บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การสร้างยีสต์ลูกผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

จากผลการทดลองเมื่อหาอายุของเชื้อยีสต์ที่เหมาะในการทำลายผนังเซลด้วยสาร-ละลายเอ็นไซม์ไซโมไลเอส -5000 พบว่าควรใช้เชื้อเมื่อเข้าสู่ปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) เมื่อยีสต์มีอายุ 15 ชม. ของสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C และ 13 ชม. ของสายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D ได้ผลดังกราฟรูปที่ 1 ซึ่งแสดงอัตราการเจริญเติบโตในช่วงต่าง ๆ

จากผลการทดลองพบว่าต้องใช้สารละลายเอ็นไซม์ไซโมไลเอส -5000 ความเข้มข้น 6 มก./มล. การละลายผนังเซลของทั้งสองสายพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 4 ชม. จึงเกิดสภาพโปรโตพลาสร้อยละ 80 โดยศึกษาจากใต้กล้องจุลทัศน์ ดังรูปภาพที่ 1 และ 2 ซึ่งแสดงภาพโปรโตพลาส

การคัดเลือกยีสต์ลูกผสมที่เกิดโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ใช้หลักคอมพลีเมนทารี (Complementary) โดยมีกรดอะมิโนชนิดไลซีน, เมทไธโอนีน และไนโตรจีเนียส-เบสชนิดยูเรซิลและอดีนีนเป็นเครื่องหมาย และคัดเลือกบนอาหารต่ำสมบูรณ์ที่เติมเฉพาะไลซีนตามลักษณะจีโนไทพ์ของลูกผสมที่ควรจะได้ พบว่าเมื่อบ่มในอาหารดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน สามารถคัดเลือกเซลผสม (Fusant) ในขั้นต้นบนอาหารคัดเลือกดังกล่าวได้ทั้งหมด 7 โคโลนี คิดเป็นความถี่การเกิดเซลผสม (fusion frequency) ร้อยละ 2.5 โดยคำนวณจาก จำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารคัดเลือกเฉพาะเซลผสมต่อจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารสมบูรณ์วายพีดี และให้ชื่อ-เซลผสมว่า Fu-d_1, Fu-d_2, Fu-d_3... และ Fu-d_7 ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถในการขึ้นบนอาหารต่ำสมบูรณ์ที่ไม่เติมไลซีน และที่เติมไลซีน ปรากฏดังตารางที่ 3

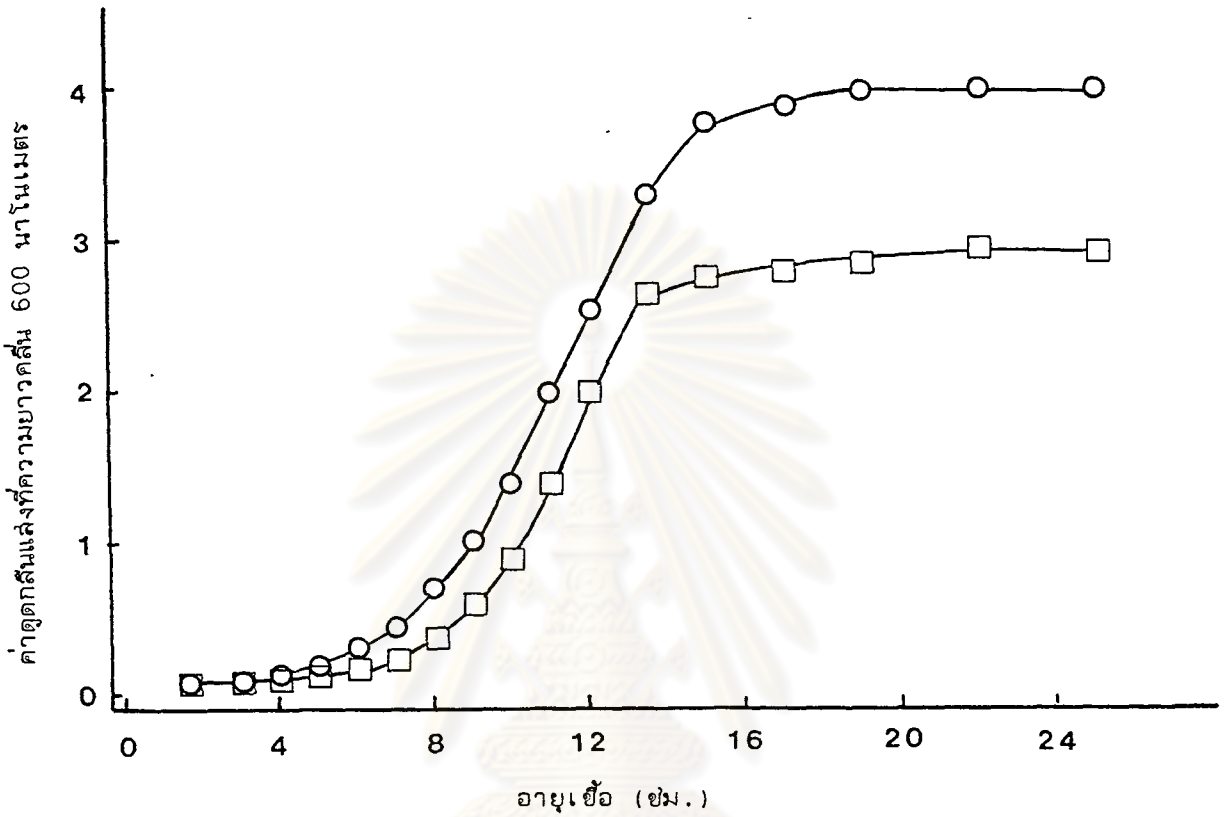
ตารางที่ 3 การตรวจลักษณะของยีสต์เซลผสมที่ได้จากการทดลองซึ่งเจริญบนอาหารต่ำสมบูรณ์ที่เติมและไม่เติมไลซีน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

สายพันธุ์	ชนิดของอาหารแข็งที่ทดสอบ			ลีโนไทพ์
	อาหารต่ำสมบูรณ์	อาหารต่ำสมบูรณ์ + ไลซีน	อาหารวายพีดี	
$\alpha\alpha(Fu\text{-}d_1)$ - $\alpha\alpha(Fu\text{-}d_7)$	-	+	+	α/α lys 9
α STX 166 - 17 C	-	-	+	α lys 9 ade 2
α STX 174 - 4 D	-	-	+	α lys 9 met 2 ura 1

หมายเหตุ + หมายถึง เจริญบนอาหารชนิดนั้น

\- หมายถึง ไม่เจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเติบโต (Growth curve) ของยีสต์สายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C และ ∝ STX 174 - 4 D ในอาหารเหลววายพีดี บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30° ซ.

O—O สายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C

□—□ สายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>ลักษณะและการตรวจสอบเอกลักษณ์ของยีสต์เซลผสมที่เกิดจากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์</u> (Characteristics and identification of fusants)

2.1 <u>สัณฐานวิทยา</u>

ลักษณะโคโลนีของยีสต์เซลผสมที่ได้คือ $\alpha\alpha$ (Fu-d_1)-$\alpha\alpha$(Fu-d_7) บนอาหารแข็ง มีลักษณะแตกต่างไปจากโคโลนีของสายพันธุ์ α STX 166 - 17 C และ α STX 174 - 4 D ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมกัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนีของเซลผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่บนอาหารแข็งวายพีดี

สายพันธุ์		
α STX 166 - 17 C (<u>lys</u> 9 <u>ade</u> 2)	α STX 174 - 4 D (<u>lys</u> 9 <u>met</u> 2 <u>ura</u> 1)	Fusant (<u>lys</u> 9)
โคโลนีมีลักษณะกลมนูนเป็นรูปโดมตรงกลางขอบเรียบ, ขณะอายุอ่อนโคโลนีมีสีแดงจาง ๆ (Red pigment) เนื่องจากมีความผิดปกติของยีนเกี่ยวกับการสร้างอดีนีนตรงตำแหน่ง <u>ade</u> 2 แต่สีที่เกิดไม่แพร่สู่อาหาร และจะมีสีแดงเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น	โคโลนีมีลักษณะกลมนูนตรงกลางและแฉะราบที่ขอบคล้ายไข่ดาว, ขอบเรียบโคโลนีมีสีครีมอมเหลือง เนื่องจากมีความผิดปกติของยีนเกี่ยวกับการสร้างไลซีนตรงตำแหน่ง <u>lys</u> 9	โคโลนีมีลักษณะกลมนูนตรงกลาง, ขอบเรียบโคโลนีมีสีครีมอมเหลืองคล้ายสายพันธุ์ α STX 174-4 D

จากการศึกษาลักษณะเซลผสมด้วยกล้องจุลทัศน์ โดยวัดขนาดของเซลด้วยออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ พบว่า เซลผสมที่ได้มีขนาดและปริมาตรใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

นอกจากนี้ลักษณะสัณฐานของเซลผสมจากกล้องจุลทัศน์มีลักษณะที่ต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่เดิม ดังรูปภาพที่ 3,4,5 โดยสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C มีลักษณะเซลค่อนข้างกลม (spherical) สายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D มีลักษณะยาวรี ขณะที่เซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) ที่ได้มีลักษณะกลม รี กว่า

ตารางที่ 5 แสดงขนาดและปริมาตรของเซลผสมที่ได้ทั้งหมด ∝∝(Fu-d_1) - ∝∝(Fu-d_7) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ∝ STX 166 - 17 C, ∝ STX 174 - 4 D โดยคำนวณปริมาตรของเซลจากสูตรปริมาตรวงรีจากทั้งหมด 20 เซล

สายพันธุ์ที่ศึกษา	ขนาด (ไมครอน)		ปริมาตร (ไมครอน)^3
	กว้าง	ยาว	
∝ STX 166 - 17 C	3.689 ± 0.366	4.046 ± 0.598	29.48 ± 9.93
∝ STX 174 - 4 D	4.344 ± 0.382	5.474 ± 0.712	56.01 ± 18.55
∝∝(Fu-d_1)	5.474 ± 1.184	7.616 ± 1.744	128.43 ± 66.12
∝∝(Fu-d_2)	5.355 ± 0.819	7.319 ± 1.111	113.91 ± 46.49
∝∝(Fu-d_3)	5.296 ± 0.817	8.033 ± 1.677	122.39 ± 51.26
∝∝(Fu-d_4)	5.772 ± 0.887	7.616 ± 1.119	138.41 ± 59.02
∝∝(Fu-d_5)	6.724 ± 1.041	8.747 ± 1.176	216.57 ± 76.02
∝∝(Fu-d_6)	5.593 ± 0.954	7.735 ± 1.520	133.11 ± 58.30
∝∝(Fu-d_7)	5.117 ± 0.782	6.724 ± 1.238	97.85 ± 47.53

2.2 ปริมาณดีเอนเอในเซล

การทดลองวัดปริมาณดีเอนเอ โดยใช้ไดเฟนิลามีน วิธีของ Schneider พบว่า ดีเอนเอของเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) - ∝∝(Fu-d_7) มีปริมาณมากกว่าดีเอนเอของสายพันธุ์พ่อ-แม่ โดยมีปริมาณดีเอนเอใกล้เคียงกับปริมาณดีเอนเอของสายพันธุ์พ่อและแม่รวมกัน ดังตาราง ที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณดีเอนเอของเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) - ∝∝(Fu-d_7) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ คือ ∝ STX 166 - 17 C และ ∝ STX 174 - 4 D จากการทำ 5 ซ้ำ

สายพันธุ์	ปริมาณดีเอนเอ (มก./10^{11} เซล)
∝ STX 166 - 17 C	1.576 ± 0.0847
∝ STX 174 - 4 D	3.801 ± 0.0862
∝∝ (Fu-d_1)	5.292 ± 0.0975
∝∝ (Fu-d_2)	5.250 ± 0.0507
∝∝ (Fu-d_3)	5.234 ± 0.1497
∝∝ (Fu-d_4)	5.238 ± 0.1372
∝∝ (Fu-d_5)	5.312 ± 0.1263
∝∝ (Fu-d_6)	5.281 ± 0.2633
∝∝ (Fu-d_7)	5.354 ± 0.1262

2.3 อัตราการเจริญเติบโตของเซลผสมในอาหารเหลว (Growth Curve)

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลผสม ในอาหารเหลววายพีดี บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบลักษณะพิเศษของเซลผสม มีแบบ (pattern) ของกราฟการเจริญซึ่งต่างไปจากการเจริญของสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เซลผสมที่ได้มีการเจริญเติบโตในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ 2 ครั้ง ที่เรียกว่า "Diauxic growth" หลังจากที่เซลเข้าสู่ปลายระยะการเจริญแบบทวีคูณครั้งแรกประมาณ ชม.ที่ $9\frac{1}{2}$ เซลมีอัตราการเพิ่มจำนวนช้ามาก ดูเหมือนเข้าสู่ภาวะคงที่ (stationary phase) โดยวัดจำนวนเซลด้วยความขุ่น จากปริมาณเซลที่

วัดได้ใน ชม.ที่ 11 มีค่าไม่ต่างไปจาก ชม.ที่ $9\frac{1}{2}$ และเมื่อวัด ชม.ที่ $11\frac{1}{2}$ พบว่าปริมาณเซล มีค่าเพิ่มขึ้นอีก และพบว่าปริมาณเซลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งหนึ่ง เข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณครั้งที่ 2 การทดลองได้สุ่มเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1), ∝∝ (Fu-d_2) และ ∝∝ (Fu-d_3) ของเซลผสมทั้งหมด ได้พบลักษณะการเจริญของเซลผสมทั้ง 3 ที่สุ่ม เป็นแบบเดียวกันมีอัตราการเจริญในช่วงทวีคูณ 2 ครั้ง โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C ∝ STX 174 - 4 D ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ ไม่พบลักษณะการเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ 2 ครั้ง ดังกราฟรูปที่ 2

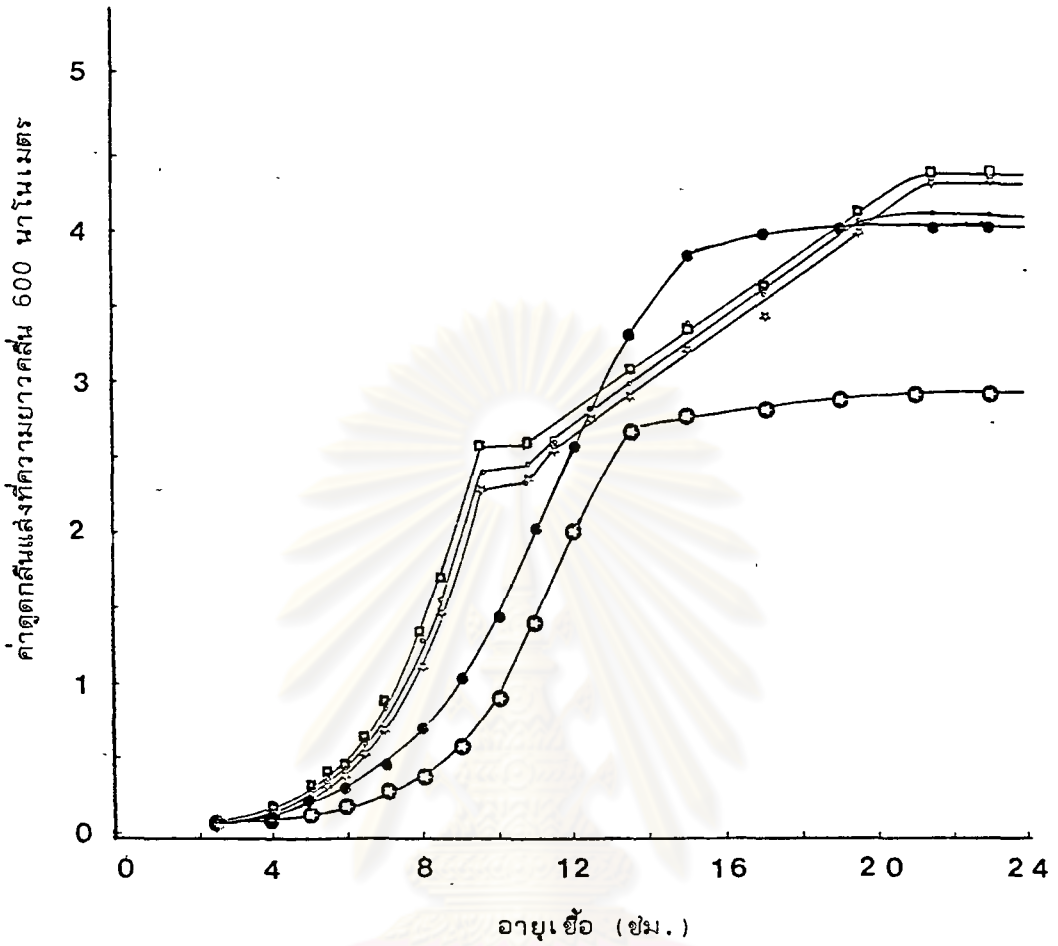
การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตในหน่วยเจเนอเรชันไทม์ (Generation time) ของเซลผสมในระยะการเจริญแบบทวีคูณ ช่วงที่เป็นเส้นตรง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้สูตร $K = \frac{\log N_T - \log No}{\log 2\ (t_2 - t_1)}$ คำนวณค่า 1/K ดังกล่าวแล้ว พบอัตราการเจริญแตกต่างกัน ดังปรากฏในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการเจริญเติบโตในหน่วยเจเนอเรชันไทม์ (1/K) ของเซลผสม ∝∝(Fu-d_1), ∝∝ (Fu-d_2), ∝∝ (Fu-d_3) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ คือ ∝ STX 166 - 17 C และ ∝ STX 174 - 4 D

สายพันธุ์	อัตราการเจริญเติบโต (1/K)	
	การเจริญแบบทวีคูณครั้งที่ 1	การเจริญแบบทวีคูณครั้งที่ 2
∝ STX 166 - 17 C	2 ชม. 44 นาที	ไม่มี
∝ STX 174 - 4 D	2 ชม. 47 นาที	ไม่มี
∝∝ (Fu-d_1)	1 ชม. 27 นาที	5 ชม. 48 นาที
∝∝ (Fu-d_2)	1 ชม. 27 นาที	5 ชม. 52 นาที
∝∝ (Fu-d_3)	1 ชม. 33 นาที	5 ชม. 28 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17069403



กราฟที่ 2 แสดงอัตราการเจริญเติบโต (Growth curve) ของเซลผสม $\propto\propto$ (Fu-d_1), $\propto\propto$(Fu-d_2) และ $\propto\propto$ (Fu-d_3) กับสายพันธุ์พ่อแม่ $\propto$ STX 166 - 17 C และ $\propto$ STX 174 - 4 D

- ยีสต์เซลผสม $\propto\propto$ (Fu-d_1)
- " $\propto\propto$ (Fu-d_2)
- " $\propto\propto$ (Fu-d_3)
- สายพันธุ์ $\propto$ STX 166 - 17 C
- " $\propto$ STX 174 - 4 D

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 ความสามารถของยีสต์เซลผสมในการตอบสนองต่อสายพันธุ์บ่งเพศที่ตรงข้าม (Mating Response)

จากการทดลองผสม $\alpha\alpha$ (Fu-d_1) ซึ่งเป็นลูกผสมที่ได้จากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส และคาดว่าเป็นดิพพลอยด์ มีสายพันธุ์บ่งเพศ α/α และตำหนิเป็น lys 9 กับ a AH-22 (cir$^+$) ซึ่งเป็นแฮพพลอยด์ มีสายพันธุ์บ่งเพศ a และตำหนิเป็น leu 8-3 leu 2-112 his 4 can 1 โดยอาศัยการรวมโดยอาศัยเพศตามหลักการธรรมชาติ พบว่า $\alpha\alpha$ (Fu-d_1) สามารถผสมกับ a AH-22 (cir$^+$) ซึ่งมีสายพันธุ์บ่งเพศที่ตรงข้ามกัน เกิดลูกผสมใหม่บนอาหารแข็งที่ไม่เติมกรดอะมิโน ให้ชื่อลูกผสมใหม่ที่ได้นั้นนี้ว่า $\alpha\alpha$a (Fu-t) สันนิษฐานเบื้องต้นว่า $\alpha\alpha$a (Fu-t) ควรเป็นทริพพลอยด์ ตามทฤษฎีที่นำดิพพลอยด์ รวมกับแฮพพลอยด์ โดยวัดขนาด, ปริมาตร และปริมาณดีเอนเอของเซลที่เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงการวัดขนาด, ปริมาตร และปริมาณดีเอนเอของลูกผสม $\alpha\alpha$ a (Fu-t) ที่เกิดจากการผสมระหว่าง $\alpha\alpha$ (Fu-d_1) และ a AH-22 (cir$^+$)

สายพันธุ์ที่ศึกษา	ขนาด (ไมครอน)		ปริมาตร	ปริมาณดีเอนเอ
	กว้าง	ยาว	(ไมครอน)^3	มก./10^{11} เซล
$\alpha\alpha$(Fu-d_1)	5.474 ± 1.184	7.616 ± 1.744	128.43 ± 66.12	5.292 ± 0.0975
a AH-22 (cir$^+$)	4.582 ± 1.352	5.117 ± 1.164	66.73 ± 47.66	2.777 ± 0.0432
$\alpha\alpha$a (Fu-t)	4.998 ± 0.5017	9.284 ± 1.094	132.48 ± 51.62	6.305 ± 0.2815

ผลการศึกษาขบวนการสร้างสปอร์ (Sporulation) ของ $\alpha\alpha$ a (Fu-t) พบว่าสามารถเกิดมัยโอซีส ให้แอสโคสปอร์บนอาหารแข็งวายพีดี หลังจากเลี้ยงบนอาหารชนิดนี้ 9 วัน และบนอาหารแข็งอซีเตต หลังจากเลี้ยงบนอาหารชนิดนี้ 5 วัน แต่ไม่ได้ศึกษาลักษณะจีโนไทพ์ของแต่ละแอสโคสปอร์ที่ได้

ผลการทดลองหาอัตราการเจริญเติบโตของลูกผสม $\alpha\alpha$ a (Fu-t) ในอาหารเหลววายพีดี พบลักษณะการเจริญที่ต่างจากสายพันธุ์ a AH-22 (cir$^+$) แต่คล้าย $\alpha\alpha$ (Fu-d_1) กล่าวคือ มีการเจริญเติบโตในระยะทวีคูณ 2 ครั้ง หรือ Diauxic growth หลังจากที่เซล

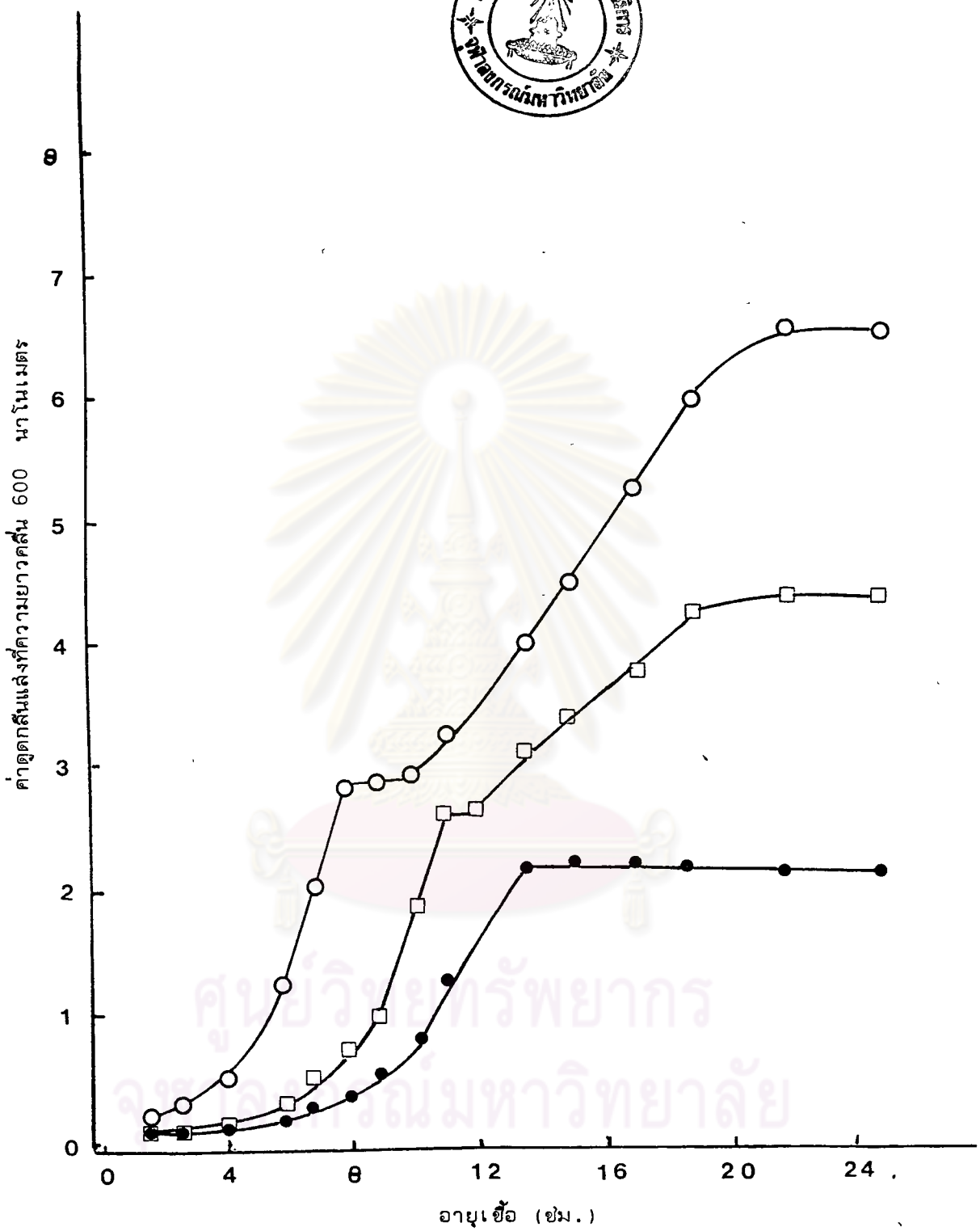
เข้าสู่ระยะทวีคูณตอนปลายใน ชม.ที่ 8 เซลมีอัตราการเพิ่มจำนวนช้ามาก จนดูเหมือนเข้าสู่สภาวะคงที่ ปริมาณเซลที่วัดได้จากเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงใน ชม.ที่ 9 และ 10 มีค่าไม่ต่างจาก ชม.ที่ 8 แต่หลังจากผ่านพ้น ชม.ที่ 10 พบว่า ปริมาณเซลที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเข้าสู่ระยะทวีคูณที่ 2 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3

จากกราฟรูปที่ 3 พบแบบกราฟการเจริญของการเพิ่มจำนวนเซลโดยพิจารณาจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ ชม.ที่ 24 ในระหว่างแฮพพลอยด์, ดิพพลอยด์ และทริพพลอยด์ ของ a AH-22 (cir^+), ∝∝ (Fu-d_1) และ ∝∝a (Fu-t) ตามลำดับ พบว่า ∝∝a (Fu-t) ซึ่งเป็นทริพพลอยด์ มีการเพิ่มจำนวนเซลที่มากกว่า ∝∝ (Fu-d_1) ซึ่งเป็นดิพพลอยด์ และ ∝∝ (Fu-d_1) นี้ มีการเพิ่มจำนวนเซลที่มากกว่า a AH-22 (cir^+) ซึ่งเป็นแฮพพลอยด์เซล โดยการเพิ่มจำนวนเซลพบว่า ∝∝a(Fu-t) มีการเพิ่มจำนวนที่มากกว่า a AH-22 (cir^+) 3 เท่า และ ∝∝(Fu-d_1) มีการเพิ่มจำนวนที่มากกว่า a AH-22 (cir^+) 2 เท่า เมื่อเซลเข้าสู่ระยะคงที่

จากผลการคำนวณอัตราการเพิ่มจำนวนในระยะทวีคูณที่เป็นเส้นตรงของ∝∝a(Fu-t) เปรียบเทียบกับ ∝∝(Fu-d_1) และ a AH-22 (cir^+) พบค่าอัตราการเพิ่มจำนวนแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการเจริญเติบโตในหน่วยเจเนอเรชันไทม์ (1/K) ของลูกผสม ∝∝a (Fu-t) ที่ได้จากการผสมระหว่าง ∝∝ (Fu-d_1) กับ a AH-22 (cir^+)

สายพันธุ์ที่ศึกษา	อัตราการเจริญเติบโต	
	การเจริญแบบทวีคูณครั้งที่ 1	การเจริญแบบทวีคูณครั้งที่ 2
a AH-22 (cir^+)	2 ชม. 44 นาที	ไม่มี
∝∝ (Fu-d_1)	1 ชม. 35 นาที	5 ชม. 34 นาที
∝∝a (Fu-t)	1 ชม. 2 นาที	4 ชม. 43 นาที



กราฟที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโต (Growth curve) ของยีสต์ลูกผสม ∝∝a(Fu-t), ∝∝(Fu-d_1) , a AH-22(cir^+) ในอาหารเหลวอายพีดี บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ.

○—○ ∝∝a (Fu-t)

□—□ ∝∝ (Fu-d_1)

●—● a AH-22 (cir^+)

3. สภาพนิวเคลียสของยีสต์เซลผสมที่ได้จากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

3.1 การย้อมนิวเคลียสด้วยวิธีการสมซ้ำ

จากการย้อมสี เพื่อศึกษาจำนวนสภาพของนิวเคลียสภายในเซลผสมที่ได้จากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส พบลักษณะที่มีการติดสีคล้ายนิวเคลียสเป็นจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 1-5 นิวเคลียส ภายใน 1 เซล ดังรูปภาพที่ 6 และมีขนาดนิวเคลียสที่แตกต่างกัน จึงไม่สามารถสรุปว่าสิ่งที่เห็นจะใช่นิวเคลียสหรือไม่

3.2 การศึกษาภาพนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตัวอย่าง

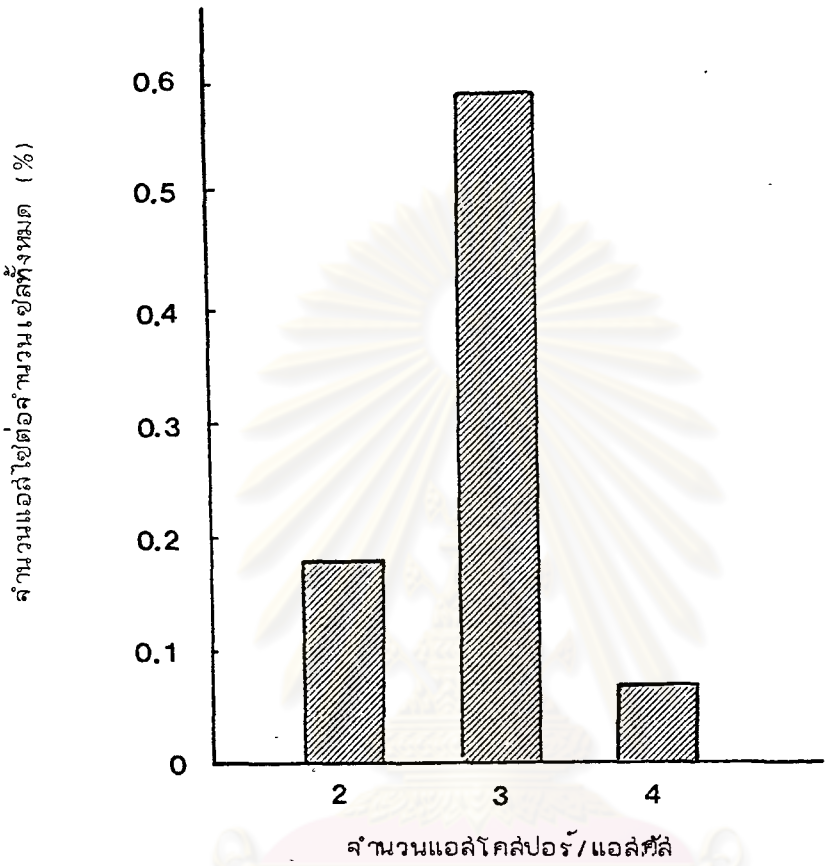
จากการศึกษาจำนวนและสภาพนิวเคลียสของเซลผสมด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตัวอย่าง โดยการตรวจในหลาย ๆ วิวของตัวอย่างที่เตรียมเพื่อศึกษา พบว่าภายในเซลผสมมี 1 นิวเคลียส แทบทุกเซล ดังรูปภาพที่ 7

4. การทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C และ ∝ STX 174 - 4 D

เนื่องจากยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มิได้ระบุการทำงานของยีน KAR จึงทำการทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์ทั้ง 2 ผลการทดลองพบว่า ยีนที่ควบคุมการรวมกันของนิวเคลียส โดยยีน KAR ในสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C และ ∝ STX 174 - 4 D ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้มียีน KAR ปกติศึกษาจากความสามารถในการเกิดแอสโคสปอร์บนอาหารแข็งอซีเตต และวายพีดี บันทึกจำนวนวันครั้งแรกที่สามารถตรวจพบการเกิดแอสโคสปอร์ ดังตารางที่ 10 และความถี่การเกิดแอสโคสปอร์ชนิดต่าง ๆ ในแอสคัส ดังกราฟรูปที่ 4 และ 5

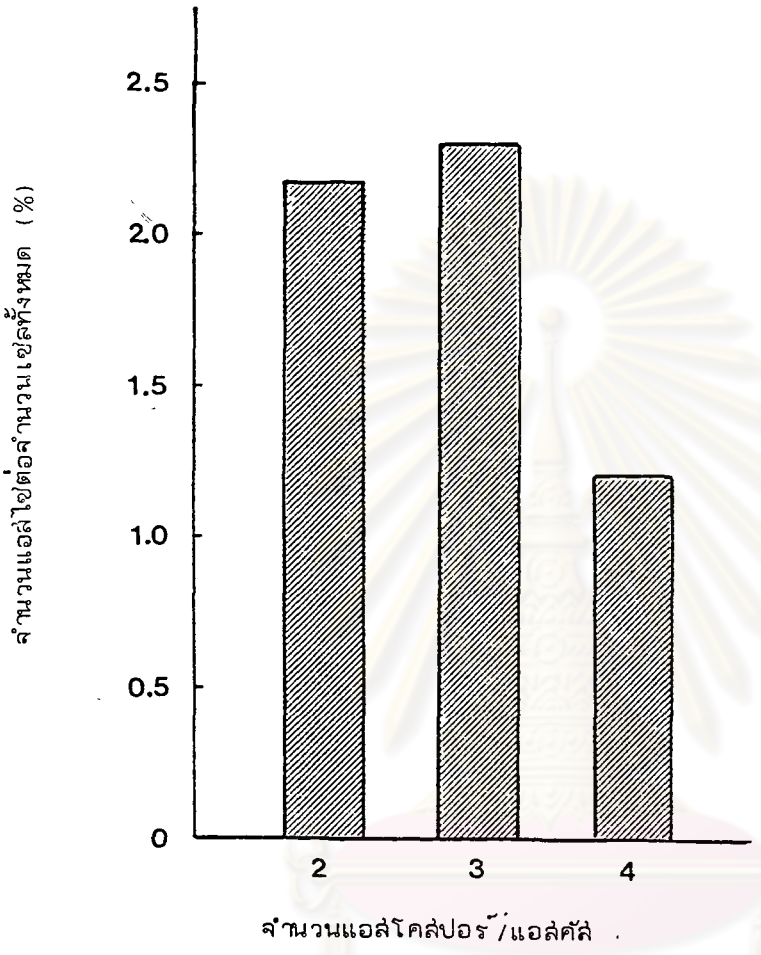
ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C และสายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D

สายพันธุ์ที่ศึกษา	จำนวนวันที่สามารถสร้างแอสโคสปอร์บน	
	อาหารอซีเตต	อาหารวายพีดี
∝ STX 166 - 17 C + a AH-22 (cir^+)	9	15
∝ STX 174 - 4 D+ a AH-22(cir^+)	3	5



กราฟที่ 4 แล์ดงจำนวนแอล์ไซ์ที่มีจำนวนแอล์โคล์ปอรัต่อแอล์ศัล์เป็น 2,3 และ 4 ที่เกิดจากการผล์มระหว่างล์ายพันธุ์ ∝ STX 166 - 17 C กับ a AH-22(cir^{+}) โดยอาศัยยีน KAR และล์ายพันธุ์บ่งเพศ ∝ ,a ตามธรรมชาติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 5 แล์ดงจำนวนแอล์ไซ์ที่มีจำนวน์แอล์โคล์ปอร์ต่อแอล์คัล์เป็น 2,3 และ 4 ที่เกิด จากการผล์มระหว่างล์ายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D กับ a AH-22 (cir^+) โดยอาศัยยีน KAR และล์ายพันธุ์บ่งเพศ์ ∝ ,a ตามธรรมชาติ

5. ความเสถียรทางพันธุกรรมของเซลผสมที่เกิดจากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์ (Genetic Stability of Fusant)

จากผลการทดลองพบว่าฟีโนไทพ์ส่วนใหญ่ของเซลผสม ยังคงขาดไลซีนตามที่คัดเลือกไว้ แม้จะเก็บรักษาเชื้อไว้เป็นเวลา 1 ปี ยกเว้นในเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) ที่พบฟีโนไทพ์ที่แปลกคือเป็น lys และ met และใน ∝∝ (Fu-d_4) ที่พบฟีโนไทพ์ lys met ura เหมือนสายพันธุ์ ∝ STX 174 - 4 D ด้วยความถี่ 0.50% และ 4.40% ตามลำดับดังตารางที่ 11 นอกจากนี้ยังพบเซลปกติ (Prototroph) ที่ไม่ต้องการกรดอะมิโนชนิดใดเลย โดยสามารถขึ้นบนอาหารต่ำสมบูรณ์ที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโน

ตารางที่ 11 แสดงฟีโนไทพ์ของเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) - ∝∝ (Fu-d_7) ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสระหว่าง ∝ STX 166 - 17 C (lys 9 ade 2) และ ∝ STX 174 - 4 D (lys 9 met 2 ura 1) หลังจากเก็บรักษาเชื้อไว้เป็นเวลา 1 ปี ที่ 4^{o} ซ.

เซลผสม	จำนวนโคโลนี	ฟีโนไทพ์									
		Prototroph		lys	lys ade	lys met	lys ura	lys ade met	lys met ura	lys ade ura	lys ade met ura
		จำนวน	ร้อยละ								
∝(Fu-d_1)	202	3	1.49	198	0	1	0	0	0	0	0
∝(Fu-d_2)	118	1	0.85	117	0	0	0	0	0	0	0
∝(Fu-d_3)	228	2	0.88	226	0	0	0	0	0	0	0
∝(Fu-d_4)	182	3	1.65	171	0	0	0	0	8	0	0
∝(Fu-d_5)	153	2	1.31	151	0	0	0	0	0	0	0
∝(Fu-d_6)	124	1	0.81	123	0	0	0	0	0	0	0
∝(Fu-d_7)	158	1	0.63	157	0	0	0	0	0	0	0

6. เวลาที่เหมาะสมในการฉายแสงอุลตราไวโอเลตซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศ และเกิดกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์ และอัตราความถี่การเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศ

6.1 อิทธิพลการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของยีสต์เซลผสม

เมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเลตไปยังยีสต์เซลผสม $\alpha\alpha$ ($Fu\text{-}d_1$) ไม่เกิน 15 วินาที อัตราการรอดชีวิตของยีสต์ไม่เกินร้อยละ 75 ดังกราฟรูปที่ 6

6.2 อัตราความถี่การเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก α เป็น a

ผลการทดลองพบว่า แสงอุลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศในเซลผสม $\alpha\alpha$ ($Fu\text{-}d_1$) ทำให้เกิดกระบวนการสร้างสปอร์ (sporulation) มีแอสโคสปอร์เกิดขึ้นในแอสคัส ดังรูปภาพที่ 8 และเมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเลตห่างจากเซลผสม $\alpha\alpha$ ($Fu\text{-}d_1$) 50 ซม. เป็นเวลา 10 วินาที สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศของยีสต์เซลผสมได้สูงสุดร้อยละ 44.33 โดยศึกษาจากจำนวนโคโลนีที่สามารถสร้างแอสไซได้บนอาหารแข็งอซีเตตหลังจากฉายแสงอุลตราไวโอเลต ดังกราฟรูปที่ 7

7. ลีโนไทพ์ และสายพันธุ์บ่งเพศในแอสโคสปอร์ที่เกิดขึ้นของเซลผสม $\alpha\alpha$ ($Fu\text{-}d_1$) จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต

7.1 จำนวนและชนิดของแอสโคสปอร์ในแอสคัส

ผลการทดลองพบว่า จำนวนแอสไซที่เกิดขึ้นจากการชักนำด้วยแสงอุลตราไวโอเลตของ $\alpha\alpha$ ($Fu\text{-}d_1$) มีจำนวนแตกต่างกัน โดยให้จำนวนแอสไซสูงสุดเมื่อฉายแสงเป็นเวลา 12 วินาที ดังกราฟรูปที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนแอสโคสปอร์ในแอสคัสแตกต่างกันตามเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลต โดยให้จำนวนแอสโคสปอร์ชนิด 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัสสูงสุด เมื่อฉายแสงนาน 12 วินาที แอสคัสชนิด 3 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัสสูงสุด เมื่อฉายแสงนาน 12 วินาทีเช่นกัน แต่ให้จำนวนแอสโคสปอร์ชนิด 2 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัสสูงสุด เมื่อฉายแสงนาน 10 วินาที ดังกราฟรูปที่ 9,10 และ 11 ตามลำดับ

7.2 การแยกแอสโคสปอร์ในแต่ละแอสคัสโดยใช้เครื่องมือไมโครมานิพูเลเทอร์

รูปภาพที่ 9 แสดงขั้นตอนการแยกแอสโคสปอร์จากแอสคัส โดยเริ่มตั้งแต่เลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็งอซีเตตที่เติมไลซีน, อดีนีน, เมทไธโอนีน และยูเรซิล เพื่อกระตุ้นการเกิดแอสไซ จากนั้นทำลายผนังเซลของแอสคัสด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส -5000 ความเข้มข้น 6

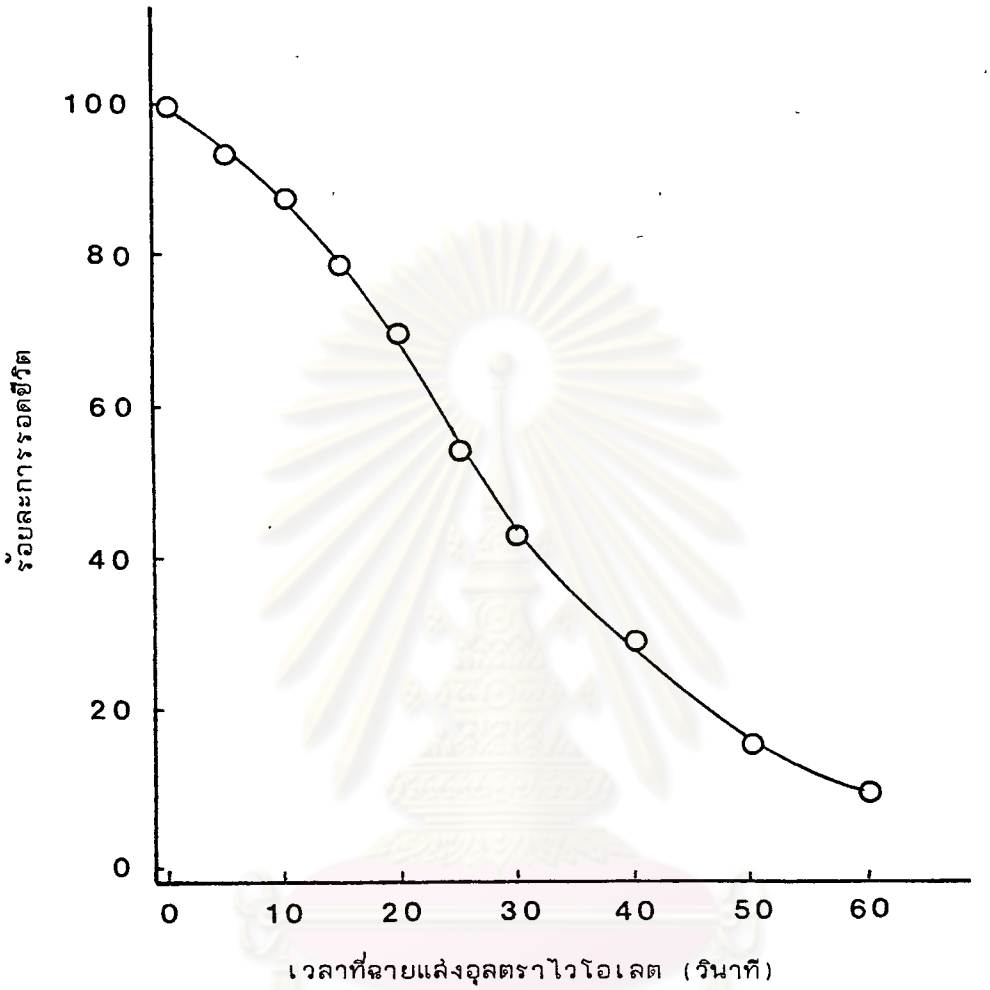
มก.ต่อมล. นาน 25 นาที นำไปแยกแอล่โคล่ปอร์โดยเครื่องมือไมโครมานิพูเลเทอร์ เพื่อศึกษาจีโนไทพ์ของแอล่โคล่ปอร์ เลือกแยกเฉพาะแอล่ศัล่ ที่มี 4 แอล่โคล่ปอร์ และเก็บ (Select) เฉพาะแอล่ศัล่ที่สามารถงอก (germination) ให้จำนวนแอล่โคล่ปอร์ในแอล่ศัล่เป็น 4 หรืออย่างน้อย 3 แอล่โคล่ปอร์ จนครบ 25 แอล่ศัล่ จากการทดลองพบว่าแอล่โคล่ปอร์ทั้ง 4 ในแต่ละแอล่ศัล่ที่ศึกษา มีความสามารถในการงอกบนอาหารแข็งวายพีดีแตกต่างกัน ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แล่ดงการงอกของแอล่โคล่ปอร์ในแต่ละแอล่ศัล่ ซึ่งแยกจากแอล่ศัล่ที่มี 4 แอล่โคล่ปอร์ต่อแอล่ศัล่

จำนวนแอล่ศัล่ทั้งหมดที่แยก	จำนวนแอล่ศัล่ที่แอล่โคล่ปอร์งอก				
	4	3	2	1	0
80	13	12	13	14	28
100%	16.25%	15%	16.25%	17.5%	35%

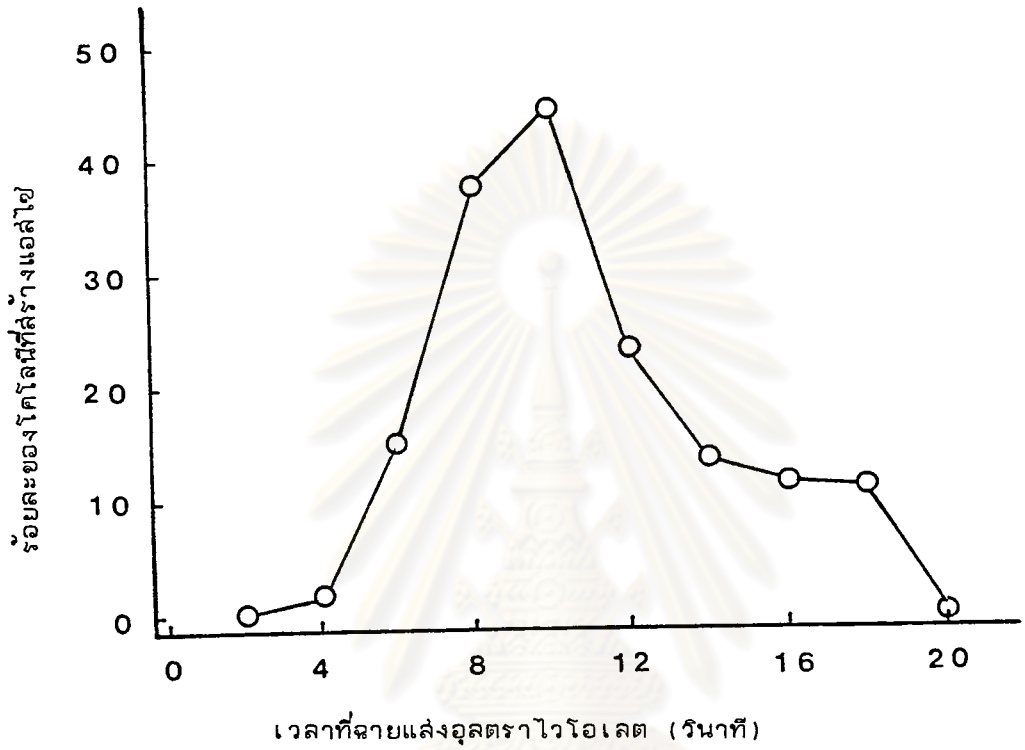
7.3 <u>ลีโนไทพ์และล่ายพันธุ์บ่งเพศ ∝ , a ในแต่ละแอล่โคล่ปอร์</u>

จากการทดลองชักนำการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศจาก ∝ เป็น a ของเซลผสม ∝∝ (Fu-d_1) ซึ่งมีลีโนไทพ์ <u>lys</u> 9 ด้วยแล่งอุลตราไวโอเลต สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการล่ร้างแอล่โคล่ปอร์ และมีการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศจาก ∝ เป็น a โดยมีอัตราการกระจาย (Segregation) ของล่ายพันธุ์บ่งเพศภายในแอล่ศัล่เป็นสัดล่วน 2 ∝ : 2 a และลักษณะลีโนไทพ์ต่อการล่ร้างกรดอะมิโนและไนโตรลีเนียล่เบล่ ของแต่ละแอล่โคล่ปอร์ แล่ดงในตารางที่ 13 และล่รุปสัดล่วนการกระจายของยีน ในตารางที่ 14



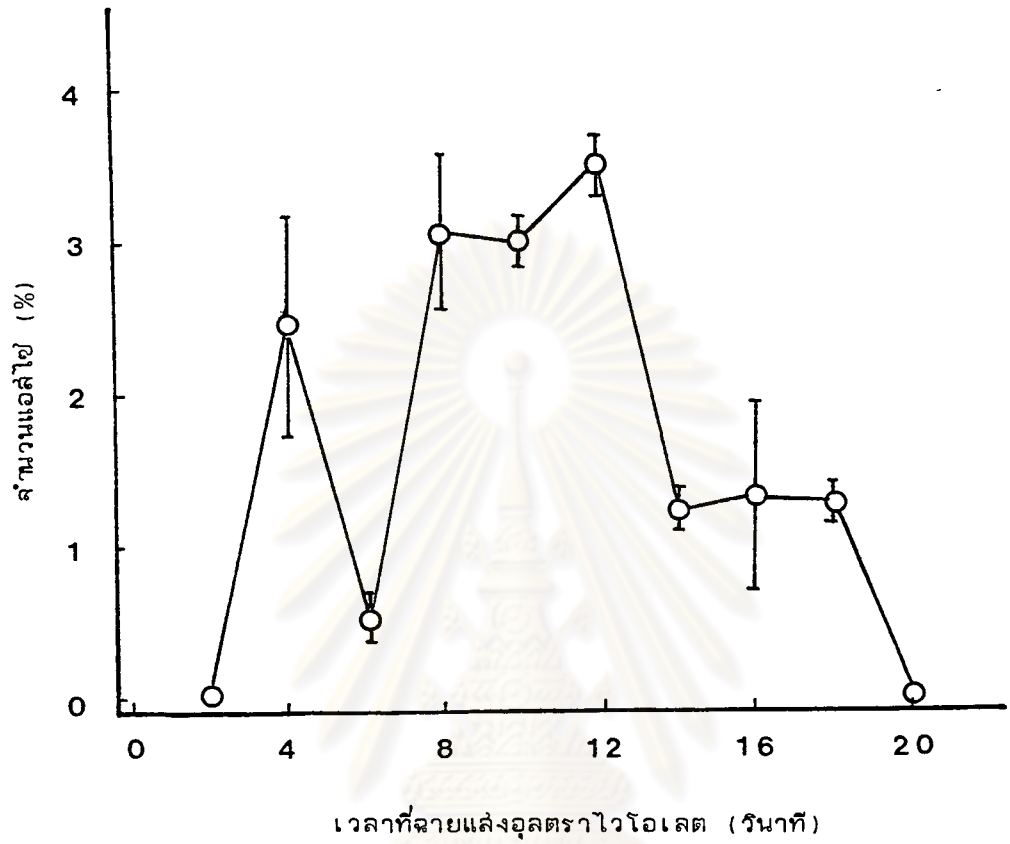
กราฟที่ 6 ผลการฉายแสงอุลตราไวโอเลตต่ออัตราการรอดชีวิตของยีสต์เซลผสม $\alpha\alpha(Fu\text{-}d_1)$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



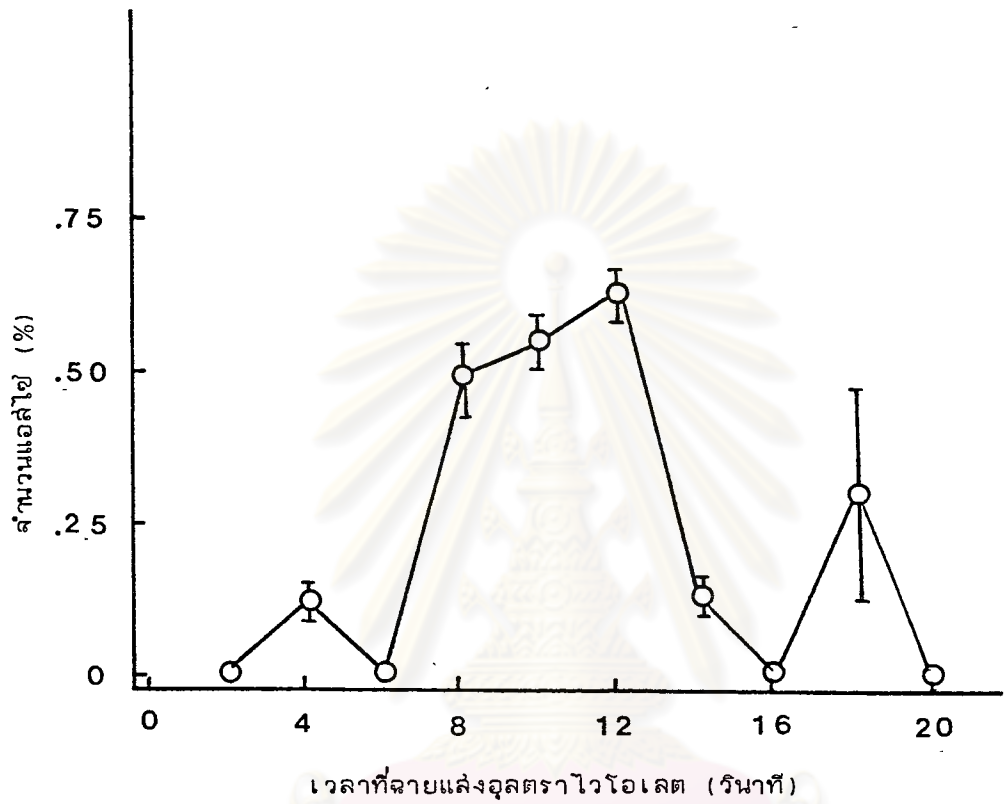
กราฟที่ 7 ผลการฉายแล่งอุลตราไวโอเลตยักนำการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศในยีสต์เซลผล่ม $\alpha\alpha(Fu-d_1)$ นับจากจำนวนโคโลนีที่ล่ร้างแอล่ศัล่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



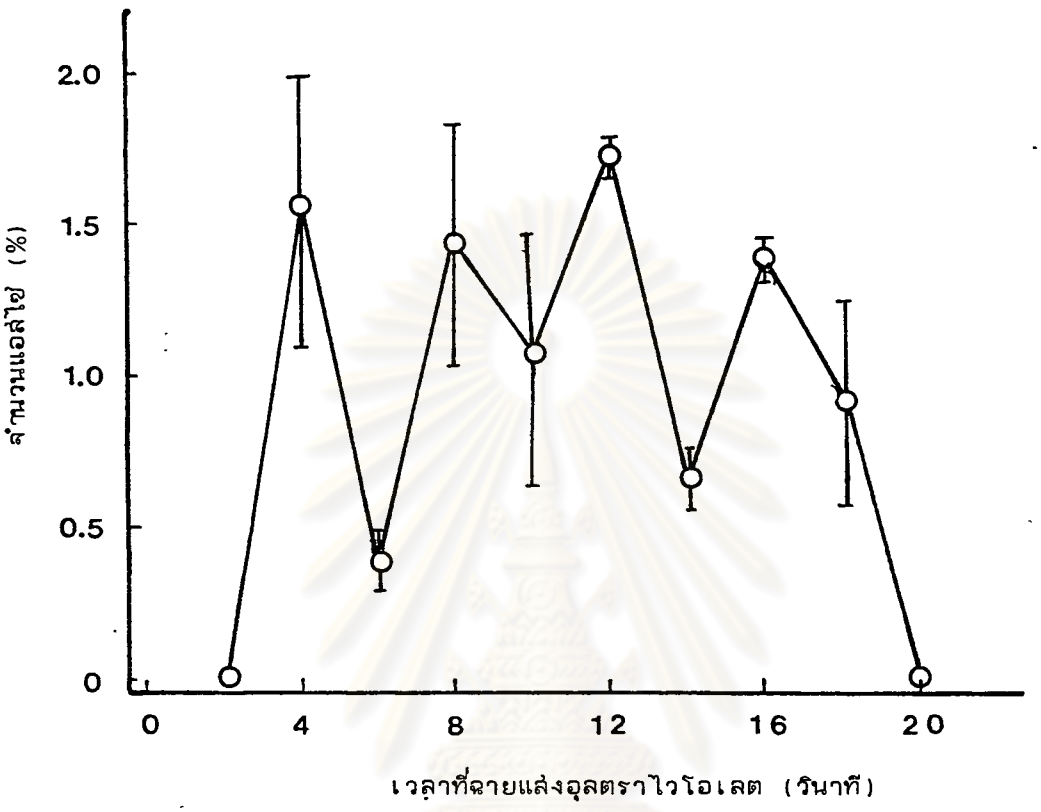
กราฟที่ 8 แล่ดงจำนวนแอล่ไซที่เกิดขึ้นจากเซลผล่ม ๔๔ ($Fu\text{-}d_1$) ที่ถูกยักนำด้วยแล่งอุลตราไวโอเลต ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



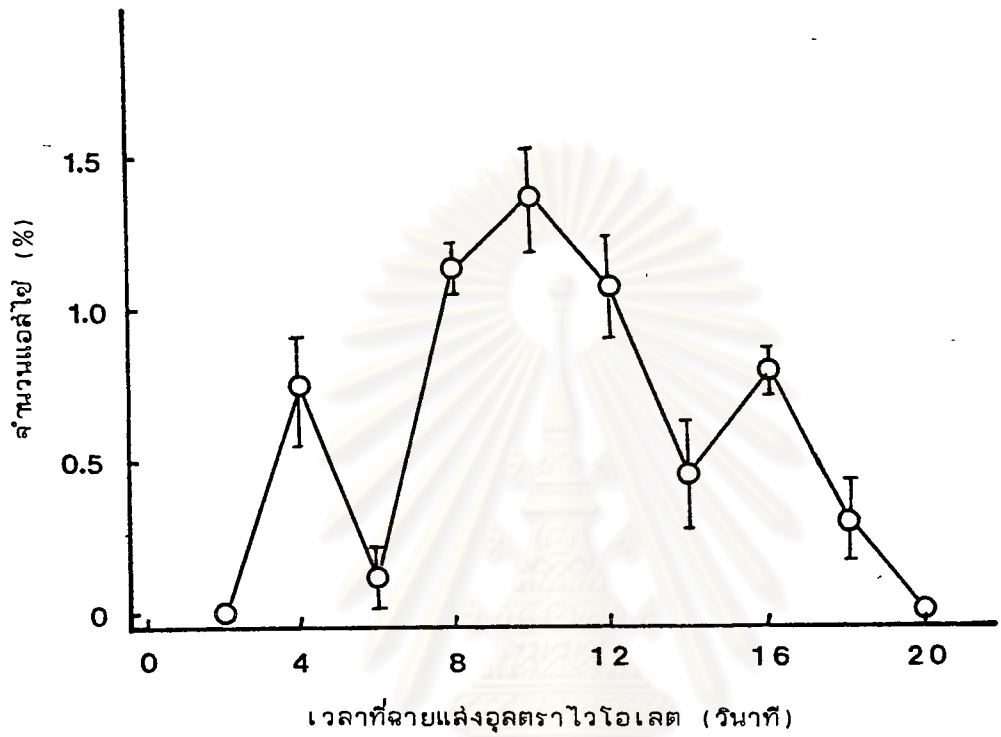
กราฟที่ 9 แล่ดงจำนวนแอล์ไซด์นิดที่มี 4 แอล์โคล์ปอร์ต่อแอล์คัล์ยองเซล์ลผล์ม $\alpha\alpha$ ($Fu-d_1$) ที่เกิดจากการชักนำด้วยแล่งอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 10 แล่ดงจำนวนแอล์ไซย์นิดที่มี 3 แอล์โคล์ปอร์ต่อแอล์ศัล์ของเซลผล์ม ๙๙ ($Fu\text{-}d_1$) ที่เกิดจากกา่รยักนำด้วยแล่งอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 11 แล่ดงจำนวนแอล์ไซน์นิดที่มี 2 แอล์โคล์ปอร์ต่อแอล์ศัล์ ของเซลผล่ม ๔๔ ($Fu\text{-}d_1$) ที่เกิดจากการชักนำด้วยแล่งอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงลายพันธุ์บ่งเพศ และจี โนไทพ์[ก] ของแต่ละแอสโคสปอร์จาก 25 แอสคัส

แอสโคสปอร์ / แอสคัส	1	2	3	4
1	∝ Prototroph[ข]	∝ lys ade met ura[ค]	a lys ade met ura	a lys ade
2	∝ lys ade met ura[ค]	a lys ade met	a Prototroph	∝ lys met ura
3	∝ lys ade met ura[ค]	a lys ade met	∝ lys met ura	a lys ade
4	a lys met ura	∝ lys ura	a lys ade met ura[ค]	ตาย
5	a Prototroph[ข]	∝ lys ade met	a lys ura	∝ lys met ura
6	a lys ade	a lys ade	∝ lys ura	ตาย
7	a lys ade met ura[ค]	a lys ade	∝ lys met	ตาย
8	a lys ade	∝ lys ade ura	∝ lys met	a lys met ura
9	a lys ade ura	∝ lys ade	a lys met	∝ lys ade met ura
10	a lys ade met	a lys met	∝ lys met	∝ Prototroph
11	∝ lys met ura	∝ lys ade met ura[ค]	a lys met	a lys ade met ura
12	a lys ura	∝ lys ade met	∝ lys met	a lys ade
13	∝ lys ade met ura[ค]	a lys ade met ura[ค]	a Prototroph	∝ lys ura
14	a lys met ura	∝ lys ade	a Prototroph	ตาย
15	∝ lys ade	∝ lys ade	a lys met ura	ตาย
16	a lys met	a lys ade	∝ lys ura	∝ lys met ura
17	a lys met ura	a lys ade	∝ lys met	∝ lys ade met
18	∝ lys met	∝ lys ade met ura[ค]	a lys ade ura	ตาย
19	a Prototroph[ข]	a lys met ura	∝ lys ade met ura	∝ lys ade met
20	a Prototroph[ข]	∝ lys met ura	a lys met	ตาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอล์โคล์ปอร์ / แอล์คัล์	1	2	3	4
21	a lys ura	a lys met ura	∝ lys ade met ura (ค)	ตาย
22	a lys met	a lys ura	∝ lys ade	ตาย
23	∝ lys ura	a lys ade met	a lys ade met ura (ค)	ตาย
24	a lys met	∝ lys ade	a lys met ura	ตาย
25	∝ lys ade	a lys ura	∝ lys ade met ura (ค)	ตาย

หมายเหตุ (ก) = ชื่อจีโนไทพ์ของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียล์เบล์ให้ยีดเล้นใต้

(ข) = Prototroph เป็นแอล์โคล์ปอร์ที่ล์ามารถขึ้นบนอาหารต่ำล์มบูรณ์ที่ปราศ จากกรดอะมิโน

(ค) = เป็นแอล์โคล์ปอร์ที่ต้องการไลซีน อดีนีน เมทไธโอนีน และยูเรซิล ในปริมาณที่มากกว่าแอล์โคล์ปอร์ปกติ 2 เท่า

ตารางที่ 14 ล์รุปสัดล์วนการกระจายของยีนภายในแอล์คัล์จำนวน 25 แอล์คัล์

ยีน	สัดล์วนการกระจายของยีน				
	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
∝ : a	0	0	25	0	0
lys : LYS	17	8	0	0	0
ade : ADE	0	3	18	4	0
met : MET	1	5	18	1	0
ura : URA	0	4	18	3	0

ถ้าให้การกระจายของยีนในตารางที่ 13 เป็นอัตราล์วนตามทฤษฎีคือ 2:2 และ 4:0 ในกรณีการขาดไลซีนของ lys : LYS เราล์ามารถคาดหรือทาย (Predict) จีโนไทพ์ของแอล์โคล์ปอร์ที่ตายในแอล์ไซที่ 4, 6, 7, 14, 15, 18 และ20-25 ได้ดังตาราง ที่ 15

ตารางที่ 15 สรุปลายพันธุ์บ่งเพศและฟีโนไทพ์ของแอสโคสปอร์ทั้งหมดที่ควรได้ใน 25 แอสคัส

แอสโคสปอร์ / แอสไซ	1	2	3	4
1	∝ prototroph	∝ lys ade met ura	a lys ade met ura	a lys ade
2	∝ lys ade met ura	a lys ade met	a prototroph	∝ lys met ura
3	∝ lys ade met ura	a lys ade met	∝ lys met ura	a lys ade
4	a lys met ura	∝ lys ura	a lys ade met ura	∝ lys ade
5	a prototroph	∝ lys ade met	a lys ura	∝ lys met ura
6	a lys ade	a lys ade	∝ lys ura	∝ lys ura met
7	a lys ade met ura	a lys ade	∝ lys met	∝ lys ura
8	a lys ade	∝ lys ade ura	∝ lys met	a lys met ura
9	a lys ade ura	∝ lys ade	a lys met	∝ lys ade met ura
10	a lys ade met	a lys met	∝ lys met	∝ prototroph
11	∝ lys met ura	∝ lys ade met ura	a lys met	a lys ade met ura
12	a lys ura	∝ lys ade met	∝ lys met	a lys ade
13	∝ lys ade met ura	a lys ade met ura	a prototroph	∝ lys ura
14	a lys met ura	∝ lys ade	a prototroph	∝ lys ade met ura
15	∝ lys ade	∝ lys ade	a lys met ura	a lys met ura
16	a lys met	a lys ade	∝ lys ura	∝ lys met ura
17	a lys met ura	a lys ade	∝ lys met	∝ lys ade met
18	∝ lys met	∝ lys ade met ura	a lys ade ura	a lys
19	a prototroph	a lys met ura	∝ lys ade met ura	∝ lys ade met
20	a prototroph	∝ lys met ura	a lys met	∝ lys ura ade

แอล์โคล์ปอร์ / แอล์ส์ล์	1	2	3	4
21	a lys ura	a lys met ura	∝ lys ade met ura	∝ lys ade
22	a lys met	a lys ura	∝ lys ade	∝ lys ade met ura
23	∝ lys ura	a lys ade met	a lys ade met ura	∝ lys
24	a lys met	∝ lys ade	a lys met ura	∝ lys ade ura
25	∝ lys ade	a lys ura	∝ lys ade met ura	a lys met

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย