เอกสารอ้างอิง

1. Kao, K.N. and Michayluk, M.R. "A Method for high-frequeney intergeneric of Plant Protoplast" Planta. 115 (1974) : 355 - 367.

2. Anne, J. and Peberdy, J.F. "Induced Fusion of Fungal Protoplasts Following Treatment with Polyethylene glycol." J. Gen. Microbiol. 92 (1976) : 413 - 417.

3. Foder, K. and Alfoldi, L. "Fusion of Protoplasts of Bacillus megaterium." Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (1976) : 2147 - 2150.

4. Schaeffer, P., Cami, B . and Hatchkiss, R.D. "Fusion of Bacterial Protoplasts." Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (1976) : 2151 - 2155.

5. Yamamoto, M. and Fukui, S. "Fusion of Yeast Protoplast." Agric. Biol. Chem. 41(9), (1977) : 1829 - 1830.

6. Seki, T. and Limtong, S. "Instruction on Yeast Genetics." เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคและวิธีการวิจัยทางจุลชีววิทยาขั้นสูง." หน้า 181 - 193 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.

7. สาวิตรี สิ่มทอง. "Fundamental Methods in Yeast Genetic." เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง "เทคนิคและวิธีการวิจัยทางจุลชีววิทยาขั้นสูง." หน้า 137 - 153 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.

8. Svoboda, A. "Fusion of Yeast Protoplasts Induced by Polyethylene Glycol." J. of Gen Microbiol. 109 (1978) : 169 - 175.

9. van Solingen, P. and van der Plaat, J.B. "Fusion of Yeast Spheroplasts." J. Bacteriol. 130 (1977) : 946 - 947.

10. Sipiczki, M. and Ferency, L. "Protoplast Fusion of Schizosaccharomyces pombe Auxotrophic Mutant of Identical Mating Type." Molec. Gen. Genet. 157 (1977) : 77 - 83.

11. Vallin, C. and Ferency, L. "Diploid Formation of Candida tropicalis via Protoplast Fusion." Acta microbiol. Acad. Sci hung. 25 (1978) : 209 - 212.

12. Sarachek, A. and Rhoads, D.D. "Production of Heterokaryons of Candida albicans by Protoplast Fusion : Effect of Differences in Proportions and Regenerative Abilities of Fusion Partners." Current Genetics. 4 (1981) : 221 - 222.

13. Evan, K.O., Adeniji, A. and McClary, D.O. "Selection and Fusion of Auxotrophic protoplasts of Candida albicans." Antonic van Leeuwenhoek. 48 (1982) : 169 - 182.

14. Morgan, A.J., Brunner, A. and Whittaker, P.A. "Protoplast Fusion in a petite - Negative Yeast, Kluyveromyces lactis." Current Genetics. 2 (1980) : 87 - 93.

15. Allmark, B.M., Morgan, A.J. and Whittaker, P.A. "The Use of Protoplast Fusion in Demonstrating Chromosomal and Mitochondrial Inheritance of Respiratory - Deficiency in Kluyveromyces lactis, a petite - Negative Yeast." Molec. gen. Genet. 159 (1978) : 297 - 299.

16. Galeotti, C.L., Sriprakash, K.S., Bartum, C.M. and Clark-Walker, G.D. "An Unexpected Response of Torulopsis glabrata Fusion Products to x - irradiation." Mutation Research. 81 (1981) : 155 - 164.

17. Fournier, P., Provost, A. Bourguignon, C. and Heslot, H. "Recombination after Protoplast Fusion in the Yeast Candida tropicalis." Arch. Microbiol. 115 (1977) : 143 - 149.

18. Arima, K. and Takano, I. "Multiple Fusion of Protoplast in Saccharomyces Yeast." Molec. gen. Gent. 173 (1979) : 271 - 277.

19. Russell, I. and Stewart, G. "Spheroplast Fusion of Brewer's Yeast strains." J. Inst. Brew. 85 (1979) : 95 - 98.

20. Sarachek, A., Rhoads, D.D. and Schwarzhoff, R.H. "Hybridization of Candida albicans through Fusion of Protoplasts." Arch Microbiol. 129 (1981) : 1 - 8.

21. Svoboda, A. "Intergeneric Fusion of Yeast Protoplasts : Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe." in Advances in Protoplast Research. (Ferenczy, L. and Farkas, G.L. eds.) pp. 119 - 124. Perganom Press, Oxford, 1980.

