด้วยวิธี heat และสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline extraction เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.1.3 การหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอสอดแทรกใน pPC1

หาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกพลาสมิด pPC1 โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI*, *EcoRV* หรือ *BglII* ซึ่งทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงรูปที่ ๑.1 และ ๑.2 (ภาคผนวก ๑) ซึ่งสามารถหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาคผนวก ๑) ดังแสดงผลการตัดในตารางที่ 4.1 ทำให้สามารถเขียนแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะได้คร่าวๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด pPC1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI*, *EcoRV* หรือ *BglII* แบบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด

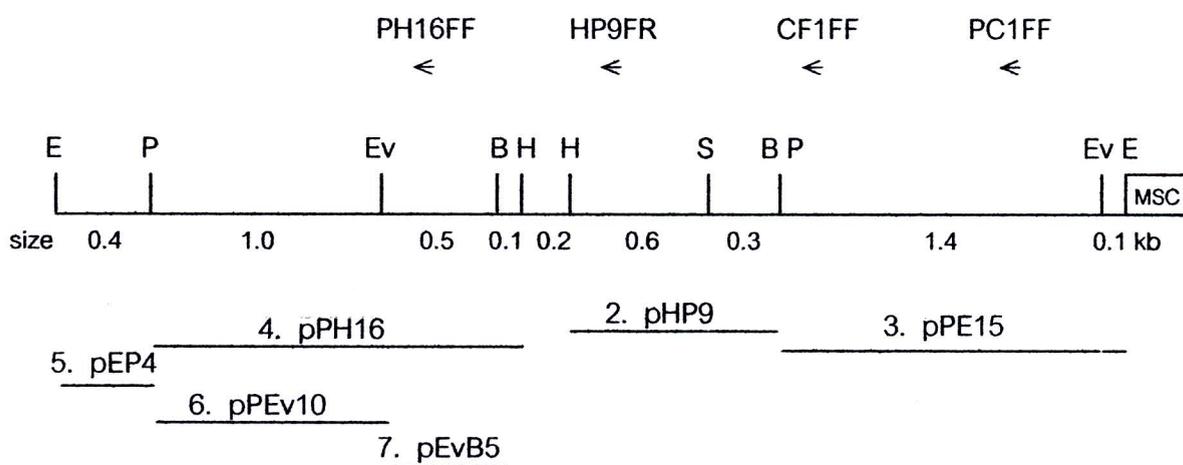
เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ขนาดของดีเอ็นเอ(กิโลเบส)
<i>EcoRI</i>	2.9, 4.7
<i>PstI</i>	1.5, 2.8, 3.3
<i>HindIII</i>	2.7, 4.7
<i>SphI</i>	2.0, 5.5
<i>EcoRV</i>	3.0, 4.2
<i>EcoRI</i> และ <i>HindIII</i>	0.2, 2.1, 2.7, 2.9
<i>EcoRI</i> และ <i>PstI</i>	0.4, 1.4, 2.8, 2.8
<i>EcoRI</i> และ <i>SphI</i>	1.8, 2.8, 2.8
<i>EcoRI</i> และ <i>BglII</i>	1.3, 1.5, 1.9, 2.9
<i>EcoRI</i> และ <i>EcoRV</i>	1.4, 2.8, 3.0
<i>PstI</i> และ <i>HindIII</i>	0.9, 1.4, 1.4, 3.2
<i>PstI</i> และ <i>SphI</i>	0.3, 1.5, 2.3, 3.2
<i>PstI</i> และ <i>BglII</i>	1.3, 1.5, 1.5, 3.2
<i>PstI</i> และ <i>EcoRV</i>	1.0, 1.3, 1.8, 3.2
<i>HindIII</i> และ <i>SphI</i>	0.5, 1.9, 4.7



รูปที่ 4.5 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPC1 โดย E = *EcoRI*, P = *PstI*, Ev = *EcoRV*, B = *BglII*, H = *HindIII*, S = *SphI* และ MSC = multiple cloning sites

4.1.4 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

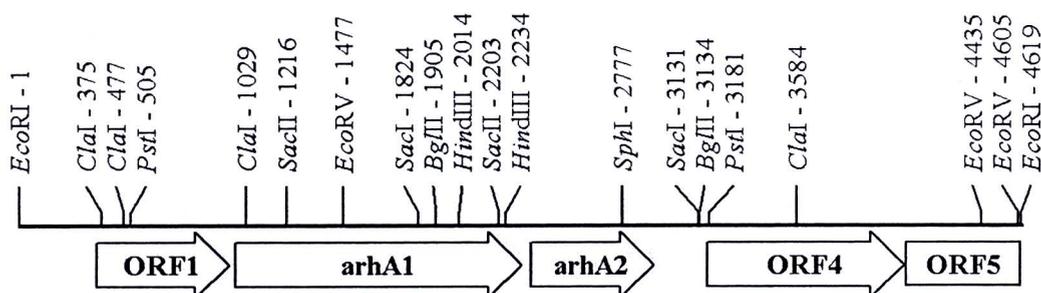
ได้สร้างโคลน 7 โคลนเพื่อเตรียมส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยให้บริเวณรวมของดีเอ็นเอสอดแทรกทุกโคลนครอบคลุมทั้งชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของ pPC1 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้ง 7 โคลน ได้แก่ พลาสมิด pPC1, pHP9, pPE15, pPH16, pEP4, pPEv10 และ pEvB5 โดยใช้ไพรเมอร์ M13F (Forward: GTAAAACGACGGCCAGT) และ M13R (Reverse: GCGGATAACAATTCACACAGG) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขาดไป ทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ PH16FF, HP9FR, CF1FF และ PC1FF ดังแสดงตำแหน่งในรูปที่ 4.6 และตารางที่ 3.3



รูปที่ 4.6 แสดงบริเวณชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในแต่ละโคลน และตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดย E = *EcoRI*, P = *PstI*, Ev = *EcoRV*, B = *BglII*, H = *HindIII*, S = *SphI* และ MSC = multiple cloning sites

4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนออกซิจิเนสของสายพันธุ์ SP2

จากการเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac version 2.05 พบว่าดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pPC1 มีขนาด 4,624 เบส และวิเคราะห์ช่วงการแสดงออกของยีน (ORF) พบว่ามี 4 ORFs ที่สมบูรณ์ และ 1 ORF ที่พบบางส่วนโดยไม่พบบริเวณหยุดการแสดงออก ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และได้แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนในภาคผนวก จ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับข้อมูลของยีนที่มีใน database GenBank DDBJ และ EMBL สามารถทำนายหน้าที่ของยีนและโปรตีนผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.7 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ และช่วงการแสดงออกของยีนบน pPC1

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (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 4.2 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับการดอจะมีในกับลำดับการดอจะมีในจากฐานข้อมูล (BlastP)

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

^a พบบางส่วนของ ORF โดยไม่พบส่วนปลายของยีนรวมทั้งโคดอนหยุด

จากตารางที่ 4.2 แสดงผลการทำนายหน้าที่ของโปรตีนที่ประมวลรหัสจากทั้ง 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 เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับ 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 เพื่อตรวจสอบบริเวณอนุรักษของเอนไซม์ พบบริเวณอนุรักษ 2 บริเวณ คือ บริเวณอนุรักษของกรดอะมิโนที่จับกับ 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 คือบริเวณอนุรักษของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His204, His209 และ Asp 358 ของ ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 ดังแสดงในรูปที่ 4.8

การทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package เพื่อจัดกลุ่มออกซิจีเนสที่ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. SP2 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกมีลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสต่างกันโดยแยกเป็นคนละกลุ่ม และ ArhA1 ของสายพันธุ์ SP2 และ A4 มีความใกล้เคียงกันมากและจัดอยู่ในกลุ่มหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีการแตกสาขาจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่น ได้แก่ ยีนกลุ่ม *nah* และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนฟธาซีน และยีนกลุ่ม *phn* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายพีแนนทริน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสของทั้ง 2 สายพันธุ์ น่าจะเป็นตัวแทนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสกลุ่มใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีน



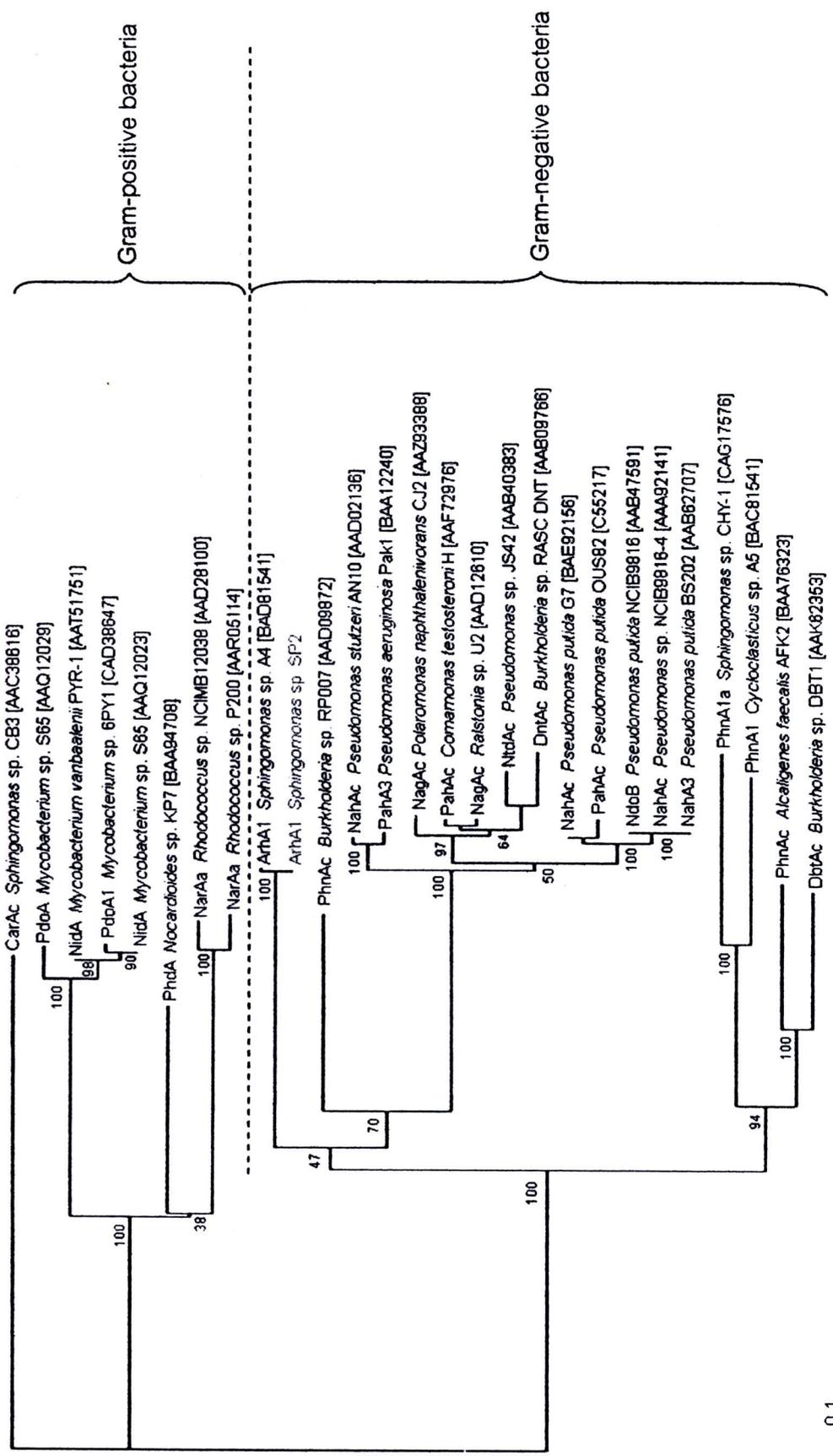
ก)

		50	52		67	70			
ArhA1_SP2	VTARMGEDEVLVVRQEDGTVKAFNLV	C	R	H	RGARVCPVEAGNRRAFV	C	NY	H	GWSYAADGSL
ArhA1_A4	VTARMGEDEVLVVRQEDGTVKAFNLV	C	R	H	RGARVCPVEAGNRRAFV	C	NY	H	GWSYAADGSL
PahAc_H	VTARMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NagAc_U2	VTARMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NagAc_CJ2	VTARMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NtdAc_JS42	VTARMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTLVHTEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGEL
DntAc_DNT	VTARMGVDEVI VSRQNDGSVRAFLNV	C	R	H	RGKTI VDAEAGNAKGFV	C	GY	H	GWGYGSNGEL
NahAc_G7	VTARMGIDEVI VSRQSDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
PahAc_OUS82	VTARMGIDEVI VSRQSDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVNAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NdoB_NCIB9816	VTARMGIDEVI VSRQNDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NahAc_NCIB9816-4	VTARMGIDEVI VSRQNDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NahA3_BS202	VTARMGIDEVI VSRQNDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVSV EAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
NahAc_AN10	VTARMGVDEVI VSRQNDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
PahA3_PaK1	VTARMGVDEVI VSRQNDGSI RAFLNV	C	R	H	RGKTLVHAEAGNAKGFV	C	SY	H	GWGFGSNGEL
PhnAc_RP007	VTTRMGTDEVI VMRQKNSI KAFNLV	C	R	H	RGARLCAVEAGNARGFA	C	NY	H	GMAYGADGSL
	*.:**.* **.*.:**.***.***.***.***.*	*	*	*	** : .**** :*.	*	*	*	**.:**.*

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	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	AASL...AGFWESD	D	NDNMET
NagAc_U2	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NagAc_CJ2	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPSENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NtdAc_JS42	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKPF AENFVGDIY	H	VGWT	H	AAAL...AGFWESD	D	NENMET
DntAc_DNT	KHSGGLELVGPPAKV VVKGWVFAENFVGDIY	H	IGWT	H	ASIL...AGTWESD	D	NDNMV-
NahAc_G7	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
PahAc_OUS82	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NdoB_NCIB9816	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NahAc_NCIB9816-4	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NahA3_BS202	KHSGGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
NahAc_AN10	KHSGGLELIGPPGKVI I KANWKAPAENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
PahA3_PaK1	KHSGGLELIGPPGKVI I KANWKAPSENFVGDAY	H	VGWT	H	ASSL...AGFWESD	D	NDNMET
PhnAc_RP007	EAGGGI ELVGP PARCFI EANKWAPSENFVGDAY	H	VGWT	H	ASAL...AGYWETE	D	NDNMES
	: .**:* **.***.* : . . . ** * : **.* ** *	*	****	*	*: * **.***.*	*	**.*

รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน และบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe²⁺ ใน Rieske center ของหน่วยย่อยแอลฟา ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ [2Fe-2S] ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe²⁺ ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเฮนไซม์ (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 4.9 Phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอสลาฟาเทอร์มินัลออกซิเนส ทั้งหมด 27 หน่วยย่อย โดยใช้หน่วยย่อยแอสลาฟา CarAc ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ CB3 เป็น out-group, scale bar: 0.1; percent divergence และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap

0.1

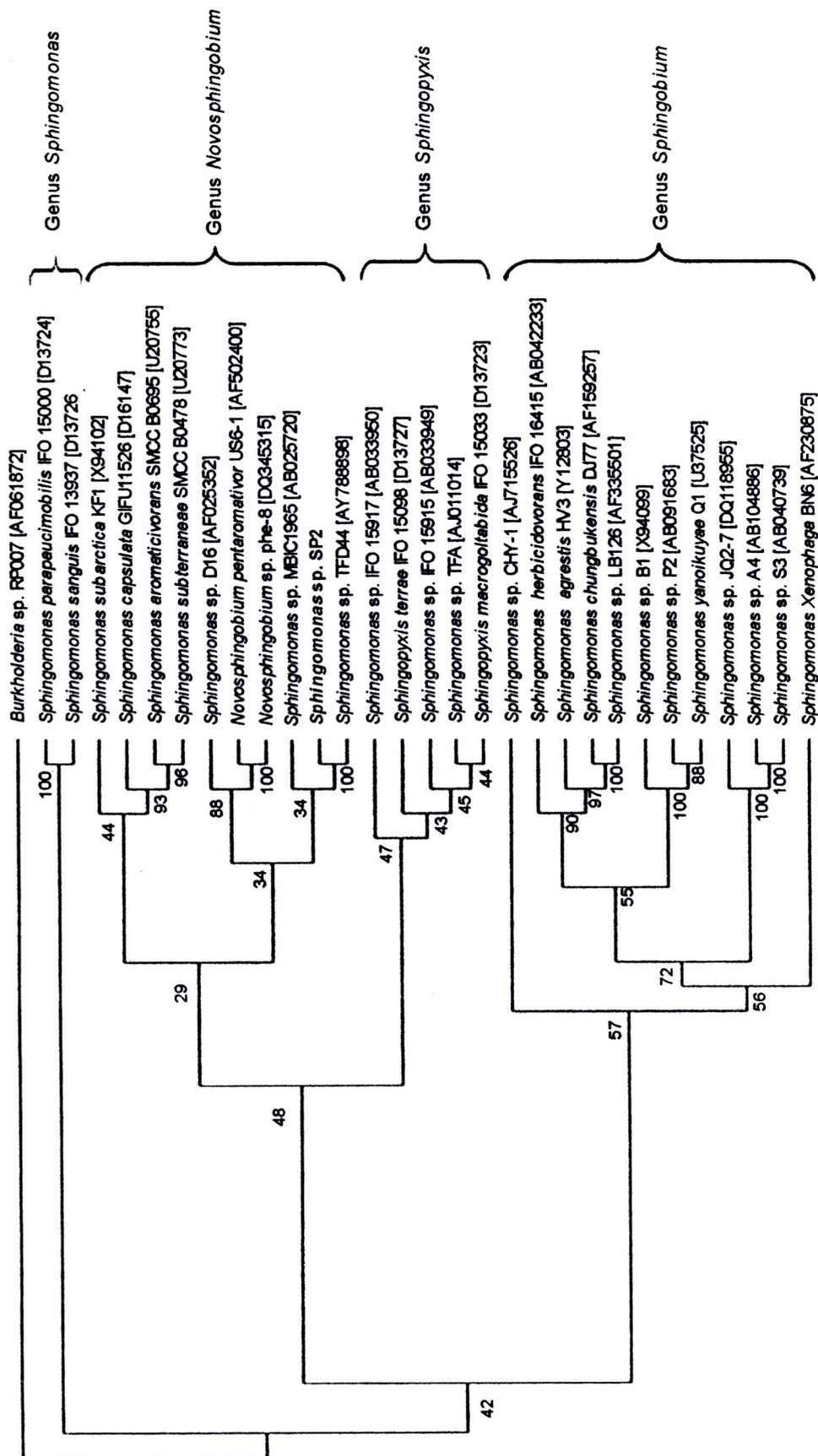
4.3 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ sphingomonad

จากที่เคยมีรายงานการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของ *Sphingomonas* sp. SP2 (Saiphet และคณะ, 2006) และ *Sphingomonas* sp. A4 (Pingyakong และคณะ, 2004) พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่ม sphingomonad เหมือนกัน แต่เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad สามารถแบ่งย่อยเป็น 4 จีนัส จึงจัดกลุ่มจีนัสทั้ง 2 สายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนทางสายพันธุ์ของทั้ง 2 ที่มีขึ้นเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ใกล้เคียงกัน โดยจัดกลุ่มสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ sphingomonad โดยใช้โปรแกรม ClustalX version 1.83 และทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad มีการแบ่งออกเป็น 4 จีนัส คือ *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* และ *Sphingobium* (Takeuchi และคณะ, 2001) โดย *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Novosphingobium* และ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Sphingobium* ทั้ง 2 สายพันธุ์จึงมีความแตกต่างกันทางสายพันธุ์

4.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนอะซีแนพทีนออกซิจีเนสใน *E.coli*

ได้เลือกตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ครอบคลุมยีน *arhA1* และ *arhA2* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ตัดที่ตำแหน่ง 505 และ *Pst*I ตัดที่ตำแหน่ง 3181 ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ทำให้ได้ชิ้นสอดแทรกขนาด 2676 เบส และใช้เวกเตอร์ pUC18 เป็นเวกเตอร์แสดงออก โดยให้ชื่อพลาสมิดที่มีการแสดงออกของยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ว่า pPPA1A2

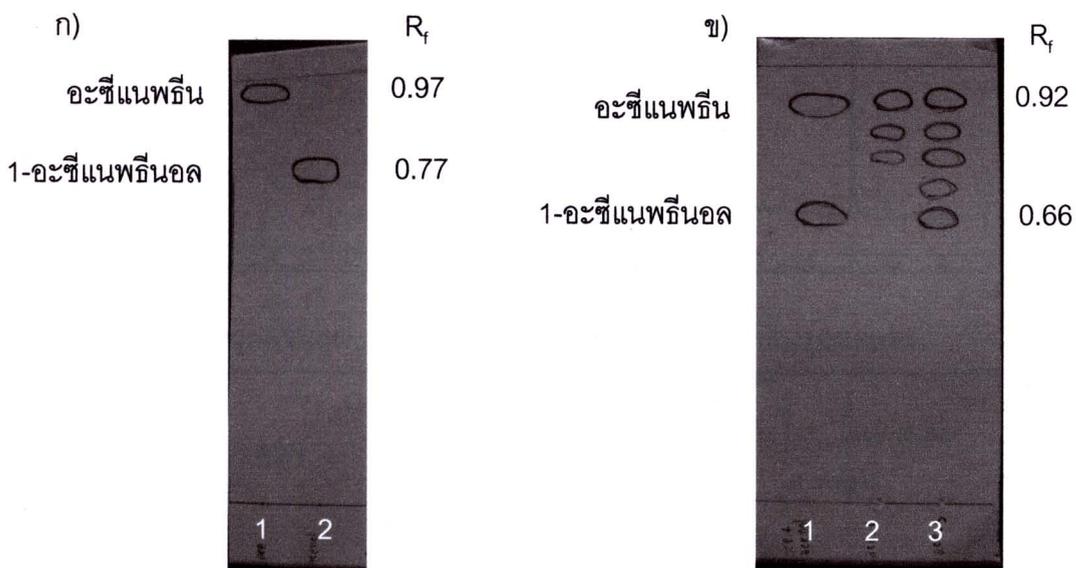
ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของชุดควบคุม ได้แก่ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pUC18 และ pSA3A4 และชุดทดลอง ได้แก่ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 โดยทดสอบกับซับสเตรต 7 ชนิด ได้แก่ อะซีแนพทีน อะซีแนพทีน พีแนนทีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และไพรีน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแนพธาซีน โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30°C 20 ชั่วโมง และตรวจสอบซับสเตรตที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC GC-FID และ GC-MS



รูปที่ 4.10 Phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม spingomonad ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 เป็น out-group และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap

4.4.1 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค TLC

การวิเคราะห์ชั้นสเตรตที่เหลื่อและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค TLC ด้วยระบบตัวทำละลาย โทลูอิน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) พบความแตกต่างของแถบที่ปรากฏในชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นชั้นสเตรตเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เมื่อใช้ชั้นสเตรตเป็นแนพธาลิน พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน ไม่พบความแตกต่างของแถบในชุดควบคุมและชุดทดลอง และเมื่อใช้ชั้นสเตรตเป็นอะซีแนพธิลีน ไม่สามารถอ่านผลได้เนื่องจากสารมาตรฐานอะซีแนพธินปรากฏแถบมากมายซ้อนทับกัน จึงไม่สามารถระบุได้ว่าการเกิดสารผลิตภัณฑ์หรือไม่



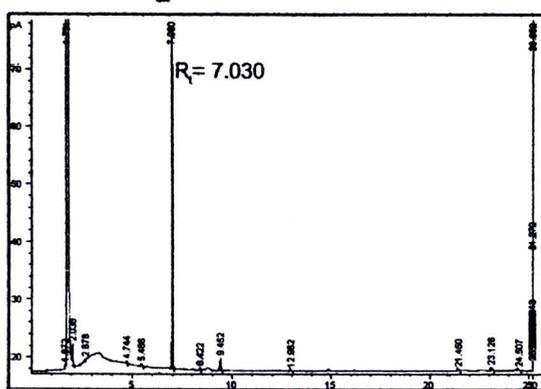
รูปที่ 4.11 TLC โคโรมาโทแกรม ภาพ ก) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพธิน ช่องที่ 2 แสดงสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธินอล ภาพ ข) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพธินและ 1-อะซีแนพธินอล ช่องที่ 2 สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นชั้นสเตรต และช่องที่ 3 สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นชั้นสเตรต

จากรูปที่ 4.11 ภาพ ข พบว่าค่า R_f ของสารชนิดหนึ่งที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นชั้นสเตรต เท่ากับค่า R_f ของสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธินอล ($R_f = 0.66$) จึงสามารถทำนายว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็น 1-อะซีแนพธินอล แต่ด้วยเทคนิค TLC ไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ เพียงแค่บอกได้ว่า *E. coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพธินได้

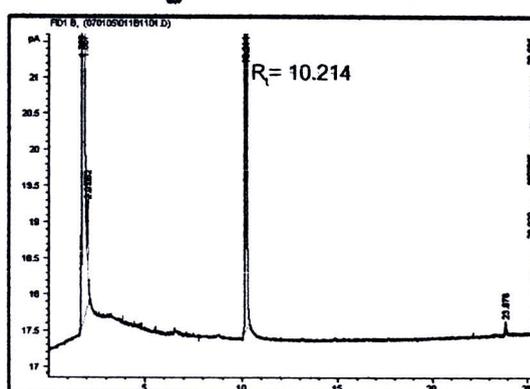
4.4.2 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-FID

การวิเคราะห์หับสเตอร์ที่เหลือและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค GC-FID ปรากฏพีคที่ คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ในชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพทีนเป็นหับสเตอร์เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และเมื่อใช้หับสเตอร์เป็นอะซีแนพทีน แนพทาลีน พีแนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนทีน และ ไพรีน ไม่พบความแตกต่างของพีคจากชุดควบคุมและชุดทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.13

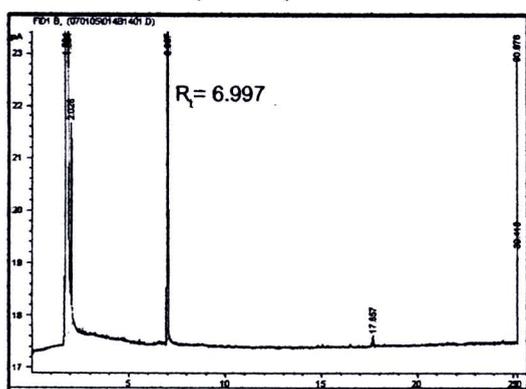
ก) สารมาตรฐานอะซีแนพทีน



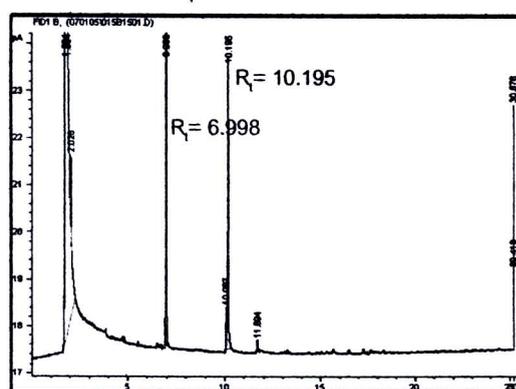
ข) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพทีนอล



ค) อะซีแนพทีนชุดควบคุม



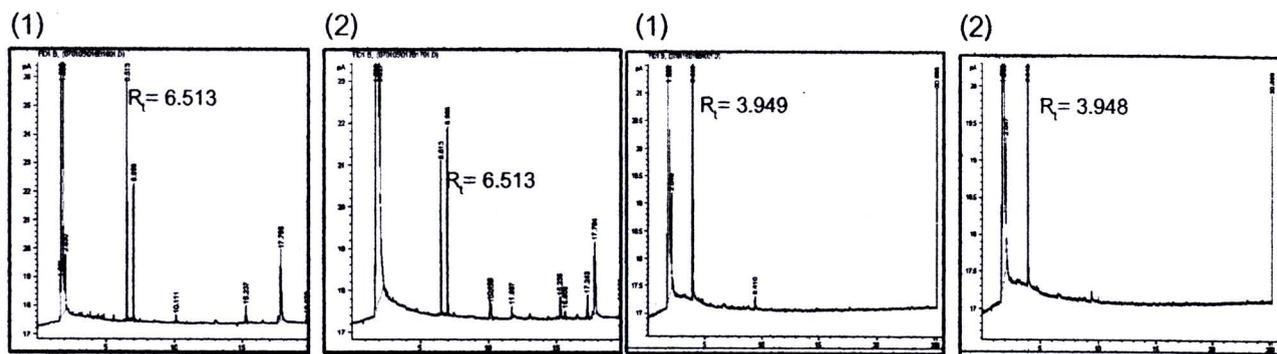
ง) อะซีแนพทีนชุดทดลอง



รูปที่ 4.12 GC-FID โครมาโทแกรม แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพทีนและ 1-อะซีแนพทีนอล และ สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพทีนเป็นหับสเตอร์

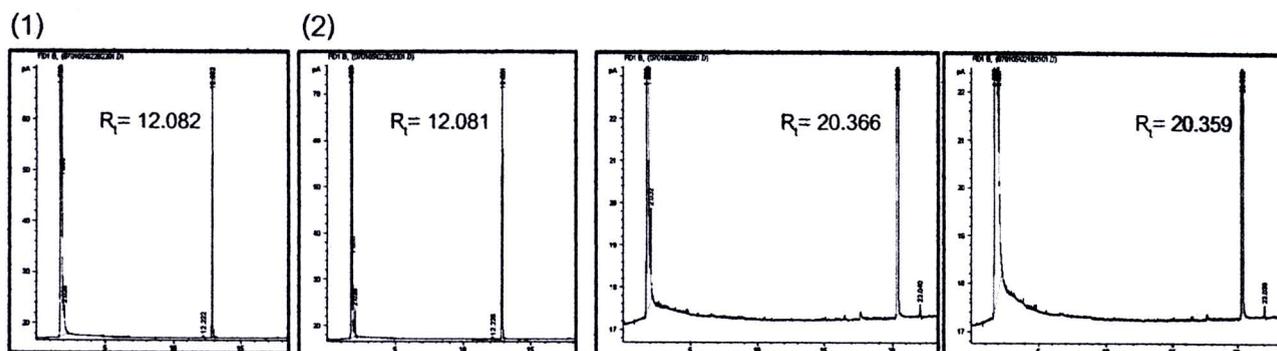
ก) อะซีแนพริลีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)

ข) แนพธาซีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)



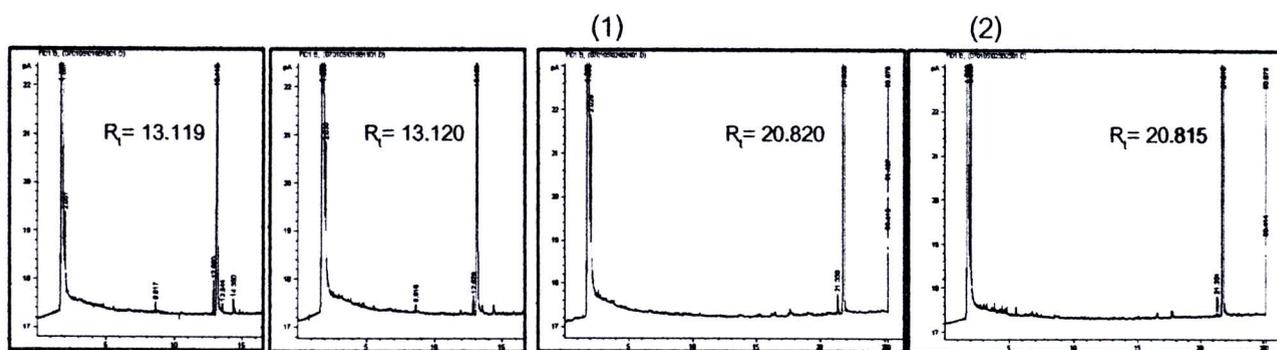
ค) พีแนนทรีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)

ง) ฟลูออแรนซีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)



จ) แอนทราซีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)

ฉ) ไพรีนชุดควบคุม (1) และชุดทดลอง (2)



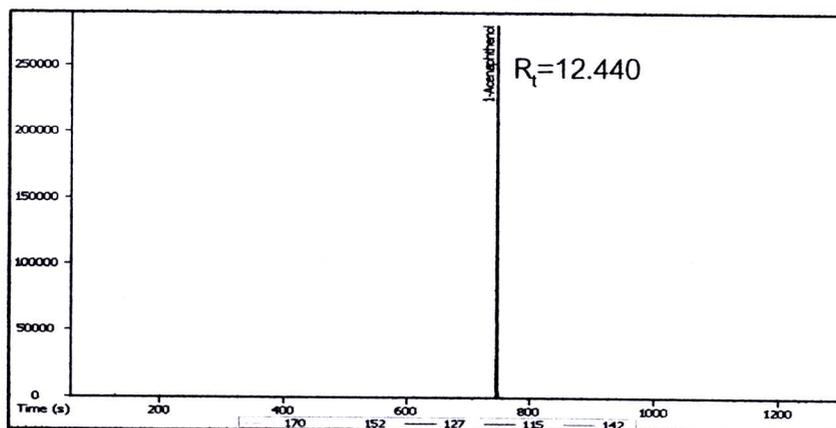
รูปที่ 4.13 GC-FID โคโรมาโทแกรม แสดงสารที่สกัดจากการทดลองโดยขั้นตอนคือ เป็น อะซีแนพริลีน แนพธาซีน พีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนซีน และไพรีน

จากรูปที่ 4.12 พบว่าค่า Retention Time (RT) ของผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นซับสเตรต มีค่า 10.195 นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ RT ของสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธินอล (RT=10.214 นาที) จึงสามารถทำนายว่าสารดังกล่าวน่าจะเป็น 1-อะซีแนพธินอล และเมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของซับสเตรต พบว่ามีการลดลงของอะซีแนพธินถึง 63% ทำให้สรุปได้ว่า *E. coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพธินได้ และไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพธิน แนนพธาลิน พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน เนื่องจากพบเพียงพีคของซับสเตรตเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC อย่างไรก็ตามเทคนิค GC-FID ไม่สามารถระบุชนิดของสารได้เช่นเดียวกัน จึงต้องทำการทดลองเพื่อทำนายโครงสร้างจากน้ำหนักโมเลกุล ทำให้ทราบชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค GC-MS

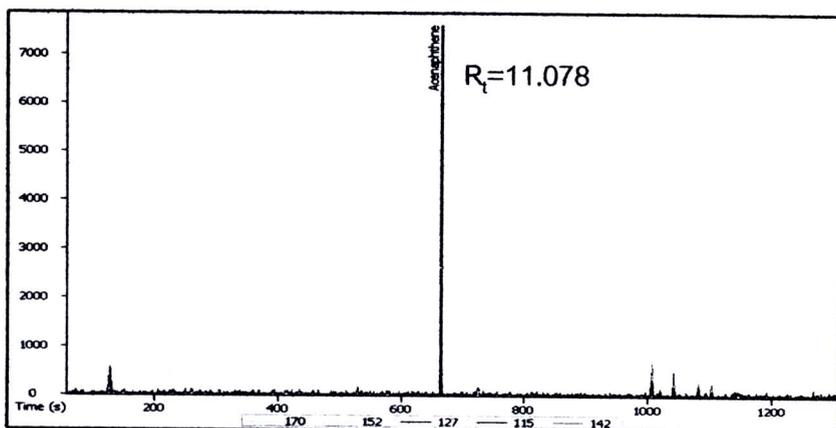
4.4.3 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วย 2 เทคนิคข้างต้น พบว่า *E. coli* JM109 ที่มี พลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนพธินได้เท่านั้น และไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแนนพธาลิน พีแนนทริน แอนทราซีน ฟลูออแรนธิน และไพรีน จึงวิเคราะห์สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธินอล และสารที่สกัดได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองของอะซีแนพธินด้วยเทคนิค GC-MS ดังแสดง total ion GC-MS โครมาโทแกรม ในรูปที่ 4.14 และแมสสเปกตรัม ในรูปที่ 4.15

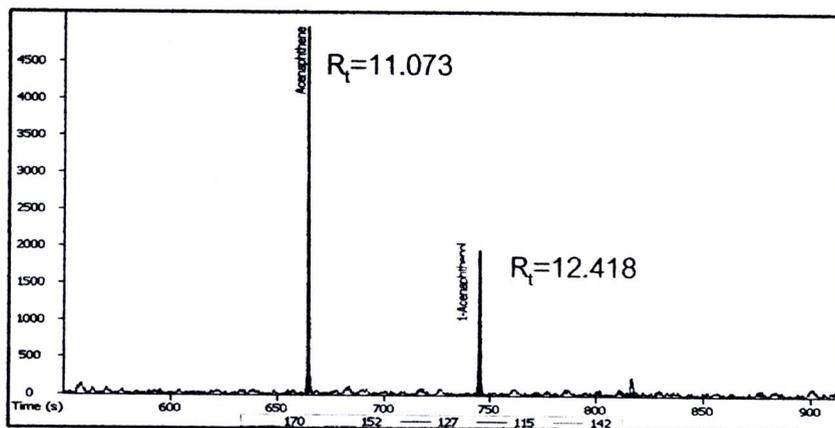
ก)



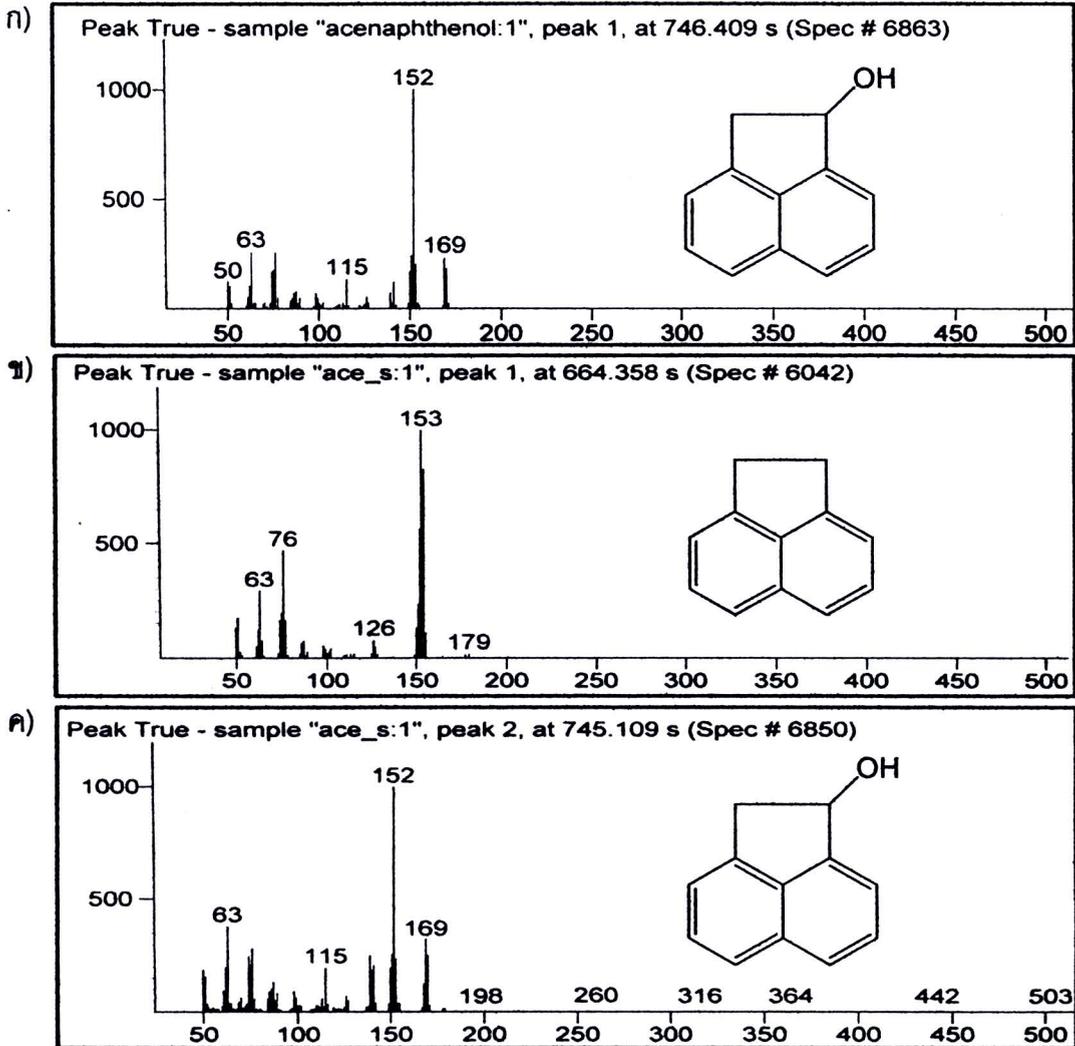
ข)



ค)



รูปที่ 4.14 GC-MS โครมาโทแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธินอล ข) สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นซับสเตรต ค) สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธินเป็นซับสเตรต



รูปที่ 4.15 Mass spectral GC-MS โครมาโทแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนฟทีนอล
 ข) สารจากพีคที่ 1 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนฟทีนเป็นซับสเตรต (ภาพ 4.14ค)
 ค) สารจากพีคที่ 2 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนฟทีนเป็นซับสเตรต (ภาพ 4.14ค)

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนฟทีนเป็นซับสเตรตปรากฏ 2 พีค ดังแสดงในรูป 4.14ค คือ พีคแรกเป็นอะซีแนฟทีนที่เหลืออยู่ และพีคที่สองเป็น 1-อะซีแนฟทีนอล ($R_T = 12.418$) เนื่องจากมีรูปแบบแมสสเปกตรัม คือ 63, 115, 152, 169 เหมือนกับสารมาตรฐาน 1-อะซีแนฟทีนอลซึ่งมีรูปแบบแมสสเปกตรัม 50, 63, 115, 152, 169 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จึงสรุปได้ว่าการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ *E. coli* JM109 ที่มีพลาสมิด pPPA1A2 และ pSA3A4 สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีน โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะซีแนฟทีนได้เป็น 1-อะซีแนฟทีนอล