อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การศึกษาการแสดงออกของยีนและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนสที่มีผลต่อการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์

โดย ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล

1 พฤษภาคม พ.ศ. 2557

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 17 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1678975
เลขเรียกหนังสือ ว QD 305 .A6 อ257ร 2557

สัญญาเลขที่ R2555C087

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การศึกษาการแสดงออกของยีนและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนสที่มีผลต่อการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์

ผู้วิจัย
ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

สนับสนุนโดยงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

โครงการ: การศึกษาการแสดงออกของยีนและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจิเนสที่มีผลต่อการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์

บทคัดย่อ

ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารพิษพบได้ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์สามารถถูกแยกได้จากน้ำทิ้งที่ได้จากน้ำดองร่างอาจารย์ใหญ่ในการศึกษาทางด้านการแพทย์ เอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ย่อยสลายและทำลายพิษฟอร์มาลดีไฮด์ คือ เอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจากแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 10 ที่แยกได้จากน้ำทิ้งน้ำดองร่างอาจารย์ใหญ่ โดยทำการสังเคราะห์ degenerate primer ที่สามารถเพิ่มขยายบริเวณอนุรักษ์ของยีนฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จากนั้นเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี PCR ได้ชิ้นยีนขนาด 708 bp นำชิ้นส่วน PCR ไปตรวจสอบโดยการหาลำดับเบสและเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสที่ได้ในฐานข้อมูลด้วยวิธี BLAST search analysis พบว่าชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนได้ดังกล่าวมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับยีนฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในฐานข้อมูล ทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนยีนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนศึกษาโดยวิธี reverse transcription PCR ผลการทดลองพบว่ายีนฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสมีการแสดงออกในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยสารฟอร์มาลดีไฮด์ ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนมีความสอดคล้องกับผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยฟอร์มาลดีไฮด์คิดเป็น 10.40 เท่า เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสที่วัดได้ในเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ ผลการทดลองนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่ายีนเอนไซม์ฟอร์มาลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งดองร่างอาจารย์ใหญ่อาจจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ในสภาวะเครียดที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ในสิ่งแวดล้อมในปริมาณสูง

Title: The gene expression and activity assay of formaldehyde dehydrogenase enzyme for formaldehyde detoxification

ABSTRACT

Formaldehyde is a toxic chemical in the environment. The formaldehyde degradation microorganisms were isolated from wastewater of the preservation of cadavers used in medical education. The formaldehyde oxidizing enzyme; formaldehyde dehydrogenase (FDH), plays an important role in formaldehyde detoxification. The expression of FDH gene from formaldehyde enriched wastewater bacterial isolation number 10 was studied. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial 708 bp fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment. The gene expression result is in accordance to the formaldehyde dehydrogenase enzyme activity assay which showed formaldehyde induced FDH activity 10.40 times over the FDH activity in TSB growing bacterial culture. These results indicated that FDH isolated gene from formaldehyde enriched wastewater bacteria may be involved in formaldehyde detoxification and play important roles in response to high formaldehyde stresses.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ไทย)	3
Abstract	4
Executive Summary	6
บทนำ	7
เนื้อหาการวิจัย	11
การดำเนินการวิจัย	12
ผลการดำเนินการวิจัย	16
Outout ที่ได้จากการวิจัย	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	29

Executive Summary

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับผิดชอบจัดการเรียนการสอนวิชากายวิภาคศาสตร์สำหรับนิสิตวิทยาศาสตร์สุขภาพทุกสาขา ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อใช้ในการเรียนการสอนดังกล่าว ในการดองร่างอาจารย์ใหญ่มีอัตราการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณที่มาก และมีความเข้มข้น ในการศึกษาของคณะวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เกี่ยวกับนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์จากการดองร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อการศึกษาทางการแพทย์ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ และพบว่า มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ให้ลดลงได้อย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ

ในการศึกษากลไกการทำลายพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ จำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายดังกล่าว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ที่เป็นตัวกำหนดการสร้างเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ ควบคู่กับการตรวจติดตามวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในภาวะต่างๆ ที่มีบทบาทต่อการลดระดับฟอร์มาลดีไฮด์ในภาวะแวดล้อมได้ ผลการศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ พบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ คือ ไอโซเลทหมายเลข 10 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตลอดจนการย้อมสีแกรม เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียเบื้องต้น สามารถจัดจำแนกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มของจีนัส *Pseudomonas sp.* การศึกษาการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ เริ่มต้นโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณที่สนใจด้วย degenerate primer พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอนเอได้ และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสจากชิ้นส่วนดีเอนเอดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าเป็นลำดับเบสที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน เอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA พบว่าการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase ในเชื้อไอโซเลทหมายเลข 10 สามารถพบได้ในเฉพาะเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาดีไฮด์ (FMI) แสดงว่ายีน Formaldehyde dehydrogenase สามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์สูง ผลการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับผลกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase เพิ่มขึ้นในเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ ไม่พบการแสดงออกของยีนและตรวจสอบพบกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ในปริมาณที่น้อยมาก ข้อมูลความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน และกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในภาวะที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูงจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการลดระดับฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดี ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมลพิษ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสารมลพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

บทนำ

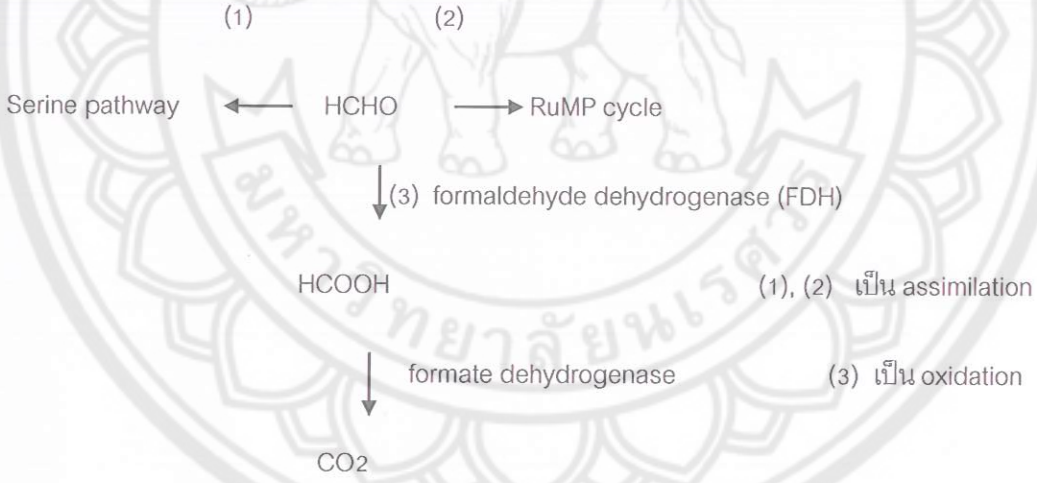
ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษและเป็นสารกระตุ้นให้เกิดมะเร็งที่ระบบทางเดินหายใจ ต่อมน้ำเหลืองและเม็ดเลือดขาว การสัมผัสสารเป็นเวลานาน ทำให้ผิวหนังผิดปกติ ก่อให้เกิดเนื้องอก มีผลทำลายตับ ไต หัวใจ มีฤทธิ์กัดกร่อนต่อตา ผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจ เป็นสารที่ใช้สำหรับดองศพเพื่อไม่ให้ศพเน่าเปื่อย ใช้ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าเชื้อรา ในการเรียนการสอนชั้นปรีคลินิกของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับผิดชอบจัดการเรียนการสอนวิชากายวิภาคศาสตร์ สำหรับนิสิตวิทยาศาสตร์สุขภาพทุกสาขา ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อใช้ในการเรียนการสอนดังกล่าว โดยมีหน่วยรับบริจาคร่างกายสำหรับผู้ประสงค์จะอุทิศร่างกายเพื่อใช้ในการศึกษาหลังจากเสียชีวิตแล้ว และอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่สำหรับดองร่างผู้เสียชีวิตให้มีสภาพที่สมบูรณ์ที่สุดก่อนนำไปศึกษา ในการดองร่างอาจารย์ใหญ่มีอัตราการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในปริมาณที่มาก และมีความเข้มข้นสูง และเมื่อศึกษาถึงส่วนประกอบของน้ำยาดองร่างอาจารย์ใหญ่ที่ใช้ในการดองแต่ละครั้งพบว่า มีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นสูง โดยมีอัตราส่วนของฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 40 % จากการศึกษาโดยคณะวิจัย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ เกี่ยวกับนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีฟอร์มาลดีไฮด์จากการดองร่างอาจารย์ใหญ่เพื่อการศึกษาทางการแพทย์ สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จำนวนสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ โดยใช้อาหาร formaldehyde enrichment medium ที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นส่วนประกอบ พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์จากบ่อดองร่างอาจารย์ใหญ่ที่มีความสามารถย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้โดยเกิดกระบวนการ formaldehyde oxidation โดยเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) มีผลทำให้ฟอร์มาดีไฮด์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และให้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย และในระหว่างปฏิกิริยาการย่อยสลายจะมีการกำจัดไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอนออกจากโครงสร้าง อิเล็กตรอนจะถูกผ่านไปยังวิถีขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อสร้างเป็นพลังงานให้กับเซลล์ จัดเป็นกระบวนการลดพิษ (Detoxification) ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ โดยศึกษาบทบาทและหน้าที่ในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในระดับยีน โดยศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในภาวะแวดล้อมที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูง จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่ทำให้เข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำความรู้ไปใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อสามารถนำมาประยุกต์ ใช้ในระบบบำบัดทางชีวภาพอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

จุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์

การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีหนึ่งที่มีความปลอดภัยและมีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ดังนั้น ในการนำจุลินทรียมาใช้ในการบำบัดสารมลพิษ จึงต้องมีการคัดแยกจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนต่าง ๆ มาทำการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถของจุลินทรีย์นั้น ๆ ในการย่อยสลายสารมลพิษเป้าหมาย โดยค้นหาจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีความสามารถเป็นเอกลักษณ์และสามารถย่อยสลายสารมลพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการปรับตัวและเหนี่ยวนำให้มีระบบเอนไซม์และวิถีทางชีวภาพที่จำเพาะในการย่อยสลายสารมลพิษจะเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว

จุลินทรีย์มีระบบเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆในวิถีการย่อยสลายสารมลพิษ ทำให้จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษด้วยประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ความจำเพาะในการย่อยสลายสารมลพิษทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการดำรงชีพอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ กัน ระบบเอนไซม์เหล่านี้เป็นระบบเอนไซม์ที่มีอยู่ในวิถีทางชีวเคมีตามธรรมชาติที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ เพื่อย่อยสลายสารให้ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลเล็กลง เพื่อให้เซลล์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญได้ รวมถึงการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ด้วย สำหรับจุลินทรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนด้วยสารมลพิษที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารตั้งต้นของเอนไซม์ จุลินทรีย์ต้องมีการปรับตัวของเซลล์ เช่นการกลายพันธุ์เพื่อให้มีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารมลพิษนั้น ๆ การเปลี่ยนแปลงอาจเกิดขึ้นจากการเกิดวิวัฒนาการในระดับยีนและโปรตีน ทำให้เอนไซม์ที่มีอยู่เดิมมีการเปลี่ยนแปลง และมีความสามารถทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีมลพิษนั้น ๆ ได้

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ ยกตัวอย่างสารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม เช่น methane, methanol, methylamine, formate และ formaldehyde จัดอยู่ในกลุ่ม methylotroph จากการรายงานการศึกษาของ Mitsui และคณะ (Mitsui et al., 2004) แบคทีเรียที่ย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์ได้นั้นเซลล์ของแบคทีเรียต้องมีระบบ formaldehyde fixation ตามด้วยการ oxidation และ assimilation ของฟอร์มาลดีไฮด์



กระบวนการเกิด formaldehyde oxidation ในจุลินทรีย์ ส่วนมากเกิดจากการผลิตเอนไซม์ aldehyde oxidase ที่สำคัญ คือ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ทำให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์เป็นกรดฟอร์มิก และตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ formate dehydrogenase ในขณะที่กระบวนการเกิด assimilation ของฟอร์มาลดีไฮด์ในจุลินทรีย์ เกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางและนำไปสร้างเซลล์ โดยใช้ pathway ที่สำคัญ คือ 1) serine pathway โดยการนำฟอร์มาลดีไฮด์ 2 โมเลกุล รวมกับ CO_2 1 โมเลกุล เพื่อสร้างเป็น 2-phosphoglycerate 2) RuMP cycle เกิดโดยการรวม ฟอร์มาลดีไฮด์ 3 โมเลกุล สร้างเป็น glyceraldehyde-3-phosphate

ระบบเอนไซม์ในการย่อยสลายฟอร์มาลดีไฮด์

วิถีการกำจัดพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ในแบคทีเรียโดยใช้ระบบของเอนไซม์ พบว่ามีการใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน 4 ระบบ คือ 1) ระบบ glutathione (GSH)-dependent NAD-linked formaldehyde dehydrogenase (GSH-FDH) พบได้ทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต (Uotila et al., 1974; Lee et al., 2002; Ras et al.,1995) อย่างไรก็ตามสามารถพบเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ชนิดที่ไม่ต้องอาศัย glutathione ได้ใน *Pseudomonas putida* (Tanaka et al., 2004) ระบบที่ 2) คือ formyl-GSH hydrolase (FGH) ระบบที่ 3) มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ในวิถี ribulose monophosphate pathway (RuMP) ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ hexulose phosphate synthase (HPS) และ hexulose phosphate isomerase (HPI) การกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์โดยวิถีนี้ ทำให้ได้เซลล์เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนของเซลล์ ทำให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ในวิถี RuMP (Christoserdova et al., 2000) ระบบที่ 4) พบได้ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวกลุ่ม Archaebacteria โดยเอนไซม์กำจัดฟอร์มาลดีไฮด์เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ tetrahydromethanopterin (H4MPT) และ methanofuran (MFR) เป็นโคแฟคเตอร์ (Christoserdova et al., 1998)

เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

เอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) (EC 1.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบได้ทั้งในแบคทีเรีย *E.Coli* และในมนุษย์ (Uotila et al., 1974) โดยการทำงานของเอนไซม์ต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ NAD+ และ glutathione ในการเร่งปฏิกิริยา สารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาจะอยู่ในรูป S-hydroxymethylglutathione (HMGSH) ซึ่งเกิดขึ้นได้เองโดยการรวมตัวของฟอร์มาลดีไฮด์และกลูตาไทโอน ปฏิกิริยานี้ไม่จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ (ปฏิกิริยา 1) และ HMGSH ที่เกิดขึ้นจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ glutathione (GSH)-dependent NAD-linked formaldehyde dehydrogenase (GSH-FDH) ต่อไป (ปฏิกิริยา 2)

ปฏิกิริยา 1 : $HCHO + GSH \longrightarrow HMGSH$

ปฏิกิริยา 2 : $HMGSH + NAD^{+} \xrightarrow{GSH\text{-}FDH} S\text{-formylglutathione} + NADH + H^{+}$

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ GSH-FDH สามารถช่วยลดความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์โดยเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นกรดฟอร์มิก ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ Kaulfers และคณะ (Kaulfers et al., 1988) พบว่าเอนไซม์ GSH-FDH มีความสัมพันธ์กับความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อระดับฟอร์มาลดีไฮด์ที่สูงขึ้นภายนอกเซลล์ได้ การศึกษาในเซลล์ *E.Coli* ยืนยันว่าความต้านทานดังกล่าวเป็นผลจากการที่เอนไซม์ GSH-FDH ทำหน้าที่สลายฟอร์มาลดีไฮด์ Gutheil และคณะ (Gutheil et al., 1997) รายงานผลของการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 7.9-264 μM สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ *E. Coli* และ *Haemophilus influenzae* สร้างเอนไซม์ GSH-FDH ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่านั้นจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์

การแสดงออกของยีน GSH-FDH ในแบคทีเรียถูกควบคุมที่กระบวนการถอดรหัสของยีน (transcription) ผลการศึกษาโดย Barber และคณะ (Barber et al., 1998b) สนับสนุนการศึกษาดังกล่าว โดยพบว่ากระบวนการถอดรหัสของยีน adhI ใน *R.Sphaeroides* จะถูกควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนมากขึ้นเมื่อมีปริมาณของฟอร์มาลดีไฮด์มากขึ้น อย่างไรก็ตามกลไกการแสดงออกของเอนไซม์ GSH-FDH ในแบคทีเรียถูกควบคุมได้จากปัจจัยควบคุมที่ซับซ้อน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป

Echenique JR และคณะ (Echenique et al., 2001) รายงานผลการศึกษายีน adhC1 ใน *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกให้เอนไซม์ GSH-FDH ผลจากการโคลนและศึกษาลำดับเบสของยีน พบว่าใน *Acinetobacter baumannii* มียีนเพิ่มเติมอีก 1 ชุดคือ adhC2 ที่ถูกถอดรหัสให้เอนไซม์ GSH-FDH เช่นกัน เมื่อทำการแยกโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสยีน adhC2 พบว่ามีขนาด 46.5 kDa ในขณะที่ adhC1 ให้โปรตีนที่มีขนาด 45 kDa โปรตีนทั้งสองมีคุณสมบัติของเอนไซม์ GSH-FDH โดยกลไกการแสดงออกของยีน adhC ทั้ง 2 ชนิดถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากในแบคทีเรียแล้ว เอนไซม์ GSH-FDH ยังสามารถพบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่นพืช โดยแหล่งของฟอร์มาลดีไฮด์ในพืช อาจเกิดจากกระบวนการ demethylation ของสารเพกทิน (pectin) หรือเกิดจากกระบวนการ decarboxylation ของ glyoxylate ในพืช นอกจากนี้ พืชอาจได้รับฟอร์มาลดีไฮด์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ การปล่อยสารพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม ทั้งนี้ฟอร์มาลดีไฮด์สามารถเข้าไปมีผลต่อเมแทบอลิซึมในกระบวนการการสังเคราะห์แสงของเซลล์ Martinez และคณะ (Martinez et al., 1996) ได้ทำการโคลน cDNA ของเอนไซม์ GSH-FDH ในพืช Arabidopsis และพบว่าเอนไซม์ GSH-FDH มีโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันมากทั้งในพืชและในสัตว์ ยีนที่แสดงออกให้ GSH-FDH เป็นยีนเดี่ยว และอยู่บนโครโมโซมที่ 5 ของจีโนม Arabidopsis งานวิจัยของ Achkor และคณะ (Achkor et al., 2003) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์ GSH-FDH ในการลดพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ในพืช Arabidopsis โดยผู้วิจัยได้ตัดต่อยีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ GSH-FDH ในปริมาณมากเข้าไปในพืช Arabidopsis และพบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำลายพิษฟอร์มาลดีไฮด์ได้สูงกว่าพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อยีนถึง 25% ทำให้พืชมีความสามารถในการทนต่อฟอร์มาลดีไฮด์ ความรู้ดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาการปรับปรุงพืชให้มีความสามารถในการต้านทานสารพิษฟอร์มาล์ดีไฮด์ต่อไปได้

ดังนั้น ความรู้ในระดับยีน ตลอดจนการศึกษาการแสดงออกของยีนเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในภาวะแวดล้อมที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษากลไกและการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในกระบวนการสลายฟอร์มาลดีไฮด์ เพื่อที่จะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

เนื้อหาการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ที่เป็นตัวกำหนดการสร้างเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากบริเวณอาคารดองร่างอาจารย์ใหญ่ ควบคู่กับการตรวจติดตามวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ โดยการศึกษาการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ ทำได้โดยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน FDH ในเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในภาวะต่างๆ ซึ่งมีบทบาทต่อการลดระดับฟอร์มาลดีไฮด์ในภาวะแวดล้อม การตรวจสอบกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ทำได้โดยวัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ต่อหน่วยเวลา

การดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสลายฟอร์มาลดีไฮด์จากดินรอบน้ำทิ้งที่ได้จากบ่อน้ำดองร่างอาจารย์ใหญ่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร formaldehyde enrichment medium ที่ประกอบด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1500 ppm ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) พร้อมกับวัดความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ลดลงในแต่ละช่วงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ

2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

ทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางตัว เพื่อจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

3. การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์

3.1) การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย stock ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยปิเปตฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 38-40% w/v ปริมาตร 2.63 มิลลิลิตร ทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตสารละลายโซเดียมซัลไฟต์มา 25 มิลลิลิตร ใส่ในflask เติมไทมอลพทาลีน 2 หยด กรดซัลฟุริค 1 N จำนวน 1-2 หยด เติมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่เตรียม 25 มิลลิลิตร ลงใน flask สารละลายผสมจะมีสีน้ำเงิน ไตเตรตด้วยกรดซัลฟุริคเข้มข้น 1 N ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี กรดซัลฟุริคเข้มข้น 1 N จำนวน 1 มิลลิลิตรจะทำปฏิกิริยาพอดีกับฟอร์มาลดีไฮด์ 30.03 มิลลิกรัม สามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของฟอร์มาลดีไฮด์ ได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ (ppm)} = \frac{A \times 30.03 \times 1000}{25}$$

เมื่อ A = ปริมาตรเป็นมิลลิลิตรของกรดซัลฟุริค 1 N ที่ใช้ไตเตรต

เจือจางให้สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มีความเข้มข้น 10 ppm ก่อน เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีเนื้อสารอยู่ 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม โดยปิเปตสารละลาย ฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 10 ppm มา 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ตัวอย่างมาตรฐานและ blank ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริค 1 N จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นทุกขวด เทใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำให้มีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยอะเซททิลอะซีโตน ต้มที่ 60 oC 10 นาที ทิ้งให้เย็นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นเป็นไมโครกรัมกับค่าการดูดกลืนแสง

3.2) การเตรียมตัวอย่าง โดยการนำตัวอย่างไป centrifuge ที่ 7,000 รอบ/นาที 10 นาที เพื่อกำจัดสารรบกวนการวิเคราะห์ตัวอื่นออกไปเช่น เซลล์จุลินทรีย์ ตะกอนต่างๆ เป็นต้น

3.3) การวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการปิเปตตัวอย่าง 15 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริค 1 N จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 1 N 5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยอะเซททิลอะซีโตน นำไปต้มที่ 60°C 10 นาที ทิ้งให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. การเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB และ FMI medium

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase จะทำการเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ TSB (Tryptic Soy Broth) medium และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ คือ FMI (Formaldehyde enrichment medium I) medium องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเป็นดังนี้

TSB (Tryptic Soy Broth) medium (ต่อ ปริมาตร 1 ลิตร)	
Casein Digest Peptone	17.0 กรัม
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0 กรัม
Disodium Phosphate	2.5 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
NaCl	5.0 กรัม

FMI (Formaldehyde enrichment medium I) (ต่อ ปริมาตร 1 ลิตร)	
Formaldehyde solution (HCHO) 38% w/v	X มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น)
NaNO3	2.0 กรัม
(NH4)2SO4	2.0 กรัม
K2HPO4	2.0 กรัม
KH2PO4	1.0 กรัม
MgSO4.7H2O	0.2 กรัม
Yeast extracts	0.2 กรัม

5. การสกัด RNA ของเชื้อหมายเลข 10

ทำการสกัด RNA จากเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ โดยขั้นตอนการสกัด RNA เริ่มต้นด้วยการ เติม easy-REDTM Solution ปริมาตร 750 ul ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล.ที่มีเชื้อแบคทีเรีย ผสมให้เข้ากันและปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 200 ul เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนที่มีลักษณะใส ใส่

ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติม Isopropanol 400 ul ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นสารละลายใส ให้เหลือแต่ตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอด จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มล. ทำการปั่นเหวี่ยงที่13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งสารละลายใส จากนั้นเปิดฝาทิ้งไว้ 15 นาที ขั้นตอนสุดท้ายทำการละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย RNase free water ปริมาตร 20-25 ul

6. การสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อหมายเลข 10

นำ RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ DyNAmo cDNA synthesis kit (FINNZYME, บริษัท Thermo Fisher Scientific) เพื่อเตรียมชิ้นส่วน cDNA โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา cDNA synthesis ประกอบด้วย RT buffer, Oligo (dT), M-MuLV Rbase H+ reverse transcriptase enzyme, RNase free water และ Template RNA จากนั้นทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้ primer extension ที่ 25 °C เวลา 10 นาที, cDNA synthesis ที่ 37 °C เวลา 30 นาที และ reaction termination ที่ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที

7. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) ด้วยวิธี PCR โดยคัดเลือกคู่ primer ที่เหมาะสมจากการออกแบบ degenerate primer

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ นำ RNA ที่สกัดได้มาสังเคราะห์ให้เป็น cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วย degenerate primer ที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของ (conserved region) ของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH) จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูล ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ตรวจสอบชิ้นยีนด้วย agarose gel electrophoresis

8. การศึกษาการแสดงออกของยีน formaldehyde dehydrogenase (FDH)

ทำการสกัดชิ้นดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR ด้วย degenerate primer เลือกแถบดีเอนเอที่มีขนาดที่ถูกต้องและทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification Kit และหาลำดับเบส (sequencing) ของชิ้นส่วนยีนบางส่วนของเอนไซม์ FDH จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก จากนั้นทำการออกแบบ specific primer จากลำดับเบสบางส่วนของ cDNA ที่ได้จากการหาลำดับเบส (sequencing) ของยีน FDH ข้างต้น จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน FDH จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการทำ RT-PCR ด้วย specific primer ที่ออกแบบอย่างจำเพาะกับยีน FDH ของเชื้อ ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน FDH กับ 16S rDNA ซึ่งนำมาใช้เป็นยีนควบคุมของการทดลอง ตรวจสอบชิ้นยีนด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอนเอที่มีขนาดที่ถูกต้องด้วย PCR purification Kit ทำการโคลนนิ่ง (cloning) และหาลำดับเบส (sequencing) ของชิ้นส่วนยีนบางส่วนของเอนไซม์ FDH ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน FDH ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยฟอร์มาลดีไฮด์

9. การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ เก็บและปั่นแยกเซลล์ จากนั้นทำการ resuspend เซลล์ใน 50 mM phosphate buffer และ 5 mM $MgCl_2$ จากนั้นทำการแตกเซลล์โดยใช้คลื่นเสียง (sonication) และปั่นแยกเก็บส่วนของเหลว (supernatant) เรียกว่าสารสกัดหยาบ(crude cell extract) เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH)

10. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

กิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) สามารถตรวจสอบได้โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของโคแฟคเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ปฏิกิริยาสำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ประกอบด้วย 0.5 mM phosphate buffer, 0.05 mM $MgCl_2$, 6 mM NAD, 9 µmol Formaldehyde, 1 mM KCN, 3 mM Glutathione ทำการบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารสกัดจากเซลล์ (crude cell extract) ที่ต้องการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ และตรวจสอบการเพิ่มขึ้นของโคแฟคเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm เป็นเวลา 5 นาที หนึ่งหน่วยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ต่อหน่วยเวลา และรายงานเป็นความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ (specific activity) เทียบต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนที่ทดสอบ

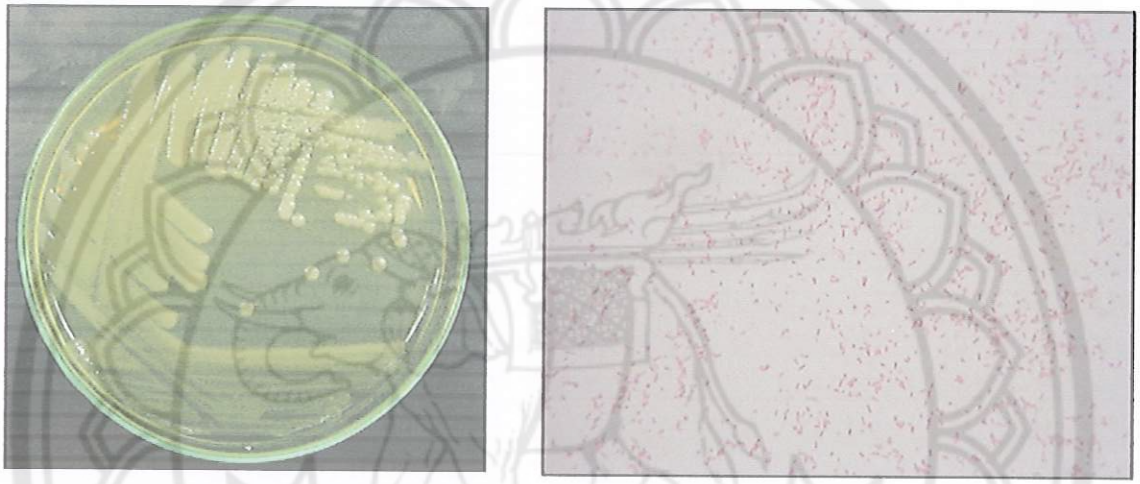
11. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทดสอบโดย Bio-Rad Protein assay (บริษัท BIO-RAD) เป็นการตรวจสอบการจับสีของโปรตีน (dye-binding assay) ด้วย Dye reagent ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

ผลการดำเนินการวิจัย

1. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการบำบัดฟอร์มาลดีไฮด์ คือ ไอโซเลทหมายเลข 10 ซึ่งแยกได้จากดินรอบน้ำทิ้งจากบ่อน้ำดองร่างอาจารย์ใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาศึกษาลักษณะโคลีนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตลอดจนการย้อมสีแกรม เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียเบื้องต้น ได้ผลดังรูปที่ 1 พบว่าลักษณะโคโลนีมีขนาดใหญ่ มีสีครีม นูน ขอบเรียบ รูปร่างท่อนสั้น ท่อนอยู่เดียวๆ หรือเป็นคู่ และเมื่อนำมาย้อมสีแกรมพบว่าติดสีแกรมลบ



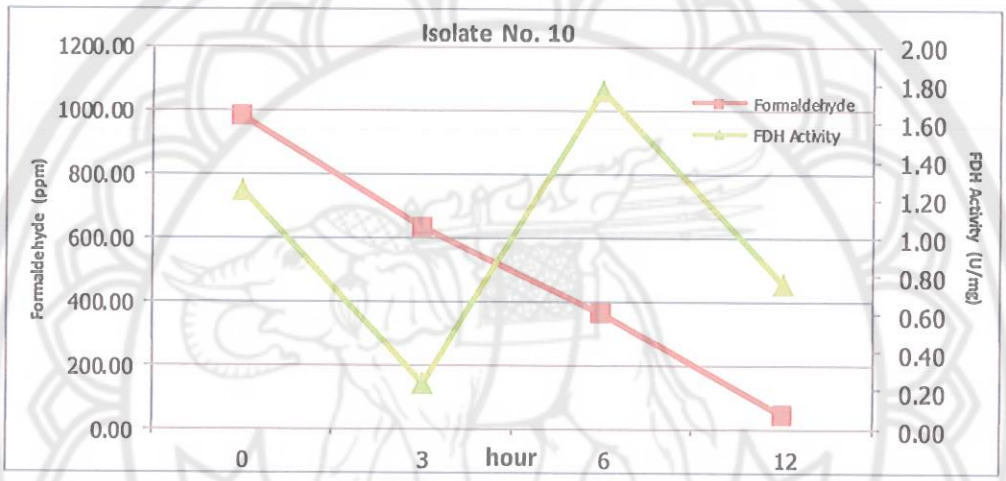
รูปที่ 1 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียหมายเลข 10

2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase

การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 10 ในการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน โดยใช้อาหาร formaldehyde enrichment medium (FMI) เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) สูงในช่วงเวลาที่ความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์มีค่าลดลง โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 10 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) มีค่าสูงสุดเมื่อท้าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชม. (รูปที่ 2) และส่งผลท้าให้ฟอร์มาลดีไฮด์ลดลงจาก 359.65 ppm เป็น 39.57 ppm เมื่อเพิ่มเวลาการเพาะเลี้ยงจาก 6 ชั่วโมงเป็น 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์และกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่ 0, 3, 6 และ 12 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 10

ไอโซเลท No.10		
ชั่วโมง	**Formaldehyde (ppm)**	**FDH Activity (U/mg)**
0 hr	984.41	1.25
3 hr	633.53	0.24
6 hr	359.65	1.77
12 hr	39.57	0.76



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ลดลงและกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ที่เพิ่มขึ้นของเชื้อไอโซเลท 10 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

3. ผลการคัดเลือกคู่ primer ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอนเอด้วยวิธี PCR

การศึกษายีนและการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ในการกำจัดพิษฟอร์มาลดีไฮด์ โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มจำนวนยีนในบริเวณที่สนใจ โดย primer ที่ใช้ในการทำ PCR คือ Degenerate primer โดย FDHF-B1 เป็น Forward primer และมี FDHR-F2 กับ FDHR-H2 เป็น reverse primer ทั้งหมด 3 เส้น โดยมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Degenerate primer (Using CODEHOP program for primer design)

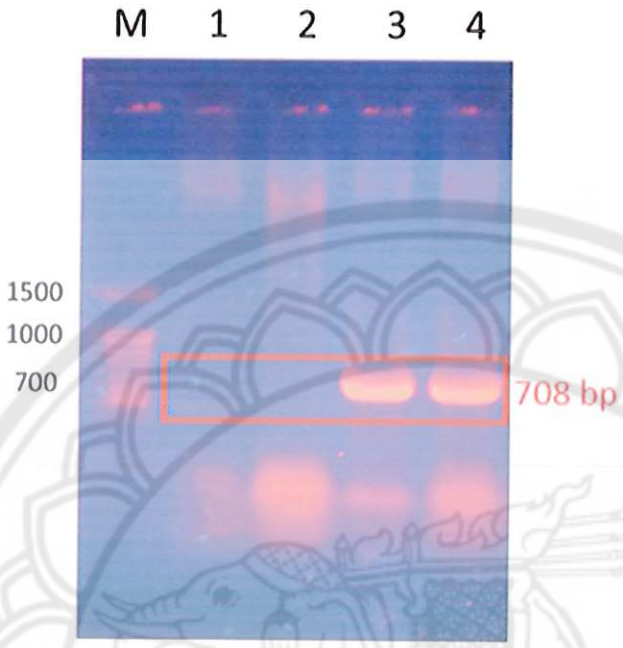
FDHF-B1 : 5'-ACATCTGCGGCTCCGAYYWNCAYAT-3'

FDHR-F2 : 5'-GGCGGCCATCAGGCCNAYNGGNCC-3'

FDHR-H2 : 5'-GCTGGCCTCGAAGCCNACNRCNTC-3'

การศึกษาคู่ primer ที่เหมาะสม โดยศึกษาคู่ primer แรก คือ FDHF-B1 และ FDHR-F2 และคู่ primer ที่สองคือ FDHF-B1 และ FDHR-H2 พบว่า คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-H2 สามารถเพิ่ม

ปริมาณชิ้นส่วนของดีเอนเอที่ต้องการคือขนาด 708 bp ได้ดังรูปที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกคู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-H2 สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่ต้องการต่อไป



รูปที่ 3 Gel electrophoresis ของ PCR product ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร TSB และ FMI โดยใช้คู่ primer ที่ต่างกัน บน 1% agarose gel; lane 1 และ 2 คือ PCR product ที่ได้จากการใช้คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-F2 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB (lane 1) และใน FMI (lane 2); lane 3 และ 4 คือ PCR product ที่ได้จากการใช้คู่ primer FDHF-B1 และ FDHR-H2 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB (lane 3) และใน FMI (lane 4); ขนาดของ PCR product ที่ต้องการคือ 708 bp; M คือ DNA ladder marker

4. การตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน Formaldehyde dehydrogenase

หลังจากการทำ PCR จนได้ชิ้นส่วนของยีน Formaldehyde dehydrogenase แล้ว ทำการตัดแถบ PCR product และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบหาลำดับเบสด้วยวิธี automated sequencing โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing service, Malaysia (http://www.base-asia.com/) ผล DNA sequencing ผลลำดับเบสของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB และ FMI เป็นดังนี้

ผลลำดับเบสของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB

>1st_BASE_638101_gDNA_TSB_10_FDHF_B1 (721 bp)

GGGCTTCGGACGTCACTGCACGGTCCGGCTGAGATCTTGTGGCGACAAAACACCTGTGAGATCGTCG
AGAAGGGCCGTGACGTCGAGAGCATGCTGATTGTCGACCTGGTCTCGGTGCCATTCTTCGTCATCTGT
GGCCGCTGCTGCTCCTGCTAGGAAATGCATACCGGTGTCTGTCTCAATGTCAACACTGCCCGCCCTG
GTGGTGTCTATGGTTACATCGACATGGGCGACTGGGCCGGCGGCCAGGCCTAGTACGTGCTGGTGC
CGTACGCTGACTGTGGCCTGCTGAAACTGCCCGAGCTCGACAAGGCCATGGAGAAGATCCGTGACCT
GACCTGCCTATGTCACGACCTGCCTACTGGTTCCACGGTGCCGTGACTGCAGGTGTAGGCCCGGGCA
GCACCATCTACGTTGCTGGTGCCGGTCCAGTCGGTCTAGCTGCCGCTGCCTCGCCGCGCCTGCTGTG
TGCTGCTTGCGTCATCGTCTGCTGACTCAACCAAGCACGTCTGGCTCACACCAAGTCCAATGCCTTCT
AAGTGGTCGACCTGACGAAGGATACCTCGCTGCAATAGCAGATCATCAATATCATCACTGAGCCGAAA
GTGGACTGCGCCTTCCACGCGGTAGGCTTCGAGGCCAGCACGTCATCGAGGCCGTCGGCTTCGAGG
CCAGCAATTTTTCCTTAGCGGGCCCAATGTGTATAGCTACCCACGCTATT

ผลลำดับเบสของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร FMI

>1st_BASE_638102_gDNA_FDw_10__FDHF_B1 (730 bp)

GGGGCCGGGACCCCCCTGCCAGGTCCGCCTGGTTTGGGCCACGAAACACCGGTGAGTTCGTCGAG
AAGGGCCGTGACGTCGAGAGATGCAGATTGTCGACCTGGTCTCGGTGCCATTCAACGTCACCTGTGG
CCGCTGCCGCTCCTGCAAGGAAATGCATACCGGTGTCTGCCTCAATGTCAACCCTGCCCGCCCTGGC
GGTGCCTATGGTTACATCGACATGGGCGACTGGACCGGCGGCCAGGCCGAGTACGTGCTGGTGCCG
TACGCTGACTTCAACCTGCTGAAACTGCCCGAGCGCGACAAGGCCATGGAGAAGATCCGTGACCTGA
CCTGCCTATCTGAGAACCTGCCTACTGGTTCCACGGTGCCGTGACTGCCGGTGTAGGCCCACGCAGC
ACCGTCTACATTGCTGGTGCCGGTCCAGTCGGTCTAGCTGCCGCTGCCTCCCCGCGCCTGCTGTGTG
CTGCTTGCGTCATCGTCTGCTACCTCAACCAAGCACGTCTGGCTCACACCAAGTCCCATGGCTTCTAA
GTGGTCGACCTGTCCAATGATACCCCGCTGCAATAGCAGATCATCAATATCATCACTGAGCCGGAAGT
GTACTGCGCCGTAGACGCGGTAGGCTTCGAGGCCAGCACGTCATCGAGGCCGTCGGCTTCAAGGCC
ATCATATTTTCTTCTTTCCTCCTCTTTTTTTTTCGCGTTGCTGTTGGTATTTTTTATTTTTT

5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไดท์ของชิ้นส่วนยีน Formaldehyde dehydrogenase กับฐานข้อมูล

หลังจากได้ลำดับเบสของยีนจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนบางส่วนโดยใช้ Degenerate primer แล้ว นำไปเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยการทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อตรวจสอบมีลักษณะใกล้เคียงกับยีนใด

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแล้วพบว่า ลำดับเบสที่ได้ มีความคล้ายคลึงกับส่วนของยีน Formaldehyde dehydrogenase ในเชื้อ *Pseudomonas putida S16* โดยตรวจสอบจากค่า % Query coverage ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทำ Blast search ของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB และ FMI เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

หมายเลขเชื้อ	Query coverage(%)	Blast result
gDNA No.10 TSB	87	*Pseudomonas putida S16*
gDNA No.10 FMI	85	*Pseudomonas putida S16*

6. การศึกษาการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase

6.1) การสกัดอาร์เอนเอ (RNA extraction) และการหาความเข้มข้นของอาร์เอนเอ

อาร์เอนเอเป็นส่วนสำคัญในการศึกษาการแสดงออกของยีน หลังจากสกัดโดยใช้ Easy-REDTM Total RNA Extraction Kit แล้ว ทำการตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของอาร์เอนเอ จากวิธี Electrophoresis เพื่อตรวจสอบแถบที่เกิดขึ้น และการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อวัดปริมาณของอาร์เอนเอ และหาความบริสุทธิ์โดยวัดโปรตีนที่ปนเปื้อนที่ความยาวคลื่นที่ 280 nm เทียบอัตราส่วนระหว่างค่า 260 nm และ 280 nm ได้ผลดังตารางที่ 3

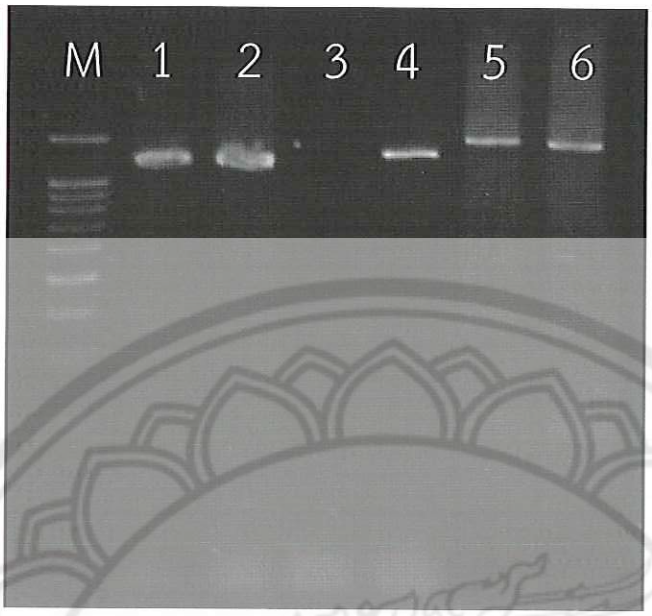
ตารางที่ 3 ผลการวัดค่า OD ค่าความเข้มข้นของอาร์เอนเอและค่าความบริสุทธิ์ของอาร์เอนเอที่สกัดจากเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB และใน FMI

No.	260 nm	280 nm	ความบริสุทธิ์	ความเข้มข้น (µg/ml)
10 TSB	0.176	0.115	1.53	3,520
10 FMI	0.530	0.395	1.34	10,600

$$\text{ค่าบริสุทธิ์} = \frac{OD260}{OD280}$$

$$\text{ความเข้มข้น} = OD260 \times \text{dilution factor} \times 40\ \mu g/ml$$

6.2) ผลการทำ PCR ของ cDNA ของเชื้อหมายเลข 10



รูปที่ 4 Gel electrophoresis จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์ของดีเอ็นเอที่สกัด และซีดีเอ็นเอ ; lane 1 คือ genomic DNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร TSB เจือจาง DNA template 1:100 ; lane 2 คือ genomic DNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร FMI เจือจาง DNA template 1:100 ; lane 3 คือ cDNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร TSB เจือจาง DNA template 1:20 ; lane 4 คือ cDNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร FMI เจือจาง DNA template 1:20 ; lane 5 คือ cDNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร TSB เจือจาง DNA template 1:20 เป็น positive control ; lane 6 คือ cDNA ของเชื้อหมาย 10 เลี้ยงในอาหาร FMI เจือจาง DNA template 1:20 เป็น positive control โดย Lane 1-4 ใช้คู่ primer All-BamHI_F และ All-HindIII-R; Lane 5-6 ใช้คู่ primer 26F และ 1390R

จาก รูปที่ 4 แสดงผลการทำ RT-PCR ของเชื้อหมายเลข 10 โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (TSB) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาดีไฮด์ (FMI) ผลปรากฏว่า เมื่อสกัด gDNA และนำมาเพิ่มปริมาณ formaldehyde dehydrogenase gene ด้วยคู่ primer All-BamHI_F และ All-HindIII-R ซึ่งเป็น specific primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสที่ได้จากการทดลองหาลำดับเบสก่อนหน้านี้ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการได้ทั้งในเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (TSB) และอาหารที่มีฟอร์มาดีไฮด์ (FMI) แสดงว่า จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อที่ถูกเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มจำนวนได้

ลำดับ specific primer

All-BamHI-F : 5'-GCGCATAGGATCCATGTCTGGCAATCGTGGAGTGGT-3'

All-HindIII-R : 5'-GGCATCAAGCTTTTACGCCGCACCCCACATCTTGT -3'

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน จะนำส่วนของ cDNA มาศึกษาโดยมียีน 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาในทุกสภาวะของการเจริญเติบโตของเชื้อ เป็นยีนที่ควบคุมในการทดลอง พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารปกติ (TSB) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาดีไฮด์ (FMI) มีการแสดงออกของยีน 16S rDNA เมื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ดังกล่าวด้วยคู่ primer 26F และ 1390R แต่เมื่อนำ cDNA มาเพิ่มปริมาณด้วยคู่ primer All-BamHI_F และ All-HindIII-R พบว่าการแสดงออกของยีน Formaldehyde dehydrogenase (product ขนาด 1.2 Kb) พบได้ในเฉพาะเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีฟอร์มาดีไฮด์ (FMI) แสดงว่ายีน Formaldehyde dehydrogenase สามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกในสภาวะที่มี Formadehyde ในเชื้อหมายเลข 10

7. การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ formaldehyde dehydrogenase gene ของเชื้อหมายเลข 10 ข้างต้นไปตรวจสอบลำดับเบสของ formaldehyde dehydrogenase gene โดยตัดชิ้นส่วนยีนที่มีขนาด 1.2 kb จาก agarose gel และ purified ดีเอ็นเอด้วย HiYieldTM Gel/PCR Fragment Extraction kit ของบริษัท Real Genomic จากนั้นนำมา Run agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอก่อนนำไปหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing ทำการส่งตรวจสอบหาลำดับเบสด้วยวิธี automated sequencing โดยบริษัท 1st BASE DNA sequencing service, Malaysia (http://www.base-asia.com/) ผล DNA sequencing เป็นดังนี้

ผลการหาลำดับเบสของเชื้อหมายเลข 10

>1st_BASE_935631_c10_Fdh_Full__All_HindIII_R

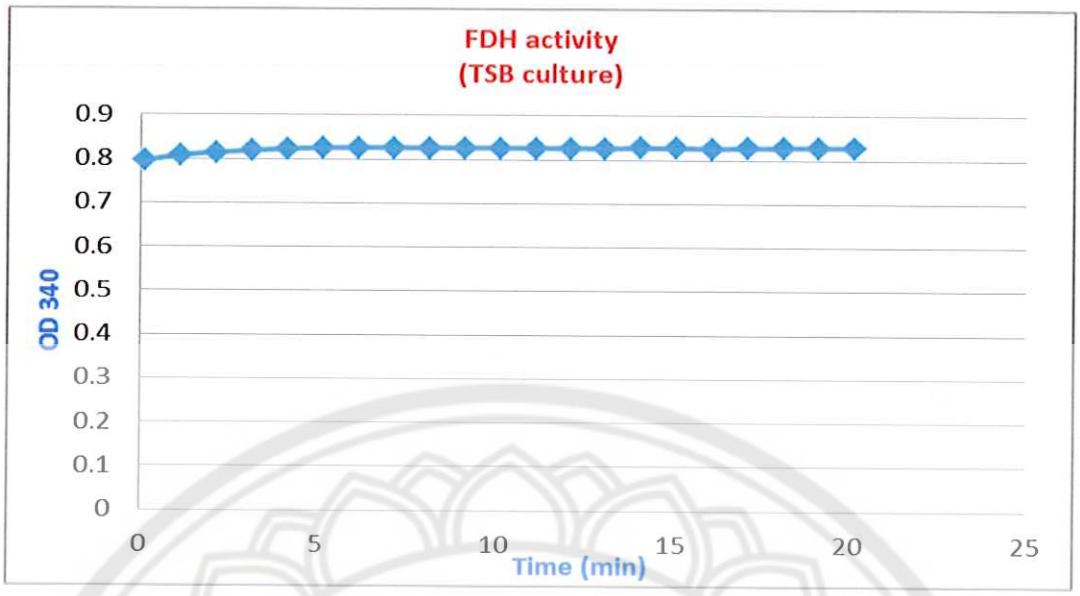
GGTCCTGGGCCACGAAATCACCGGTGAGATCGTCGAGAAGGGCCGTGACGTCGAGCGCATGCAGAT
TGGCGACCTGGTCTCGGTGCCATTCAACGTCGCCTGTGGCCGCTGCCGCTCCTGCAAGGAAATGCAT
ACCGGTGTCTGCCTCACTGTCAACCCTGCCCGCGCTGGCGGTGCCTATGGTTACGTCGACATGGGCG
ACTGGACCGGCGGCCAGGCCGAGTACGTGCTGGTGCCGTACGCTGACTTCAACCTGCTGAAACTGC
CCGAGCGCGACAAGGCCATGGAGAAGATCCGTGACCTGACCTGCCTATCTGACATCCTGCCTACTGG
TTACCACGGTGCCGTGACTGCCGGTGTAGGCCCAGGCAGCACCGTCTACGTTGCTGGCGCCGGCCC
GGTCGGTCTGGCTGCCGCTGCCTCGGCGCGCCTGCTGGGTGCTGCTTGCGTCATCGTCGGCGACCT
CAACCAGGCCCGTCTGGCTCACGCCAAGTCCCAGGGCTTCGAAGTGGTCGACCTGTCCAAGGATAC
CCCGCTGCACGAGCAGATCGTCGATATCCTCGGTGAGCCGGAAGTGGACTGCGCCGTCGACGCCGT
CGGCTTCGAAGCCCGCGGCCATGGCCATGAAGGTGCCAAGCATGAAGCCCCGGCCACCGTGCTGAA
CTCGCTGATGCAGGTTACCCGCGTTGCCGGCAACATCGGTATCCCGGGCCTGTACGTGACCGAAGAC
CCGGGTGCGGTGGATGCTGCCGCCAAGATCGGCGCGCTGAGCATTCGCTTTGGCCTGGGCTGGGCC
AAGTCGCACAGCTTCCACACCGGCCAGACCCCGACCATGAAGTACAACCGCCAGCTGATGCAGGCA
ATCATGTGGGATCGAATCAACATCGCTGAAGTGGTTGGTGTGCAGGTGATCAACCTGGATCAGGCGC
CGGAAGGTTATGGCGAGTTCGATGCAGGTGTACCGAAGAAGTTCGTGATCGACCCGCCCC

8. **ผลการตรวจสอบ** Formaldehyde dehydrogenase activity

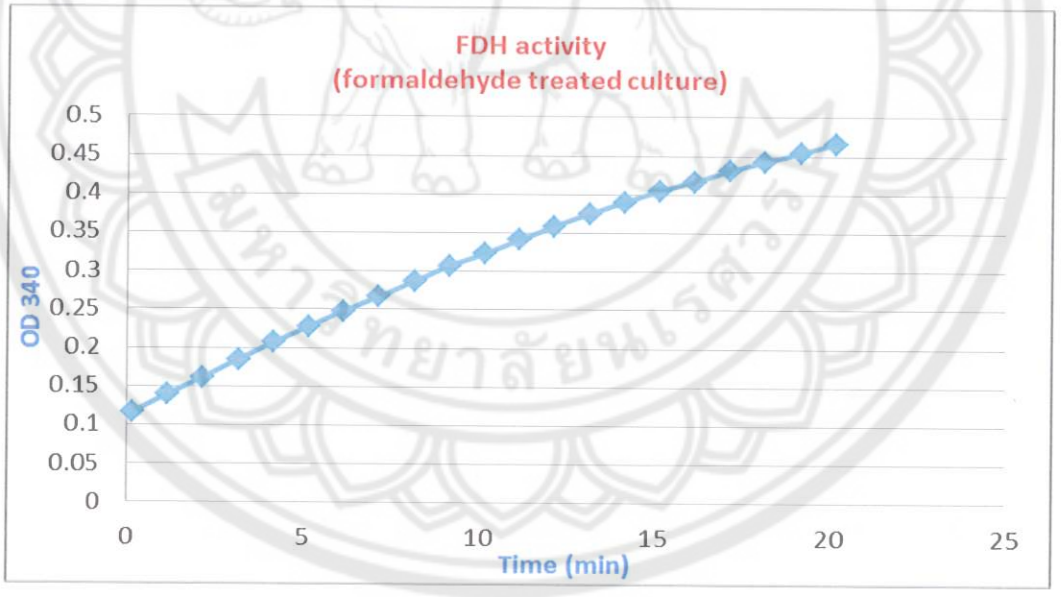
กิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) สามารถตรวจสอบได้โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของโคแฟคเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm หนึ่งหน่วยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ วัดจากอัตราการเพิ่มขึ้นของ NADH ต่อหน่วยเวลา และรายงานเป็นความสามารถจำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ (specific activity) เทียบต่อหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนที่ทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 10 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ TSB (Tryptic Soy Broth) medium และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ คือ FMI (Formaldehyde enrichment medium I) medium จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 4 ผลการวัดค่า OD340 เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB และใน FMI

Time (min)	OD340	
	TSB culture	FMI culture
0.15	0.795	0.117
1.15	0.808	0.14
2.15	0.814	0.162
3.15	0.819	0.185
4.15	0.823	0.207
5.15	0.825	0.228
6.15	0.826	0.248
7.15	0.826	0.267
8.15	0.826	0.287
9.15	0.826	0.307
10.15	0.826	0.323
11.15	0.826	0.341
12.15	0.826	0.359
13.15	0.826	0.375
14.15	0.827	0.39
15.15	0.827	0.405
16.15	0.826	0.417
17.15	0.827	0.431
18.15	0.828	0.443
19.15	0.828	0.454
20.15	0.828	0.466



รูปที่ 5 ผลความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ของเชื้อไอโซเลทหมายเลข 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB medium โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของโคแฟคเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ต่อหนึ่งหน่วยเวลา



รูปที่ 6 ผลความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase (FDH) ของเชื้อไอโซเลทหมายเลข 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ FMI medium โดยติดตามการเพิ่มขึ้นของโคแฟคเตอร์ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm ต่อหนึ่งหน่วยเวลา

จ QD
305
.A6
ว257ร
2557

1 6998975

สำนักหอสมุด
17 มิ.ย. 2558

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase ของเชื้อหมายเลข 10 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB และใน FMI medium

ไอโซเลท No.10	
Culture	**FDH Activity (U/mg)**
TSB meduium	0.54
FMI medium	5.62

ผลการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นในเชื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FMI medium คิดเป็น 5.62 unit/mg protein ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ (TSB medium) มีค่า 0.54 unit/mg protein ซึ่งมีค่าน้อยมาก พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ในเชื้อที่ถูกกระตุ้นได้โดยฟอร์มาลดีไฮด์ มีค่าเป็น 10.40 เท่าของกิจกรรมเอนไซม์ในเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าเอนไซม์ Formaldehyde dehydrogenase เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วยสารฟอร์มาลดีไฮด์ โดยกระตุ้นทั้งในระดับการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์

Output ที่ได้จากโครงการ

ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนและความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH)

การศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทหมายเลข 10 จากน้ำทิ้งรอบบ่อดองร่างอาจารย์ใหญ่ ซึ่งเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ เมื่อนำเชื้อมาแยกให้เป็น pure culture และนำมาศึกษากลไกการลดฟอร์มาลดีไฮด์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มีสารฟอร์มาลดีไฮด์เป็นตัวกระตุ้น ระดับเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FDH) ของเชื้อจะถูกเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น โดยระดับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้น เป็นผลมาจากการที่ยีน FDH ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแตกต่างจากในภาวะที่ไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อมูลความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน และกิจกรรมของเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase ในภาวะที่มีระดับฟอร์มาลดีไฮด์สูงจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการลดระดับฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดี ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายมลพิษ จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดสารมลพิษได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้วางแผนคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำแบบแผนการแสดงออกของยีน FDH ในเชื้อแบคทีเรียที่น่าสนใจ ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการโคลนยีน FDH ทั้งหมด (full length) ในการศึกษาวิจัยขึ้นต่อไป ซึ่งข้อมูลยีนทั้งหมดจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการบำบัดสารพิษฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

Achkor H, Diaz M, Fernandez MR, Biosca JA, Pares X and Martinez C (2003) Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from Arabidopsis. Plant Physiology 132: 2248-2255

Barber RD, Donohue TJ (1998b) Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. J Mol Biol 280 : 775-784

Christoserdova L, Gomelsky L, Vorholt JA, Gomelsky M, Tsygankov YD and Lidstrom ME (2000) Analysis of two for formaldehyde oxidation pathways in Methylobacillus flagellatum KT, a ribulose monophosphate cycle methylotroph. Microbiology 146: 3762-3769

Chistoserdova L, Vorholt JA, Thauer RK and Lidstrom ME (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archea. Science 281: 99-102

Echenique JR, Dorsey CW, Patrito LC, Petroni A, Tolmasky ME and Actis LA (2001) Acinetobacter baumannii has two genes encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase : evidence for differential regulation in response to iron 147 : 2805-2815

Gutheil WG, Kasimoglu E and Nicholson PC (1997) Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in Escherichia Coli and Haemophilus influenzae. Biochem Biophys Res Commun 238: 693-696

Kaulfers PM and Wollman A (1988) Cloning and expression of formaldehyde resistance from Escherichia Coli. FEMS Microbiol Lett 55: 299-302

Lee BH, Sakai Y, and Kato N (2002) Physiological role of the glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast Candida boidinii. Microbiology 148: 2697-2704

Martinez MC, Achkor H, Persson B, Fernandez MR, Shafqat J, Farres J, Jornvall H, Pares X (1996) Arabidopsis formaldehyde dehydrogenase: molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insight into the origins, structure and function of plant class P and liver classl alcohol dehydrogenase. Eur J Biochem 241: 849-885

Mitsui R, Omori M, and Tanaka M (2004) Formaldehyde-Limited Cultivation of a Newly Isolated Methylotrophic Bacterium ,Methylobacteruim sp. MF1: Enzymatic Analysis Related to C1 Metabolism. Journal of Bioscience and Bioengineering 1,18-22

Ras J, Ophem V, Reijnders WN, Van Spanning RJ, Duine JA, Stouthamer AH and Harms N (1995) Isolation sequencing and mutagenesis of the gene encoding NAD and glutathione

dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from Paracoccus denitrificans in which GD-FALDH is essential for methylotrophic growth. J. Bacteriol 177: 247-251

Tanaka N, Kusakabe Y, Ito K, Yoshimoto T, and Nakamura KT (2002) Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from Pseudomonas putida : the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenase. J Mol. Biol. 324: 519-533

Uotila L., and Koivusalo M (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. J. Biol. Chem. 249: 7653-7663

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

Poster : Apinun Limmongkon, Pornpan Pookrai, Monthon Yimyai, Suthipong Chuchan, Chayawat Paonoo, Panompan Thathong, Wipaluk Dangjai. Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification. The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference. April 2-3, 2004. Bangkok, Thailand.

Abstracts and Proceedings

The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference

Rama Gardens Hotel & Resort, Bangkok, Thailand

April 2-3, 2014

Bridging ASEAN Biochemical Research Communities

Organized by

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand
Biochemistry and Molecular Biology Section of the Science Society of Thailand
under the Patronage of His Majesty the King

The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference
April 2-3, 2014, Bangkok, Thailand

BP-06

Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification

Apinun Limmongkon*, Pompan Pookrai, Monthon Yimyai, Suthipong Chuchan, Chayawat Paonoo, Panompan Thathong and Wipaluk Dangjai

Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

* Corresponding Author: *apinunl007@yahoo.com*

Formaldehyde is a toxic chemical in the environment. The formaldehyde degradation microorganisms were isolated from wastewater of the preservation of cadavers used in medical education. The formaldehyde oxidizing enzyme; formaldehyde dehydrogenase (FDH), plays an important role in formaldehyde detoxification. The cloning and expression of FDH gene from formaldehyde enriched wastewater bacterial isolation was studied. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial 708 bp fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique. The coding sequence consisted of 1200 bp encoding a polypeptide of 399 amino acid and shows high sequence identity (95 %) with *Pseudomonas putida HB3267* FDH gene. These results indicated that FDH isolated gene from formaldehyde enriched wastewater bacteria may be involved in formaldehyde detoxification and play important roles in response to high formaldehyde stresses.

Keywords: cloning, degenerate primers, formaldehyde dehydrogenase, gene expression

Cloning and Expression Analysis of Formaldehyde Dehydrogenase Gene for Formaldehyde Detoxification

Apinun Limmongkon[3]*, Pornpan Pookrai[3], Monthon Yimyai[3], Suthipong Chuchan[3], Chayawat Paonoo[3], Panompan Thathong[3], Wipaluk Dangjai[3]

[3] Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, THAILAND

*Corresponding Author: apinunl007@yahoo.com

Abstract

Formaldehyde is a toxic chemical in the environment. The formaldehyde degradation microorganisms were isolated from wastewater of the preservation of cadavers used in medical education. The formaldehyde oxidizing enzyme; formaldehyde dehydrogenase (FDH), plays an important role in formaldehyde detoxification. The cloning and expression of FDH gene from formaldehyde enriched wastewater bacterial isolation was studied. Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The PCR product of partial 708 bp fragment was confirmed to FDH gene by sequencing and BLAST search analysis. Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique. The coding sequence consisted of 1200 bp encoding a polypeptide of 399 amino acid and shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida HB3267* FDH gene. These results indicated that FDH isolated gene from formaldehyde enriched wastewater bacteria may be involved in formaldehyde detoxification and play important roles in response to high formaldehyde stresses.

Introduction

To address the problem of formaldehyde pollution, the microorganisms from formaldehyde polluted wastewater were isolated and studied. There are several enzyme systems used for biological detoxification of formaldehyde. The main enzyme responsible for detoxify formaldehyde is formaldehyde dehydrogenase (FDH) which catalyze to formate. This reaction is considered the essential function for cell viability against formaldehyde.

$$\text{Formaldehyde} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{FDH}} \text{formate} + NADH + H^+$$

The purpose of the present study was to study the gene expression and clone the FDH gene from formaldehyde polluted wastewater isolated bacteria.

Results

1. Formaldehyde degradation and FDH activity of bacterial isolate

The bacterial isolate has high potential to degrade toxic formaldehyde and the FDH enzyme tend to response for formaldehyde detoxification.

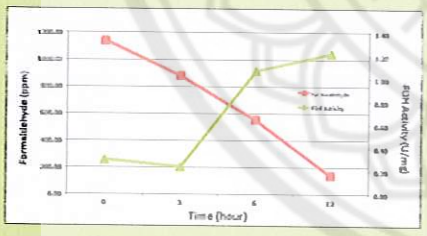


Figure 1. Formaldehyde degradation and crude FDH activity of bacterial isolate within 12 hours culture inoculation.

2. Cloning and sequencing of FDH gene

Partial gene encoding the conserved sequence of FDH was amplified using the degenerate primers. The full-length of FDH cDNA was performed using one-base excess adaptor ligation method for gene walking technique.

Degenerate primer (Using CODEHOP program for primer design)

FDHF-B1 : 5'-ACATCTGCGGCTCCGAYYWNCAYAT-3'

FDHR-H2 : 5'-GCTGGCCTCGAAGCCNACNRCNTC-3'

3. Gene expression analysis

RT-PCR (lane 4) represent the FDH gene expression induced by formaldehyde while no FDH gene induction in culture media without formaldehyde (lane 3). Gene expression studied by reverse transcription PCR using specific primer indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment.

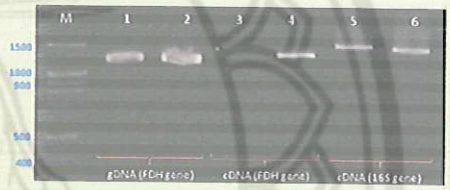
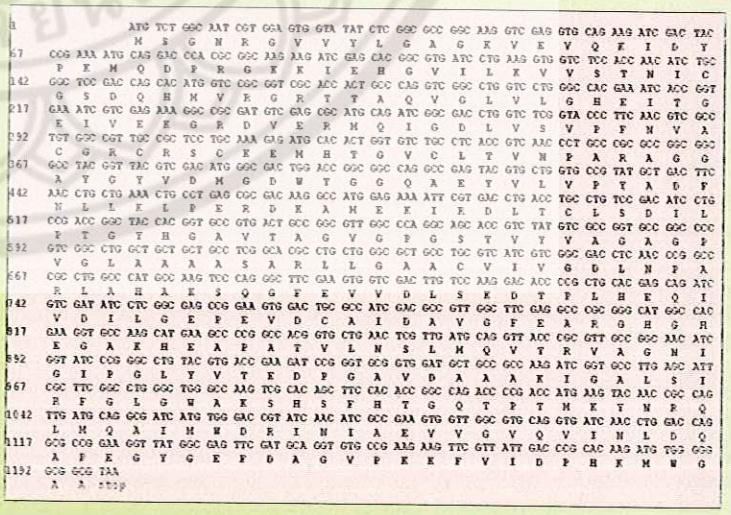


Figure 2. PCR product of FDH gene (lane1-4) and 16s reference gene (lane 5-6) from bacterial culture isolate; lane 1: gDNA (culture without formaldehyde), lane 2: gDNA (formaldehyde enriched culture), lane 3: cDNA (culture without formaldehyde), lane 4: cDNA (formaldehyde enriched culture), lane 5: cDNA (culture without formaldehyde), lane 6: cDNA (formaldehyde enriched culture),

4. FDH sequence of bacterial isolate

The coding sequence shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida HB3267* FDH gene.



Conclusion

These results show that FDH from the bacterial isolated has the capacity to take up and detoxify high concentration of formaldehyde and is proportionally related to the FDH activity. Revealing the essential role of FDH enzyme in formaldehyde detoxification. Gene expression studied indicated the expression of FDH gene under formaldehyde treatment and the coding sequence of FDH gene shows high sequence identity (95%) with *Pseudomonas putida HB3267* FDH gene.

References

Tonooka Y, Mizukami Y, Fujishima M (2008) One-base excess adaptor ligation method for walking uncloned genomic DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:173-180

Acknowledgements

This research is supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) and Research Fund from Naresuan University.