

การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของ
แคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย

นายวชิรศักดิ์ ว่างังวาน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 7 7 2 4 4 7 5 2 3

POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL
INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT

Mister Wachirasak Wangkangwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

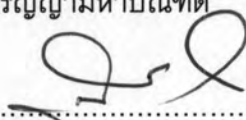
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

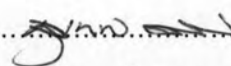
502084

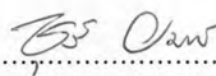
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออก
ฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้สีย้อมฟลูออโรกลาย
โดย นาย วชิรศักดิ์ ว่างังวาน
สาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี

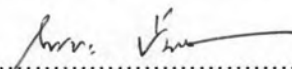
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

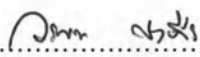

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปันพานิชการ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

วชิรศักดิ์ ว่างังวาน : การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย. (POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ชูลี ยมภักดี, 102 หน้า.

การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ระบบยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นวิธีการคัดกรองแบบใหม่ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ยังไม่ถูกค้นพบได้จากวิธีการคัดกรองที่มีอยู่เดิม ระบบนี้มีความเกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแบ่งเซลล์จากระยะ G2-M ในยีสต์ เมื่อทำการกระตุ้นวิถีนี้ด้วยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง จะทำให้เซลล์ยีสต์ดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้ แต่หากมีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่อยู่ในส่วนสกัดอย่างหยابไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม จะทำให้เซลล์ยีสต์ดังกล่าวสามารถแบ่งตัวได้ตามปกติ จากการทดสอบสารสกัดอย่างหยابจากพืชในประเทศไทยจำนวน 141 ชนิด พบว่ามีสารสกัดอย่างหยابที่ให้ผลบวก 2 ชนิด คือ ฟ้าทะลายใจ และกระชาย ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกเฉพาะกระชายเพื่อการศึกษาต่อไป จากการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดอย่างหยابจากกระชายและติดตามฤทธิ์ด้วยระบบยีสต์สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลบวกได้ 3 ชนิด ได้แก่ pinostrobin, alpinetin และ pinocembrin chalcone พบว่า pinostrobin ให้ผลบวกในระบบยีสต์แรงที่สุด และฤทธิ์ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์นี้ได้ถูกยืนยันโดยพบว่า pinostrobin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งสัญญาณของแคลเซียมที่กระตุ้น การเกิดสัณฐานวิทยาการแตกหน่อที่ผิดปกติ (abnormal bud morphology) รวมทั้งไม่ทำให้เกิดการชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2-M (G2 phase cell cycle delay) จากการศึกษาเบื้องต้นถึงโมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของ pinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์พบว่า pinostrobin ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยการลดระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์และ ไม่ได้ยับยั้งโปรตีน Calcineurin Mpk1 หรือ Mck1

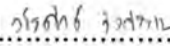
ภาควิชา..... จุลชีววิทยา..... สายมือชื่อนิสิต..... วชิรศักดิ์ ว่างังวาน.....
 สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... สายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ. ชูลี ยมภักดี.....
 ปีการศึกษา..... 2550..... สายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

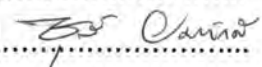
4772447523 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: YEAST/CALCIUM SIGNAL INHIBITOR/PLANTS/SCREENING

WACHIRASAK WANGKANGWAN: POSITIVE SCREENING AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CALCIUM SIGNAL INHIBITOR FROM PLANT EXTRACTS USING *Saccharomyces cerevisiae* MUTANT. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., 102 pp.

A positive screening system using a mutant strain of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to screen for bioactive compounds was used in this study. The principle of the assay based on one of the roles of intracellular Ca^{2+} signal in yeast in controlling of cell-cycle progression at G2-M phase. When growing the mutant yeast cells in medium with high concentration of Ca^{2+} , the high Ca^{2+} signal causes the mutant yeast cells (as indicator cells) to arrest at G2 phase, resulting in no growth phenotype. However, if there is a Ca^{2+} signal inhibitor as a small molecule presence in the crude plant extracts, the yeast cells can be able to grow normally in medium with high Ca^{2+} concentration. Two positive crude ethanol extracts were obtained from the screens of 141 plants in Thailand using the $\Delta zds1$ yeast mutant growth assay. There were *Andrographis paniculata* (APA) and *Boesenbergia pandurata* (BPA). Only the latter was chosen for further study. Biological activities in fractions from column chromatography of crude extract of *B. pandurata* were monitored by the yeast based assay. After purification of the positive fractions, three pure compounds were obtained: pinostrobin, alpinetin and pinocembrin chalcone. Among them, pinostrobin showed the strongest activity in the assay. Inhibition of the calcium signaling pathway by pinostrobin was confirmed by flow cytometry profile and bud morphology studies. Pinostrobin at 1mM could inhibit the hyperactivation of Ca^{2+} caused abnormal cell morphology and the G2-M cell cycle delay. Regarding to the search for molecule that pinostrobin target at in the Ca^{2+} signaling pathway, it was found that not the intracellular Ca^{2+} , Calcineurin, Mpk1 nor Mck1.

Department Microbiology Student's Signature..... 

Field of Study Industrial Microbiology Advisor's Signature..... 

Academic Year 2007 Coadvisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ขวศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology, Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan ที่กรุณาให้สายพันธุ์ยีสต์และพลาสติกต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้รวมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ขวศิริที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. โกวิท พัฒนปัญญาสัตย์ และขอขอบคุณนางสาว กษมา สุขาภิรมย์ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง Flow cytometer และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทัศนวิธานกรรม.....	4
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง	13
3.2 เคมีภัณฑ์.....	14
3.3 ยีสต์และแบคทีเรีย.....	15
3.4 พลาสมีดและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟร์เมอร์	16
3.5 วิธีการสร้างพลาสมีด pYES2::GAL1p-MCK1.....	16
3.6 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์จากตัวอย่างพืช.....	22
3.7 ทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์.....	37
3.8 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดยการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย <i>Δzds1</i> โดยเครื่อง Flow cytometry และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
3.9 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้ง การส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์เซลล์.....	40
3.9.1 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อ MPK1 และ Calcineurin...	40
3.9.2 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายใน ยีสต์เซลล์.....	41
3.9.3 การตรวจสอบผลของสารออกฤทธิ์ที่มีต่อช่วง downstream ของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1.....	44

บทที่	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	46
4.1 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์.....	46
4.2 ทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์.....	59
4.3 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของสารออกฤทธิ์ที่คัดกรองได้จากระบบยีสต์โดย Flow cytometry และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์.....	61
4.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบระยะการแบ่งเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ โดยเครื่อง Flow cytometry	62
4.3.2 การตรวจสอบผลการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ที่คัดกรองจากระบบยีสต์โดย Flow cytometry profile และลักษณะการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$	64
4.4 การตรวจสอบหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์.....	69
4.4.1 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์.....	69
4.4.2 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อ Mpk1 และ Calcineurin	70
4.4.3 การตรวจสอบผลของ pinostrobin ที่มีต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1.....	72
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	76
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก	89
ภาคผนวก ข	94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	102


สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 เว็บไซต์ของฐานข้อมูลหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีสต์.....	5
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์ สายกลาย $\Delta zds1$ เป็นเซลล์บ่งชี้.....	12
3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	15
3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	15
3.3 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	16
3.4 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	16
3.5 รายชื่อสมุนไพรรักษาโรคที่นำมาคัดกรองโดยระบบยีสต์.....	22
4.1 ผลการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบจากพืชโดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย.....	46
4.2 ผลการทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์.....	60
4.3 ผลของ pinostrobin ต่อระดับแคลเซียมในเซลล์โดยการวัดระดับแอกติวิตีของ เอนไซม์ β -Galactosidase.....	70

สารบัญรูป

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 ความสัมพันธ์ของ essential ยีนที่ทำหน้าที่หลักของมนุษย์กับยีสต์.....	7
2.2 แบบจำลองวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ในยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	10
3.1 แผนที่เรสทริกชันเอนไซม์ของพลาสมิด pYES2.....	19
3.2 การจัดตั้งอุปกรณ์สำหรับการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ.....	36
3.3 ส่วนประกอบภายในพลาสมิด pKC190 ซึ่งมี <i>PMR2A</i> promoter เชื่อมกับ ORF ของเอนไซม์ β -galactosidase.....	41
4.1 ฟ้ำทลายใจ <i>Andrographis paniculata</i>	57
4.2 กระจายเหลือง <i>Boesenbergia pandurata</i>	57
4.3 ลักษณะของงานเพาะเชื้อที่ให้ผลการทดสอบบวกของสารสกัดอย่างหายาจากกระจายเหลือง (BPA) และฟ้ำทลายใจ (APA) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ.....	58
4.4 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระจายเหลือง.....	59
4.5 ผลของการทดสอบด้วยระบบยีสต์ของ pinostrobin, alpinetin, pinocembrin chalone ที่คัดกรองได้จากกระจายเหลืองที่ค่าความเข้มข้นต่างๆในหน่วยมิลลิโมลาร์ โดยใช้ FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์และ ethanol เป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ.....	61
4.6 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมด้วย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 3, 4, 5, และ 6 ชั่วโมง โดยแกน x แสดงปริมาณดีเอ็นเอ แกน y แสดงปริมาณเซลล์ 1C คือปริมาณดีเอ็นเอหนึ่งเท่า 2C คือปริมาณดีเอ็นเอเป็นสองเท่า	63
4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของการแตกหน่อของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 40 เท่า.....	63
4.8 Flow cytometry profile ของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อบ่มด้วย pinostrobin ก่อนที่จะมีการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมด้วย $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 และ 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ และมี FK506 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนโมลาร์เป็นตัวควบคุมผลบวก	65

ภาพประกอบ

- 4.9 ผลของ pinostrobin ที่มีต่อการแตกหน่อของยีสต์ภายใต้สภาวะที่วิถีการสังเคราะห์ของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ด้วยความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้กำลังขยาย 100 เท่า ตัวเลขด้านล่างของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud) 66
- 4.10 ผลของสารบริสุทธิ์ pinostrobin ที่มีต่อการแบ่งเซลล์แบบแตกหน่อ (budding) ภายใต้สภาวะที่วิถีการสังเคราะห์ของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายถูกกระตุ้นด้วย CaCl_2 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย้อมด้วยสี Hoechst 33342 โดยรูปทางขวาแสดงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง Fluorescence (กำลังขยาย 40 เท่า)..... 68
- 4.11 หลักการของการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin โดยใช้หลักการเกิด synthetic lethality..... 71
- 4.12 ผลการทดสอบของ pinostrobin ที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย..... 72
- 4.13 ลักษณะพื้นฐานของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta zds1$ ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิดซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมงโดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ตัวเลขด้านล่างซ้ายของภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อที่ผิดปกติ (Elongated bud) 74
- 4.14 ลักษณะการแบ่งนิวเคลียสภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ของยีสต์สายพันธุ์ $\Delta zds1$ ที่ถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนในพลาสมิดซึ่งอยู่ในเซลล์ด้วย galactose เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยที่รูปทางขวามีการเติม pinostobin ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์..... 75
- 5.1 วิถีการสังเคราะห์ของแคลเซียมโดย  แทนเป้าหมายของการยับยั้งวิถีของ pinostrobin ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้..... 79