22. Provost, A. Bourguignon, C., Fournier, P., Ribet, A.M. and Heslot, H. "Intergeneric Hybridization in Yeast through Protoplast Fusion." FEMS Microbiol. Lett. 3 (1978) : 309 - 312.

23. Wilson, J.J., Khachatourians, G.G. and Ingledew, W.M. "Protoplast Fusion in the Yeast, Schwanniomyces alluvius." Mol. Gen. Genet. 186 (1982) : 95 - 100.

24. Spata, L. and Weber, H. "A Study on Protoplast Fusion and Parasexual Hybridization of Alkane Utilizing Yeasts." in Advances in Protoplast Research. (Ferenczy, L. and Farkas, G.L. eds) pp. 131 - 137. Pergamon Press, Oxford, 1980.

25. Conde, J.C. and Fink, G.R. "A Mutant of Saccharomyces cerevisiae Defective for Nuclear Fusion." Proc. Natl. Acad. Sci. 73 (1976) : 3651 - 3655.

26. Mortimer, R.K. and Hawthrone; D.C. "Yeast Genetics." in The Yeasts (Rose, A.H. and Harrison, J.S. eds) Vol. 1 pp. 385 - 460. Academic Press, Inc., New York, 1969.

27. Hick, J.B., Strathern, J.N., Klar, A.J.S. and Dellaporta, S.L. "Cloning By Complementation in Yeast : The Mating type Genes." in Text and Laboratory of Yeast. (Oshima, Y. ed) pp. E 1 - E 15. Osaka University, Japan, 1984.

28. Mackay, V. and Manney, T. "Mutation Affecting Sexual Conjugation and Related Process in Saccharomyces cerevisiae I Isolation and Phenotypic Characterization of Nonmating mutant." Genetics. 76 (1974) : 255 - 271.

29. Hawthorne, D.C. "Directed Mutation of the Mating type Alleles as an Explanation of Homothallism in Yeast." Proc. 11th Inter. Congr. Genet. 1 (1963) : 34 - 35.

30. Takano, I., Oshima, T., Harashima, S. and Oshima, Y. "Tetraploid Formation through the conversion of the Mating type Alleles by the Action of Homothallic Genes in the Diploid Cells of Saccharomyces Yeasts." J. Ferment. Technol. 55(1), (1977) : 1 - 12.

31. Takano, I., and Oshima, Y. "Mutational Nature of an Allele-specific Conversion of the Mating type by the Homothallic gene, HO_{α} in Saccharomyces." Genetics. 65 (1970) : 421 - 427.

32. Hick, J. and Herskowitz, I. "Interconversion of Mating type in Yeast. I Direct Observation of the Action of the Homothallism (HO) gene." Genetics 83 (1976) : 245 - 258.

33. Youthananukorn, V. and Oshima, Y. "Hexaploid Formation through the Conversion of the Mating-type Alleles by the Action of Homothallic Genes in Saccharomyces Yeast." J. Sci. Soc. Thailand. 4 (1978) : 78 - 89.

34. Harashima, S., Nogi, Y. and Oshima, Y. "The Genetic System Controlling Homothallism in Saccharomyces Yeasts." Genetics. 77 (1974) : 639 - 650.

35. Lindegren, C.C. and Lindegren, G. "A New Method for Hibridizing Yeast." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 29 (1943) : 306 - 308.

36. Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B. "Homothallic Switching of Yeast Mating types." in Methods in Yeast Genetics. pp. 103 - 105 Cold Spring Harbor, New York. 1983.

37. Hawthrone, D.C. "A Deletion in Yeast and Its Bearing on the Structure of the Mating type Locus." Genetics. 48 (1963) : 1727 - 1729.

38. Schneider, W.C. "Phosphorus Compound in Animal Tissues. I Extraction and Estimation of Deoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid." Biochem. J. 62 (1956) : 315 - 322.

39. Ketchum, P.A. "Microbiol Growth." in Microbiology : Introduction for Health Professionals. pp. 129 - 142. John Wiley & Sons, New York. 1984.

40. Sherman, F., Fink, GR and Hicks. J.B. "Giemsa Staining of Yeast Nuclei." in Methods in Yeast Genetics. pp. 69 - 70. Cold Spring Harbor, New York. 1983.

41. Lucy, J.A. in Membrane Fusion. (Poste, G. and Nicolson, G. eds) pp. 267 - 304. Elsevier / North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam, 1978.

42. de van Broock, M.R., Sierra, M. and de Figueroa, L.C. "Ploidy Reduction Using p - Fluorophenylalanine of Fusion Products of Saccharomyces cerevisiae." Current Microbiology. 8 (1983) : 13 - 16.

43. Townsend, G.F. and Lindegren, C.C. "Characteristic Growth Patterns of the Different Members of a Polyploid Series of Saccharomyces." J. Bacteriol. 67 (1954) : 480 - 483.

44. Petersen, J.G.L., Olson, L.W. and Zickler, D. "Synchronous Sporulation of Saccharomyces cerevisiae At High Cell Concentration." Carlsberg Res. Commun. 43 (1978) : 241 - 253.

45. Svoboda, A. "Mating Response in Yeast Protoplast." Arch Microbiol. 110 (1976) : 313 - 318.

46. Oshima, Y. "Introduction to Genetics and Cloning System in Yeast." in Text and Laboratory Manual For AMBO Course on Genetics and Molecular Biology of Yeast. (Oshima, Y. ed) pp. A 1 - A 12. Osaka University, Japan, 1984.

47. Holliday, R. "A Mechanism for Gene Conversion in Fungi." Genet. Res. 5 (1964) : 282 - 304.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารวายพีดี (Yeast extract Peptone Dextrose)

ผงสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	20.0	"
กลูโคส	20.0	"
วุ้นผง	20.0	"
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารต่ำส่วนบูรณ์ (Minimum Media)

ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่ปราศจากกรดอะมิโน	6.7	กรัม
กลูโคส	20.0	"
วุ้นผง	20.0	"
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารต่ำส่วนบูรณ์ที่ใช้แยกยีสต์เซลผสม

ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่ปราศจากกรดอะมิโน	6.7	กรัม
กลูโคส	20.0	"
โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์	44.7	มล.
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่นเติมจนครบ	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. สูตรอาหารอซีเตต (Acetate media)

โซเดียมอซีเตต	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	1.0	"
กลูโคส	0.5	"

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

5. ความเข้มข้นของกรดอะมิโนและไนโตรจีนิเบล

5.1	อดีนีน	0.2	กรัม
	น้ำกลั่น	10.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ. ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

เวลาใช้เติมลงไป 1 มล. ต่อ 1000 มล. ของอาหาร

5.2	ไลซีน	0.3	กรัม
	น้ำกลั่น	10.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ. ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

เวลาใช้เติมลงไป 1 มล. ต่อ 1000 มล. ของอาหาร

5.3	เมทไธโอนีน	0.2	กรัม
	น้ำกลั่น	10.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ. ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

เวลาใช้เติมลงไป 1 มล. ต่อ 1000 มล. ของอาหาร

5.4	ยูเรซิล	0.2	กรัม
	น้ำกลั่น	10.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°ซ. ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

เวลาใช้เติมลงไป 1 มล. ต่อ 1000 มล. ของอาหาร

6. สารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส-5000

1.5 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์	4	มล.
0.1 โมลาร์ 2 - เมอแคปโตเอทธานอล	1	"
$\frac{2}{15}$ โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	4	"
6 มก./มล. ไซโมไลเอส-5000	1	"

ฆ่าเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 0.45 ไมครอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

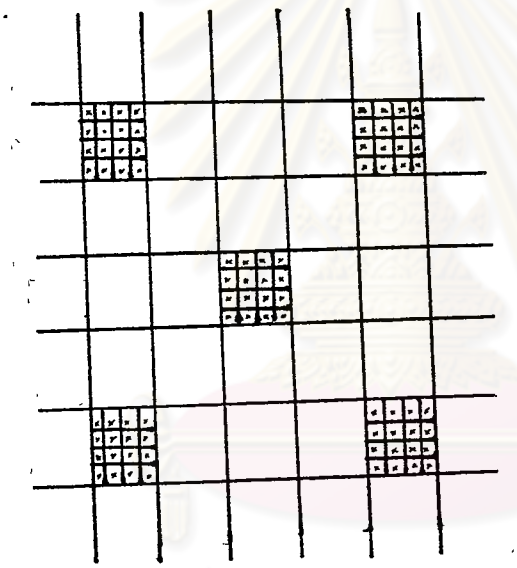
7. สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอน-8000

ชั่งโพลีเอทธิลีนไกลคอล-8000 จำนวน 15 กรัมละลายในน้ำร้อน 30 มล. จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 45 มล. และเติม 5 มล. ของ 500 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

8. การนับจำนวนเซลโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

การนับจำนวนเซลโดยนับเซลในช่องใหญ่ 5 ช่อง และในแต่ละช่องใหญ่นับหมดทั้ง 16 ช่องเล็ก

1 ช่องเล็กฮีมาไซโตมิเตอร์มีปริมาตร 2.5×10^{-7} มล.



จำนวนเซล = จำนวนเซลเฉลี่ยใน 1 ช่องเล็ก x 4 x 10^6 เซลต่อมล.

9. การหาปริมาณดีเอนเอในเซลยีสต์ (38)

9.1 การเตรียมสารละลาย

9.1.1 ไดเฟนีลามีน รีเอเจนต์ (Diphenylamine reagent)

ไดเฟนีลามีน	2	กรัม
กรดอซีติก (glacial acetic acid)	100	มล.

เก็บไว้ในที่มืด

9.1.2 1.6 มก./มล. อเซ่ทาลดีไฮด์

อเซ่ทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde) (1 ลิตรหนัก 0.78 กก.) 0.20 มล.

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

9.1.3 6 % กรดเพอคลอริค (Perchloric acid)

70 % กรดเพอคลอริค (Perchloric acid) 6 มล.

เติมน้ำกลั่นจนครบ 70 มล.

9.1.4 95 % เอธานอล (ethanol) 4 ส่วน

น้ำกลั่น 1 ส่วน

9.1.5 ไดเอธิล อีเธอร์ (Diethyl ether) 1 ส่วน

95 % เอธานอล 3 ส่วน

9.2 การสกัดดีเอนเอจากยีสต์

ใช้ 30 มล. ของเชื้อยีสต์อายุ 48 ชม. ปั่นแยกเซลที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 5 นาที ล้างเซลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เติม 5 มล.ของ 95 % เอธานอลต่อน้ำในอัตส่วน 4 : 1 (9.1.4) ปั่นแยกเฉพาะเซลมาเติม 5 มล. ของ 95 % เอธานอล ปั่นแยกเฉพาะเซลมาเติม 5 มล.ของสารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอลในอัตส่วน 1 : 3 (9.1.5) ปั่นแยกเฉพาะเซลเติมสารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอลซ้ำ ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เซลที่ได้ครั้งสุดท้ายตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติม 5 มล.ของกรดเพอคลอริค (6.1.3) นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 90°ซ. นาน 15 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกเฉพาะส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอนเอ

9.3 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอ

ใช้ 1 มล. ของส่วนน้ำใสที่ได้ เติม 2 มล. ของสารละลายไดเฟนีลามีน (9.1.1) และเติม 0.1 มล. ของสารละลายอเซ่ทาลดีไฮด์ (9.1.2) เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าดูดกลืนแสงนี้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณดีเอนเอ โดยใช้คลาฟ ไทมัส ดีเอนเอ เป็นมาตรฐาน (0.05 - 0.30 มก. ต่อ มล.)

10. การย้อมนิวเคลียส์ด้วยจิมซ่า รีเอเจนต์ (40)

10.1 การเตรียมสารละลาย

10.1.1 สารละลายเฮลลี่ (Helly solution)

เมอคูริคคลอไรด์ ($HgCl_2$)	5	กรัม
โปแตสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$)	3	"
40 % ฟอร์มาลิน (Formalin)	15	มล.
เติมน้ำกลั่นจนครบ	100	"

(เติม 40 % ฟอร์มาลิน เมื่อจะใช้สารละลายนี้)

10.1.2

เกลือแกง	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

10.1.3 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) pH 6.9

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	3	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.5	"
น้ำกลั่น	500	มล.

10.1.4 สีจิมซ่า (Giemsa stock Solution)

เมธานอล (methanol)	5	มล.
กลีเซอรอล (glycerol)	5	"
ผงจิมซ่า (Giemsa powder)	76	มก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติ

นางสาวยุวพิน เลิศวีระวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 29 สิงหาคม 2501 ในกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2524

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย