ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248389

การผลิตสารชีวพอลิเมอร์ของแบคทีเรียชนิดใหม่สายพันธุ์ที่ผลิตได้จากกลีเซอรอล *Sphingomonas* sp. SP2

นางสาวกรองกาญจน์ สายทิม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00253628

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248389

การแยกและลักษณะสมบัติของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2

นางสาวกรองกาญจน์ สายพิณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4772209523

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACENAPHTHENE OXYGENASE GENES OF *Sphingomonas* sp. SP2

Miss Krongkan Saipin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและลักษณะสมบัติของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2
โดย	นางสาวกรองกาญจน์ สายพิณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

กรองกาญจน์ สายพิณ: การแยกและลักษณะสมบัติของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. SP2 (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACENAPHTHENE OXYGENASE GENES OF *Sphingomonas* sp. SP2) อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง; 128 หน้า.

248389

อะซีแนพธีนมีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วง และวงไซโคลเพนเทน 1 วง เชื่อมต่อกัน ซึ่งจัดเป็นสารมลพิษ *Sphingomonas* sp. SP2 สามารถย่อยอะซีแนพธีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน งานวิจัยนี้ได้โคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.6 กิโลเบสบรรจุยีนออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ซึ่งแยกและคัดเลือกโคลนโดยอาศัยสมบัติการเปลี่ยนอินโดลเป็นอินดิโกของออกซิจีเนส ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีนส่งถ่ายอิเล็กตรอนจาก *Sphingomonas* sp. P2 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบ 4 ORFs และ 1 ORF ที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่ง *orf*2 และ *orf*3 ประมวลรหัสโปรตีนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส (ArhA1 และ ArhA2) จากสายพันธุ์ A4 ถึง 99% ตามลำดับ โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF2 แตกต่างจาก ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 และพบบริเวณอนุรักษ์ของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนส คือ บริเวณอนุรักษ์ใน Rieske center ([2Fe-2S]) (Cys50, Cys67, His52 และ His70) และบริเวณอนุรักษ์ที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (His204, His209 และ Asp358) ซึ่ง ArhA1 ของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความใกล้เคียงกันมากแต่สามารถใช้ PAHs ต่างกัน โดยสายพันธุ์ A4 สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซีแนพธีนและอะซีแนพธิลีน แต่สายพันธุ์ SP2 ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซีแนพธิลีน เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของเทอร์มินัลออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 ที่แสดงออกใน *E.coli* พบว่าสามารถใช้อะซีแนพธีนเป็นสารตั้งต้นได้เพียงชนิดเดียว ในขณะที่เทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 ใน *E.coli* สามารถแสดงกิจกรรมของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนสกับสารตั้งต้นได้หลายชนิด

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....กรองกาญจน์ สายพิณ.....

ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อรฤทัย ภิญญาคง.....

4772209523: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: Acenaphthene/ Oxygenase/ *Sphingomonas* sp. SP2

KRONGKAN SAIPIN: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACENAPHTHENE OXYGENASE GENES OF *Sphingomonas* sp. SP2. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ONRUTHAI PINYAKONG, Ph. D. 128 pp.

248389

Acenaphthene, a two-fused ring aromatic hydrocarbon and one cyclopentane, is classified as one of priority pollutants due to its toxicity. *Sphingomonas* sp. SP2 is capable of utilizing acenaphthene as sole carbon and energy source. The 4.6-kb DNA fragment containing putative ISP subunits of oxygenase genes was cloned and isolated from this strain using the ability of oxidizing indole to indigo of the clone containing electron transport protein from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. P2. This DNA fragment was completely sequenced and found to contain four open reading frames (ORFs) and one putative ORF. The translated proteins of *orf2* and *orf3* were 99% identical to large and small subunits of dioxygenase (ArhA1 and ArhA2) of *Sphingomonas* sp. A4, respectively. The deduced amino acid sequences of ORF2 were different from those of ArhA1 of strain A4 at Met261 and Ser347, whereas the Rieske-type [2Fe-2S] cluster binding motif (Cys50, Cys67, His52 and His70) and the potential mononuclear nonheme iron coordinate site (His204, His209 and Asp358) were conserved. Although the enzymes of these two strains are very closely related, the ability of these strains to utilize polycyclic aromatic hydrocarbons are different. The strain A4 can grow on both acenaphthene and acenaphthylene, while the strain SP2 cannot grow on acenaphthylene. Biotransformation with recombinant *E. coli* clone revealed its substrate specificity only to acenaphthene, whereas the recombinant *E. coli* clone of strain A4 exhibited ring-hydroxylating dioxygenase activity toward several PAHs.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature.....Krongkan Saipin.....

Academic year.....2006.....Advisor's signature.....Onruthai Pinyakong.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยดี โดยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรฤทัย ภิญญาคง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์ ทางผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ให้เกียรติรับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำชี้แนะต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณโครงการแห่งชาติด้านสิ่งแวดล้อมและของเสียอันตราย ที่เอื้ออำนวยให้ใช้เครื่อง GC-MS ในการวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือในทุกด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฏ
คำย่อและสัญลักษณ์.....ณ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. ปริทัศน์วรรณกรรม.....5
2.1 อะซีแนพธีน.....7
2.1.1 แหล่งกำเนิดอะซีแนพธีน.....8
2.1.2 ความเป็นพิษของอะซีแนพธีน.....8
2.1.3 การสูญสลายและการคงสภาพของอะซีแนพธีนในสิ่งแวดล้อม.....9
2.2 กระบวนการย่อยสลาย PAHs ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรีย.....10
2.2.1 วิถีการย่อยสลายแนพธาลีน.....11
2.2.2 วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีน.....15
2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs.....20
2.3.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมลบ.....20
2.3.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ในแบคทีเรียแกรมบวก.....26
2.3.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน.....27
2.4 ออกซิจีเนส.....29
2.4.1 โครงสร้างของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส.....30
2.4.2 ระบบขนส่งอิเล็กตรอน.....35

2.4.3 แนพธาลีนไดออกซิจีเนส.....36
2.5 วิธีการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs.....40
2.5.1 เทคนิคเซาเธิร์นไฮบริไดเซชัน.....40
2.5.2 การโคลน.....42
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....46
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....46
3.2 เคมีภัณฑ์.....48
3.3 แบคทีเรีย พลาสมิดและไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัย.....50
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....52
3.4.1 แยกยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. SP2 และหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....52
3.4.1.1 การเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ SP2.....52
3.4.1.2 ค้นหายีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ SP2.....57
3.4.1.3 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์...59
3.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2.....62
3.4.3 วิเคราะห์ความเหมือนทางสายพันธุ์ของสายพันธุ์ SP2 และ A4.....63
3.4.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสใน *E.coli*.....63
3.4.4.1 สร้างพลาสมิดที่มียีนที่ผลิตออกซิจีเนสโดยแสดงออกได้ใน *E. coli*.....63
3.4.4.2 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของ *E. coli* ที่มี recombinant oxygenase ที่สร้างขึ้น.....65
4. ผลการทดลอง.....68
4.1 แยกยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสจาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2.....68
4.1.1 การคัดเลือกโคลนที่มียีนออกซิจีเนสจากห้องสมุดดีเอ็นเอ.....68
4.1.2 การแยกพลาสมิด pPC1 จากพลาสมิดผสม.....70
4.1.3 การหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอสอดแทรกใน pPC1.....71

4.1.4 โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสอดแทรกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....72
4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางชีวโมเลกุลของยีนออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2.....73
4.3 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ sphingomonad.....80
4.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนอะซีแนพธีนออกซิจีเนสใน *E.coli*.....80
4.4.1 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค TLC.....82
4.4.2 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-FID.....83
4.4.3 การวิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิค GC-MS.....85
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....88
รายการอ้างอิง.....96

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.....107
ภาคผนวก ข.....109
ภาคผนวก ค.....116
ภาคผนวก ง.....117
ภาคผนวก จ.....119
ภาคผนวก ฉ.....122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....128

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงสมบัติทางเคมีและกายภาพของอะซีแนพธีน.....	7
2.2	แสดงค่าครึ่งชีวิตของอะซีแนพธีนในสิ่งแวดล้อม.....	9
2.3	แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีน.....	15
2.4	แสดงรายละเอียดต่างๆของเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในแต่ละกลุ่ม (Nam และคณะ, 2001).....	32
3.1	แสดงสมบัติของแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย.....	50
3.2	แสดงสมบัติของพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
3.3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	51
4.1	แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด pPC1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sph*I, *Eco*RV หรือ *Bgl*II แบบปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิด.....	71
4.2	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล (BlastP)	74
ง.1	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BlastN)	118
จ.1	แสดงค่าความเชื่อมั่นและสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานที่คำนวณได้จากรูปที่ จ.3 และ จ.4.....	120

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสารประกอบ PAHs 16 ชนิด.....	6
2.2	วิถีการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ทั่วไปด้วยวิธีทางชีวภาพโดยแบคทีเรียแบบใช้ออกซิเจน (Cerniglia, 1992)	10
2.3	การเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสและยีนประมวลรหัสแนพธาลีนไดออกซิจีเนสใน *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4 (Gibson และ Parales, 2000).....	12
2.4	วิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans , 1964; Yen และ Gunsalus, 1982).....	13
2.5	วิถีล่างของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยจุลินทรีย์ต่างๆ 1) *Pseudomonas* sp. (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) 2) *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 (Zhou และคณะ, 2001).....	14
2.6	วิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีนโดย *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong, 2003c).....	17
2.7	การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนและระบบควบคุมการทำงานของยีน (Yen และ Gunsalus, 1982)	20
2.8	การเรียงของยีนกลุ่มคล้าย *nah* ในวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนของ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816, *P. putida* สายพันธุ์ G7, *P. putida* สายพันธุ์ NCIB9816-4, *Pseudomonas* สายพันธุ์ C18, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ PaK1, *P. putida* สายพันธุ์ OUS82 และ *P. stutzeri* สายพันธุ์ AN10 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003) *nahA*: แนพธาลีนไดออกซิจีเนส *nahB*: แนพธาลีนไดไฮโดรไดออลดีไฮโดรจีเนส *nahC*: ไดไฮดรอกซีแนพธาลีนไดออกซิจีเนส *nahD*: HCCA ไอโซเมอเรส *nahE*: tHBPA ไฮดราเทส-แอลโดรเลส *nahF*: ซาลิไซแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส.....	21

รูปที่ **หน้า**

2.9 กลุ่มยีนที่มีการเรียงตัวแตกต่างจากกลุ่มคล้าย *nah* ได้แก่ *nah* ของ *Comamonas testeroni* สายพันธุ์ GZ42, *nag* ของ *Ralstonia* sp. สายพันธุ์ U2 และ *phn* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ดัดแปลงจาก Habe และ Omori, 2003)..... 22

2.10 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณ ORFs บนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Eco*RI ขนาด 5 กิโลเบส (pU288E1) และบริเวณของดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Sal*I และ *Pst*I ขนาด 2.6 กิโลเบส (pUArhA1A2) บรรจุยีน *arhA1* และ *arhA2* จาก *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)..... 28

2.11 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณ ORFs บนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Kpn*I ขนาด 16.4 กิโลเบส และลูกศร 2 ทาง แสดงบริเวณที่ศึกษาด้วยเทคนิค RT-PCR ของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ A4 (Kouzuma และคณะ, 2006)..... 28

2.12 การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันโดยแนพธาลีนไดออกซิจีเนส..... 29

2.13 การเร่งปฏิกิริยาการแตกวงอะโรมาติกโดยแคทีคอล-1,2-ไดออกซิจีเนส..... 30

2.14 การจัดเรียงของระบบการทำงานร่วมกันของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส (Butler และ Mason, 1997)..... 31

2.15 phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของริงไฮดรอกซิเลทิงไดออกซิจีเนส, OxoO ของ *P. putida* สายพันธุ์ 86 (Y12655) เป็น outgroup, scale bar: 0.2 substitution per site และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap (Nam และคณะ, 2001)..... 34

2.16 การเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างของระบบการทำงานของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (Parales, 2003)..... 36

2.17 โครงสร้างส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (MMDB Id: 9837) domain สีชมพู (NDO A), น้ำตาล (NDO C) และเทา (NDO E) แทนหน่วยย่อยแอลฟา และ domain สีน้ำเงิน (NDO B), เขียว (NDO D) และเหลือง (NDO F) แทนหน่วยย่อยบีตา (Kauppi และคณะ, 1998)..... 37

รูปที่ **หน้า**

2.18 การเปรียบเทียบความเหมือนของยีนและบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ของหน่วยย่อยแอลฟา ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ [2Fe-2S] ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งเกิดเป็นสาร 2-His-carboxylate 9826-4: NahAc ของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4, DNT: DntAc ของ 2,4-ไดไนโตรโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. DNT, JS42: NtdAc ของ 2-ไนโตรโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. JS42, KKS102: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KKS102, KF707: BphA1 ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. KF707, LB400: BphA ของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia* sp. LB400, F1: TodC1 ของโทลูอีนได ออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. F1, P51: TcbAa ของไทรคลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนสจาก *Pseudomonas* sp. P51 38

2.19 การส่งผ่านอิเล็กตรอนระหว่างหน่วยย่อยแอลฟา (Kauppi และคณะ,1998)..... 39

2.20 ขั้นตอนการเกิดอินดิโกโดยปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างเอนไซม์ทริปโตเฟเนสและไดออกซิจีเนสใน *E. coli* สายพันธุ์ลูกผสม (Ensley และคณะ, 1983)..... 43

4.1 ภาพ ก) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่ไม่ได้วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ และภาพ ข) *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ที่วางอินโดลบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ..... 68

4.2 ภาพ ก) ห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 ก่อนวางอินโดล และ ภาพ ข) ห้องสมุดดีเอ็นเอของ *Sphingomonas* sp. สายพันธุ์ SP2 หลังวางอินโดล โดยโคลนที่อยู่ในกรอบสีเหลี่ยมเส้นประ (⬚) แสดงโคลนควบคุมผลบวก (*E.coli* JM109 ที่มี pUArhA1A2 และ pSA3A4) และโคลนที่อยู่ในกรอบสีเหลี่ยมเส้นทึบ (☐) แสดงโคลนจากห้องสมุดดีเอ็นเอที่ให้ผลบวก..... 69

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..... 69

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 70

รูปที่ **หน้า**

4.5 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะของดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pPC1 โดย E = *Eco*RI, P = *Pst*I, Ev = *Eco*RV, B = *Bgl*II, H = *Hin*dIII, S = *Sph*I และ MSC = multiple cloning sites 72

4.6 แสดงบริเวณซิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในแต่ละโคลน และตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดย E = *Eco*RI, P = *Pst*I, Ev = *Eco*RV, B = *Bgl*II, H = *Hin*dIII, S = *Sph*I และ MSC = multiple cloning sites 72

4.7 แสดงแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ และช่วงการแสดงออกของยีนบน pPC1..... 73

4.8 การเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน และบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ของหน่วยย่อยแอลฟา ก) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ [2Fe-2S] ข) บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์..... 78

4.9 Phylogenetic tree ของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนส ทั้งหมด 27 หน่วยย่อย โดยใช้หน่วยย่อยแอลฟา CarAc ของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ CB3 เป็น out-group, scale bar: 0.1; percent divergence และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap..... 79

4.10 Phylogenetic tree ของ 16S S rDNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad ทั้งหมด 29 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S S rDNA ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 เป็น out-group และตัวเลขที่สาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap..... 81

4.11 TLC โครมาโทแกรม ภาพ ก) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพธีน ช่องที่ 2 แสดงสารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธีนอล ภาพ ข) ช่องที่ 1 แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพธีนและ 1-อะซีแนพธีนอล ช่องที่ 2 สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต และช่องที่ 3 สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต..... 82

4.12 GC-FID โครมาโทแกรม แสดงสารมาตรฐานอะซีแนพธีนและ 1-อะซีแนพธีนอล และสารที่สกัดได้จากชุดควบคุมและชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต... 83

4.13 GC-FID โครมาโทแกรม แสดงสารที่สกัดจากการทดลองโดยซับสเตรต คือ เป็น อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน ฟีแนน ทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไพรีน..... 84

รูปที่ **หน้า**

4.14 GC-MS โครมาโทแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธีนอล ข) สารที่สกัดได้จากชุดควบคุมเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต ค) สารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต..... 86

4.15 Mass spectral GC-MS โครมาโทแกรม ก) สารมาตรฐาน 1-อะซีแนพธีนอล ข) สารจากพีคที่ 1 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต (ภาพ 4.14ค) ค) สารจากพีคที่ 2 ของสารที่สกัดได้จากชุดทดลองเมื่อใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรต (ภาพ 4.14ค)..... 87

5.1 เปรียบเทียบตำแหน่งของยีนที่แยกได้จากสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4..... 90

ค.1 แผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะและกรอบการแสดงออกบนพลาสมิด pSA3A4..... 116

จ.1 ภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ภาพ ก) ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *Eco*RI ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *Hin*dIII ช่องวิ่งที่ 4: ตัดด้วย *Pst*I ช่องวิ่งที่ 5: ตัดด้วย *Sph*I ช่องวิ่งที่ 6: ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII ช่องวิ่งที่ 7: ตัดด้วย *Eco*RI และ *Pst*I และช่องวิ่งที่ 8: ตัดด้วย *Eco*RI และ *Sph*I ภาพ ข) ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *Eco*RI ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *Hin*dIII และ *Sph*I ช่องวิ่งที่ 4: ตัดด้วย *Hin*dIII และ *Pst*I และช่องวิ่งที่ 5: ตัดด้วย *Pst*I และ *Sph*I..... 119

จ.2 ภาพถ่าย 0.9% อะกาโรสเจล ช่องวิ่งที่ 1: 1 kb DNA ladder เข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร ภาพ ก) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *Eco*RV ภาพ ข) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *Eco*RI ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *Eco*RV และ *Pst*I และภาพ ค) ช่องวิ่งที่ 2: พลาสมิด pPC1 ตัดด้วย *Bgl*II และ *Eco*RI ช่องวิ่งที่ 3: ตัดด้วย *Bgl*II และ *Pst*I..... 120

จ.3 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอในการทดลองรูปที่ จ.1..... 121

จ.4 กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอในการทดลองรูปที่ จ.2..... 121

ฉ.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอแทรกสอดในพลาสมิด pPC1 ซึ่งมีขนาด 4,624 เบส โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้เป็นตำแหน่งโคดอนเริ่มต้น และบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้นเป็นตำแหน่งโคดอนหยุด โดยระบุชื่อยีนที่บริเวณเริ่มต้น orf และ orf5 ไม่พบบริเวณโคดอนหยุด..... 122

คำย่อและสัญลักษณ์

ชม.	=	ชั่วโมง
^{o}ซ.	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
a.a.	=	กรดอะมิโน
A_{260}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความความคลื่น 280 นาโนเมตร
Ace	=	acenaphthene
Acele	=	acenaphthylene
Ala	=	alanine
Ap	=	ampicillin
Ap^{r}	=	resistance ampicillin
Arg	=	arginine
Asn	=	asparagine
Asp	=	aspartic acid
bp	=	base pairs
BSA	=	bovine serum albumin
CFMM	=	carbon free mineral medium
CIAP	=	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
Cm	=	chloramphenicol
Cm^{r}	=	resistance chloramphenicol
CTAB/NaCl	=	hexadeyl trimethyl ammoniumbromide/sodium chloride
Cys	=	cysteine
DNA	=	deoxyribonucleoside
DMF	=	dimethyl formamide
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	=	flavine adenine dinucleotide
FMN	=	flavine mononucleotide
GC-FID	=	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector

GC-MS	=	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
Gln	=	glutamine
Gly	=	glycine
HCCA	=	2-hydroxychromene-2-carboxylic acid
His	=	Histidine
IARC	=	International Agency for Research on Cancer
Ile	=	isoleucine
IPTG	=	isopropyl thio- ß-D-galactoside
ISP	=	iron sulfur protein
LB	=	Luria Bertani
Leu	=	leucine
Lys	=	lysine
MES	=	2-*N*-morpholino]ethanesulfonic acid
Met	=	methionine
MSTFA	=	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoro acetamide
NAD(P)H	=	nicotinamide adenine (phosphate) dinucleotide
OD	=	optical density
ORFs	=	open reading frames
PAHs	=	polycyclic aromatic hydrocarbon
PCBs	=	poly chlorinated biphenyls
PCR	=	polymerase chain reaction
Phe	=	phenylalanine
ppm	=	parts per million
R_T	=	retention time
RT-PCR	=	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
R_f	=	retention factor
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
Ser	=	serine
sp.	=	species

TAE	=	Tris-acetate/EDTA
TE	=	Tris-EDTA
TEG	=	Tris-EDTA/glucose
tHBPA	=	*trans*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvic acid
Thr	=	threonine
TLC	=	Thin Layer Chromatography
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp	=	tryptophan
Tyr	=	tyrosine
U.S.EPA	=	United States Environmental Protection Agency
Val	=	valine
X-gal	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside