บทที่ 1

บทนำ

การรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์ (Protoplast fusion) เป็นเทคนิคที่ได้นำมาใช้กับยีส์ต์ เพื่อช่วยในการศึกษาทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะที่ดีขึ้นตามต้องการ แต่เดิมเทคนิคนี้ถูกนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (1), ราที่มีสายใย (2) และแบคทีเรีย (3, 4) เป็นการรวมของเซลในขณะที่ผนังเซลถูกสลาย อยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซล (cell wall) เหลือแต่เซลเมมเบรน (cell membrane) หุ้มโปรโตพลาส์ม เรียกเซลที่อยู่ในสภาพนี้ว่า โปรโตพลาส์ (protoplast) จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า การรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์

การรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์เป็นวิธีการรวมเซลที่ทำขึ้นเองโดยอาศัยสารเคมี เป็นการรวมเซลแบบไม่อาศัยเพศ (asexual fusion) (5) และไม่ขึ้นกับจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy) ของเซล เซลผสมที่ได้ซึ่งเรียกว่า ไฮบริด (hybrid), ฟิวแส่นท์ (fusant) หรือฟิวชัน โปรดัค (fusion product) จึงมีจำนวนชุดของโครโมโซมได้ต่าง ๆ กัน ขึ้นกับจำนวนชุดของโครโมโซมของเซลพ่อและเซลแม่เดิมที่นำมาผสม ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ยีส์ต์บางชนิด โดยเฉพาะยีส์ต์พวกที่มีนิวเคลียส์ซึ่งมีโครโมโซมหลายชุดเป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) หรือพวกที่มีโครโมโซมไม่ครบชุดที่เรียกว่า อนิวพลอยด์ (aneuploid) ซึ่งทำให้ยีส์ต์พวกนี้อาจจะไม่แส่ดงลักษณะของสายพันธุ์บ่งเพศ (mating type) จึงไม่สามารถเกิดมัยโอซีส์ (meiosis) โดยวิธีใช้เพศ (mating) ตามธรรมชาติ เซลผสมที่เกิดจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์จะรวมลักษณะพันธุกรรมของเซลพ่อและเซลแม่เดิมที่ผสมกัน เนื่องจากโครโมโซมของเซลพ่อและเซลแม่ จะรวมอยู่ในนิวเคลียส์ของเซลผสมที่ได้ (6)

<u>เทคนิคและวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส์</u> แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ดังนี้

1. การเตรียมเซลให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซล ซึ่งเรียกเซลนี้ว่า โปรโตพลาส์ (protoplast) โดยใช้เอนไซม์ละลายผนังเซลของยีส์ต์ให้เหลือแต่เซลเมมเบรน หรืออยู่ในสภาพโปรโตพลาส์ หรือ ส์เฟียร์โรพลาส์ (spheroplast) จะมีรูปร่างกลมในสารละลายที่มีแรงดันออส์โมซีส์ย้างนอกเท่ากับย้างในเซล สารละลายนี้เรียกว่า โปรโตพลาส์ บัฟเฟอร์

(protoplast buffer) (7) ซึ่งมักใช้สารละลายของน้ำตาลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น 0.8 - 1.2 โมลาร์ซูโครส (Sucrose), 0.8 - 1.2 ซอร์บิทอล (sorbitol) หรือแมนนิทอล (manitol) หรือสารละลายเกลืออนินทรีย์ เช่น 0.6 โมลาร์โปรแตสเซียมคลอไรด์ เป็นต้น ความเหมาะของการเตรียมเซลให้อยู่ในรูปโปรโตพลาสขึ้นกับอายุของเซล พบว่าเซลที่อยู่ในช่วงของการเพิ่มจำนวนเป็นแบบทวีคูณ (exponential phase) ผนังเซลจะถูกทำลายได้ง่ายที่สุด (8)

เอนไซม์ที่ใช้ละลายผนังเซลของยีสต์มีหลายชนิดจากแหล่งต่าง ๆ กัน เช่น

ชนิดของเอนไซม์	แหล่งที่ได้
Helicase	หอยทาก (snail)
Gluconidase	Helix pomatia
Gluconases	Trichoderma harzianum
Zymolyase	Arthobacter luteus

2. การผสมเซล (Fusion) โดยนำเซลมารวมกันในสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จากการศึกษาในพืชและเชื้อรา พบว่า PEG เป็นสารที่มีสมบัติในการชักนำเซลให้รวมกลุ่มกัน (1) (fusogenic properties) ดังนั้นในปี ค.ศ. 1977 van Solingen และ van der Plaat จึงนำ PEG มาใช้กับเซลยีสต์ โดยการทำให้เซลอยู่ใกล้ชิดกันและรวมกลุ่มกัน ซึ่งผนังเซลเมมเบรนจะเปิดเป็นช่อง ทำให้เกิดการผสมกันได้ (9)

3. การทำให้เกิดผนังเซลใหม่ของเซลที่ผสมกัน (Regenerate) เป็นการทำให้เซลโปรโตพลาสที่ผสมกันแล้วเกิดการสร้างผนังเซลขึ้นใหม่ ในยีสต์ พบว่า การกระตุ้นให้เกิดการสร้างผนังเซลใหม่ ถ้าทำในอาหารแข็งที่มีวุ้นอยู่ร้อยละ 3 เพิ่มจากอาหารแข็งซึ่งปกติมีวุ้นอยู่ร้อยละ 2 จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างผนังเซลได้เร็วและสร้างได้มาก (9)

การรวมเซลที่ต่างกลุ่มให้มารวมตัวกันโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสแบ่งได้

3 แบบ โดยถือตามหลักของอนุกรมวิธาน (taxonomy) คือ

1. Intraspecific fusion เป็นการรวมเซลที่ได้มาจากชนิด (species) เดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์ (strain) เซลผสมที่เกิดโดยวิธีนี้มักเสถียร (stable) เนื่องจากเซลพ่อและเซลแม่ที่ผสมกัน มีความแตกต่างกันน้อยทางพันธุกรรม

ในปี ค.ศ. 1977 มีรายงานเล่นอการรวมเซลแบบนี้เป็นครั้งแรกในยีสต์ โดย van Solingen และ van der Plaat (9) ซึ่งใช้ Saccharomyces cerevisiae 2 สายพันธุ์ที่มีโครโมโซม 1 ชุด หรือ แฮพพลอยด์ (haploid) และมีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a ทั้งคู่ ซึ่งตามปกติจะไม่ผสมกันเองตามธรรมชาติ มาผสมกันในที่มี PEG และแคลเซียมไอออน ผลการทดลองพบว่าได้เซลผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุดเป็นดิพพลอยด์ (diploid) มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a/a ซึ่งพิสูจน์โดยการนำไปผสมกับยีสต์อีกสายพันธุ์หนึ่งที่เป็นดิพพลอยด์ และมีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น α/α ผลการทดลองพบว่า สามารถเกิดกระบวนการสร้างสปอร์ (sporulation) และให้แอสโคสปอร์ (ascospore) เกิดขึ้นในถุงที่เรียกว่า แอสคัส (ascus) ซึ่งทำให้เขาสรุป ผลการทดลองว่า การรวมเซลเทคนิคนี้มีการรวมตัวของนิวเคลียสเกิดขึ้นด้วย แต่ยังไม่มีรายงานทางพันธุกรรม หรือยีวเคมีของเซลผสมที่ได้ ต่อมาในปีเดียวกัน Yamamoto และ Fukui (5) รายงานถึงเซลผสมที่ได้โดยเทคนิคนี้ว่า มีลักษณะลัณฐานวิทยา (morphological properties) ที่ต่างไปจากเซลพ่อและเซลแม่ โดยมีขนาดใหญ่กว่า และปริมาณดีเอนเอ (DNA) ในนิวเคลียสสูงขึ้น

ได้มีรายงานถึงการผสมกันในชนิดเดียวกันของยีสต์ที่สามารถเกิดการรวมตัวโดย PEG ในการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ทั้งหมด 6 สกุล (genus) ดังนี้

ยีสต์ชนิดที่ใช้	เอกสารอ้างอิงที่
1. Saccharomyces cerevisiae	5, 8, 9, 16, 18
2. Schizosaccharomyces pombe	10
3. Hansenular wingei	8
4. Candida tropicalis	11, 17
5. Candida albicans	12, 13
6. Kluyveromyces lactis	14, 15
7. Torulopsis glabrata	16
8. Saccharomyces unisporus	16

2. Interspecific fusion เป็นการผสมของเชื้อยีสต์ที่ต่างชนิดกัน แต่อยู่ในสกุลเดียวกัน

ได้รวบรวมรายงานที่ได้มีผู้วิจัยรายงานไว้ถึงการรวมเซลที่ต่างชนิดกัน แต่อยู่ในสกุลเดียวกัน ไว้ดังนี้

ชนิดที่รวมกัน	เอกสารอ้างอิงที่
1. Saccharomyces cerevisiae กับ Saccharomyces uvarum	19
2. Candida tropicalis กับ Candida albicans	20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Intergeneric fusion เป็นการรวมเซลระหว่างเชื้อที่ต่างกันทั้งชนิดและสกุล ได้รวบรวมรายงานที่ได้มีผู้วิจัยรายงานไว้ถึงการรวมเซลวิธีนี้ ดังนี้

สกุลที่รวมกัน	เอกสารอ้างอิงที่
1. Saccharomyces cerevisiae Schizosaccharomyces pombe	21
2. Saccharomycopsis fibuligera Candida tropicalis	22
3. Saccharomyces cerevisiae Schwaniomyces alluvius	23
4. Saccharomycopsis lipolytica Candida guillermondii	24

อย่างไรก็ดี ถึงแม้ van Solingen และ van der Plaat (9) จะสรุปตามการทดลองของเขาว่า มีการรวมกันของนิวเคลียสเกิดขึ้นในการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสดังกล่าวข้างต้นแล้ว แต่ก็ยังไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัดว่ามีการรวมตัวกันของนิวเคลียสเกิดขึ้นเมื่อไร หลังจากมีการรวมของเซล หรือว่านิวเคลียสจะอยู่ในสภาพไดคารีโอทิค (dikaryotic) แล้วนิวเคลียสจึงมีการรวมภายหลัง เนื่องจากต่อมาได้มีการทดลองย้อมนิวเคลียสของเซลผสมที่ได้ โดยใช้สีย้อมชนิด acridine orange โดย Evan และคณะ ในปี ค.ศ. 1982 (13) พบว่าจำนวนนิวเคลียสของเซลผสมที่ได้จากการรวมเซลแบบชนิดที่เหมือนกัน (Intraspecific fusion) ของ Candida albicans มีจำนวนนิวเคลียสต่างกันในแต่ละเซลผสมที่ได้ โดยพบจำนวนนิวเคลียสตั้งแต่ 1 ถึง 5 นิวเคลียสต่อเซลผสม

ในปี ค.ศ. 1976 Conde และ Fink (25) พบว่าการเกิดการรวมกันของนิวเคลียส หรือคารีโอกามี (karyogamy) ถูกควบคุมโดยยีน kar 1 ในยีสต์ที่มียีนนี้ปกติ เมื่อเกิดการรวมกันของไซโตพลาสม หรือ พลาสโมกามี (plasmogamy) ก็จะเกิดการรวมกันของ

นิวเคลียสตามมา และในกรณีที่เป็นการรวมกันระหว่างเซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศต่างกัน คือระหว่าง a กับ α ก็จะเกิดการแบ่งนิวเคลียสหรือมัยโอซีส ผลของมัยโอซีสจะเกิดสปอร์ที่เรียกว่า แอสโคสปอร์ ในถุงที่เรียกว่า แอสคัส (26)

สายพันธุ์บ่งเพศในแฮพพลอยด์ยีสต์ พวก Saccharomyces มียีนที่ควบคุมคือ a และ α ซึ่งฟีโนไทพ์ (phenotype) หรือลักษณะที่ปรากฏของสายพันธุ์บ่งเพศนี้จะถูกควบคุมโดยยีน MAT ซึ่งมีตำแหน่งที่คู่กัน (locus 2 alleles) คือ MAT a และ MAT α ซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 กระบวนการผสมแบบใช้เพศจนเกิดกระบวนการมัยโอซีส และเกิดการสร้างแอสโคสปอร์ นอกจากจะเกี่ยวข้องกับ MAT แล้ว ยังมียีนโครงสร้าง (structural gene) มาเกี่ยวข้อง โดยที่ MAT จะทำหน้าที่เป็นยีนโครงสร้างควบคุมการแสดงออกของยีนจำเพาะ (specific gene) ที่อยู่บนจีโนม (genome) นั้น (27, 28)

การผสมแบบมีเพศของยีสต์ Saccharomyces จะเกิดระหว่างคู่ของเซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศต่างกัน ระหว่าง α กับ a คือเป็น heterogenic compatibility กล่าวคือ เซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a ในแฮพพลอยด์ หรือ a/a ในยีสต์ดิพพลอยด์ สามารถผสมกับเซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น α ในแฮพพลอยด์ หรือ α/α ในยีสต์ดิพพลอยด์ ตามลำดับ ขณะที่การผสมกันระหว่างเซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเหมือนกัน จะพบน้อยมาก หรือแทบไม่พบเลย (29) เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีนจาก a เป็น α หรือ α เป็น a เกิดขึ้นน้อยมากโดยธรรมชาติ

ในยีสต์ Saccharomyces ที่สามารถสืบพันธุ์แบบมีเพศ และสร้างแอสโคสปอร์ แบ่งเป็น 2 แบบคือ

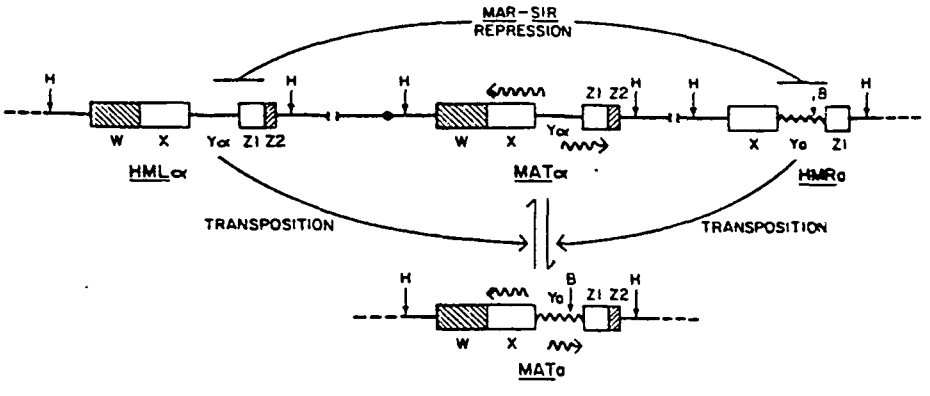
1. <u>เฮทีโรธาลลิค ยีสต์</u> (Heterothallic yeast) พวกนี้หลังจากเกิดแอสโคสปอร์ในแอสคัส ได้แฮพพลอยด์เซลที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a หรือ α การเกิดการสืบพันธุ์แบบมีเพศโดยธรรมชาติ สายพันธุ์ที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a หรือ α จะมารวมกันเป็นดิพลอยด์นิวเคลียส (30)

2. <u>โฮโมธาลลิค ยีสต์</u> (Homothallic yeast) พบว่าสายพันธุ์บ่งเพศของยีสต์พวกนี้ไม่เสถียร (29, 31) ถ้าเป็นแฮพพลอยด์ ยีสต์ ที่มีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a หรือ α เมื่อแต่ละสายพันธุ์เติบโตย่อมจะไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual reproduction) เกิดขึ้น และในดิพลอยด์ ยีสต์ ที่เป็น α/α และ a/a ก็ย่อมไม่มีแอสโคสปอร์เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน ในธรรมชาติเราพบว่าโฮโมธาลลิค ยีสต์ สามารถเกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศได้ในทุกขณะ ที่มีการ

แบ่งเซล (32) แต่พวกเฮทที่โรธาลลิค ยีล่ต้ การเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศ์เกิดขึ้นด้วยความถี่ 10^{-6} (31,32) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "Mating type mutation" หรือ "Homothallic Switching" ได้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับยีนโฮโมธาลลิค หรือ HO การเกิดดิพพลอยด์โฮโมธาลลิค ยีล่ต้ จากพวกแฮพพลอยด์โฮโมธาลลิค ยีล่ต้ ดังกล่าวเกิดจากการผล่มกันระหว่างแฮพพลอยด์เซลเดิม ที่ไม่มีการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศ์กับแฮพพลอยด์เซลใหม่ที่เกิดการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศ์ ทำให้เกิดคู่ของเซลที่มีล่ายพันธุ์บ่งเพศ์ที่ต่างกัน จึงล่ามารถผล่มกันได้ (33)

แต่เดิมทฤษฎีการเปลี่ยนล่ายพันธุ์บ่งเพศ์ Harashima และคณะ (34) เล่นอในปี ค.ศ. 1974 ว่า ถูกควบคุมโดยโฮโมธาลลิคยีน 3 คู่ ซึ่งประกอบด้วยคู่ของยีนดังนี้ HO/ho, HM_{α}/hm_{α} หรือ HM_a/hm_a โดย HM_a และ HM_{α} อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 (26, 35) แต่ไม่ทราบว่า HO อยู่บนโครโมโซมแท่งใด ต่อมาปัจจุบันมีการศึกษาโครงล่ร้างยีนเหล่านี้ในระดับโมเลกุล พบว่ายีนเหล่านี้จะทำงานกันเป็นชุดอยู่บนโอเปอรอน (operon) เดียวกัน และให้ชื่อ HM_a, HM_{α} ใหม่เพื่อให้ล่อดคล้องกับตำแหน่งที่อยู่ทางซ้ายมือและขวามือของยีน MAT บนโครโมโซมแท่งที่ 3 เป็น HML และ HMR โดยที่ HML อยู่ทางซ้ายมือของยีน MAT และ HMR อยู่ทางขวามือของยีน MAT ดังแผนภาพที่ 1 ซึ่งแล่ดงตำแหน่งและการทำงานของยีนเหล่านี้บนโครโมโซมของ Saccharomyces (27) และจากการทำแผนที่ยีน (Gene Map) พบว่า HO อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 (36)

แผนภาพที่ 1 แล่ดงตำแหน่งและการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแล่ดงออกของล่ายพันธุ์บ่งเพศ์ (36) โดยยีน MAR และ SIR เป็นยีนที่ควบคุม HML และ HMR แบบ negative control การเปลี่ยนของ $MAT_a \rightleftharpoons MAT_{\alpha}$ ถูกกระตุ้นโดยยีน HO ลำดับของเบล่ตรงบริเวณ (region) W X Y Z_1 และ Z_2 ระหว่าง MAT และ HML หรือ HMR มีความคล้ายกัน (homology) Y_a เป็น a specific sequence ของ MAT_a และ HMR ล่วน Y_{α} เป็น α specific sequence ของ MAT_{α} และ HML



อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนลำยพันธุ์บ่งเพศในโฮโมธาลลิคเซล เป็นกระบวนการผันกลับ (Reversible process) ยกเว้นในกรณีที่เกิดการเปลี่ยนจากยีน HO เป็น ho โดยวิธีกลายพันธุ์ (Mutation) ทำให้ได้ยีน ho เกิดขึ้น จึงจะพบว่าเซลที่ได้เสถียร ไม่เกิดการเปลี่ยนลำยพันธุ์บ่งเพศ เนื่องจาก ho ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนของยีน MAT (36, 37)

การเปลี่ยนลำยพันธุ์บ่งเพศเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ หรือโดยการชักนำด้วยสารเคมี หรือแสงอุลตราไวโอเลตที่ความเข้มของแสงเหมาะสม และไปกระตุ้นการเกิดไมโตติค รีคอมบิ-เนชั่น (mitotic recombination) (30) โดยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความเข้มต่ำจะกระตุ้นการเกิดไมโตติค รีคอมบิเนชันได้สูง

ในปี ค.ศ. 1977 Takano และคณะ (30) ทดลองฉายแสงอุลตราไวโอเลตไปยังยีสต์ Saccharomyces พวกที่เป็นดิพพลอยด์ และมีลำยพันธุ์บ่งเพศเป็น a/α ในขนาดความเข้มต่ำ โดยทำให้เกิดการอยู่รอดของเซลประมาณร้อยละ 20 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนลำยพันธุ์บ่งเพศในยีสต์เซลเดิมเป็น a/a หรือ α/α ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1978 Yuthananukorn และ Oshima (33) ได้รายงานการฉายแสงอุลตราไวโอเลตในขนาดความเข้มต่ำไปยังยีสต์พวกที่มีโครโมโซม 3 ชุด หรือ ทริพพลอยด์ (triploid) ที่มีลำยพันธุ์ บ่งเพศเป็น α / α / a พบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดไมโตติครีคอมบิเนชัน ได้ยีสต์เซลที่มีโครโมโซม 3 ชุด โดยมีลำยพันธุ์บ่งเพศเป็น α / α / α

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการนำเทคนิคการสร้างยีสต์ที่มีตำหนิ (marker) ของกรดอะมิโน และไนโตรจีเนียส เบส ให้ได้เซลผสม โดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส และศึกษาสมบัติเซลผสมที่ได้ทางการเจริญเติบโต, ชีวเคมี, สัณฐานวิทยา และสรีระวิทยา ว่ามีความแตกต่างตามลักษณะดังกล่าวจากเซลพ่อแม่เดิมที่นำมารวมกันอย่างไร โดยการนำลำยพันธุ์ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ที่เป็นแฮพพลอยด์ และมีตำหนิเกี่ยวกับการสร้างกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียส เบส ที่มีตำหนิ ดังนี้คือ

ลำยพันธุ์ α STX 166 - 17 (lys 9 ade 2)

ลำยพันธุ์ α STX 174 - 4D (lys 9 met 2 ura 1)

โดยทั้ง 2 ลำยพันธุ์มีลำยพันธุ์บ่งเพศเป็น α เหมือนกันทั้งคู่ มารวมกันคัดเลือกเฉพาะลูกผสมที่เป็นพวกดิพพลอยด์ ซึ่งควรจะมีลำยพันธุ์บ่งเพศเป็น α/α จากนั้นเพื่อศึกษาการเปลี่ยนของลำยพันธุ์บ่งเพศ

จาก α เป็น a โดยฉายแสงอุลตราไวโอเลตในขนาดความเข้มแสงที่เวลาต่าง ๆ กัน ไปยังเซลผสมที่ได้ เพื่อดูผลการกระตุ้นของแสงอุลตราไวโอเลตว่าสามารถจะทำให้เกิดการเปลี่ยนลายพันธุ์บ่งเพศจาก α/α เป็น α /a หรือ a/α ได้หรือไม่ และได้มากน้อยเท่าไร โดยอาศัยกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์อยู่ในแอสคัส และใช้เครื่องมือแยกเซลเดี่ยว คือ ไมโครมานิพูเลเทอร์ (micromanipulator) แยกแต่ละแอสโคสปอร์ในแอสคัสมาศึกษาการกระจายของจีโนไทพ์และลักษณะลายพันธุ์บ่งเพศที่เกิดขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สร้างยีสต์ลูกผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุด หรือดิพพลอยด์ยีสต์ จากยีสต์ 2 ลายพันธุ์ที่มีโครโมโซม 1 ชุด หรือแฮพพลอยด์ยีสต์ โดยยีสต์ทั้ง 2 ลายพันธุ์นี้มีตำหนิการสร้างกรดอะมิโนและไนโตรจีเนสเบส ซึ่งสามารถติดตามได้

2. การคัดเลือก (Screening) ลูกผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุดออกจากลูกผสมอื่น ๆ

3. ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสมที่ได้ และศึกษาสภาพของนิวเคลียสของยีสต์ลูกผสมที่ได้

4. ศึกษาการเปลี่ยนเพศในลายพันธุ์ยีสต์ลูกผสมที่ได้ โดยการชักนำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ติดตามความถี่การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนลายพันธุ์บ่งเพศจากอัตราการเกิดแอสไซ

5. ทดสอบว่ายีน KAR มีผลต่อการเกิดการรวมกันของนิวเคลียส

6. ศึกษาว่าแสงอุลตราไวโอเลตมีผลต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนลายพันธุ์บ่งเพศจากแอลฟา เป็น เอ และเกิดกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์โดยผ่านการแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีสหรือไม่ โดยติดตามจากการกระจายของยีนในแอสโคสปอร์

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. สร้างยีสต์ลูกผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสจากยีสต์ Saccharomyces cerevisiae 2 ลายพันธุ์ ที่มีตำหนิการสร้างกรดอะมิโนและไนโตรจีเนสเบส และมีลายพันธุ์บ่งเพศเป็น แอลฟา และ แอลฟา ตามลำดับ

2. ศึกษาสมบัติและลักษณะเอกลักษณ์ของยีสต์เซลผสมที่ได้

3. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจากแอลฟาเป็นเอ โดยมีกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีส และการเกิดแอสโคสปอร์

4. ตรวจสอบความถี่การเกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศ โดยตรวจจากแอสคัสที่เกิดขึ้นหลังการชักนำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

5. ศึกษาสภาพและจำนวนนิวเคลียสของยีสต์เซลผสมที่ได้โดยวิธีการย้อมนิวเคลียสด้วยสีจิมซา และใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่างศึกษาประกอบ

6. ศึกษาลักษณะการกระจายของฉีโนไทพ์และสายพันธุ์บ่งเพศในแอสโคสปอร์ที่เกิดขึ้น

<u>ประโยชน์ที่ได้รับ</u>

1. นำไปประยุกต์กับการสร้างยีสต์เซลผสมใหม่ ให้มีลักษณะรวมของลักษณะที่ต้องการจากยีสต์ 2 สายพันธุ์ โดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

2. เพื่อสร้างเซลใหม่จากยีสต์ 2 สายพันธุ์ที่มีโครโมโซม 1 ชุดทั้งคู่ และมีสายพันธุ์บ่งเพศเหมือนกัน ทำให้เกิดเซลผสมที่มีโครโมโซม 2 ชุด และแสดงสายพันธุ์บ่งเพศซึ่งจะมีความเสถียรต่อการเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีส

3. สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างเซลผสมที่ได้ โดยอาศัยลักษณะของตำหนิกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมารวมกัน และอาศัยวิธีการทางชีวเคมี, สัณฐานวิทยา และสรีระวิทยา

4. พิสูจน์ว่าแสงอุลตราไวโอเลตมีผลต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก α เป็น a และเกิดกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์ โดยผ่านกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีส ในยีสต์เซลผสมที่เกิดจากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส