หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ Saccharomyces cerevisiae ซึ่งมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีตำหนิ (Marker) ของยีน หรือสีโนไทพ์ที่ทราบแน่ชัด ดังตารางที่ 1

สายพันธุ์	สายพันธุ์บ่งเพศ	สีโนไทพ์	จำนวนชุดของโครโมโซม	ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก
1. STX 166-17 C	∝	lys 9 ade 2	แฮพพลอยด์	Prof. H. Heslot Institute National Agronomique Paris
2. STX 174-4 D	∝	lys 9 met 2 ura 1	"	
3. STX 4-4 A	∝	lys 1 his 6 arg 4 gal 2	"	
4. AH-22 (cir^+)	a	leu 8-3 leu 2-112 his 4 can 1	"	AMBO

2. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

อุปกรณ์

1. ตู้เขย่าและตู้ควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc. New Jersy U.S.A.

2. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท

Bausch and Lomb. Rochester, U.S.A.

3. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan

4. เครื่องปั่น (Centrifuge) รุ่น Universal II ของบริษัท Hettich Postfach Germany

5. ไมโครมานิพูเลเทอร์ (Micromanipulator) ออกแบบและประดิษฐโดย Prof. Skerman, V.B.D., University of Queenland, Australia

6. กล้องจุลทัศน์แบบเฟส คอนทราสต์(phase contrast microscope) ที่ใช้ประกอบกับไมโครมานิพูเลเท่อร์เป็นรุ่น CH (CHA) ของ Olympus, Tokyo, Japan

7. ถ่ายภาพด้วยฟิล์ม Kodak ชนิดขาว-ดำ panatomic X ASA 32 ด้วยกล้องจุลทัศน์รุ่น BH-2 (BHS) ของ Olympus, Tokyo, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดยีสต์ (Yeast Extract) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

2. เปปโตน (Peptone) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

3. ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่ปราศจากกรดอะมิโน (Yeast Nitrogen Base with out amino acid) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

4. วุ้นผง (Bacto-Agar) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.

5. กลูโคส (Glucose) ของ Riedel-de Haen AG Seelze - Hannover

6. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของ May and Baker Laboratory Chemical, England

7. โซเดียมอซีเตต (CH_3COO-Na) ของ Fluka Garantie, Switzerland

8. ไลซีน (L-Lysine) ของ Sigma Chemical Company, U.S.A.

9. เมทไธโอนีน (L-Methionine) ของ BDH Biochemicals Ltd., Poole England.

10. ยูเรซิล (Uracil) ของ Sigma Chemical Company, U.S.A.

11. อดีนีน (Adenine) ของ Sigma Chemical Company, U.S.A.

12. ไซโมไลเอส (Zymolyase-5000) ของ Kirin Brewery Co. Ltd., Japan

13. โพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol-8000; PEG) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

14. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของ E. MERCK Darmstadt, Germany

15. ไดเฟนีลามีน (Diphenylamine) ของ Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover

16. กรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ของ Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover

17. อเซทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ของ BDH Laboratory Chemicals division Poole, England

18. กรดเพอคลอริค (Perchloric acid 70 %) ของ Riedel-De Haen AG Seelze-Hannover

19. เอธานอล (Ethanol) ของ E. MERCK, Darmstadt, Germany

20. ไดเอธิล อีเธอร์ (Diethyl ether) ของ May and Baker Laboratory Ltd. Dagenham, England

21. ปรอทคลอไรด์ ($HgCl_2$) ของ Mallinckrodt Chemical Works ST. Louis

22. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของ E. MERCK, Darmstadt, Germany

23. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ BDH Laboratory Chemical division Poole, England

24. โปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ของ Riedel - de Haen AG Seelze - Hannover

25. ฟอร์มาลิน (Formaldehyde 40 % w/v) ของ May and Baker Laboratory Ltd Dagenham, England

26. เกลือแกง (NaCl) ของ May and Baker Laboratory Ltd. Dagenham, England

27. เมธานอล (Methanol) ของ E. MERCK, Darmstadt, Germany

28. กลีเซอรอล (Glycerol) ของ May and Baker Laboratory Ltd. Dagenham, England

29. ลีชมซ่า (Giemsa stain) ของ Fluka Garantie, Switzerland

3. การสร้างยีสต์ลูกผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

ปรับปรุงจากวิธีการของ Seki และ Limtong (6) โดยใช้ S. cerevisiae สายพันธุ์ α STX 174-4D ซึ่งมีตำหนิคือ lys 9 met 2 ura 1 และสายพันธุ์ α STX 166-17 C ซึ่งมีตำหนิคือ lys 9 ade 2 เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่จะนำมาผสมกันโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ซึ่งมีรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 การเตรียมเซลโปรโตพลาส

เลี้ยงเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ดังกล่าวแล้วบนอาหารวุ้นเอียง วายพีดี (Yeast extract peptone dextrose agar slant) (ภาคผนวกข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ. นาน 24 ชม. จากนั้นใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลากเชื้อ 1 ห่วง ใส่ลงในอาหารเหลววายพีดี 50 มล. ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ขวดละ 1 เชื้อ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ Reciprocal ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30^{o}ซ. จนกระทั่งเข้าปลายช่วงการเจริญแบบทวีคูณ ใช้ปิเปตดูดเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ 10 มล. นำไปปั่นให้ตกตะกอนความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 5 นาที ล้างเซลที่ได้ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

2 ครั้ง จากนั้นกระจายเซลยีสต์ในสารละลายเอ็นไซม์ไซโมไลเอส (ภาคผนวก ข้อ 6) เพื่อละลายผนังเซล บ่มที่ 30°ซ. เขย่าเบา ๆ ตรวจเซลด้วยกล้องจุลทัศน์จนกว่าจะเกิดสภาพโปรโตพลาสประมาณร้อยละ 80 นำเซลไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างเซล 2 ครั้งด้วย 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ กระจายเซลที่ล้างแล้วใน 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์แต่ละหลอดโดยให้มีเซลโปรโตพลาสอย่างน้อย 10^7 เซลต่อ มล.

จากนั้นนำเซลยีสต์สภาพโปรโตพลาสของสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D ที่เตรียมแล้วจำนวนเท่า ๆ กัน ผสมเป็นหลอดเดียวกัน นำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที 5 นาที นำเซลที่ได้ใส่ลงในสารละลาย PEG (ภาคผนวกข้อ 7) 4 มล. บ่มที่ 37°ซ. 15 นาที ปั่นแยกสารละลาย PEG ออกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 10 นาที นำเซลที่ได้กระจายใน 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ และทำให้เจือจางเป็นลำดับ จนได้ความเข้มข้นของเซลเหมาะสม ใช้ปิเปตดูดสารละลายยีสต์เซล 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารแข็งวายพีดีบนจานแก้ว และบนอาหารต่ำสมบูรณ์ (minimum medium) ที่เติมกรดอะมิโนซนิดไลซีน (lysine) (ภาคผนวกข้อ 3 และ 5.2) ที่มีสมบัติคัดเลือกเฉพาะเซลผสม (Fusant) เท่านั้นที่สามารถขึ้นได้ ใช้แท่งแก้วปลายรูปสามเหลี่ยมฆ่าเชื้อแล้ว กระจายเซลให้ทั่วจานแก้ว จากนั้นเททับผิวหน้าอาหารด้วยอาหารแข็งชนิดเดิม แต่เพิ่มความเข้มข้นวุ้นเป็นร้อยละ 3 ลงบนจานแก้วที่มีเชื้อยีสต์กระจายอยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. 5 - 7 วัน

3.2 <u>การตรวจเซลที่เกิดจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสในเบื้องต้น</u>

นำเซลยีสต์ที่ขึ้นบนอาหารคัดเลือกเฉพาะลูกผสม แต่ละโคโลนีมาส่องดูขนาดด้วยกล้องจุลทัศน์ เก็บเฉพาะโคโลนีที่ให้ยีสต์เซลขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงจนเจริญเต็มที่ นำแต่ละโคโลนีมาทดสอบต่อ โดยใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อแตะลงบนโคโลนีที่จะทดสอบแล้วนำไปลากบนอาหารต่ำสมบูรณ์ (ภาคผนวกข้อ 2) และอาหารต่ำสมบูรณ์สูตรเติม แต่มีกรดอะมิโนชนิดไลซีนอยู่ด้วย บ่มที่ 30 ซ. 2 วัน เปรียบเทียบการเจริญเติบโตบนอาหารทั้ง 2 ชนิด

013523

4. ศึกษาสมบัติและตรวจสอบเอกลักษณ์ของเซลผสมที่ได้จากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

เพื่อศึกษาความเหมือนและแตกต่างของเซลผสมต่อสายพันธุ์พ่อแม่ โดยตรวจสอบจากวิธีการดังนี้

4.1 สัณฐานวิทยา (Morphology)

โดยการเลี้ยงเซลผสมที่ได้บนอาหารแข็งวายพีดี บนจานแก้วที่ 30°ซ. 24 ชม. บันทึกลักษณะจากโคโลนีเดี่ยว และวัดขนาดแต่ละเซลจากกล้องจุลทัศน์ (x 40) โดยใช้ออคคูลาร์ ไมโครมิเตอร์ซึ่งเทียบมาตราส่วนแล้ว คำนวณปริมาตรของเซลโดยใช้สูตรปริมาตรวงรี ตามลักษณะเซลของยีสต์ คือ $\frac{\pi}{6}$ x ยาว x (กว้าง)^2 เปรียบเทียบกับปริมาตรของเซล α STX 166-17 C และ α STX 174-4 D

4.2 สกัดและหาปริมาณดีเอนเอ (DNA) (38)

เลี้ยงเชื้อเซลผสม $\alpha\alpha$(Fu-d_1) - $\alpha\alpha$(Fu-d_7), α STX 174-4 D และ α STX 166-17 C ในอาหารเหลววายพีดี 50 มล. ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ขวดละ 1 เชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. นาน 48 ชม. สกัดดีเอนเอโดยวิธีของ Youthananukorn และ Oshima (33) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Schneider (38) วัดปริมาณดีเอนเอ โดยใช้ไดเฟนีลามีน รีเอเจนต์ (Diphenylamine reagent) (ภาคผนวกข้อ 9) วัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอ (calf thymus DNA) เป็นมาตรฐาน นับจำนวนเซลโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) (ภาคผนวกข้อ 8) ดังมีรายละเอียดการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอในภาคผนวกข้อ 9

4.3 อัตราการเจริญเติบโต

เลี้ยงเชื้อ α STX 166-17 C, α STX 179-4 D และเซลผสม $\alpha\alpha$ (Fu-d_1) - $\alpha\alpha$ (Fu-d_3) ในอาหารเหลววายพีดี 50 มล. ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บเชื้อที่เวลาต่าง ๆ นำไปวัดความขุ่นโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ลากกราฟระหว่างค่าความขุ่นของเซลที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับอายุของเชื้อที่เวลาต่าง ๆ คำนวณอัตราการเจริญเติบโตช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่เป็นเส้นตรง เปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์พ่อแม่ คือ $\propto$ STX 166-17 C และ $\propto$ STX 174-4 D โดยใช้สูตร (39)

$$K = \frac{\log N_T - \log No}{\log 2 \ (t_2 - t_1)}$$

โดย $1/K$ = ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจาก 1 เซล เป็น 2 เซล

N_T = จำนวนเซลหรือความขุ่นที่เวลา t_2

No = จำนวนเซลหรือความขุ่นที่เวลา t_1

4.4 <u>ความสามารถในการตอบสนองต่อสายพันธุ์บ่งเพศที่ต่างกัน</u> (Mating Response)

โดยนำเซลผสม $\propto\propto$ ($Fu\text{-}d_1$) ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ $\propto$ STX 166-17 C และ $\propto$ STX 174-4 D ซึ่งมีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น $\propto$ ทั้ง 2 สายพันธุ์ มาผสมกับสายพันธุ์ aAH-22 (cir^+) ซึ่งมีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น a และมีตำหนิของยีนเป็น <u>leu</u> 8-3 <u>leu</u> 2-112 <u>his</u> 4 <u>can</u> 1 โดยดัดแปลงจากการสร้างทริพพลอยด์เซล (Triploid) ของ Youthananukorn และ Oshima (33) คัดเลือกลูกผสมใหม่ที่เป็นทริพพลอยด์เซลบนอาหารแข็งซึ่งไม่มีกรดอะมิโนทุกชนิด (ภาคผนวกข้อ 2) ตามหลักคอมพลีเมนทารี (Complementary) จากนั้นนำเซลที่ได้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและหาปริมาณดีเอนเอในเซลโดยวิธีของ Ketchum (39) และ Schneider (38) ตามลำดับ

โดยมีรายละเอียดการศึกษาการตอบสนองต่อสายพันธุ์บ่งเพศที่ต่างกันของเซลผสมคือ เลี้ยงเซลผสม $\propto\propto$ ($Fu\text{-}d_1$) และ aAH-22 (cir^+) บนอาหารวุ้นเอียงวายพีดี หลอดละ 1 สายพันธุ์ ที่ 30°ซ. 24 ชม. ใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อมา 1 ห่วง (loop) ปลูก (inoculate) ลงในอาหารเหลววายพีดี 2 มล. บ่มที่ 30°ซ. 24 ชม. นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 5 นาที นำเซลที่ได้กระจายในอาหารเหลววายพีดี 1 มล. หลอดละ 1 สายพันธุ์ ใช้ปิเปตดูด 0.1 มล. ของแต่ละสายพันธุ์ใส่ลงในอาหารเหลววายพีดี 2 มล. หลอดเดียวกัน นำไปบ่มที่ 30°ซ. 24 ชม. ปั่นแยกเซลมาล้างด้วยน้ำกลั่น นำเซลที่ได้กระจายใน 0.2 มล. ของน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปิเปตดูด 0.1 มล. ของสารแขวนลอย

ของเซล (Cell suspension) ใส่ลงในอาหารแข็งต่ำส่วนรณ์ที่ไม่มีกรดอะมิโนทุกชนิด (ภาคผนวกข้อ 2) ใช้แท่งแก้วปลายสามเหลี่ยมกระจายเซลยีสต์ให้ทั่วจานแก้ว นำไปบ่มที่ 30°ซ. 2 - 3 วัน

5. <u>ศึกษาสภาพของนิวเคลียสของยีสต์เซลผสม</u>

5.1 <u>การย้อมนิวเคลียสด้วยวิธีของจิมซ่า (Giemsa)</u> (40)

ใช้เซลผสม αα ($Fu-d_1$) อายุ 15 ชม. บนอาหารเหลววายพีดี บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. ใช้ 1 มล.ของสารแขวนลอยของเซลผสมกับสารละลายเฮลลี (Helley solution) (ภาคผนวกข้อ 10.1.1) เพื่อตรึงเซลนาน 10 นาที ใช้ภู่กันป้ายไข่ขาวลงบนสไลด์ (cover glass) และใช้เซลที่ตรึงแล้วทาทับลงไปบนสไลด์ ทิ้งไว้พอแห้งหมาด ๆ แช่สไลด์ลงใน 1 % โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวกข้อ 10.1.2) ที่ 60°ซ. 1 ชม. ล้างด้วยน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 (ภาคผนวกข้อ 10.1.3) ใช้กรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์แมล ไฮโดรไลซ์ที่ 60°ซ. 10 นาที ย้อมด้วยสีจิมซ่า 60 นาที (ภาคผนวกข้อ 10.1.4) ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น pH 6.9 ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ ส่วนที่เป็นนิวเคลียสจะเห็นเป็นจุดสีม่วงแดงเข้ม

5.2 <u>การศึกษาจำนวนนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตัวอย่าง (Transmission Electron Microscope)</u>

เลี้ยงเซลผสม αα ($Fu-d_1$) อายุ 18 ชม. บนอาหารแข็งวายพีดี บนจานแก้วที่ 30°ซ. ตรึงเซลด้วย 3 % กลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตัวอย่างแบบ JEM 200 Cx ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น กระแสไฟฟ้า (accelerating voltage) 80 กิโลวัตต์ เลนส์คอนเดนเซอร์ (Condensor lense) เส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ไมโครเมตร เลนส์วัตถุ (Objective lense) เส้นผ่าศูนย์กลาง 60 ไมโครเมตร ถ่ายภาพด้วยกล้อง Jeol แบบ JEM 200 Cx ประเทศญี่ปุ่น ใช้ฟิล์ม Fuji electron microscopic film G.G. orthochromatic ขนาด 5.9 x 8.2 ชม.

6. การทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์พ่อและแม่

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3 เพื่อทดสอบความสามารถในการรวมของเซลโดยใช้เพศตามธรรมชาติต่อสายพันธุ์บ่งเพศที่ต่างกัน โดยมีการรวมตัวของนิวเคลียสซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีน KAR โดยศึกษากระบวนการรวมกันของไซโตพลาสม (plasmogamy) การรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) การแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีส (Meiosis) จนเกิดแอสโคสปอร์ขึ้นในถุงแอสคัส โดยใช้อาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอน (carbon source) เป็นอซีเตต (acetate) (ภาคผนวกข้อ 4)

โดยทำการผสมระหว่างสายพันธุ์ ∝ STX 174-4 D กับ a AH-22 (cir^+) และ ∝ STX 166-17 C กับ a AH-22 (cir^+) ซึ่งยีน KAR ของสายพันธุ์ AH-22 (cir^+) เป็นสายพันธุ์ที่ทดสอบแล้วว่ายีน KAR ปกติ

7. ความเสถียรทางพันธุกรรมของเซลผสมที่ได้ (Genetic Stability)

เพื่อศึกษาความเสถียรทางพันธุกรรมของเซลผสมที่ได้จากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ซึ่งเก็บไว้ที่ 4^{o}ซ. บนอาหารวุ้นเอียงวายพีดี 1 ปี

เลี้ยงเซลผสมบนอาหารวุ้นเอียงวายพีดีที่ 30^{o}ซ. 24 ชม. เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทำให้จำนวนเซลยีสต์เจือจางเป็นลำดับ จนได้เซลยีสต์ความเข้มข้นเหมาะสมที่จะกระจายในจานแก้วประมาณ 30 - 300 โคโลนีต่อจานแก้ว โดยดูดสารแขวนลอยของเซลยีสต์ 0.1 มล. ใส่ลงในอาหารแข็งวายพีดีบนจานแก้ว ใช้แท่งแก้วกระจายเซลยีสต์ให้ทั่วจานแก้ว นำไปบ่มที่ 30 ซ. 2 วัน ใช้แท่นปั๊ม (replica plate) ซึ่งทำด้วยทองเหลืองคลุมด้วยผ้ากำมะหยี่นึ่งฆ่าเชื้อ ประทับลงบนจานแก้วที่มีโคโลนียีสต์ขึ้นอยู่ ทำเครื่องหมายระหว่างจานแก้วกับแท่นปั๊มให้ตรงกัน แล้วยกขึ้นนำไปประทับแบบจุดต่อจุดบนอาหารต่ำสมบูรณ์ และอาหารต่ำสมบูรณ์ที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ และไนโตรจีเนียส เบส (Nitrogenous base) ดังตารางที่ 2 (ภาคผนวกข้อ 2 และ 5) ตามลำดับ บ่มที่ 30^{o}ซ. 5 วัน ตรวจโคโลนีที่ขึ้นและไม่ขึ้นในแต่ละจานแก้วเปรียบเทียบกัน เพื่อแปลผลเป็นจีโนไทพ์ต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียสเบส ที่เติมลงในอาหารต่ำสมบูรณ์

สาร / เลขที่จานแก้ว	ไลซีน	อดีนีน	เมทไธโอนีน	ยูเรซิล
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	+	-	-
4	+	-	+	-
5	+	-	-	+
6	+	+	+	-
7	+	-	+	+
8	+	+	-	+
9	+	+	+	+
10	อาหารสมบูรณ์วายพีดี			

หมายเหตุ เครื่องหมาย (-) หมายถึง ไม่เติมสารชนิดนั้น

เครื่องหมาย (+) หมายถึง เติมสารชนิดนั้น

8. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก $\propto$ เป็น a และการเกิดกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์และอัตราความถี่การเกิดแอสโคสปอร์

8.1 อิทธิพลของแสงอุลตราไวโอเลตต่อการเปลี่ยนของสายพันธุ์บ่งเพศ $\propto$ เป็น a ที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลผสม

โดยเลี้ยงเซลผสม $\propto\propto(Fu-d_1)$ บนอาหารวุ้นเอียงวายพีดี อายุ 16 ชม. ที่ 30°ซ. เติมน้ำกลั่นทำให้เซลเจือจางเป็นลำดับจนได้ความเข้มเหมาะสม ดูดสารแขวนลอย

ของเซล 0.1 มล. ลงในอาหารแข็งวายพีดี กระจายเซลให้ทั่วจานแก้ว นำไปฉายแล่งอุลตรา-ไวโอเลต โดยวางจานแก้วห่างจากหลอดไฟ 50 ซม. เป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 วินาที ตามลำดับ นำเชื้อไปบ่มในที่ไม่มีแล่ง 3 วัน นับจำนวนโคโลนียีล่ต์ที่ยืน คำนวณเป็นร้อยละการรอดชีวิต โดยเปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีบนจานแก้วที่เป็นจานควบคุม (control) ซึ่งไม่ฉายแล่งให้เท่ากับร้อยละ 100 การรอดชีวิต

8.2 ตรวจล่อบอัตราความถี่การเกิดการเปลี่ยน ∝ เป็น a ของเซลผล่ม

ทำการทดลองเหมือน 8.1 แต่เปลี่ยนเวลาการฉายแล่งอุลตราไวโอเลตช่วง 0 - 20 วินาที ให้ถี่ยืนเป็น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 วินาที ตามลำดับ ซึ่งให้ร้อยละการรอดชีวิตไม่เกินร้อยละ 80 (จากผลการทดลอง 8.1) หลังจากการฉายแล่งและบ่มในที่ไม่มีแล่ง 3 วัน ใช้แท่นปั๊มคลุมด้วยผ้ากำมะหยี่ ประทับลงบนจานแก้วที่มีเชื้อยีล่ต์ยืนอยู่ ทำเครื่องหมายระหว่างแท่นปั๊มกับจานแก้วให้ตรงกัน แล้วยกยืนนำไปประทับบนอาหารแข็งอซีเตตที่เติมกรดอะมิโนชนิดไลซีน, เมทไธโอนีน และไนโตรจีเนียล่ เบล่ คือ ยูเรซิล, อดีนีน (ภาคผนวกข้อ 4, 5) โดยทำเครื่องหมายตำแหน่งจุดต่อจุด บ่มที่ 30°ซ. 5 วัน นำแต่ละโคโลนีบนจานแก้วมาตรวจนับการเกิดแอล่คัล่ โดยตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีการล่ร้างแอล่คัล่ต่อจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เลือก ซึ่งทำการบันทึกข้อมูลจากการสุ่ม (Random) จำนวนร้อยละ 25 ของจำนวนโคโลนีทั้งหมด ซึ่งมีประมาณ 100 - 200 โคโลนี ในแต่ละจานแก้ว

9. ศึกษาลักษณะจีโนไทพ์และล่ายพันธุ์บ่ง เพศ์ของแอล่โคล่ปอร์ในแอล่คัล่ที่เกิดยืนจากการฉายแล่งอุลตราไวโอเลตไปยังเซลผล่ม

9.1 ศึกษาจำนวนและชนิดของแอล่โคล่ปอร์ในแอล่คัล่

ใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อฆ่าเชื้อแล้ว แตะโคโลนีเซลผล่มทุกโคโลนีที่พบว่าเกิดการล่ร้างแอล่โคล่ปอร์ จากการฉายแล่งอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ กัน ลงในอาหารเหลววายพีดี 2 มล. แต่ละหลอด บ่มที่ 30°ซ. 24 ช.ม ใช้ปิเปตดูดล่ารแขวนลอยของเซลยีล่ต์ 0.1 มล. ใล่ลงในอาหารแข็งวายพีดีบนจานแก้ว กระจายเซลให้ทั่วจานแก้ว บ่มที่ 30°ซ. 24 ชม. ใช้แท่นปั๊มคลุมผ้ากำมะหยี่ฆ่าเชื้อแล้ว ประทับลงบนจานแก้วที่มีโคโลนียีล่ต์ยืน ยกยืนนำไปประทับลงบนอาหารแข็งอซีเตตที่เติมกรดอะมิโนชนิดไลซีน, เมทไธโอนีน และไนโตรจีเนียล่ เบล่ ชนิดยูเรซิล และอดีนีน (ภาคผนวกข้อ 4, 5) บ่มที่ 30°ซ. 5 - 7 วัน

ใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อลากเซลมา 1 ห่วง ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปนับจำนวนแอสโคสปอร์ในแต่ละแอสคัส โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ว่ามีจำนวนแอสไซซ์นิดที่มีแอสโคสปอร์ 2, 3 และ 4 สปอร์ต่อแอสคัสเป็นจำนวนเท่าไร เพื่อหาเวลาการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่ให้จำนวน 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัสมากที่สุด

9.2 การแยกแอสโคสปอร์ในแต่ละแอสไซโดยใช้เครื่องมือไมโครมานิพูเลเทอร์

เลือกยีสต์เซลผสมจากผลการทดลองที่ 9.1 จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตในเวลาที่ให้จำนวนแอสโคสปอร์เป็น 4 สปอร์ต่อแอสคัสมากที่สุดมาศึกษา โดยเก็บทุกโคโลนีที่ตรวจพบว่ามีการสร้างแอสโคสปอร์ลงในอาหารเหลววายพีดี ทำเป็นเชื้อผสม (Mixed Culture) ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยของเซลยีสต์ลงในอาหารแข็งอซิเตต 0.1 มล. กระจายให้ทั่วจานแก้ว บ่มที่ 30^{o}ซ. 5 - 7 วัน ใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อลากเซลมา 1 ห่วง ใส่ลงใน 1 มล. ของสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอสเข้มข้น 6 มก. ต่อ มล. โดยให้มีความขุ่นของเซล 10^{8} เซลต่อ มล. ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 25 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว ใช้เข็มห่วงเขี่ยเชื้อแตะสารละลายที่มีเชื้อยีสต์ซึ่งสร้างแอสโคสปอร์ลากลงบนวุ้นที่เคลือบอยู่บนแผ่นสไลด์ (Slide) ตอนบน จากนั้นใช้เครื่องมือไมโครมานิพูเลเทอร์แยกแอสโคสปอร์จากแอสคัส โดยเลือกแยกเฉพาะแอสคัสที่มีจำนวน 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส ดังแสดงในรูปภาพที่ 9

9.3 ศึกษาการกระจายของฟีโนไทพ์ของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียส เบส และลักษณะของลายพันธุ์บ่งเพศ์ในแต่ละแอสโคสปอร์ที่แยกได้

9.3.1 ศึกษาการกระจายของฟีโนไทพ์ของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียส เบส

การผสมแบบใช้เพศ์ในยีสต์ทำให้เกิดการสร้างแอสโคสปอร์ขึ้น โดยที่แต่ละแอสโคสปอร์เป็นผลจากการแบ่งนิวเคลียสแบบมัยโอซีส ซึ่งจะทำให้เกิดการกระจาย (segregation) ของยีนเกิดขึ้นในเซลลูก หรือแอสโคสปอร์ที่ได้ โดยอาศัยหลักการนี้ จึงคาดว่าฟีโนไทพ์ของแต่ละแอสโคสปอร์จะมีการกระจายของยีนที่มีตำหนิเกี่ยวกับการสร้างกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียส เบส ของลายพันธุ์พ่อแม่เดิมคือ $\propto$ STX 166-17 C (lys 9 ade 2) และ $\propto$ STX 174-4 D (lys 9 met 2 ura 1) ก่อนที่จะมารวมกันโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสเป็นเซลผสม ซึ่งมีฟีโนไทพ์เป็น lys 9

การกระจายของลักษณะที่ปรากฏในลูก (Ascospore) บันทึกโดยเลี้ยงเซลที่แยกได้จากแต่ละแอสโคสปอร์บนอาหารแข็งวายพีดี บ่มที่ 30^{o}ซ. 24 ชม. ใช้ไม้

ปลายแหลมฆ่าเชื้อแตะแต่ละแอสโคสปอร์ที่เจริญแล้วเบา ๆ และนำไปแตะต่อบนอาหารต่ำสมบูรณ์และอาหารต่ำสมบูรณ์ที่เติมกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียส เบส ดังตารางที่ 2 บ่มที่ 30^{o}ซ. 2 วัน ตรวจโคโลนีจากแต่ละแอสโคสปอร์ที่ยืนและไม่ยืนในแต่ละจานแก้วเปรียบเทียบกัน เพื่อแปรผลเป็นจีโนไทพ์ต่อไป

9.3.2 <u>ศึกษาชนิดและการกระจายของสายพันธุ์บ่งเพศ์ในแต่ละแอสคัส</u>

เตรียมการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3 คือความสามารถในการตอบสนองต่อสายพันธุ์บ่งเพศ์ที่ต่างกัน โดยนำเซลจากแต่ละแอสโคสปอร์ที่แยกจากไมโครมานิพูเลเทอร์มาทดสอบสายพันธุ์บ่งเพศ์ว่าเป็น a หรือ α โดยนำมาผสมกับสายพันธุ์มาตรฐาน (Standard Strain) ที่ทราบสายพันธุ์บ่งเพศ์แน่นอนคือ a AH-22 (cir^{+}) และ α STX 4-4A เซลจากแอสโคสปอร์ที่มีสายพันธุ์บ่งเพศ์ตรงข้ามกับสายพันธุ์มาตรฐาน จะสามารถเกิดการผสมแบบใช้เพศ์ตามธรรมชาติ เกิดการสร้างแอสโคสปอร์ในแอสคัส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากกล้องจุลทัศน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย