

บทที่ 4

ผลการทดลอง

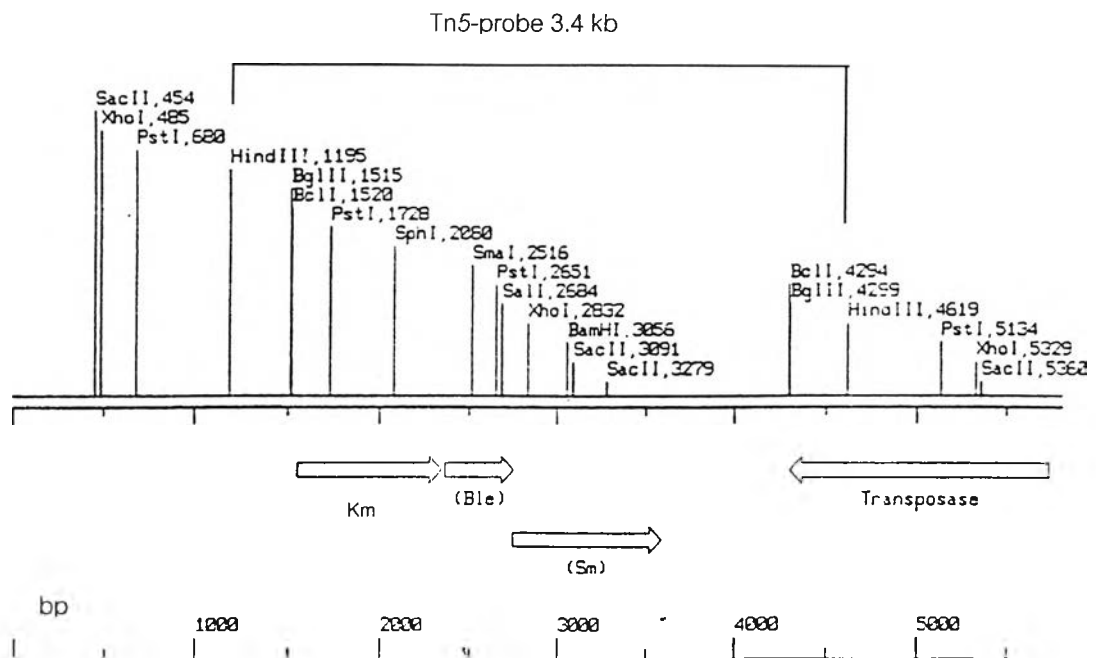
ศรัลยา แพงไตร (2543) พบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ไม่สามารถเปลี่ยนอินโดล (indole) ไปเป็นอินดิโก (indigo) ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถคัดแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนจากเชื้อสายพันธุ์นี้ด้วยการโคลนยีนโดยวิธีสร้างห้องสมุดยีนแบบ Shot-gun เนื่องจากไม่มีระบบคัดเลือกโคลนที่เหมาะสม จึงได้ติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเทคนิคไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม pDI1 ที่จำเพาะต่อยีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ OUS82 (Kiyohara และคณะ, 1994) กับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ในสภาวะความเข้มงวดต่ำ (low stringency) พบว่าไม่เกิดสัญญาณจากการไฮบริโดระหว่างดีเอ็นเอติดตามกับจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ไม่ได้แสดงผลไว้ในรายงานฉบับนี้) จากผลการทดลองดังกล่าวเป็นการยืนยันในระดับหนึ่งว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในเชื้อสายพันธุ์ CU-A1 นี้ น่าจะมีความหลากหลายออกไปจากรายงานอื่นๆ

ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ (2544) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน ได้สายพันธุ์กลายต่างๆที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่เกิดจากการสอดแทรกด้วยทรานสโปซอน Tn5 ดังกล่าวมาศึกษาหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน ด้วยเทคนิคเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันโดยมีทรานสโปซอน Tn5 เป็นตัวติดตาม

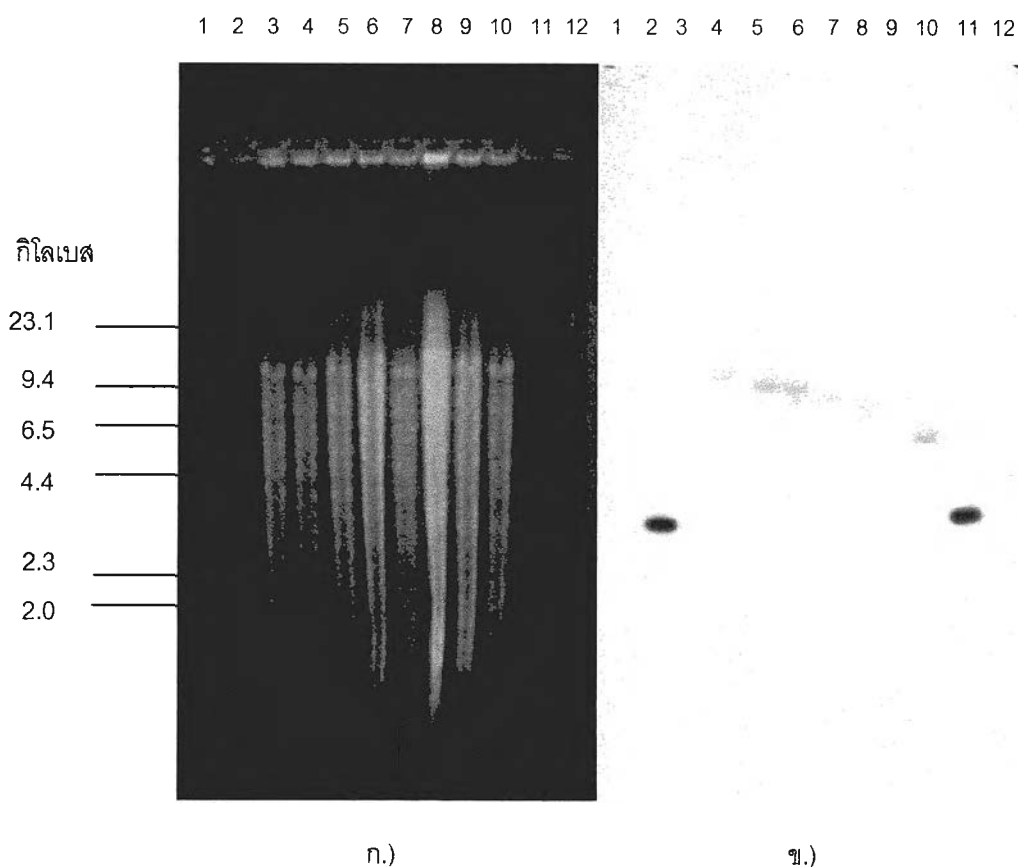
4.1 ค้นหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริโดเซชัน (hybridization)

สายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนจึงคาดว่าทรานสโปซอน Tn5 น่าจะเข้าไปแทรกสอดที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน การติดตามทรานสโปซอน Tn5 ที่สอดแทรกอยู่ในสายดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนเหล่านี้จะสามารถใช้ประโยชน์เป็นเครื่องมือเพื่อหาพื้นที่เกี่ยวข้องการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนได้ โดยเริ่มจากการหาตำแหน่งดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่มีทรานสโปซอนแทรกอยู่ด้วยการสร้างดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับทรานสโป

ซอน Tn5 ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลองข้อ 3.6 และแสดงแผนที่เรสทริกชันของทรานสโปซอน Tn5 ในรูปที่ 4.1 จากนั้นนำไปไฮบริดชันในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) กับ ดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งเป็นเรสทริกชันเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สายพันธุ์นี้ได้ดี และไม่มีตำแหน่งตัดภายในทรานสโปซอน Tn5 ผลไฮบริดเซชันเป็นดังที่ได้แสดงในรูปที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆมีทรานสโปซอนแทรกอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกันโดยสังเกตได้จากสัญญาณการไฮบริดชัน ในขณะที่สายพันธุ์ CU-A1 ชนิดที่ไม่มีทรานสโปซอนแทรกอยู่ไม่ให้อสัญญาณการไฮบริดชัน ส่วนพลาสมิด pSUP2021 ที่ตัดด้วย *HindIII* จะให้อสัญญาณเฉพาะขึ้น ดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่นำไปใช้สร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5



รูปที่ 4.1 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของทรานสโปซอน Tn5 (ขนาด 5818 bp) และตำแหน่งที่นำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5



รูปที่ 4.2 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 12	lambda DNA/ <i>HindIII</i> marker
ช่องวิ่งที่ 2 และ 11	พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII</i> (ตัวควบคุมผลบวก)
ช่องวิ่งที่ 3	ดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>EcoRI</i> (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 4-10	ดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ได้แก่ สายพันธุ์ A53, D1, E11, G12, G531, H1 และ J1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>EcoRI</i> ตามลำดับ

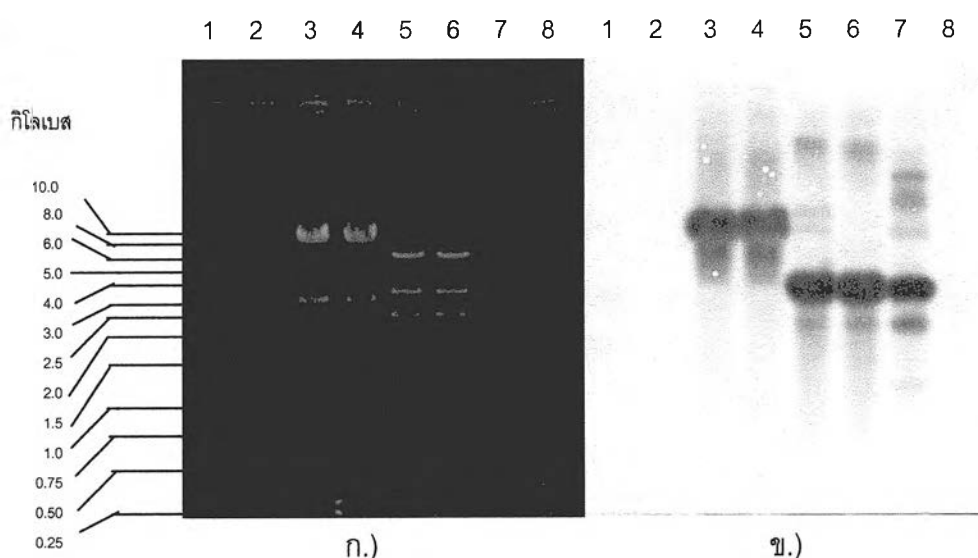
4.2 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ E11 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่

จากผลการทดลองในข้อ 4.1 ทำให้ทราบตำแหน่งดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายต่างๆของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่ จากนั้นได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้สัญญาณขนาดที่เหมาะสมในการโคลน ได้แก่ สายพันธุ์ J1, H1, E11 เป็นต้น มาทำการโคลนเข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตามวิธีการดังที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7 โดยการคัดเลือกโคลนนั้นจะอาศัยสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซินของทรานสโปซอน Tn5 ที่สอดแทรกอยู่เป็นหลัก

พร้อมกันนี้ได้ทำ Inverse PCR ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.8 ควบคู่ไปด้วยเพื่อหาวิธีที่จะได้ข้อมูลของยีนโดยเร็วด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่งแต่พบว่าการทำ Inverse PCR ไม่ประสบผลสำเร็จ ถึงแม้จะทำการแปรผันตัวแปรต่างๆแล้วก็ตาม เช่น เปลี่ยนอุณหภูมิช่วง annealing ให้สูงขึ้น 1-3 °C และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ MgCl₂ ให้ต่ำลงเป็น 0.5 หรือ 1.0 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูงขึ้น หรือแม้แต่การเพิ่มระยะเวลาช่วง extension หรือการใช้ KOD DNA polymerase ที่มีความสามารถสูงกว่า Taq DNA polymerase (TOYOBO) และผลการทดลองโดยใช้พลาสมิด pSUP2021 ที่เป็นตัวควบคุมผลบวกก็ไม่เกิดผลิตภัณฑ์จาก Inverse PCR (ไม่แสดงผล) การที่ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่ต้องการอาจจะเนื่องมาจากการทำ Inverse PCR จะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบด้วยการไลเกทดีเอ็นเอภายในสายเดียวกัน (intramolecular joining) เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ PCR ที่สมบูรณ์ ซึ่งการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบดังกล่าวทำได้ยากและเป็นปัญหาที่สำคัญ จึงไม่ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามที่ต้องการ (Rich และ Willis, 1990) หรืออาจจะเป็นเพราะผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (Sambrook และ Russell, 2001)

ผลจากการโคลนพบว่าสามารถโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 9.2 กิโลเบส จากสายพันธุ์ E11 เข้าในพลาสมิด pBluescript KS(+/-) และให้ชื่อพลาสมิดว่า pTEM หลังจากทรานสฟอร์มพลาสมิด pTEM เข้าใน *E. coli* DH5α พบว่าสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดดังกล่าวสามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ จากนั้นทำการยืนยันโคลนด้วยเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5 ดังที่แสดงผลในรูปที่ 4.3 จากรูปสัญญาณที่เกิดขึ้นในส่วนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) ที่ถูกตัดออกมาจากตำแหน่งโคลน (cloning site) ของพลาสมิด pBluescript KS(+/-) ด้วยเอนไซม์ EcoRI ขนาดประมาณ

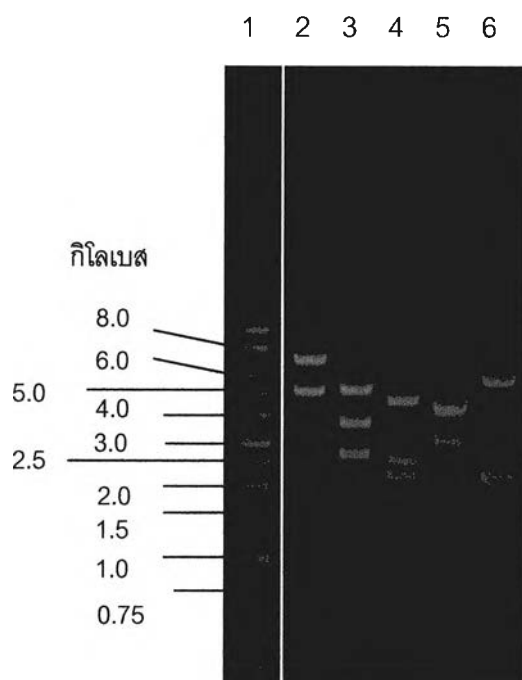
9.2 กิโลเบส เป็นการยืนยันว่าโคลนดังกล่าวมีพลาสมิด pTEM ซึ่งมีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่ในชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว และเมื่อทำการหักลบขนาดของสัญญาณกับขนาดของทรานสโปซอน Tn5 (5.8 กิโลเบส) ก็จะทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอข้างเคียงที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินขนาดประมาณ 3.4 กิโลเบส ส่วนผลจากการตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเอนไซม์ *Hind*III เป็นการยืนยันการแทรกอยู่ของทรานสโปซอน Tn5 ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกนี้ด้วยเพราะในทรานสโปซอน Tn5 มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Hind*III อยู่ภายในซึ่งจะทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.4 กิโลเบส ที่เป็นบริเวณเดียวกับที่นำมาทำเป็นดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5



รูปที่ 4.3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pTEM ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI หรือ *Hind*III ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

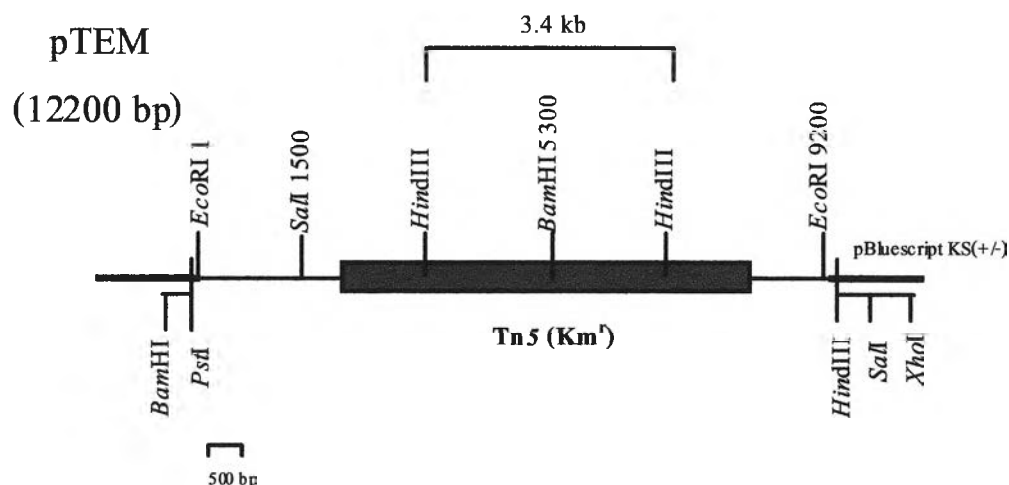
ช่องวิ่งที่ 1 และ 8	1 kb DNA ladder
ช่องวิ่งที่ 2	พลาสมิด pBluescript KS(+/-) ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 3 และ 4	พลาสมิด pTEM ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Eco</i> RI
ช่องวิ่งที่ 5 และ 6	พลาสมิด pTEM ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III
ช่องวิ่งที่ 7	พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind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

นอกจากนี้ยังได้ทำการตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเอนไซม์ restriction บางชนิดเพื่อระบุขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ restriction และนำไปสร้างแผนที่เอนไซม์ restriction ภายในรีคอมมิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว ดังที่แสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5



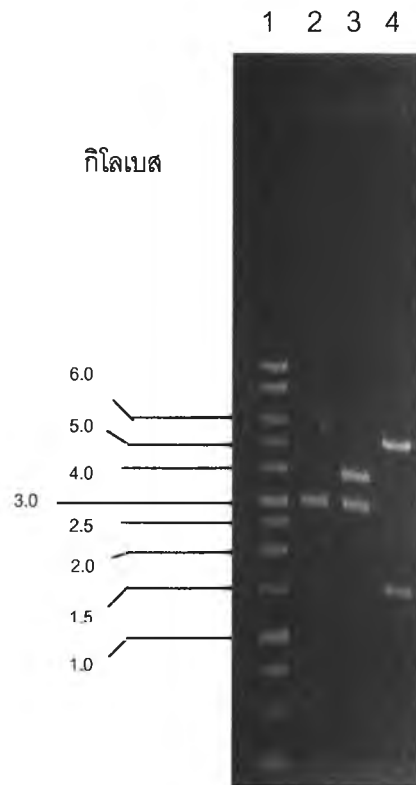
รูปที่ 4.4 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิด pTEM ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ restriction บางชนิดเพื่อระบุตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ restriction

- ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pTEM ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *Bam*HI
- ช่องวิ่งที่ 3 พลาสมิด pTEM ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *Eco*RI/*Bam*HI
- ช่องวิ่งที่ 4 พลาสมิด pTEM ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *Pst*I
- ช่องวิ่งที่ 5 พลาสมิด pTEM ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *Sal*I
- ช่องวิ่งที่ 6 พลาสมิด pTEM ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction *Xho*I



รูปที่ 4.5 แผนที่เรสทริกชัน (Restriction map) ของพลาสมิด pTEM

พลาสมิด pTEM ที่ได้นั้นยังไม่สามารถนำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ได้เพราะไพรเมอร์ TN5-OE ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะต่อปลายทั้ง 2 ด้านของทรานสโปซอน Tn5 ดังนั้นจึงทำการสับโคลน (subcloning) พลาสมิด pTEM เพื่อตัดแบ่งครึ่งทรานสโปซอน Tn5 ภายในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรก เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปหาลำดับเบสต่อไปตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.7.6 โดยตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส สับโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ให้ชื่อพลาสมิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า pTEB ทำการยืนยันพลาสมิดที่ได้ด้วยการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ดังที่แสดงในรูปที่ 4.6 และสร้างแผนที่เรสทริกชันภายในพลาสมิดดังกล่าวดังแสดงในรูปที่ 4.7 จากรูปยังแสดงถึงตำแหน่งที่ทำการสับโคลนจากพลาสมิด pTEM และผลการทดลองในส่วนที่ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *BamHI/HindIII* เกิดเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.6 กิโลเบส ทำให้สามารถระบุได้ว่าสับโคลนนี้มีชิ้นส่วนด้านใดของทรานสโปซอน Tn5 อยู่



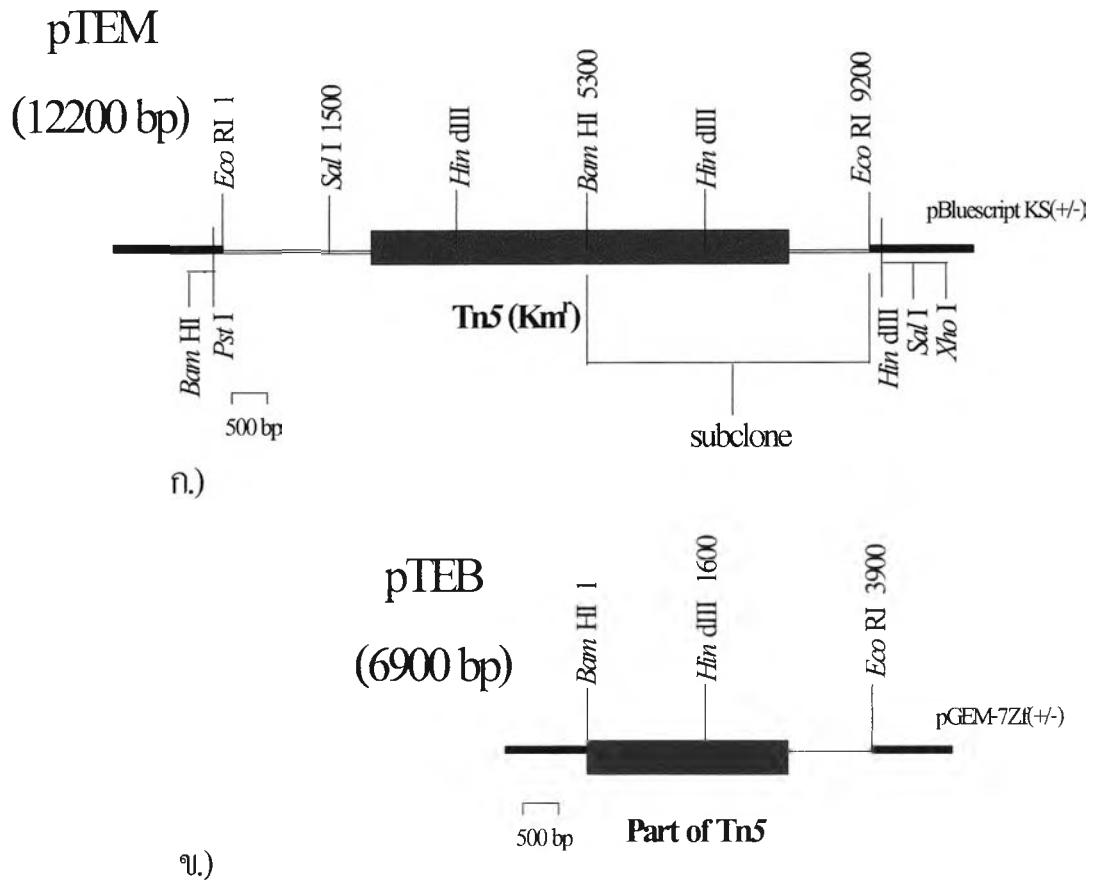
รูปที่ 4.6 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pTEB ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆเพื่อยืนยันพลาสมิด

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (พลาสมิดเวกเตอร์ที่ใช้ในการโคลน)

ช่องวิ่งที่ 3 พลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI/BamHI*

ช่องวิ่งที่ 4 พลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII/BamHI*



รูปที่ 4.7 ภาพแสดงการสับโคลนเพื่อสร้างพลาสมิด pTEB ตำแหน่งที่ทำการสับโคลนของพลาสมิด pTEM (ก.) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTEB (ข.)

4.3 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างเคียงทรานสโปซอนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรณีนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn5 (TN5-OE primer) โดยมีทิศทาง 5' → 3' ออกจากทรานสโปซอน ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คือส่วนที่ติดกับทรานสโปซอนหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือเป็นบริเวณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนซึ่งทรานสโปซอนเข้าไปแทรกอยู่แล้วทำให้การย่อยสลายอะซีแนพริลีนบกพร่องไป จากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงในรูปที่ 4.8 เมื่อนำไปเทียบดูความเหมือน (homology) ในระดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BlastN version 2.2.1 แล้วพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับยีนใดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs จึงได้เทียบหาความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 ซึ่งจะทำให้การแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวให้เป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำเข้าไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ได้ผลที่แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนของไฮดรატเอส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ถอดรหัสมาจากยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) (ภาคผนวก ค2)

```

      10          20          30          40          50
5' TTGTGTATAA GAGTCAGGAA TAGGCTCGTT CGCCAGCCG ATGGCCGCCG
      60          70          80          90          100
TCAGCGTATG GATGGCGTCC TGGTTCCGGG CTCGATCGC TCTCATCAGG
      PHNF primer →
      110         120         130         140         150
GCGATTGCAG GCGCAGGGTT CATGCCGGAG GCCGTTGCC AGCAGGCCGT
      160         170         180         190         200
CGTCGTATTG GGCGCGATGG CGAAGAAGTC CTGCACGACC ATTTTCGTTCC
      210         220         230         240         250
GCATGAAATT GATCCGCCCC CCCGTCGCCG CGATCAGTTC CTTCAGTCCC
      260         270         280         290         300
TGGTACGGG AATACTTCGC CGAAGTCACG GTGGGAGCCG CCTGCGCCAC
      310         320         330         340         350
TGCCGACCAG AACTCAAGCG GAAAGGAGAA GCGGAAGGCG CGCGCATTAN
      360         370         380         390         400
CGTAAGCCAT GATCGCAAGA TCGGGGAACA GTTCTGAAAT TCCCGCGTAA
      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'

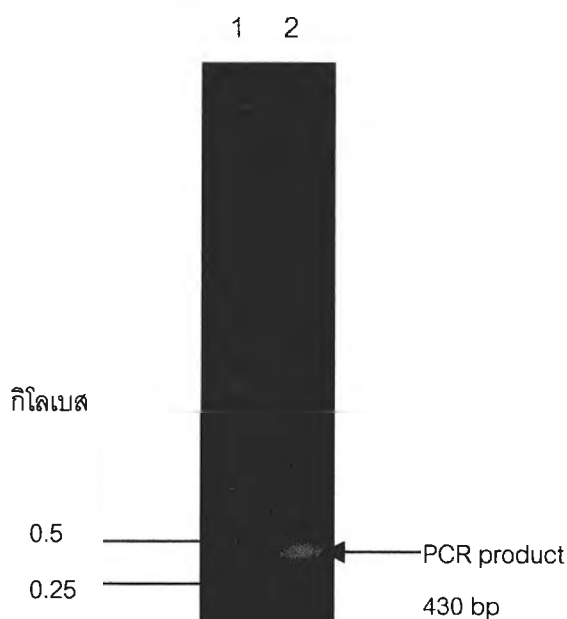
```

รูปที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เป็นตัวอักษรหนาแสดงถึงส่วนที่เป็นทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรปกติคือดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการทำดีเอ็นเอติดตาม AE และลูกศรแสดงถึงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

4.4 ค้นหาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบนโครโมโซม *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน

4.4.1 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 สามารถนำมาใช้ในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวโดย forward primer ตั้งชื่อว่า PHNF และ reverse primer ตั้งชื่อว่า PHNR โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.8 จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.10.2 โดยใช้พลาสติก pTEB ที่มีส่วนของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) มีขนาด 430 bp ตามที่คาดหมายไว้ดังแสดงในรูปที่ 4.9 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการติดฉลากด้วย DIG ตามขั้นตอนและวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.10.3 เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า ดีเอ็นเอติดตาม AE (AE-probe)



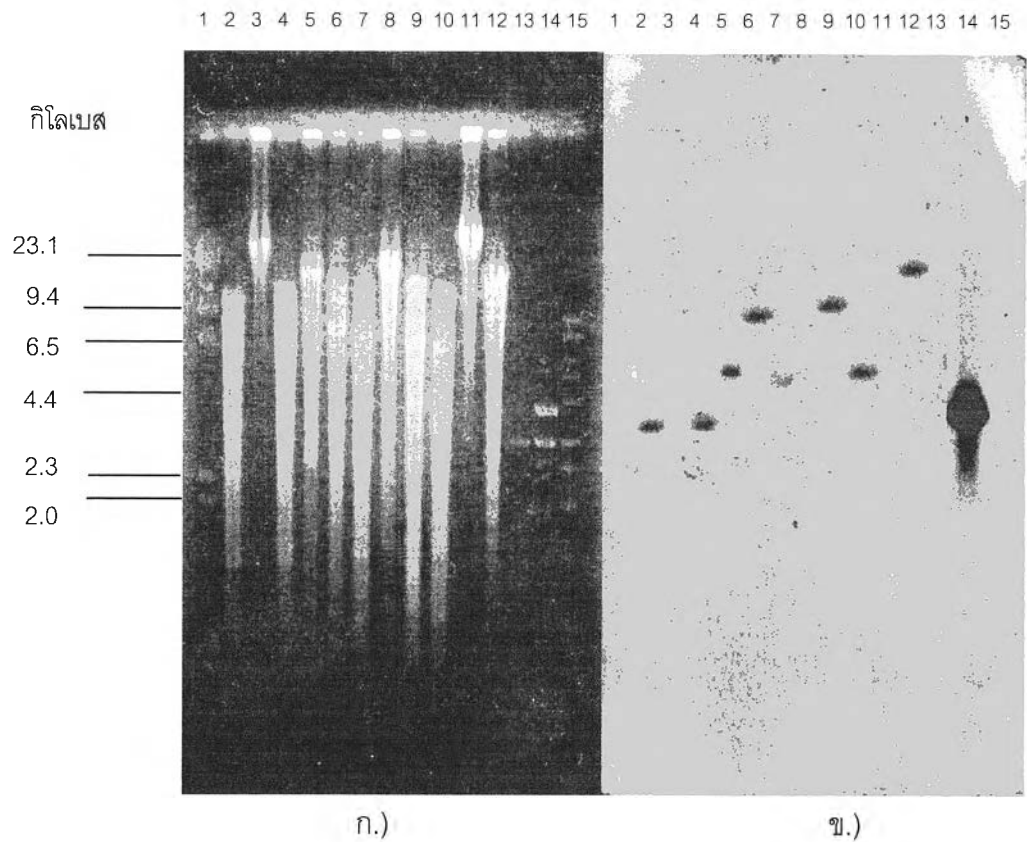
รูปที่ 4.9 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะนำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม

ช่องวิ่งที่ 1 1 kb DNA ladder

ช่องวิ่งที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR

4.4.2 ไฮบริโดเซชันดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีน (AE-probe)

การหาตำแหน่งดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน ตรงบริเวณที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลีนนั้นทำโดยนำดีเอ็นเอติดตาม AE มาไฮบริโดซ์ในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) กับไลบรารีในเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ผลการไฮบริโดซ์เป็นดังที่ได้แสดงในรูปที่ 4.10 จากการทดลองพบว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เกิดสัญญาณจากการไฮบริโดซ์ขนาดต่างๆ กัน โดยที่พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลลบ) ไม่ให้สัญญาณการไฮบริโดซ์ ส่วนพลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณเฉพาะส่วน insert ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส นอกจากนี้ยังพบว่าสัญญาณที่เกิดขึ้นจากกรณีที่ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์ดั้งเดิม *Rhizobium* sp. CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* มีขนาดประมาณ 3.4 กิโลเบส (ไม่มีทรานสไปซอนแทรกอยู่) ซึ่งสอดคล้องกับขนาดสัญญาณในกรณีที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* ที่แสดงไว้ข้างต้นของสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ E11 ที่มีขนาดประมาณ 9.2 กิโลเบส (มีทรานสไปซอนแทรกอยู่) โดยหักลบส่วนที่เป็นทรานสไปซอน Tn5 แล้วจะเหลือส่วนที่เป็นดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสไปซอนประมาณ 3.4 กิโลเบส เช่นกัน



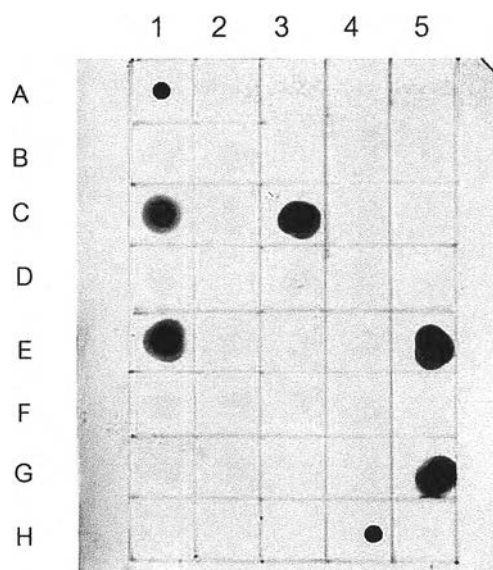
รูปที่ 4.10 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE

- ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 lambda DNA/*Hind*III marker และ 1 kb DNA ladder ตามลำดับ
- ช่องวิ่งที่ 2-12 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ คือ *Eco*RI, *Pst*I, *Eco*RI/*Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Bam*HI/*Hind*III, *Bgl*II, *Sal*I, *Bgl*II/*Sal*I, *Xba*I และ *Xho*I ตามลำดับ
- ช่องวิ่งที่ 13 พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องวิ่งที่ 14 พลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)

4.5 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแวนพิธิน

จากผลไฮบริดเซชันที่ได้ในข้อ 4.4 ทำให้ทราบตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแวนพิธินในบริเวณที่ศึกษาอยู่ดังกล่าว ซึ่งเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้สัญญาณที่แตกต่างกัน ในที่นี้ได้คัดเลือกสัญญาณที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III ซึ่งให้สัญญาณขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส เพื่อการโคลน โดยการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสัญญาณดังกล่าวเข้ายังพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ตามวิธีการในข้อ 3.11.1 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109

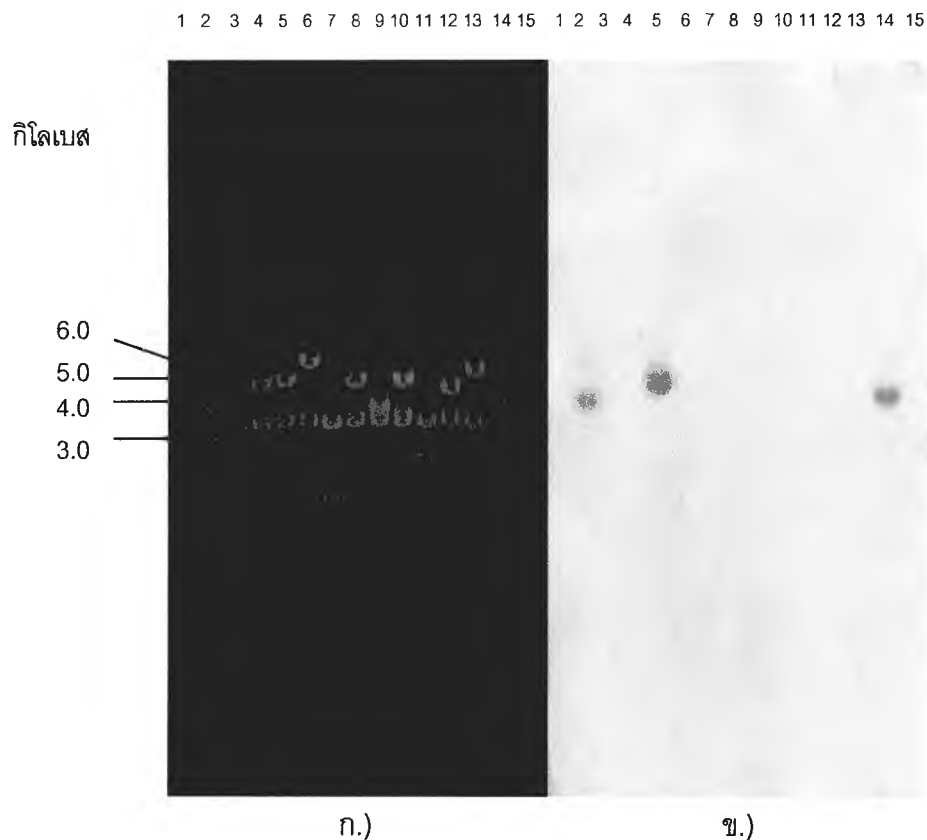
สำหรับวิธีการคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแวนพิธินในบริเวณดังกล่าวทำได้โดยขั้นตอนดังนี้ ขั้นแรกคัดเลือกด้วยวิธี Blue/White selection โดยคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก (insert) เชื่อมกับพลาสมิดพาหะซึ่งจะให้โคโลนีสีขาวและต้านต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ในที่นี้ได้คัดเลือกโคลนดังกล่าวมาทดสอบจำนวน 300 โคลน จากนั้นทำการสุ่มผสมโคลนทั้งหมด โดยผสม 10 โคลน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 หลอด สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากแต่ละหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ 1 ตัวอย่างของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้นั้นจะประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจาก 10 โคลน จากนั้นนำพลาสมิดเหล่านั้นมาทำ Dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.11.2 ผลของสัญญาณจากการไฮบริดซีเป็นไปตามรูปที่ 4.11 จากสัญญาณที่ปรากฏขึ้นแสดงว่ามีโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (positive clone) อยู่ในกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่ม คือ ตัวอย่างกลุ่ม C1, C3, E1, E5 และ G5



รูปที่ 4.11 ภาพแสดงการทำ Dot blot hybridization ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากโคลนที่ได้จากสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE

- ช่องที่ A1 และ H4 พลาสมิด pTEB (ตัวควบคุมผลบวก)
 ช่องที่ A2 และ H5 พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) (ตัวควบคุมผลลบ)
 ช่องที่ B1-G5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่คัดเลือก 10 โคลน ต่อ 1 ช่องตัวอย่าง

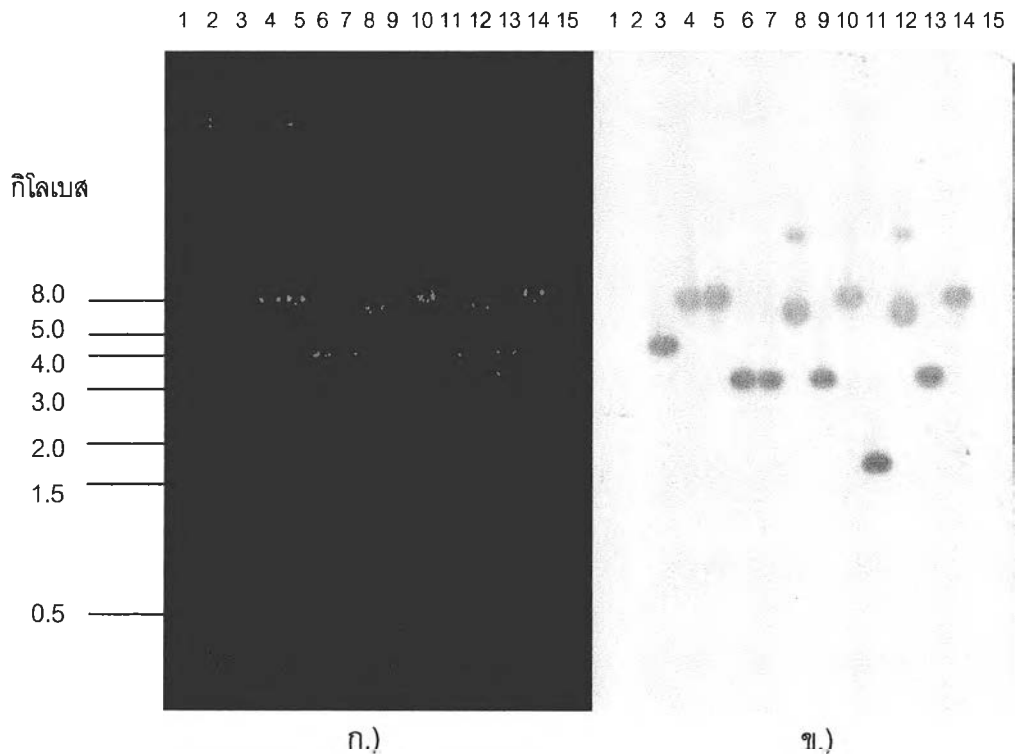
ในที่นี้ได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างกลุ่ม C3 ซึ่งประกอบด้วยโคลนต่างๆ 10 โคลน มาคัดแยกให้ได้โคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการแยกเพาะเลี้ยงแต่ละโคลนในอาหารเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม AE อีกครั้ง ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.11.2 พบว่าโคลนที่ 22 ในช่องวงที่ 5 ให้ผลบวกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน แสดงว่าโคลนดังกล่าวมีขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 จากรูปแสดงว่าโคลนที่ 22 มีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก *Bam*HI-*Hind*III ขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส เชื่อมอยู่กับพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า พลาสมิด pWT



รูปที่ 4.12 ภาพแสดงเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากตัวอย่างกลุ่ม C3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของโคลนตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III ข.) ภาพไนลอนเมมเบรนที่ให้สัญญาณจากไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE

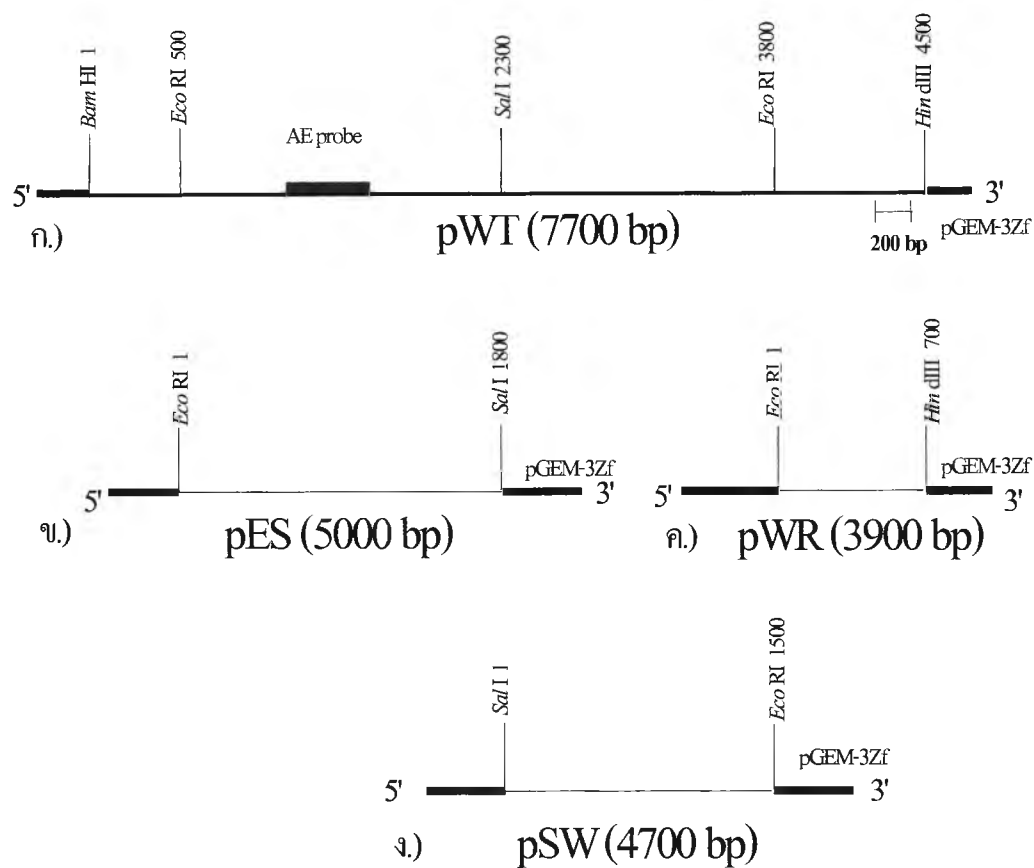
- ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 1 kb DNA ladder
- ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI (ตัวควบคุมผลบวก)
- ช่องวิ่งที่ 3 พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III (ตัวควบคุมผลลบ)
- ช่องวิ่งที่ 4-13 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดของโคลนที่ 21-30 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III

ทำการตัดพลาสมิด pWT ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์บางชนิดและทำเซาท์เธอร์นไฮบริดส์ด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE เพื่อระบุตำแหน่งของเรสทริกชันเอนไซม์และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตามบนชั้นดีเอ็นเอดังแสดงในรูปที่ 4.13 จากนั้นสร้างแผนที่เรสทริกชันได้ดังแสดงในรูปที่ 4.14 จากรูปยังแสดงถึงตำแหน่งที่ทำการสับโคลนเพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT



รูปที่ 4.13 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของพลาสมิด pWT ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งเรสทริกชันเอนไซม์ในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตาม AE

- | | |
|----------------------|---|
| ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 | 1 kb DNA ladder |
| ช่องวิ่งที่ 2 | พลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII/BamHI</i> (ตัวควบคุมผลลบ) |
| ช่องวิ่งที่ 3 | พลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII/BamHI</i> (ตัวควบคุมผลบวก) |
| ช่องวิ่งที่ 4-14 | พลาสมิด pWT ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRI/BamHI</i> , <i>PstI</i> , <i>EcoRI/PstI</i> , <i>Sall</i> , <i>EcoRI/Sall</i> , <i>XhoI</i> , <i>EcoRI/XhoI</i> และ <i>Sall/XhoI</i> ตามลำดับ |



รูปที่ 4.14 ก.) ภาพแสดงแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pWT และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม AE ในบริเวณขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสับโคลนขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pES (ข.) pWR (ค.) และ pSW (ง.)

4.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธินจากพลาสมิด pWT

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในที่นี่ใช้ทั้งวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ทราบแล้วและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อกับบริเวณดังกล่าว และอีกวิธีหนึ่งคือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย universal primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของพลาสมิดพาหะในรีคอมมิแนนท์พลาสมิดของสับโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของรีคอมมิแนนท์พลาสมิด

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมิด pWT ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 4574 bp ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 4.15 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank (ภาคผนวก ค) ได้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 138 ของ ORF1 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือน กับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลผลโดยยีน *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 ความเหมือน กับไฮดรอะเลส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ประมวลผลโดยยีน *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 ความเหมือน กับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนส ที่ประมวลผลโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% ให้ชื่อ ORF3 ว่า *acnK*

4. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 260 ของ ORF4 ซึ่งพบว่ามี ความเหมือน กับโปรตีนที่คล้ายแอดดูซิน (similar to adducin) ที่ประมวลผล

โดยยีนในจีโนมของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko และคณะ, 2000) เท่ากับ 38% ORF4 อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5

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

นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็นที่จับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4.16 จากรูปนอกจากจะแสดงบริเวณจุดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT โดยสมบูรณ์แล้วยังได้แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่เป็น ORF ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและแสดงตำแหน่งที่ทรานสโปซอน Tn5 แทรกสอดในสายพันธุ์กลาย E11 ด้วย

ORF1 →

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

61 GCGGCTGGAAAACCTGGATGCACGCACTCGACCACGGCACAGTGCCCGGGCAAATGCAGC
 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 CGGTGGAGACATTGCCTACGAAGCAAAACCTCCTTCTGGTCTGAACAATACGATCTTTA
 41 G G D I A Y E A K P S F W S E Q Y D L Y

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

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

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

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

421 CAGGACCAACCCTATGCACGGACAGCCCTGCGCTGGGCGGACTGGATAACACGGCAATAG

481 AATTCAGTTTTACAGAATTCATTTCTTTATTACAGAATTTATTTGCCACATACATCGATG

541 CCGCCTATAGTGATCACGCGGTCCGAGTGCTGGAGGGGAAGAACAGGCATCCGTCATCTC

601 GACACGGCCTTGCGGGCATTGACGATTGTACAAGCGGGGAGTGAAAAGCGCTTCGCTTG

661 CAGCCGGAACCTGGAGGAGACACCTGGCACTTCCTTGATGACGCAACCGCAGACACACCAT

721 TCCC GGCAATGATCACCCCTTAAAGGGCGGAGCCGAAAGCTCGATTGACGTTCTTGACGT

RBS

781 CCATTGCAAGCGCTCCGGACGACCTGTTGTCGTGGGCGCTTTTTATTTTCGAAGAAAGGTT

ORF2 (acnE) →

841 GAAGACCAATGCTCACTGCTGCCGACATCCATGGGATGTACGCCATCATCGCGACCCCGGC
 1 M L T A A D I H G M Y A I I A T P A

901 GAAACCCATGCCGAAGACTGGACGCCAAGGACACCGTTGATCTTGCCGAAACCGAGCG
 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

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

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

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

1201 GTGGCAGCCGGTGACGACACGGATGGCCGTCGATTATTACGCGGAATTTTCAGAACTGTT
 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

(มีต่อหน้าถัดไป)

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

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

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

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

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

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

1681 GATCAATGCCCGCGGTTACAGCCAGTGGCGCCCGT GAGACCCCTATCAGGACTTCCC
 279 I N A A G Y S Q C G P V R P P Y Q D F P

1741 GGAAGATTATGCCGCGCAGGCCCGTGAATGCGGCCAGCGCTGGCACCGCATCTGCGATGC
 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

RBS

1861 CTGAAACGGCAGCCGCGCCACTGCGCGCGGCGCCTTTATGCACAGCCAAACTATCTGGAG
 339 *

ORF3 (acnK) →

1921 TAGGTCGATGGGATACATCACGACAGCAGACCGCATGCTGATTGGCGGCGAGCTGGTGG A
 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 CGTTCCTGCCGGGACAAGGGAGGATGTGGACCGCGCCGTTGCCGAGCCAGGCGGCATG
 39 V P A G T R E D V D R A V A A A Q A A W

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

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

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

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

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

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

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

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

(มีต่อหน้าถัดไป)

2581 CCCGAAATCAAGCGCATCGCGTTCATTGGATCGGCAGCCACCGGCCGCGCCATCCAGAG
 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 GATCGTTTTTCCCACAAATGATCCGGACGAGATTGCGCAAGCCGCGGTCAAGGGAATGAA
 259 I V A P D N D P D E I A Q A A V K G M N

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

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

2881 GATGCGCGACGACAGCGACATGGGACCGATCAACTCCGCCGGCAGTATCGCAAGGTCAT
 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 GGATGGTCAAGCCTTCGCCAAGGGTACTGGGTGACACCCACCGTCTTTGCCGATGTCGA
 359 D G Q A F A K G Y W V R P T V A A D V D

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

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

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

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

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

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

3421 GGAATTTTGTA AAAACAAAGAGATGGAGCATATCCGGCAAGCGGGAGGCGCACC GGAAAT

ORF4 →

1 RBS M P D H I K Q T I S E A
 3481 GCTCCGGAATGCAG**GGAG**TTTCATACC**ATG**CCTGACCACATCAAACAGACCATCAGCGAGG

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

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

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

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

(มีต่อหน้าถัดไป)


```

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

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 TGCGCCTGCGCTCCGTTTTTTCATATGGCCGGTTTTTCATCGGTGAGGACGCACCGCTTTTTCG

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 ACGCGCTGGCCGCTGCTGCGGAGAGCGGAACATCGTGTGATGCGCGGACATGGTTCGA

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

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

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

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

                                RBS      ORF5 →
4321 CGCGATAACAATTCAAGCAACATGAGAGGCATCATGGGTAATCGTCTGGATGAAAAAGT
1      M G N R L D E K V

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

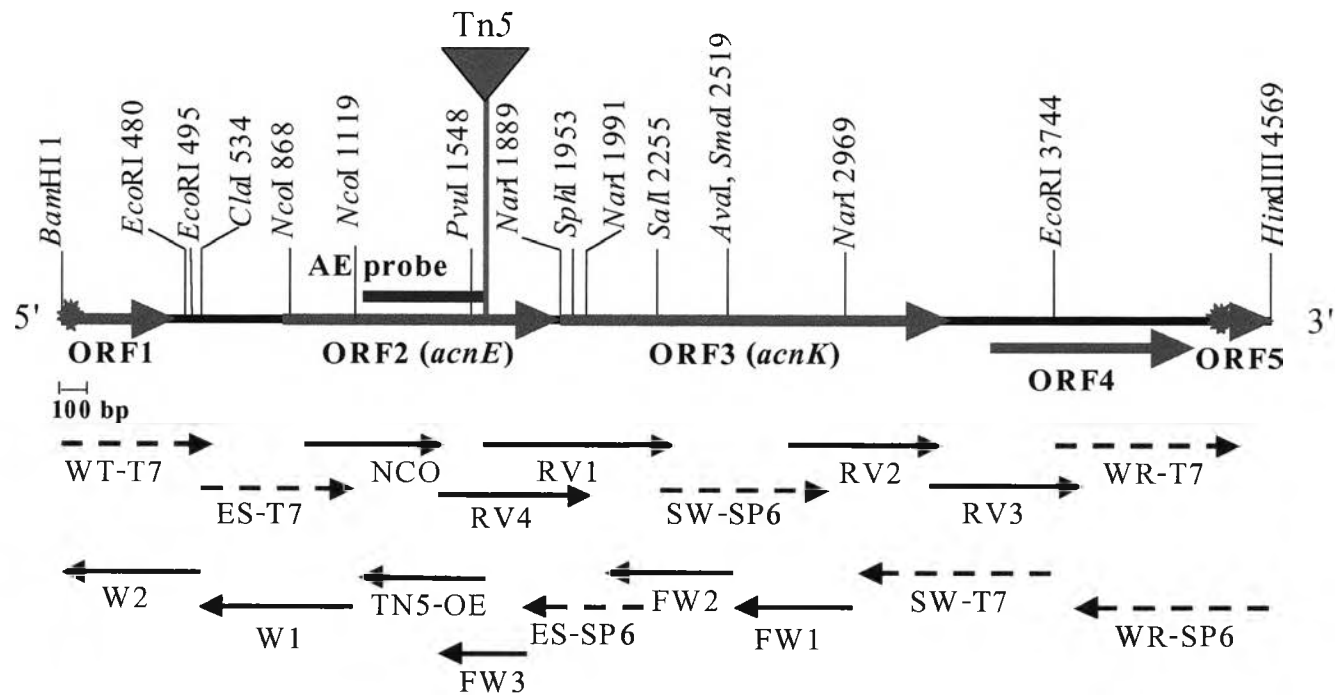
4441 TCAGGGCGGCAGGATCGTTGTCAGTGACCGCAATGTCGCTGGCGGCGAGGAAACCGTTCC
30     Q G G R I V V S D R N V A G G E E T V R

4501 GCAAATCGTCGAGCTGGGCGGTGAGGCAATCTTCGTTGCCTGTGACGTGCGGAACCGCGA
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 4.15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp ลูกศรแสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน ตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย * แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาแสดงบริเวณที่เป็น putative ribosome binding site (RBS) กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดเดียวกันแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงินและกรดอะมิโนที่อยู่ต่างกรอบอ่านรหัสเปิดแสดงด้วยอักษรสีแดง กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม



รูปที่ 4.16 แผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม AE ตำแหน่งสอดแทรกของทรานสโปซอนในสายพันธุกรรมในสายพันธุ์กลาย E11 และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตัวต่างๆตามที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย \longrightarrow เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ \dashrightarrow เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย \star แสดง ORF ที่ยังไม่สมบูรณ์