

ทิพวรรณ ล้อรัตนไชยวงศ์ : การคัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ISOLATION AND SEQUENCING OF ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE GENE IN *Rhizobium* sp. CU-A1). อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช; 107 หน้า. ISBN 974-17-0912-9.

ได้คัดแยกและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนจากสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ E11 ที่เกิดจากการสอดแทรกโดยทรานสโปซอน Tn5 และมีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน จากการติดตามขึ้นทรานสโปซอน Tn5 ด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันโดยใช้ชิ้นส่วนของทรานสโปซอน Tn5 เป็นดีเอ็นเอติดตาม สามารถทำการคัดแยกและโคลนขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณจากการไฮบริไดซ์ได้ จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอนโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายของทรานสโปซอน Tn5 เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,014 bp ที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนใน GenBank พบว่าทรานสโปซอนเข้าแทรกยังยีนที่ประมวลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับไฮดรากล-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 จากนั้นนำบางส่วนของขึ้นดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอนขนาด 430 bp ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อตรวจหาขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการในสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 พบว่าสามารถโคลนขึ้นดีเอ็นเอ *Bam*HI-*Hind*III ขนาด 4.5 kb ที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามเข้ายังพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pWT จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนขึ้นดีเอ็นเอขนาด 4.5 kb นี้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ทั้งหมด 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังนี้ ORF1 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 33% กับ putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ORF2 (*acnE*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 38% กับไฮดรากล-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ORF3 (*acnK*) มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 46% กับ 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮโดรจีเนส ของ *Nocardioide*s sp. สายพันธุ์ KP7 ORF4 อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 38% กับโปรตีนที่คล้ายกับแอดดูซิน (adducin like protein) ของ *Mesorhizobium loti* ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน 43% กับ short-chain dehydrogenase ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 การศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือ ยีน *acnE* และยีน *acnK*

4272289223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Rhizobium* sp./ Transposon Tn5/ acenaphthylene/ nucleotide sequences

TIPPAWAN LORRATTANACHAIYONG : ISOLATION AND SEQUENCING OF ACENAPHTHYLENE DEGRADATIVE GENE IN *Rhizobium* sp. CU-A1. THESIS ADVISER : KOBCHAI PATTARAGULWANIT, Dr. rer. nat., 107 pp. ISBN 974-17-0912-9.

Genes involving acenaphthylene degradation from a transposon Tn5-inserted *Rhizobium* sp. mutant strain E11 defective in acenaphthylene degradation were isolated and sequenced. Southern hybridization with transposon Tn5 probe was performed, DNA fragment with positive signal was isolated and cloned. The nucleotide sequence adjacent to transposon was sequenced by using oligonucleotide primer specific to outside end of Tn5. Comparison of amino acid sequence deduced from 1,014 bp nucleotide sequence with those in GenBank revealed that Tn5 was inserted into the gene encoding for amino acid sequence with homology to that of hydratase-aldolase from *Burkholderia* sp. RP007. The fragment of 430 bp adjacent to transposon was generated by PCR and employed as DNA-probe for detecting the positive DNA fragment from wildtype CU-A1. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III-positive fragment was cloned into pGEM-3Zf(+/-) and designated as pWT. Nucleotide sequence thereof revealed fragment with 4.5 kb in size containing 5 Open Reading Frames (ORFs) in the same orientation. ORF1 is an incomplete ORF with 33% homology in term of the respective amino acid sequence to that of the putative ferredoxin reductase of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; ORF2 (*acnE*) shows 38% amino acid sequence homology to that of hydratase-aldolase of *Burkholderia* sp. RP007; ORF3 (*acnK*) shows 46% amino acid sequence homology to 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase of *Nocardioide*s sp. KP7; ORF4 is in the different reading frame to that of ORF1-3 and 5 by showing 38% amino acid sequence homology to adducin like protein of *Mesorhizobium loti*; ORF5 is an incomplete ORF showing 43% homology of amino acid sequence to short-chain dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. The present study is the first to report genes, *acnE* and *acnK*, which involve in the degradation of acenaphthylene in *Rhizobium* sp. CU-A1.