บทที่ 12
การปรับตัว การผ่าเหล่า และพันธุกรรม

สายพันธุ์ของแบคทีเรียอาจแสดงการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ทั้งในด้านสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีรวิทยา (physiology) ในการตรวจสอบเอกลักษณ์หรือความเป็นอย่างหนึ่งอย่างเดียวกันของจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ อาจพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะบางอย่างเกิดขึ้นได้ แต่ก็จะไม่เป็นที่สงสัยเลยถ้าพิจารณาถึงสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์นั้นต้องเผชิญและการมีชั่วอายุ (generation) จำนวนมากเกิดขึ้นในระยะเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ ก็มีขอบเขตจำกัดอย่างน้อยก็ภายใต้สภาพแวดล้อมอันหนึ่ง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในลักษณะต่าง ๆ มีขอบเขตจำกัด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไปจึงแตกต่างจากสายพันธุ์ที่เป็นแบบอย่างเพียงเล็กน้อย ลูกหลานของแบคทีเรียเซลล์หนึ่งจะรับมรดกลักษณะต่าง ๆ โดยทั่วไปจากเซลล์พ่อแม่ ซึ่งก็เป็นคุณลักษณะโดยทั่วไปของขบวนการสืบพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตทุกรูปแบบ

การเปลี่ยนแปลงได้และมรดกของลักษณะต่าง ๆ

พันธุศาสตร์ (Genetic) คือการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงได้และมรดกตกทอดของลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต พันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ได้สร้างความตื่นเต้นเป็นอย่างมากในวงการชีววิทยาตลอดช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา ก่อนที่วิชาการทางพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์เจริญเติบโตขึ้นมานั้นการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์จะต้องทำการแสดงโดยใช้พืชหรือสัตว์ชั้นสูงที่เหมาะสมมาผสมพันธุ์กัน การทดลองแบบนี้ต้องประสพกับปัญหาเกี่ยวกับระยะเวลาชั่วอายุของพืชและสัตว์ชั้นสูงซึ่งยาวนานมากและให้ลูกหลานได้น้อย ตัวอย่างเช่น สมมุติว่าใช้หนูกินนีพิกเป็นสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาหลักการทางพันธุศาสตร์โดยเลือกแบบอย่างพ่อแม่ (parental type) ที่เหมาะสม แล้วคาดหมายในการชันสูตรลักษณะต่าง ๆ ของลูกหลานจะต้องใช้เวลาประมาณ

10 สัปดาห์ และจำนวนลูกหลานต่าง ๆ ที่อาจเป็นได้ซึ่งพ่อแม่สามารถถ่ายทอดให้ นอกจากนี้ถ้าต้องการศึกษาลูกหลานในชั่วอายุต่อไปก็ต้องรอเวลาอีกหลายเดือนจนกว่าหนูกินนีพิกจะโตพอสามารถผสมพันธุ์ได้ ดังนั้นปัญหายุ่งยากสำคัญในการใช้พืชและสัตว์ชั้นสูงเพื่อการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ คือ อัตราสืบพันธุ์ได้ช้าและมีจำนวนลูกหลานจำกัด

ความเจริญทางด้านพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ได้เปลี่ยนแปลงสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ทั้งหมด เนื่องจากระบบทางพันธุกรรมของแบคทีเรียก็คล้ายคลึงกันกับในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ดังนั้นการทดลองโดยใช้แบคทีเรียเช่น *Escherichia coli* ก็อาจแสดงให้เห็นถึงหลักการพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีระบบการรวมกันใหม่ทางพันธุกรรมซึ่งไม่เหมือนใครหลายอย่าง การรวมกันใหม่ทางพันธุกรรม (genetic recombination) หมายถึงเซลล์ลูกหลานสามารถเกิดขึ้นโดยมียีน (gene) ประกอบกันแตกต่างจากยีนซึ่งปรากฏอยู่ในเซลล์พ่อแม่ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ก็ยากที่จะเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ขนาดของประชากรนั้นมีจำนวนมากจึงทำให้มีโอกาสพบเซลล์ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ในระยะเวลาอันสั้น จุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว *E. coli* ระหว่างการเจริญเติบโตในช่วง logarithmic stage สามารถแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสองได้ใน 20 นาที ดังนั้นจึงทำให้มีชั่วอายุใหม่เกิดขึ้นทุก ๆ 20 นาที จะเห็นได้ว่ามีเซลล์ลูกหลานเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก จำนวนเซลล์ทั้งหมดของ *E. coli* ภายหลัง 18 ถึง 24 ชั่วโมงอาจสูงถึงสองหมื่นล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ลักษณะการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว มีประชากรจำนวนมากและง่ายต่อการทดลองทำให้แบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่น ๆ เป็นเครื่องมือที่สะดวกในการศึกษาขบวนการทางพันธุกรรมเป็นอย่างยิ่ง

GENOTYPE AND PHENOTYPE

ลักษณะของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในแง่ของวิชาพันธุศาสตร์คือ ความคงทนทั่วไปหรือความเหมือนกันในลักษณะต่าง ๆ ของลูกหลานและพ่อแม่ อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตหนึ่งอาจไม่แสดงลักษณะต่าง ๆ เหมือนกันเมื่อเจริญเติบโตอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติพื้นฐานของเซลล์สองประการ คือ genotype และ phenotype Genotype หมายถึงลำดับยีนทั้งหมดที่เซลล์มีอยู่ Phenotype หมายถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เซลล์แสดงออกในขณะใดขณะหนึ่ง Genotype ของเชื้อจุลินทรีย์มักค่อนข้างคงที่ตลอดช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามก็อาจเปลี่ยนแปลงได้ และการเปลี่ยนนั้นก็ค่อนข้างคงที่ การเปลี่ยนแปลงทาง genotype เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของยีน Genotype เป็นสิ่งควบคุมพิสัยของลักษณะต่าง ๆ สำหรับสิ่งมีชีวิตแต่พิสัยของลักษณะต่าง ๆ อาจไม่เหมือนกัน

ภายใต้การครอบคลุมทั้งหมดของสิ่งแวดล้อม หรืออาจกล่าวได้ในอีกทางหนึ่งว่าลักษณะซึ่งถูกควบคุมโดยยีนอาจถูกดัดแปลง (modification) ไปชั่วคราวโดยสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ดังนั้น genotype จึงเป็นตัวแทนความสามารถซึ่งเป็นไปได้ทั้งหมดของเซลล์ แต่ส่วน phenotype ใช้แทนลักษณะต่าง ๆ ที่ปรากฏ

การปรับปรุงตัว

การปรับปรุงตัว (Modification) หมายถึงการเปลี่ยนแปลง phemotype ก่อนที่จะกล่าวอย่างละเอียดถึงความสามารถในการแสดงออกซึ่งแตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตก็ควรสังเกตว่าในการศึกษาภายใต้ภาวะที่เหมือนกันแบคทีเรียจะแสดงคุณสมบัติซึ่งคงที่อย่างเห็นได้ชัด กรณีเช่นนี้ช่วยให้สามารถชันสูตรและจัดแบ่งหมวดหมู่ของแบคทีเรียได้ ตัวอย่างเช่นแบคทีเรีย *Neisseria perflava* ซึ่งคัดแยกได้จากลำคอ เป็นพวก gram-negative diplococcus ทำให้เกิดการหมักคาร์โบไฮเดรตได้สี่ชนิด คือ glucose, fructose, maltose และ sucrose และแบคทีเรีย Neisseria *meningitidis* ซึ่งคัดแยกได้จากลำคอเช่นเดียวกันเป็นพวก gram-negative diplococcus ทำให้เกิดการหมักคาร์โบไฮเดรตได้สองชนิด คือ glucose และ maltose เชื้อบริสุทธิ์ของทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถเก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการได้เป็นเวลานาน และเมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นอีกครั้งหนึ่งที่ภาวะเดียวกันกับครั้งแรกพบว่าลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียพวกนี้ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง ในตารางที่ 12-1 เป็นตัวอย่างรายละเอียดแสดงความคงทนของลักษณะต่าง ๆ

ตารางที่ 12-1

Table 12-1. Some Characteristics of Lactobacillus lactis (Strain OJ10) Determined at Intervals over a Period of 37 Years*

INVESTIGATOR AND YEAR	LACTIC ACID IN MILK %	FINAL pH IN GLUCOSE BROTH	FERMENTATION REACTIONS							
			Sorbitol	Mannitol	Sucrose	Trehalose	Maltose	Lactose	Inulin	Salicin
Orla-Jensen 1919	1.4		−	−	+		+	+	−	+
Orla-Jensen 1943	1.4	3.9	−	−	+	+	+	+	−	+
Hansen 1950	1.5	3.9	−	−	+		+	+	−	−
Miller 1955		3.7	−	−	+	±	+	+	−	+
Miller 1956		3.6	−	−	+	+	+	+	−	+

*The same strain was used in each of these studies, and a remarkable degree of stability is evidenced from the results. (Courtesy of P. A. Hansen.)

สำหรับแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* ซึ่งได้ตรวจสอบทางสายพันธุ์เดียวกันซ้ำอีกโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่านในช่วงระยะเวลากว่า 40 ปี ที่ภาวะเดียวกันกับครั้งแรกจะสังเกตเห็นว่าได้ผลคล้ายคลึงกัน

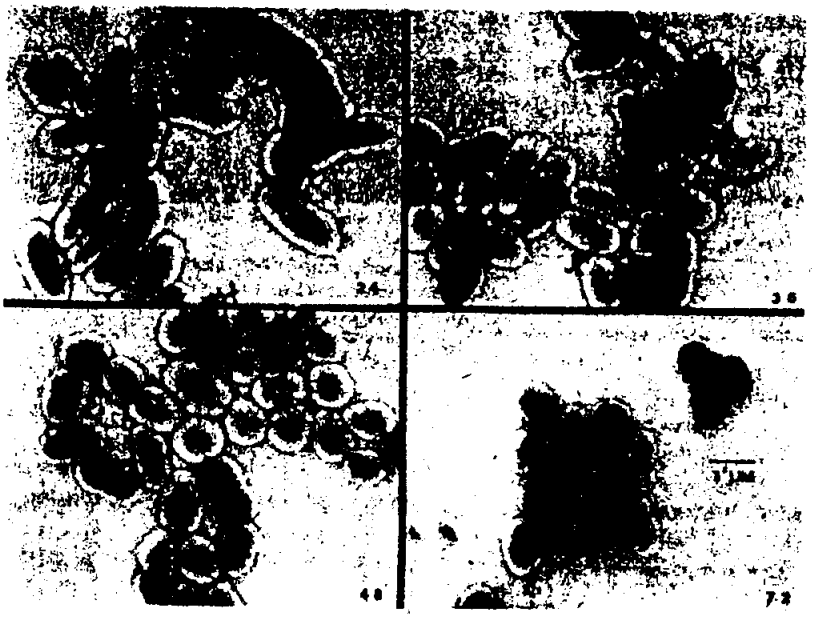
อย่างไรก็ตามถ้าศึกษาจุลินทรีย์ที่ระยะของวงจรการเจริญเติบโตแตกต่างกัน หรือในสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือปรับปรุงตัว (modification) ในด้านลักษณะหรือกิจกรรมทางเมตาโบลิซึม การปรับปรุงตัวในที่นี้หมายถึงการเปลี่ยนแปลง phenotype หรือการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสิ่งแวดล้อมโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ยีน (genetic change) การปรับปรุงตัวยังหมายถึงการแปรปรวนทาง phenotype หรือการปรับตัวทางสรีรวิทยา

เป็นที่น่าสังเกตว่าการปรับปรุงตัวเป็นการเปลี่ยนแปลง phenotype ซึ่งเกิดขึ้นกับเซลล์ส่วนใหญ่ในเชื้อเดียวกัน แต่ในกรณีของการเปลี่ยนแปลง genotype มักเกิดขึ้นที่เซลล์เพียงเซลล์เดียวและเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก ในเชื้อหนึ่ง ๆ มีเพียงไม่กี่เซลล์เท่านั้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลง genotype ขึ้นได้เอง นอกจากนี้ phenotype ที่เปลี่ยนแปลงไปยังไม่คงถาวรและไม่อาจถูกถ่ายทอดเป็นมรดกให้แก่ลูกหลานได้เหมือนดังการเปลี่ยนแปลง genotype เมื่อนำเซลล์ซึ่งถูกทำให้ปรับปรุงตัวกลับมาอยู่ในสภาพแวดล้อมเดิมก็จะมี phenotype กลับคืนมาดังเดิม ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างการปรับปรุงหรือการเปลี่ยนแปลง phenotype

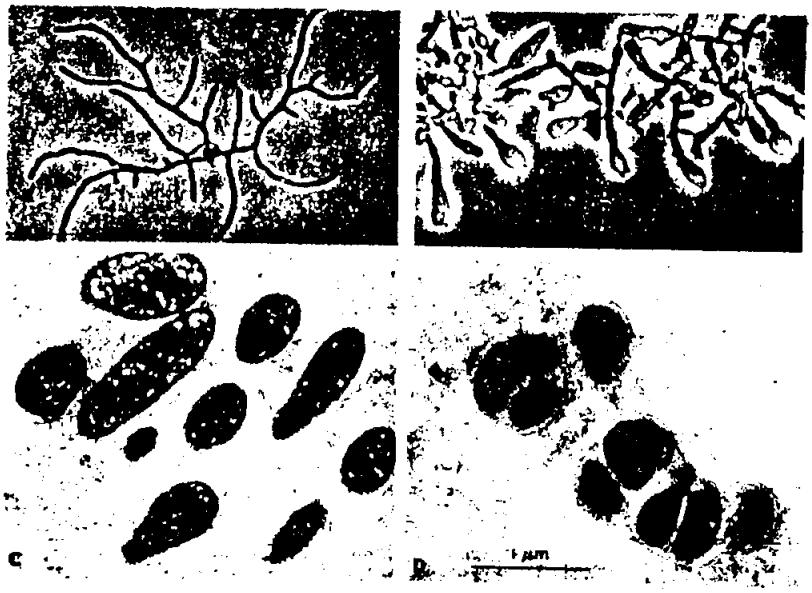
การปรับปรุงตัวทางสัณฐานวิทยา

ในบทที่ 7 ได้ทราบถึงเส้นกราฟของลักษณะการเจริญเติบโตเมื่อใส่เชื้อลงในอาหารซึ่งจัดเตรียมใหม่ ถ้าตรวจสอบเซลล์ในระยะสุดท้ายของ lag phase จะพบว่าเซลล์มีขนาดใหญ่โตอย่างผิดปกติ แต่เมื่อการเจริญเติบโตดำเนินต่อไปผ่าน log phase และเข้าใกล้ stationary phase เซลล์จะมีขนาดเล็กลงและมีขนาดใกล้เคียงกันเกือบทั้งหมด การแสดงความเจริญเติบโตเช่นนี้เป็นลักษณะปกติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ เซลล์จากเชื้อเก่าอาจแสดงความผิดปกติเช่นมีก้อนเม็ดต่าง ๆ ภายในเซลล์หรือมีขนาดและรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์เหล่านี้ถูกถ่ายลงสู่อาหารซึ่งจัดเตรียมใหม่ แบบฉบับของพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาก็จะเกิดขึ้นซ้ำใหม่ได้อีกดังกล่าวข้างต้น ดูรูปที่ 12-1 การปรับปรุงตัวทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารได้แสดงไว้ในรูปที่ 12-2

การสร้างแคปซูลของแบคทีเรียได้รับอิทธิพลอย่างมากจากชนิดของอาหารที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งอาจสร้างแคปซูลขนาดใหญ่เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำนมแต่จะไม่สร้างแคปซูลเลยเมื่อเพาะเลี้ยงใน nutrient broth เช่นเดียวกันกับการสร้างสปอร์ได้รับอิทธิพลจากส่วนผสมของอาหาร



รูปที่ 12-1 Morphological changes exhibited by *Arthrobacter globiformis* during growth in a chemically defined broth medium. The number in each electron micrograph refers to incubation time in hours: 24 h = early exponential growth phase; 36 h = mid-exponential growth phase; 48 h = late exponential growth phase; and 72 h = stationary phase. The cells were first fixed with glutaraldehyde and then stained negatively with phosphotungstic acid. *(Courtesy of Margaret Gomersall and E. C. S. Chan.)*



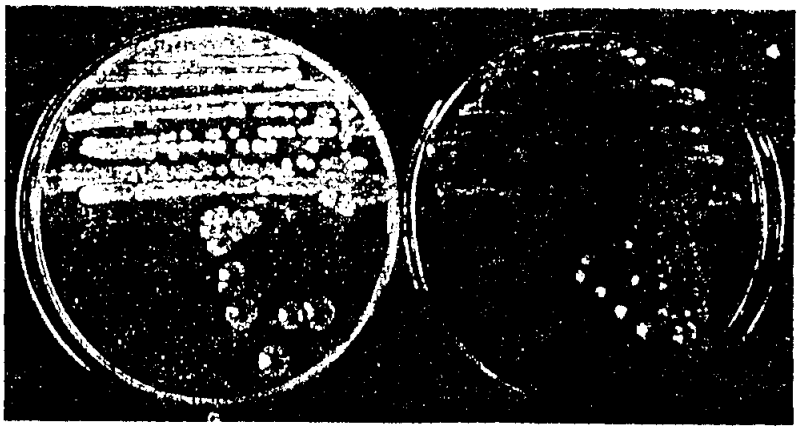
รูปที่ 12-2 Morphological modifications (phenotypic changes) resulting from changes in media composition. (A) and (B) are phase-contrast micrographs of *Nocardia* sp. in (A) tryptone agar culture; (B) brain-heart-infusion agar: both cultures 12 h at 30°C. *(Courtesy of B. L. Beaman and D. M. Shankel, and J. Bacteriol. 99:876, 1969.)* (C) and (D) are electron micrographs of thin sections of *Arthrobacter globiformis* 425 grown in (C) nutritionally complete medium; (D) biotin-deficient medium resulting in abnormal forms of the bacterium (several protoplasts embedded in an amorphous matrix). Note that the aberrant cells are devoid of cell walls and no longer exhibit the typical shape of the species as shown in (C). Incubation was at 25°C and for 36 h. *(Courtesy of Margaret Gomersall and E. C. S. Chan.)*

สถานะทางกายภาพของอาหาร (แข็งหรือเหลว) และอุณหภูมิในการบ่ม ตัวอย่างเช่น *Bacillus sphaericus* ซึ่งสร้างสปอร์ได้และเจริญเติบโตในสภาพที่มีแกสอ๊อกซิเจน เมื่อแบคทีเรียนี้ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีเพ็บโตน 2 เปอร์เซ็นต์ ประชากรทั้งหมดจะอยู่ในสภาพที่เป็นเซลล์ร่างกาย (vegetative cell) ไม่มีการสร้างสปอร์เลยถึงแม้ว่าจะใช้ระยะเวลาในการบ่มให้ยาวนานออกไปอีก แต่ถ้าลดความเข้มข้นของเพ็บโตนลงเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์จะมีการสร้างสปอร์ได้ถึง 100 เปอร์-เซ็นต์ภายหลังจากการบ่มเป็นระยะเวลาสองวัน

การปรับปรุงทางลักษณะเชื้อ

การเปลี่ยนแปลงซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะเชื้อที่เห็นได้ชัดอย่างหนึ่งคือการเกิดสี *Serratia marcescens* เป็นแบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดสีอิฐแดงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียตจะกลายเป็นแบคทีเรียซึ่งเกือบจะไม่มีสีเลย จุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งทำให้เกิดสีก็อาจแสดงการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติด้านนี้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงก็อาจมีอิทธิพลต่อความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกันกับลักษณะเชื้อในด้านอื่น

การเปลี่ยนแปลงความสามารถในด้านการทำให้เกิดแคปซูลก็อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโคโลนีของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ polysaccharide capsule ทำให้เกิดโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกขนาดใหญ่ ในบางกรณีอาจเกิดขึ้นเฉพาะบนอาหารซึ่งมี disaccharide sucrose ส่วนในอาหารชนิดอื่นจะมีขนาดเล็กเนื่องจากไม่ทำให้เกิดแคปซูล ดังรูปที่ 12-3 ทั้งสองกรณีจะเห็นได้ว่าความสามารถทางพันธุกรรมในการปรับปรุงลักษณะของแบคทีเรียนั้นคงที่แต่จะถูกกระตุ้นให้มีลักษณะเป็นแบบใดก็ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม



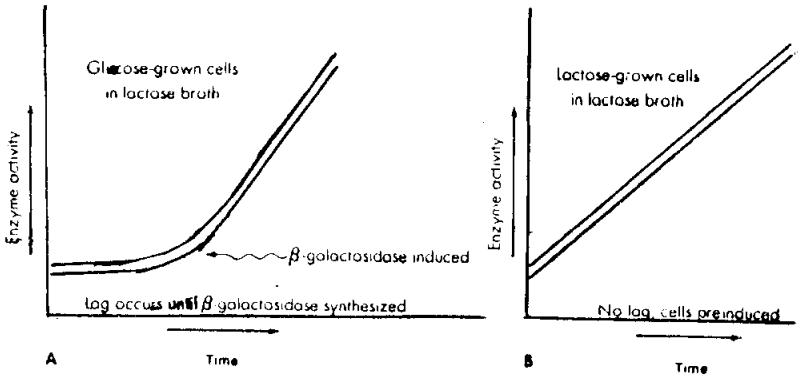
รูปที่ 12-3 ***Agrobacterium radiobacter*** **grown on two different media. Left: Mucoid colonies on sucrose-salts medium; right: non-mucoid colonies on trypticase-soy agar medium**

การปรับปรุงตัวในด้านสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี :

เซลล์แบคทีเรียซึ่งมีอายุน้อยและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจะอ่อนไหวต่อการทำลายด้วยสารเคมีเช่น disinfectant มากกว่าเซลล์แบคทีเรียซึ่งแก่มีอายุมาก โดยทั่วไปความทนทานของจุลินทรีย์ต่อการทำลายด้วยสารเคมีและปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ จะเปลี่ยนแปลงได้ในขนาดหนึ่งตามอายุของเชื้อ

ในบทที่ 10 และ 11 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดกวรเปลี่ยนแปลงแก่สารเคมีได้หลายชนิด และปฏิกริยาเหล่านั้นเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ด้วยความเป็นจริงแล้วการที่จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ มีกิจกรรมทางเคมีแตกต่างกันเป็นผลเนื่องมาจากมีเอนไซม์แตกต่างกันนั่นเอง โดยทั่วไปอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งซึ่งสามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมทางเคมีและกายภาพแตกต่างกันได้อย่างกว้างขวางเป็นแบคทีเรียซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมใหม่ได้เสมอ หรือกล่าวในอีกทางหนึ่งว่า แบคทีเรียเมื่อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะหนึ่งอาจไม่สร้างเอนไซม์ทั้งหมดที่แบคทีเรียนั้นสามารถสร้างได้ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันเมื่อเจริญเติบโตอยู่ในสภาพแวดล้อมซึ่งแตกต่างกันหรือบนซับสเตรตที่แตกต่างกันก็อาจสร้างเอนไซม์ที่แตกต่างหรือเพิ่มเติมขึ้น

ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลง phenotype ในด้านลักษณะทางชีวเคมีก็คือการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 9 การกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์หรือการปรับตัวหมายถึงการทำให้เกิดเอนไซม์เมื่อมีสารกระตุ้นเฉพาะปรากฏอยู่ในอาหาร ตัวอย่างเช่นการเกิดเอนไซม์ B-galactosidase (เอนไซม์ซึ่งทำให้น้ำตาลที่มี galactose แตกตัว เช่นน้ำตาล lactose) โดย *Escherichia coli* เมื่อเผชิญกับน้ำตาลซึ่งมี galactose หรือสารประกอบที่ใกล้เคียงกัน ในแง่ของ phenotype และ genotype หมายความว่าสิ่งมีชีวิตรู้วิธีและมีกลไกในการสร้างเอนไซม์อยู่ตลอดเวลา ความสามารถอันนี้เป็นมรดกอยู่ใน genotype ของตน อย่างไรก็ตามเอนไซม์นั้นจะถูกสร้างขึ้นมาหรือไม่เป็นลักษณะที่แสดงอ่อกทาง phenotype ซึ่งถูกควบคุมโดยสิ่งแวดล้อม ในที่นี้ก็คือการมีหรือไม่มีสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น ดังแสดงในรูปที่ 12-4



รูปที่ 12-4 Induced enzyme formation. *E. coli* cells can utilize lactose only after induction of β-galactosidase. When noninduced cells (glucose-grown) are suspended in lactose broth, a lag in enzyme activity occurs because the enzyme must be synthesized. Induced cells (lactose-grown), since they already contain the enzyme, do not exhibit a lag in lactose utilization. (A) Glucose-grown cells in lactose broth; (B) lactose-grown cells in lactose broth.

การเปลี่ยนแปลง genotype

เป็นที่มั่นใจแน่นอนแล้วว่าสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเช่น มนุษย์มีระบบสืบทอดลักษณะต่าง ๆ เป็นมรดกจากบรรพบุรุษเนื่องจากการสังเกตว่าสมาชิกในบางตระกูลมีผมสีดำ ตาสีน้ำตาล มีจมูกและคางมีรูปร่างเป็นแบบหนึ่ง ส่วนในอีกบางตระกูลกลับมีผมสีทอง ตาสีฟ้า และมีรูปร่างของจมูกและคางแตกต่างไป นอกจากนี้ในบางครั้งก็อาจพบการเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหันเกิดขึ้นในมนุษย์ ในพืชและในสัตว์ต่าง ๆ เช่น แมวสีเผือกเกิดขึ้นในท่ามกลางแมวสีดำทั้ง ๆ ที่เป็นลูกหลานคลอกเดียวกัน หรือเม็ดถั่วสีเหลืองเกิดขึ้นในท่ามกลางเม็ดถั่วสีเขียว จากการสังเกตเช่นนี้ทำให้อาจสรุปหลักการสำคัญโดยทั่วไปได้สองประการคือ (1) สิ่งมีชีวิตมีโครงสร้างซึ่งเรียกว่ายีน (gene) เป็นตัวกำหนดลักษณะต่าง ๆ ยีนทั้งหมดที่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตหนึ่งมีอยู่ถูกเรียกว่ายีโนม (genome) (2) ยีนใดยีนหนึ่งสามารถที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลง (mutating) แตกต่างไปได้ ดังนั้นจึงทำให้ลักษณะของสิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลง การกระทำของการเปลี่ยนแปลง (mutating) ที่ยีนถูกเรียกว่าการผ่าเหล่า (mutation) ในบางครั้งอาจกล่าวได้ว่าการผ่าเหล่าคือการเปลี่ยนแปลงตัวเอง สิ่งมีชีวิตใดซึ่งมีการผ่าเหล่าถูกเรียกว่าตัวผ่าเหล่า (mutant) ความคิดเช่นนี้ได้เกิดขึ้นกับมนุษย์เป็นระยะเวลานานหลายปีแล้วและก็สามารถใช้ได้กับจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน

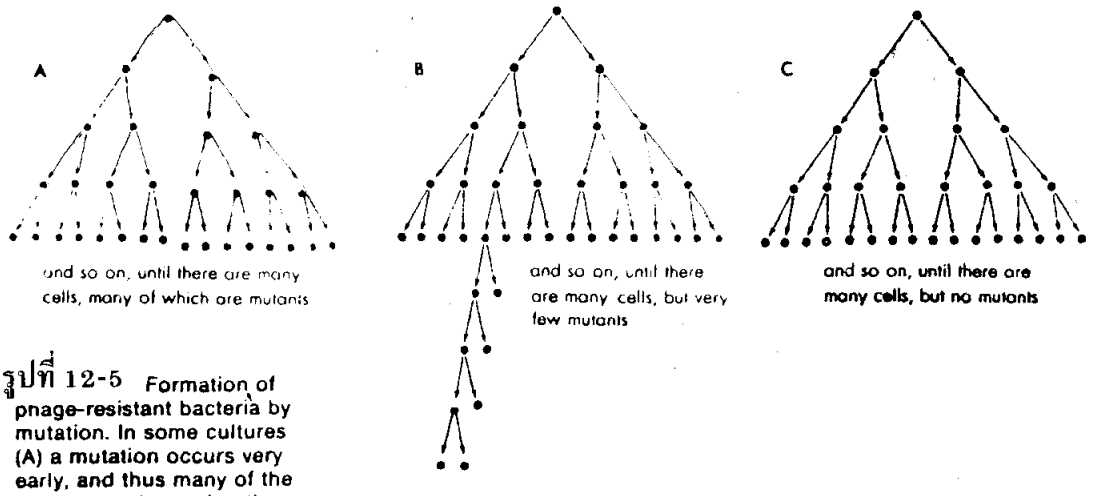
ได้ทราบกันมาแล้วว่ามีวิถีทางหลายอย่างซึ่งทำให้ phenotype ของสายพันธุ์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงปรับปรุงได้โดยความแตกต่างของภาวะการเจริญเติบโต แต่ต่อมาเป็นระยะเวลานานเข้านักจุลชีววิทยาได้เริ่มปฏิเสธที่จะเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงซึ่งถูกกระตุ้นในเชื้อแบคทีเรียเป็นผลเนื่องมาจากการปรับปรุงตัวเองแต่เพียงอย่างเดียว เช่นปฏิเสธที่จะเชื่อว่าแบคทีเรียมีระบบ

พันธุกรรมเป็นมรดกซึ่งคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และคิดว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อเนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมนั้นง่ายมาก อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1943 Max Delbruck และ Salvador Luria ยังเชื่อว่าแบคทีเรียมีกลไกในการรับมรดกเป็นพันธุกรรมซึ่งคงที่ และได้ทำการทดลองเพื่อพิสูจน์จุดนี้โดยใช้ไวรัสของแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า bacteriophage หรือ phage เป็นเครื่องช่วยในการทดลอง พบว่าเมื่อแบคทีเรียถูกทำลายโดย phage จะมีบางเซลล์เหลือรอดตายอยู่ เซลล์เหล่านี้และลูกหลานของเซลล์เหล่านี้เป็นพวกซึ่งมีความทนทานต่อ phage นักจุลชีววิทยาบางท่านคิดว่าเซลล์เหล่านี้ถูกปรับปรุงให้เปลี่ยนแปลงโดยการสัมผัสกับ phage แต่ Luria และ Delbruck กลับเชื่อว่าความคงทนต่อ phage ของแบคทีเรียนั้นเป็นผลเนื่องมาจากการผ่าเหล่าในยีนของแบคทีเรีย เขาได้สังเกตว่ามีความสำคัญซึ่งแตกต่างกันระหว่างสมมุติฐานของการผ่าเหล่าและสมมุติฐานของการปรับปรุงตัวเอง สมมุติว่าเซลล์ซึ่งทนทานเป็นผลเนื่องมาจากการปรับปรุงตัวเองโดยการสัมผัสกับ bacteriophage จริง ถ้านำเซลล์แบคทีเรียจำนวนมากมาแบ่งใส่หลอดภาชนะแยกกันในจำนวนเท่า ๆ กันแล้วปล่อยให้สัมผัสกับ phage เหมือนกันในจำนวนเท่ากันก็ควรปรากฏเซลล์ซึ่งทนทานต่อ phage ในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน แต่ถ้าเซลล์ซึ่งทนทานเป็นผลเนื่องมาจากการผ่าเหล่าจริงการผ่าเหล่าจะเกิดขึ้นอย่างสะเปะสะปะ (random) ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเหมือนกันหลายเชื้อจำนวนเท่า ๆ กันแล้วปล่อยให้สัมผัสกับ phage เหมือนกันจำนวนเท่ากันก็จะพบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ทนทานต่อ phage แตกต่างกันมากเชื้อในบางหลอดอาจไม่มีการผ่าเหล่าเลยคือไม่มีเซลล์ที่ทนทานต่อ phage เกิดขึ้นเลย แต่เชื้อในบางหลอดอาจพบว่ามีการผ่าเหล่าเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มต้น ดังนั้นจึงทำให้เกือบทุกเซลล์ในหลอดนั้นเป็นพวกที่มีความทนทานต่อ phage ดังรูปที่ 12-5

จากผลการทดลองของ Luria และ Delbruck พบว่ามีเซลล์ที่ทนทานต่อ phage เกิดขึ้นเป็นจำนวนซึ่งแตกต่างกันมากจึงเป็นการพิสูจน์ว่าความทนทานต่อ phage เป็นผลเนื่องมาจากการผ่าเหล่า ดังรูปที่ 12-6 ในปีต่อ ๆ มาภายหลังจากการทดลองนี้ได้มีผู้ค้นพบการผ่าเหล่าแบบอื่น ๆ ในแบคทีเรียอีกหลายอย่างซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป แต่ในที่นี้เพียงแต่จะกล่าวย้ำให้เห็นว่าแบคทีเรียก็มีระบบพันธุกรรมเป็นมรดกตกทอดเหมือนกันกับในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

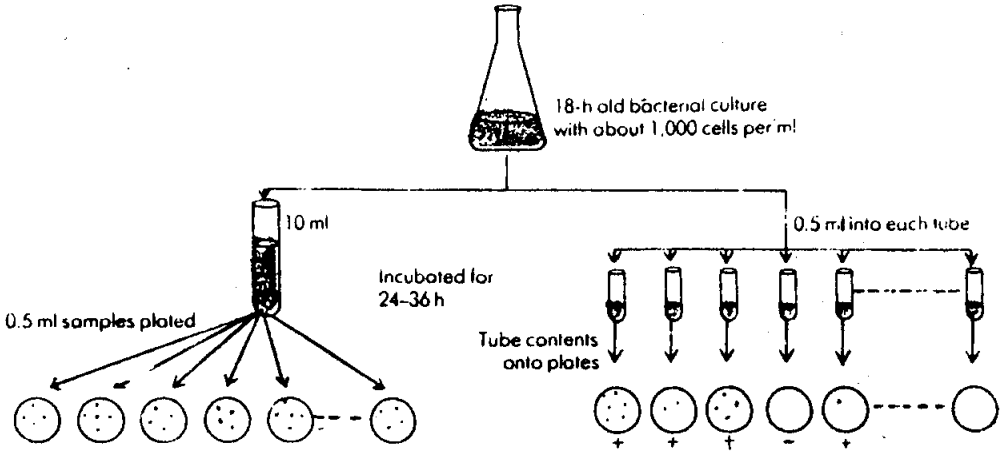
GENE AND DNA

หลายปีมาแล้วนักชีววิทยาได้ตรวจตราเซลล์เพื่อค้นหาสารเคมีซึ่งรวบรวมรายละเอียดเพื่อกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์และอาจถูกถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลานได้จากการค้นคว้าทางชีววิทยาซึ่งอาจถือได้ว่ายิ่งใหญ่ที่สุดในรอบศตวรรษนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงธรรมชาติของสาร



รูปที่ 12-5 Formation of phage-resistant bacteria by mutation. In some cultures (A) a mutation occurs very early, and thus many of the cells are resistant. In others (B) a mutation may occur very late, so that there are few resistant cells. In still others (C) there is no mutation and hence no resistant cells.

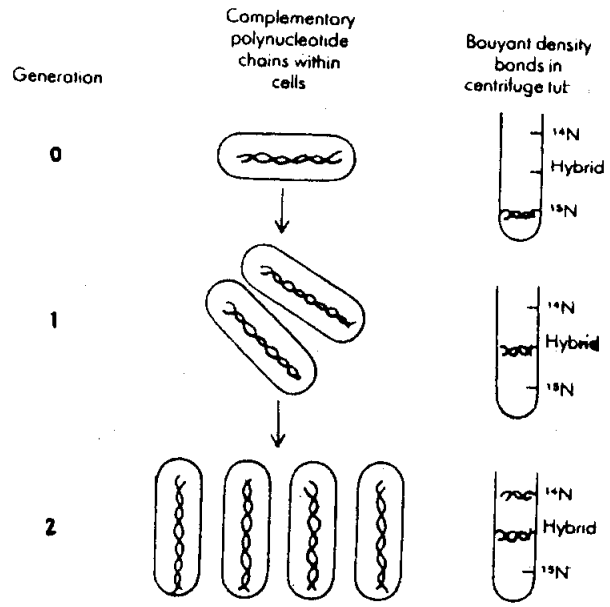
รูปที่ 12-6 The fluctuation test was performed essentially as follows. A series of tubes containing 0.5 ml of cells was incubated without phage until a certain population size was reached. The cultures were then exposed to phage by pouring the contents of each tube into an agar plate containing phage. The number of phage-resistant mutants in each tube was thus determined. The colony counts from such a *series of similar cultures* were then compared with the results of a series of samples taken from *one culture* started with a similar density of cells per milliliter and allowed to reach a similar population number per milliliter. The results showed that resistant bacteria arise spontaneously prior to the exposure to phage since a series of similar cultures yielded results different from those obtained with a series of samples from one culture. (See text for further explanation.)



ซึ่งรวบรวมรายละเอียดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต สารสิ่งนั้นก็คือ deoxyribonucleic acid หรือ DNA หลักฐานแน่นอนซึ่งแสดงว่า DNA เป็นสารสำคัญในการถ่ายทอดลักษณะและรายละเอียดทางพันธุกรรมได้จากการวิจัยทางแบคทีเรียวิทยาของ Avery, MacLeod และ Mc Carty ในปีค.ศ. 1944 โดยแสดงให้เห็นถึงการกลายพันธุ์ (transformation) ของ pneumococcus type ต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงของ pneumococcus จาก type หนึ่งไปเป็นอีก type หนึ่งเกิดขึ้นได้โดยการจัดการของ DNA ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในท้ายบทนี้ ต่อมาในปี 1962 James D.Watson, Francis H.C.Crick และ Maurice H.F. Wilkins ได้รับรางวัลโนเบลจากการแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างโมเลกุลอย่างแท้จริงของ DNA และความสำคัญของ DNA ในการถ่ายทอดรายละเอียดทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต รูปจำลองโมเลกุลของ DNA โดย Watson และ Crick ยังได้เสนอถึงกลไกการเพิ่มจำนวนตัวเอง (replication) ของ DNA อีกด้วย ในบทที่ 11 ได้กล่าวมาแล้วว่า DNA ประกอบด้วยเส้นยาวของ polynucleotide 2 เส้น ขดพันกันเป็นเกลียวคู่ (double helical molecule) เส้นทั้งสองถูกยึดเข้าด้วยกันโดยไฮโดรเจนบอนด์ ระหว่าง cytosine ของเส้นหนึ่งกับ guanine ของอีกเส้นและระหว่าง adenine ของเส้นหนึ่งกับ thymine ของอีกเส้นหนึ่งโดยวิถีทางเช่นนี้ทำให้ polynucleotide ทั้งสองเส้นเป็นคู่ประกอบกันอย่างแท้จริงตลอดทั้งเส้น การดึงดูดกันด้วยไฮโดรเจนบอนด์นั้นอ่อนมากอาจถูกทำให้หลุดออกและเกาะกันเข้ามาใหม่ได้โดยสภาวะทางสรีรวิทยา

ก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ เส้น polynucleotide ทั้งสองจะถูกทำให้แยกออกจากกันโดยการคลายเกลียวแล้วแต่ละเส้นจะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (templete) เพื่อการสังเคราะห์เส้น polynucleotide ซึ่งเป็นคู่ประกอบของตนเองขึ้นมาใหม่ ทำให้ได้เส้น DNA ซึ่งเป็นเกลียวคู่สองชุดและเหมือนเดิมทุกประการ แต่ละเซลล์ที่ถูกแบ่งออกจากเซลล์เดิมจะได้รับเส้นเกลียวคู่ของ DNA หนึ่งชุด การลอกเลียนใหม่ (duplication) แบบนี้โดยใช้ polynucleotide เส้นหนึ่งทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์กำหนดการสังเคราะห์เส้นใหม่ให้เป็นคู่ประกอบของตนถูกเรียกว่ากึ่งอนุรักษ์นิยม (semiconservative) มีผลทำให้เส้นเกลียวคู่ของ DNA แต่ละชุดประกอบด้วยเส้น polynucleotide เดิมที่ถูกใช้เป็นแม่พิมพ์กับเส้นใหม่ซึ่งเป็นคู่ประกอบที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ polynucleotide เส้นเก่าเพียงเส้นเดียวเท่านั้นที่ถูกเก็บเอาไว้ในเส้นเกลียวคู่ DNA ที่เป็นลูกหลาน Meselson และ Stahl ในปี ค.ศ. 1958 ได้พิสูจน์แสดงให้เห็นจริงว่าการคัดลอกและจำลอง (replication) เส้น DNA ขึ้นมาใหม่เป็นกลวิธีแบบกึ่งอนุรักษ์นิยมโดยใช้หลักการของสมดุลย์ระหว่างความหนาแน่นต่าง ๆ กับแรงเหวี่ยง (equilibrium density gradient centrifuga-

tion) พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ไปหลาย ๆ ชั่วอายุ (generation) ในอาหารซึ่งมี heavy isotope ^{15}N จนกระทั่งเซลล์มีธาตุไนโตรเจนที่ DNA เป็น ^{15}N ทั้งหมด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีธาตุไนโตรเจนเป็นไอโซโทปธรรมดาคือ ^{14}N ซึ่งมีน้ำหนักเบาว่าเพียงแค่หนึ่งชั่วอายุ ทำให้ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ของ *E.coli* นี้ทั้งหมดมีความหนาแน่นเป็นแบบผสมระหว่าง DNA ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็น ^{14}N ทั้งหมดกับ DNA ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็น ^{15}N ทั้งหมด ต่อมาภายหลังจากการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกจนครบสองชั่วอายุ พบว่า DNA ครึ่งหนึ่งมีความหนาแน่นเป็นแบบผสม และอีกครึ่งหนึ่งเป็น DNA ขนาดเบาเนื่องจากมีธาตุไนโตรเจนเป็น ^{14}N ทั้งหมด ดังนั้นจึงทำให้เชื่อได้ว่าการคัดเลือกจำลองเส้น DNA คู่ใหม่ขึ้นมานั้นเป็นแบบกึ่งอนุรักษ์นิยม ดังรูปที่ 12-7



รูปที่ 12-7 Distribution of the common or light isotope of nitrogen (^{14}N) and the heavy isotope (^{15}N) in semiconservative DNA replication after density-gradient centrifugation. Blue strands denote ^{15}N; brown strands denote ^{14}N isotopes. (Buoyant density here is the point of density of the salt solution in the gradient at which DNA polymer neither sediments nor floats after centrifugation.)

จากข้อมูลต่าง ๆ อาจสรุปได้ว่ายีน คือลำดับของ nucleotide ช่วงหนึ่งซึ่งอยู่เป็นคู่ใน DNA และเป็นรหัสเฉพาะสำหรับเส้นโพลีเพ็บไทด์ ยีนต่าง ๆ เหล่านี้จะเรียงรายอยู่ในโครโมโซม (chromosome) ในแบคทีเรียและไวรัส (virus) หลายชนิดมีโครโมโซมเพียงอันเดียวเป็นวงกลมโมเลกุลขนาดใหญ่ของ DNA แต่ในไวรัสบางชนิดก็มีโครโมโซมประกอบขึ้นด้วย ribonucleic acid หรือ RNA ขนาดโมเลกุลของโครโมโซมในแบคทีเรีย เช่น *E.coli* มีน้ำหนัก 2.5×10^9 daltons (หนึ่ง dalton เท่ากับน้ำหนักไฮโดรเจนหนึ่งอะตอม) และมียีนประมาณ 3,800 ยีน ใน bacteriophage เช่น bacteriophage $\emptyset \times 174$ มีโครโมโซมขนาด 1.7×10^6 ดัลตันและมียีนเจ็ดยีน

แบคทีเรียเกือบทั้งหมดมีโครโมโซมเป็นจำนวน haploid ซึ่งหมายความว่าไม่มีโครโมโซมที่เป็นคู่ซึ่งเหมือนกัน ผิดจากพวกยูคารีโอติกเซลล์ส่วนใหญ่ (ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์) ซึ่งเป็น diploid คือมีโครโมโซมเป็นคู่ ๆ ซึ่งเหมือนกัน (homologous chromosome) แบคทีเรียทั้งหมดที่ศึกษากันในปัจจุบันมีโครโมโซมเพียงอันเดียวต่อจีโนม (genome)

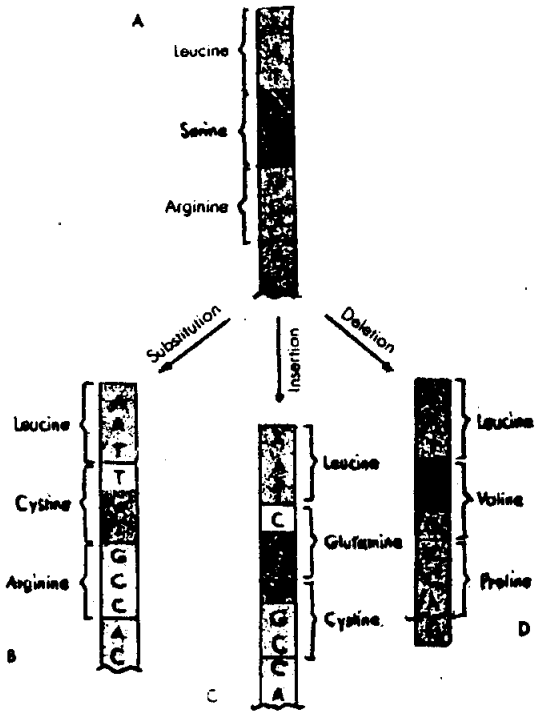
กลไกระดับโมเลกุลของการผ่าเหล่า

ที่ระดับโมเลกุล การผ่าเหล่าก็คือการเปลี่ยนแปลงลำดับของ nucleotide ใน DNA ซึ่งมีผลทำให้รายละเอียดที่มีอยู่ในโมเลกุลของ DNA เปลี่ยนแปลงไปและมีผลทำให้มีการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติเช่น มีการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน โปรตีนที่ได้อาจทำงานแลวลงหรือทำงานไม่ได้เลย เช่น โปรตีนที่ถูกใช้เป็นเอนไซม์เป็นต้น

เนื่องจาก DNA เป็นโมเลกุลซึ่งค่อนข้างคงที่ การผ่าเหล่าจึงเกิดขึ้นได้ยาก การผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นเองในแบคทีเรียระหว่างการเจริญเติบโตตามปกติจะมีอัตราระหว่าง 10^{-6} ถึง 10^{-10} ต่อแบคทีเรียต่อชั่วอายุ ซึ่งหมายความว่ามีแบคทีเรียเพียงหนึ่งเซลล์เท่านั้นในหนึ่งถึงหมื่นล้านเซลล์ที่มีการผ่าเหล่าไป โดยปกติตัวผ่าเหล่า (mutant) ในประชากรหนึ่งมักถูกกลบเกลื่อนหรือปิดบังด้วยเซลล์ปกติที่ไม่ได้ผ่าเหล่าไปเนื่องจากมีจำนวนมากกว่าในการค้นหาตัวผ่าเหล่าจำเป็นจะต้องคัดเลือกเอาจากประชากรขนาดใหญ่ ตัวอย่างเช่น Luria และ Delbruck ค้นหาตัวผ่าเหล่าซึ่งทนทานต่อ phage โดยใส่ bacteriophage จำนวนมากลงไปในเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้ เซลล์ทุกเซลล์ที่อ่อนไหวจะถูกฆ่าตาย มีแต่เซลล์ผ่าเหล่าซึ่งทนทานต่อ phage เท่านั้นที่เหลือรอดเจริญเติบโตเป็นโคโลนีขึ้น

มีหลายวิถีทางซึ่งทำให้ลำดับการเรียงตัวของ purine-pyrimidine base ใน DNA เปลี่ยนแปลงเช่นสับเปลี่ยนที่กันระหว่าง nucleotide ในเส้น DNA หรือทำให้ nucleotide อันใดอันหนึ่งหรือหลายอันหลุดหายไป หรือโดยการสอดใส่เพิ่มเติม nucleotide เข้าไปในเส้น DNA ดังรูปที่ 12-8 การสับเปลี่ยนทดแทนคู่ของเบส (Base) อาจแบ่งออกได้เป็นสองแบบโดยทั่วไปคือ (1) การสับเปลี่ยนจาก purine อย่างหนึ่งเป็น purine อีกอย่างหนึ่ง หรือจาก pyrimidine อย่างหนึ่งเป็น pyrimidine อีกอย่างหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงแบบนี้ถูกเรียกว่า transition (2) การสับเปลี่ยนทดแทนจาก purine เป็น pyrimidine หรือจาก pyrimidine เป็น purine การเปลี่ยนแปลงแบบนี้ถูกเรียกว่า transversion

รูปที่ 12-8 A schematic illustration of DNA base changes resulting in mutations. (A) The sequences of bases in three codons and the corresponding amino acids; (B) substitution of thymine (T) for adenine (A) at the fourth position may occur by replication error, the result being a change in the second amino acid in the sequence; i.e., cystine replaces serine; (C) insertion of an additional nucleotide between the third and fourth bases results in a frame shift in reading the codons so that all the codons following the insertion are altered and all amino acids changed; (D) loss or deletion of a nucleotide likewise results in a frame shift in reading the codons by creating a new series of triplets, altering the sequence of amino acids.



การสับเปลี่ยนคู่ของเบสทำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ในสามแบบคือ

1. เปลี่ยนแปลงองค์สาม (triplet) ของเบส ทำให้ codon ใน mRNA ซึ่งเฉพาะเจาะจงต่อกรดอะมิโนแตกต่างไปจากที่ปรากฏอยู่ในโปรตีนปกติ การผ่าเหล่าแบบนี้ถูกเรียกว่า missense mutation โปรตีนที่ได้เป็นโปรตีนซึ่งไม่อาจทำงานได้หรือทำงานได้น้อยผิดจากโปรตีนปกติ

2. ทำให้ได้ codon ใน mRNA เป็นรหัสบอกการสิ้นสุดขบวนการสังเคราะห์โปรตีน เช่น UAA, UAG และ UGA ก่อนถึงกำหนดจริง ทำให้ได้เส้นโปรตีนยาวไม่สมบูรณ์ใช้ทำงานไม่ได้ การผ่าเหล่าแบบนี้ถูกเรียกว่า nonsense mutation

3. ทำให้ codon ในเส้น mRNA เปลี่ยนแปลงแต่ไม่ทำให้ลำดับของกรดอะมิโนในเส้นโพลีเพ็บไทด์เปลี่ยนแปลง เนื่องจาก codon ที่เปลี่ยนไปนั้นมีความหมายเหมือนเดิม การผ่าเหล่าแบบนี้ถูกเรียกว่า neutral mutation

ได้ทราบกันมาแล้วว่าในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีน การอ่านรหัสทางพันธุกรรมจะเริ่มต้นจากปลายข้างหนึ่งของยีนซึ่งใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) และเกิดขึ้นเป็นช่วง ๆ ช่วงละสามเบส เนื่องจากเหตุผลอันนี้การผ่าเหล่าแบบทำให้ เบสนั้นผิดช่วงไป การผ่าเหล่าขึ้น

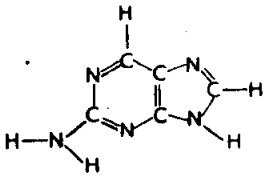
เพิ่มเติมเข้ามาโดยทั่วไปจะทำให้ยีนถูกใช้งานไม่ได้โดยสิ้นเชิง หรืออาจกล่าวได้ว่าโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นโดยยีนนี้จะเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ซึ่งใช้งานไม่ได้เลย โปรตีนหรือเอนไซม์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยการผ่าเหล่าแบบใส่เติมเพิ่มเข้ามาหรือหลุดหายไปของเบสเป็นผลเนื่องมาจากกรอบของการอ่านรหัสทีละสามเบสนั้นผิดช่วงไป การคลาดเคลื่อนของกรอบ (frame shift) ในการอ่านรหัสได้แสดงไว้ในรูปที่ 12 8

จากการบรรยายข้างต้นอาจสรุปได้ว่าการผ่าเหล่าทั้งหมดเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสใน DNA การผ่าเหล่าหลายอย่างที่เกิดขึ้นจากการใส่เติมเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของคู่ nucleotide อาจเป็นผลเนื่องมาจากการไขว้กัน (crossing over) ของเส้น DNA จุดซึ่งคู่ของเส้น DNA ขาดหลุดออกจากกันและเชื่อมต่อกันเข้ามาใหม่อาจถูกแทนที่หรือสับเปลี่ยนด้วยเบสคู่หนึ่งของ DNA ต่างเส้นกันซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดไฮโดรเจนบอนด์ผิดพลาดในระหว่างการลอกแบบจำลองขึ้นมาใหม่ (replication) การผ่าเหล่าในบางครั้งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากรังสีอุลตราไวโอเลตหรือ x-ray ทำให้เกิดความเสียหายแก่ DNA เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งของสิ่งแวดล้อมซึ่งไม่อาจหลบหนีไปไหนได้ ดังนั้นจึงอาจมีส่วนร่วมในการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous mutation) อัตราการผ่าเหล่าสามารถถูกทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยทำให้เชื้อแบคทีเรียได้รับรังสีดังกล่าว สิ่งใดก็ตามซึ่งเพิ่มอัตราการผ่าเหล่าจะถูกเรียกว่าสิ่งกระตุ้นการผ่าเหล่า (mutagen) การผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นโดยใช้สิ่งกระตุ้นถูกเรียกว่าการผ่าเหล่าจากการกระตุ้น (induced mutation) การผ่าเหล่าจากการกระตุ้นสามารถเกิดขึ้นได้บ่อยครั้งกว่าที่เกิดขึ้นเองแต่รูปแบบที่ผ่าเหล่าไปนั้นไม่แตกต่างกัน

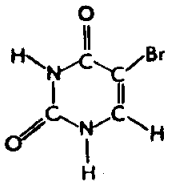
สิ่งกระตุ้นการผ่าเหล่าที่น่าสนใจอีกพวกหนึ่งคือสารเคมีซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของ DNA เนื่องจากความเฉพาะเจาะจงของ DNA ขึ้นอยู่กับไฮโดรเจนบอนด์ระหว่าง purine และ pyrimidine และไฮโดรเจนบอนด์เป็นบอนด์อย่างอ่อนเกิดขึ้นระหว่างอะตอมไม่กี่อะตอมบนแต่ละโมเลกุล ดังนั้นสิ่งใดซึ่งมีผลต่ออะตอมเหล่านี้จะสามารถทำให้เกิดการผ่าเหล่าได้ ตัวอย่างเช่น nitrous acid สามารถกำจัด amino group จาก purine และ pyrimidine ได้จึงเป็นสิ่งกระตุ้นการผ่าเหล่าที่สามารถมาก นอกจากนี้ยังมีสารอื่นซึ่งมีประโยชน์มากในการทำให้เกิดการผ่าเหล่า คือ สารซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเบส (Base analog) ต่าง ๆ เช่น 2-aminopurine หรือ 5-bromouracil ดังรูปที่ 12-9 ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกับ purine หรือ pyrimidine base ปกติมาก สารประกอบเหล่านี้อาจเข้าไปรวมอยู่ใน DNA โดยบังเอิญทำให้เกิดการผ่าเหล่านั้น อย่างไรก็ตามควรระลึกไว้เสมอว่าสิ่งกระตุ้นการผ่าเหล่าสามารถเพิ่มอัตราการ

ผ่าเหล่าได้สำหรับทุกยีนไม่แต่เฉพาะยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นในการใช้สิ่งกระตุ้นการผ่าเหล่าจึงไม่อาจกำหนดให้ยีนใดยีนหนึ่งโดยเฉพาะมีอัตราการผ่าเหล่าเพิ่มขึ้นได้

รูปที่ 12-9 Two base-analog mutagens that are similar to normal DNA bases. Compare with the structures of normal bases in Fig. 11-5. 2-Aminopurine is an analog of adenine and can pair with thymine or cytosine. 5-Bromouracil (which is more effective as its deoxynucleoside) is an analog of thymine and is quantitatively incorporated in its place in the DNA of bacteria and phages. Base-pairing with guanine is possible besides pairing with adenine.



2-Aminopurine



5-Bromouracil

ประเภทของแบคทีเรียผ่าเหล่า

คุณสมบัติทุกอย่างของเซลล์มีชีวิตโดยแท้จริงแล้วถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นการผ่าเหล่าของยีนจึงมีผลทำให้ลักษณะและความสามารถของสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงไปประเภทต่าง ๆ ของแบคทีเรียผ่าเหล่าอาจรวบรวมได้ดังนี้

1. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงความทนทานเพิ่มขึ้นต่อสิ่งยับยั้งโดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ

2. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการหมักหรือเพิ่มหรือลดความสามารถในการผลิตสารขั้นสุดท้าย

3. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงการขาดสารอาหาร เช่น ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนมากยิ่งขึ้นเพื่อการเจริญเติบโต

4. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโคโลนี หรือความสามารถในการทำให้เกิดสี ดูรูปที่ 12-10

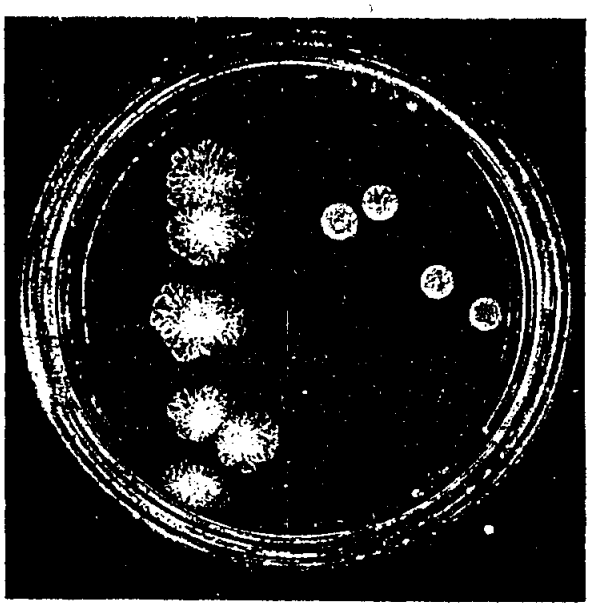
5. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (antigenic mutant)

6. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงความทนทานต่อการกระทำของ phage

7. แบคทีเรียผ่าเหล่าซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงในลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สูญเสียความสามารถในการสร้างสปอร์ แคปซูล หรือ แฟลกเจลล่า เป็นต้น

จากรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียโดยขบวนการผ่าเหล่าดังกล่าวรวบรวมไว้ข้างต้นจะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงบางอย่างก็คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการปรับปรุงตัวเองอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบให้แน่นอนก่อนว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นเป็นผลเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมหรือการผ่าเหล่าจริง

มีการปฏิบัติหลายอย่างซึ่งเกี่ยวข้องกับการผ่าเหล่าของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์บางอย่างสามารถกลายเป็นพวกที่ทนทานต่อสารปฏิชีวนะได้ ข้อเท็จจริงอันนี้มีความสำคัญมากในการรักษาโรค เนื่องจากสารปฏิชีวนะเริ่มแรกสามารถควบคุมการติดเชื้ออย่างได้ผลแต่ต่อมากลายเป็นไม่สามารถควบคุมได้หรือควบคุมได้น้อยลง เนื่องจากการเกิดการผ่าเหล่าซึ่งทนทานต่อสารปฏิชีวนะ ในแง่ของอุตสาหกรรมการหมักก็มีทางเป็นไปได้ที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ผ่าเหล่าทางชีวเคมีซึ่งสามารถทำให้เกิดผลผลิตจำนวนมาก ตัวอย่าง เช่น ผลผลิตของเพ็นนิซิลิน (penicillin) ซึ่งผลิตขึ้นเป็นการค้าได้ถูกทำให้เพิ่มขึ้นอย่างน่าพิศวงโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ผ่าเหล่าของ *Penicillium*. ในการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แบบอย่าง (typical species) จำเป็นต้องป้องกันการเกิดตัวผ่าเหล่ามิฉะนั้นเชื้ออาจไม่สามารถใช้เป็นแบบอย่างได้ต่อไป



รูปที่ 12-10 Colony variation of *Pseudomonas pseudomallei*. (*Left*) Large, lacy, rough colonies before adaptation to mice. (*Right*) Small, intermediate, rough, yellow colonies after adaptation to mice. (*From C. Nigg et al., J Bacteriol, 71: 530, 1956.*)

แบคทีเรียและจุลินทรีย์ผ่าเหล่าต่าง ๆ ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาขบวนการทางชีวเคมีอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะปฏิกริยาในการสังเคราะห์ต่าง ๆ ตัวอย่างต่อไปนี้จะได้แสดงให้เห็นถึงการใช้ตัวผ่าเหล่าซึ่งแสดงการขาดสารอาหารในการศึกษาขบวนการสังเคราะห์สารบางอย่างในเซลล์

ได้ทราบกันมาแล้วว่าเชื้อปกติของ *Escherichia coli* สามารถเจริญเติบโตในอาหารซึ่งมีแต่เกลืออนินทรีย์เป็นแหล่งของธาตุไนโตรเจนอย่างเดียวได้โดยไม่ต้องการกรดอะมิโนต่าง ๆ จึงหมายความว่าจุลินทรีย์นี้ปกติมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนต่าง ๆ ของตนจากสารอินทรีย์ไนโตรเจนได้ เมื่อต้องการทราบถึงขั้นตอนทางเคมีในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น arginine ก็จะกระทำได้โดยนำ *E.coli* ปกติซึ่งมักเรียกว่า wild type หรือ parent หรือ prototroph มาทำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยสิ่งกระตุ้นแล้วคัดแยกเซลล์ผ่าเหล่าต่าง ๆ ซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตได้จนกว่าจะมี arginine ปรากฏอยู่ในอาหาร ดูรูปที่ 12-11 ตัวผ่าเหล่าประเภทนี้แสดงความต้องการสารอาหารนอกเหนือจากเซลล์ที่เป็นพ่อแม่ (parent type) จึงถูกเรียกว่า auxotroph ขบวนการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นโดยพวก prototroph จะแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังต่อไปนี้ ซึ่ง E ในที่นี้หมายถึงกรดอะมิโน arginine

gene a gene b gene C gene D

enzyme a enzyme b enzyme C enzyme D

A ——→ B ——→ C ——→ D ——→ E

A, B, C และ D เป็นการสื่อกลาง (precursor) ในลำดับปฏิกริยาซึ่งนำไปสู่การสังเคราะห์ E ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสร้างเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแปลงสารประกอบ A——→B ซึ่งถูกควบคุมโดย gene a ; B—C โดย gene b และต่อ ๆ กันมา เมื่อเป็นดังนี้จึงจำเป็นต้องคัดแยกตัวผ่าเหล่าซึ่งแสดงการขาด arginine ให้ละเอียดย่อยออกไปอีกว่ายีนใดในลำดับปฏิกริยานี้ขาดหายไปหรือใช้การไม่ได้โดยตรวจสอบสารประกอบซึ่งนอกเหนือจาก arginine แล้วมีสารประกอบใดบ้างที่สามารถทำให้ตัวผ่าเหล่าเจริญเติบโตได้ แสดงว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นสารสื่อกลางในลำดับปฏิกริยานำไปสู่การสังเคราะห์ arginine และทำให้ทราบได้ว่ามีขั้นตอนใดบ้างในขบวนการสังเคราะห์ arginine ที่ถูกขัดขวางจึงพลอยทำให้ทราบถึงขั้นตอนปฏิกริยาต่าง ๆ ที่นำไปสู่การสังเคราะห์ arginine ได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น ถ้าสาร C ทำให้มีการเจริญเติบโตของตัวผ่าเหล่าที่ต้องการ arginine แสดงว่าตัวผ่าเหล่านี้ขาด gene a หรือ gene b ยีนใดยีนหนึ่งหรือทั้งสองยีนจึงทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ arginine จาก A ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นได้ เมื่อได้ทำการคัดแยกและตรวจสอบความต้องการสารอาหารของตัวผ่าเหล่าต่าง ๆ ซึ่งแสดงการขาดสาร

สิ่งใดสิ่งหนึ่งได้แล้วก็สามารถทราบถึงเส้นทางการสังเคราะห์สารสิ่งนั้นได้ เช่น กรดอะมิโน ไวตามิน และสารประกอบอื่น ๆ เป็นต้น

ในการพยายามคัดแยกตัวผ่าเหล่าจากเชื้อแบคทีเรียจะต้องนึกไว้เสมอว่าถ้ามีเซลล์ผ่าเหล่าปรากฏอยู่ก็จะปรากฏอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องนำเซลล์มาเป็นจำนวนมากเพื่อตรวจหาตัวผ่าเหล่า เพื่อเป็นการประหยัดแรงงานได้มีวิธีการที่ฉลาดหลายอย่างซึ่งช่วยให้สามารถคัดแยกตัวผ่าเหล่าประเภทที่ต้องการได้

ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างวิธีการคัดแยกตัวผ่าเหล่าทางโภชนาการ (auxotroph) ของ *E.coli* ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

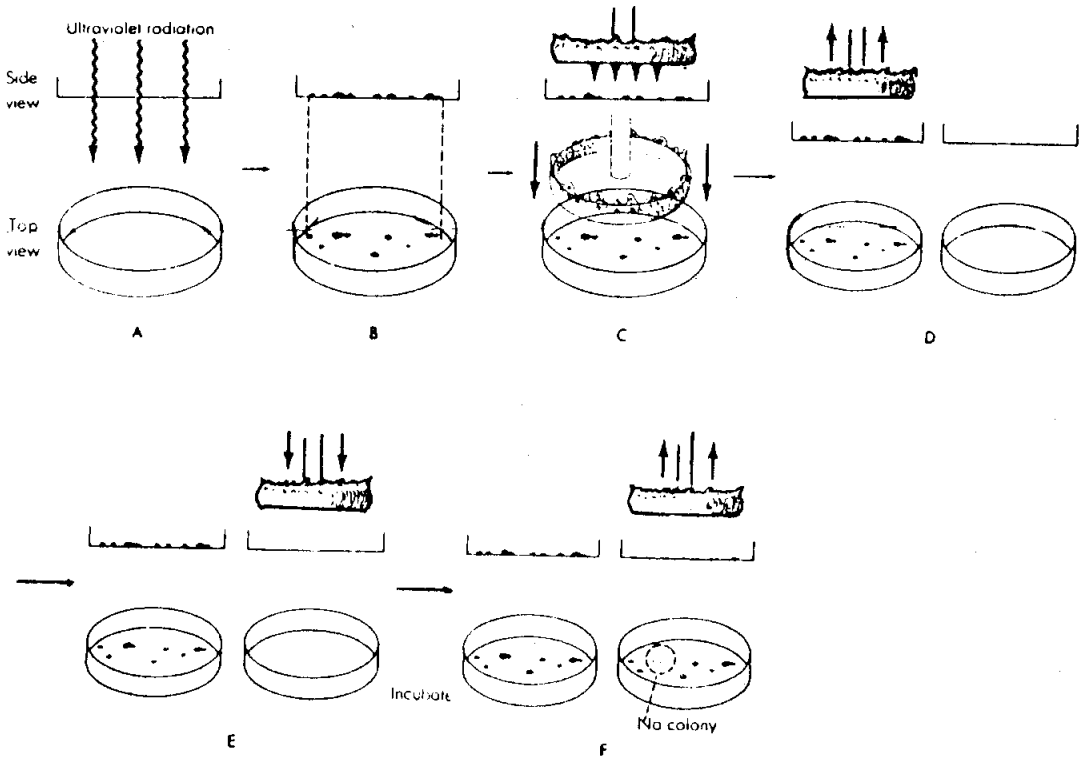
1. *E.coli* สายพันธุ์ซึ่งเป็น prototroph ถูกนำมาฉายด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตเพื่อทำให้มีอัตราการผ่าเหล่าสูงขึ้น แต่ขบวนการนี้ก็ทำให้เซลล์ส่วนใหญ่ถูกฆ่าทำลาย

2. เชื้อที่ได้รับการฉายรังสีถูกถ่ายลงในอาหารซึ่งสมบูรณ์ทางโภชนาการ (nutritionally complete medium) เพื่อเซลล์ทั้งหมดที่รอดตายจากขั้นตอนแรกจะได้เจริญเติบโต

3. ถ่ายเชื้อจากขั้นตอนที่สามลงสู่อาหารซึ่งมีโภชนาต่ำ (minimal medium) ผสมด้วยเพ็นนิซิลลิน พวก auxotroph จะไม่เจริญเติบโตในอาหารซึ่งมีโภชนาต่ำ ดังนั้นจึงไม่ได้รับผลจากเพ็นนิซิลลิน เพ็นนิซิลลินจะกระทำต่อเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตเท่านั้น ดังนั้นจึงฆ่าทำลายเซลล์พวกที่ยังไม่ได้ผ่าเหล่าไป การกระทำเช่นนี้จึงเป็นการกำจัดจุลินทรีย์พวกที่ไม่ได้รับความสนใจออกจากการทดลอง

4. เซลล์ซึ่งรอดตายจากอาหารซึ่งมีเพ็นนิซิลลินในขั้นตอนที่สามจะถูกนำกลับมาเพาะเลี้ยงบนอาหารซึ่งสมบูรณ์ทางโภชนาการอีกครั้งหนึ่ง เช่น อาหารซึ่งมีกรดอะมิโน วิตามิน และอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียครบทุกอย่าง ดังนั้นเซลล์ซึ่งมีชีวิตจึงทำให้เกิดโคโลนีขึ้น

5. ประชากรเซลล์ในแต่ละโลโคนีที่ปรากฏบนอาหารสมบูรณ์ในขั้นตอนที่สี่ จะถูกนำมาตรวจสอบการเป็นตัวผ่าเหล่าทางโภชนาการ (auxotrophic strain) การตรวจสอบจะถูกกระทำให้เสร็จภายในครั้งเดียวโดยใช้กลวิธีการจำลองโคโลนีบนผิววุ้นอาหาร (replica plating technique) ดังรูปที่ 12-1 ในขณะที่ผ้ากำมะหยี่ปราศจากเชื้อถูกกดทาบอย่างเบา ๆ บนผิวหน้าทั้งหมดของวุ้นอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ เซลล์จำนวนหนึ่งจากแต่ละโคโลนีจะเกาะติดอยู่ที่ขนของผ้ากำมะหยี่และทำหน้าที่เป็นแหล่งเชื้อเมื่อผ้ากำมะหยี่นี้ถูกนำไปกดทาบบนผิวของอาหารโภชนาการต่ำในจานเลี้ยงเชื้ออีกจานหนึ่ง ด้วยกลวิธีนี้โคโลนีทั้งหมดจากจานเลี้ยง



รูปที่ 12-11 Replica plating as used for isolating nutritional mutants of *E. coli*. (A) Bacterial suspension placed in open half of petri dish and exposed to mutagenic agent, such as ultraviolet radiation. (B) Sample from (A) plated on surface of a "complete" medium like nutrient agar. The plate is incubated; after incubation, the exact position of colonies on the plate is noted. (C) A sterile replica plating unit is gently pressed to the surface of plate (B), then raised (D), and then pressed to the surface of a plate of "minimal" agar medium (E). The positioning of the replica plating unit on the minimal agar must be precise, so that colony locations will be comparable on each of the two plates. The plates will be replicas of one another. The "minimal" agar in the plate in (E) consists of inorganic salts and glucose, nutrients which normally permit growth of *E. coli*. After incubation (F), colonies appear on the new plate at most, but not all, of the positions corresponding to locations of colonies on the original plate. It may be assumed that the organisms that failed to develop are nutritional mutants; i.e., they are not able to grow on an inorganic salts-glucose medium, a characteristic which they originally possessed.

เชื้อหนึ่งจะถูกถ่ายทอดไปยังอีกจานหนึ่งโดยการกระทำเพียงครั้งเดียว และตำแหน่งของเชื้อบนอาหารในจานใหม่ก็จะตรงกับตำแหน่งของโคโลนีในจานแรก เชื้อซึ่งติดมากับขนผ้ากำมะหยี่มีปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับจานอื่น ๆ ได้อีกหลายจาน

6. โคโลนีใดซึ่งไม่อาจเจริญเติบโตบนอาหารโภชนาการต่ำได้ แสดงว่าโคโลนีนั้น เป็นโคโลนีของตัวผ่าเหล่าทางโภชนาการ แล้วคัดแยกเพื่อนำไปศึกษาตรวจสอบการขาดสารอาหารที่แน่นอนต่อไปได้

กลวิธีการจำลองโคโลนีบนผิวรุ้นอาหารได้ถูกเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1952 โดย J. Lederberg และ E.M. Lederbery

การรวมกันใหม่ของแบคทีเรีย

การรวมกันใหม่ทางพันธุกรรม หมายถึง การรวมกันของยีนซึ่งทำให้เกิดลูกหลานที่มียีนแตกต่างจากที่ปรากฏอยู่ในพ่อแม่ ในระบบทางพันธุกรรมชั้นสูง เช่น ที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูง การรวมกันใหม่ของยีนเกิดขึ้นภายหลังจากการเข้ามาอยู่ด้วยกันในเซลล์สืบพันธุ์ (gametic cell) แล้วต่อมาจึงรวมกันเป็นหนึ่ง diploid nucleus ยีนทั้งหมดของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองจะถูกทำให้รวมกัน การรวมกันใหม่อาจเกิดขึ้นจากการจัดเป็นพวกโดยอิสระของโครโมโซมหรือโดยขบวนการไขว้ข้าม (crossing over) ระหว่างโครโมโซมซึ่งเหมือนกัน (homologous chromosome) ส่วนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็น haploid และไม่ถูกทำให้แตกต่างเป็นเซลล์สืบพันธุ์หรือเซลล์ร่างกาย (somatic cell) แต่ละเซลล์สามารถที่จะทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) ได้ในแบคทีเรียซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ เซลล์ซึ่งถือได้ว่าเป็นเซลล์สืบพันธุ์จะถูกทำให้แตกต่างกันโดยหน้าที่ในการทำงานเป็นสองแบบ คือ เซลล์ผู้ให้ (donor or male) และเซลล์ผู้รับ (recipient or female) โดยทั่วไป และเป็นเอกลักษณ์สำหรับแบคทีเรีย คือ เฉพาะยีนบางส่วนของเซลล์ผู้ให้เท่านั้นที่ถูกถ่ายให้แก่เซลล์ผู้รับ ไม่ใช่ยีนทั้งหมด (genome) ของตนและไซโตพลาสซึมของเซลล์ผู้ให้ก็เช่นเดียวกัน เซลล์ผู้รับจึงกลายเป็น zygote ชนิดที่เรียกว่า merozygote ซึ่งเป็น diploid ที่ไม่สมบูรณ์ การรวมตัวกันใหม่จะเกิดขึ้นเฉพาะตรงส่วนของยีนที่เป็น diploid เท่านั้น และเกิดเมื่อมีการสังเคราะห์หรือจำลองโครโมโซมขึ้นมาใหม่เพื่อส่งต่อให้แก่เซลล์ลูกหลาน การถ่ายทอด DNA จากเซลล์ผู้ให้ไปยังเซลล์ผู้รับอาจทำได้ในสามวิถีทางด้วยกัน คือ

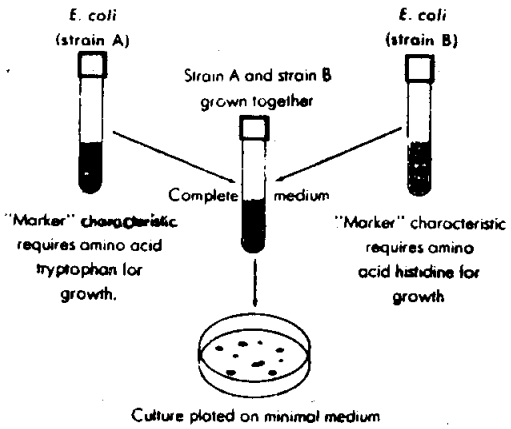
(1) การผสมพันธุ์หรือการเชื่อมต่อติดกันของเซลล์ (mating or conjugation)

(2) การนำพาโดย bacteriophage (transduction) และ

(3) การดูดรับเอา DNA อิสระจากสิ่งแวดล้อม (transformation)

การผสมพันธุ์ของแบคทีเรีย (Bacterial conjugation)

ถึงแม้ว่า Luria และ Delbruck ในปี ค.ศ. 1943 ได้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียมีระบบการรับมรดกทางพันธุกรรมคงที่ แต่ก็ไม่สามารถทำการสำรวจระบบได้โดยการทดลอง เนื่องจากยังไม่พบระบบการผสมพันธุ์ของแบคทีเรีย พันธุกรรมของพืชและสัตว์ขึ้นอยู่กับวงจรการสืบพันธุ์ทางเพศตามปกติของสิ่งมีชีวิตนั้น ตัวผ่าเหล่าซึ่งแตกต่างกันของสายพันธุ์หนึ่งมีโอกาสที่จะผสมพันธุ์กันได้แล้วทำให้ได้ลูกผสม (recombinant) มีลักษณะผ่าเหล่าของทั้งสองตัวอย่าง เช่น ถั่วเม็ดเรียบสีเหลืองอาจผสมกับถั่วผิวย่นสีเขียวทำให้ได้ลูกหลานจำนวนหนึ่งมีลักษณะเหมือนกับพ่อแม่ (parental type) คือ เม็ดเรียบสีเหลืองหรือผิวย่นสีเขียว และอีกจำนวนหนึ่งมีลักษณะผสม คือ ผิวเรียบสีเขียวหรือผิวย่นสีเหลือง เพียงแค่การผสมข้ามกันเช่นนี้ และสังเกตลักษณะลูกหลานก็ถือได้ว่าเป็นงานทางพันธุศาสตร์ การรวมกันใหม่ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียได้ถูกแสดงให้ทราบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1946 โดย Lederberg และ Tatum เขาทั้งสองทราบว่าการรวมกันใหม่ทางพันธุกรรมในแบคทีเรียนั้นน้อยมาก จึงไม่มีใครค้นพบทั้งที่ได้มีความพยายามเป็นอย่างมาก เขาได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *escherichia coli* ซึ่งเป็น auxotrop สองพันธุ์แตกต่างกันในหลอดอาหารหลอดเดียว แล้วปล่อยให้มีโอกาสได้ผสมพันธุ์กัน ดังรูปที่ 12-12 เมื่อนำเชื้อผสมของทั้งสองใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโภชนาการต่ำซึ่งมีแต่พวก prototroph เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ พบว่ามีโคโลนีของเซลล์ที่เป็น proto-



รูปที่ 12-12 Evidence for conjugation in bacteria. The two specific characteristics of the *E. coli* strains are (A) trp⁻, a tryptophan auxotroph, and (B) his⁻, a histidine auxotroph. The mixture is plated on a minimal medium; growth allows for the selection of prototrophic recombinants (organisms which can synthesize all their amino acid requirements).

troph ปรากฏขึ้น จึงทำให้ทราบได้ว่าจะต้องเป็นผลเนื่องมาจากการรวมกันใหม่ทางพันธุกรรมของ auxotroph ทั้งสอง

ในการทดลองของ Lederberg และ Tatum เขาได้ใช้ polyauxotroph (ตัวผ่าเหล่าซึ่งต้องการสารอาหารมากกว่าหนึ่งอย่าง) เพื่อป้องกันไม่ให้สงสัยว่า prototroph นั้นเกิดจากการผ่าเหล่ากลับเป็น wild type ได้เอง ทั้งนี้เนื่องจาก polyauxotroph มียีนผ่าเหล่าหลายยีน จึงยากที่จะกลับกลายเป็นปกติหรือ prototroph ได้ง่าย เช่น ถ้ามีการผ่าเหล่าสามลักษณะหรือสามยีน โอกาสที่กลับคืนเป็นปกติหรือเป็น wild type ก็มีเพียงหนึ่งใน $(10^{-6})^3$ เท่านั้น

นอกจากนี้ ยังได้มีการพิสูจน์ว่า prototroph ไม่ได้เกิดขึ้นโดยขบวนการ transformation ซึ่งถูกค้นพบก่อนโดย Griffith ในปี ค.ศ. 1928 ที่จะกล่าวถึงในตอนต่อไป โดยใช้หลอดแก้วรูปตัว "ยู" ใส่เชื้อไว้ทั้งสองข้าง และมีแผ่นแก้วพรุนกันไม่ให้เซลล์ผ่าเหล่าทั้งสองพวกสัมผัสกันได้ แต่สารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น DNA และสารละลายต่าง ๆ สามารถไหลผ่านไปมาหากันได้โดยอิสระระหว่างเชื้อทั้งสอง ผลปรากฏว่าไม่มี prototroph หรือเซลล์ลูกผสมเกิดขึ้นในเชื้อทั้งสอง จึงแสดงว่าแบคทีเรียมีการผสมพันธุ์กันทางเพศอย่างแท้จริง

ตั้งแต่ปี 1946 เป็นต้นมา พันธุศาสตร์ของแบคทีเรียได้เจริญขึ้นเป็นอย่างมาก โดยใช้สายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *E. coli* ที่เป็นตัวผ่าเหล่าเช่นเดียวกันกับที่ Lederberg และ Tatum ได้ใช้ทำการทดลอง ทั้งนี้ เนื่องจาก prototroph ของ *E. coli* สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายบนอาหารซึ่งมีแต่น้ำตาลกลูโคสกับเกลือแร่ต่าง ๆ เท่านั้น และเจริญเติบโตได้รวดเร็ว อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ซึ่งมีรายละเอียดเป็นที่รู้จักกันดี จากการศึกษาของนักจุลชีววิทยาหลายท่าน ทำให้ได้ทราบถึงขบวนการรวมตัวกันใหม่ทางเพศของแบคทีเรียได้ชัดเจนยิ่งขึ้นและอาจสรุปได้ดังนี้

1. การถ่ายทอดสารพันธุกรรมจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง จะต้องอาศัยการสัมผัสเชื่อมต่อกันอย่างแท้จริงระหว่างแบคทีเรียที่ผสมพันธุ์กัน สารพันธุกรรมจะถูกส่งผ่านสิ่งเชื่อมต่อบางชนิด เช่น sex pilus ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป ขบวนการนี้ถูกเรียกโดยทั่วไปว่าการเชื่อมต่อ (conjugation) แบคทีเรียซึ่งเชื่อมต่อกันเป็นคู่อาจแสดงให้เห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในรูปที่ 12-13

2. ยังได้มีการค้นพบว่า ยีนของ *E. coli* มีการเชื่อมต่อกันเป็นลำดับและสามารถทำเป็นแผนที่เส้นตรงได้เช่นเดียวกันกับแผนที่ของยีน (genetic map) ในพืชและสัตว์ชั้นสูง จึงหมายความว่าแบคทีเรียมียีนเรียงต่อกันเป็นโครงสร้างและมีการทำงานคล้ายกับโครโมโซมของ

สิ่งมีชีวิตชั้นสูง การค้นพบเช่นนี้ได้มาจากการทดลองของ Lederberg โดยใช้ polyauxotroph ต่าง ๆ เป็นคู่ผสมพันธุ์กัน เมื่อ polyauxotrophic mutant เชื่อมต่อกันทำให้เกิดไซโกต (zygote) ซึ่งมีโครโมโซมจากแต่ละเซลล์ที่เป็นพ่อแม่อยู่รวมกันในระหว่างการแบ่งตัวลดจำนวนจาก diploid เป็น haploid บางตอนของโครโมโซม จะมีการไขว้ข้ามเพื่อแลกเปลี่ยนกัน ดังตัวอย่างแผนภูมิต่อไปนี้

Met^+ Bio^+ Thr^- Leu^- Thi^-

Met^- Bio^- Thr^+ Leu^+ Thi^+

รูปที่ 12-13

Electron micrograph of conjugating E. coli cells.

สัญลักษณ์ต่าง ๆ หมายถึง methiomine, biotin, threonine, leucine และ thiamine ตามลำดับ เครื่องหมาย + และ – กำกับข้างบน หมายถึงการเป็น prototroph และ auxotroph ตามลำดับ หรือหมายถึงมีความสามารถในการสังเคราะห์สารนั้น และไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารนั้นตามลำดับ จากตัวอย่างนี้แสดงให้เห็นถึงการไขว้ข้ามกันครั้งเดียวตรง biotin และ threonine ทำให้ได้ลูกผสมเป็น prototroph คือ มียีนทั้งหมดเป็น Met^+ Bio^+ Thr^+ Leu^+ Thi^+ Prototroph เหล่านี้อาจถูกคัดเลือกได้โดยใช้อาหารโภชนาการต่ำโดยไม่มีการเติมสารต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นลงไป เนื่องจาก prototroph สามารถสังเคราะห์สารอาหาร

ทุกอย่างที่ต้องการได้เองจากน้ำตาลกลูโคสและเกลือแร่ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายในการคัดเลือก (selective marker) อื่น ๆ อีก เครื่องหมายเพื่อการคัดเลือกหมายถึงยีนซึ่งสามารถแสดงออกให้ทราบได้เฉพาะบนอาหารเพื่อการคัดเลือกเท่านั้น เช่น ความต้องการ biotin เป็นต้น เซลล์ซึ่งเป็นพ่อแม่หรือ wild type มียีนต่าง ๆ ซึ่งยังไม่ผ่าเหล่าไปจากปกติ อาจถูกเรียกว่ายีนผ่าเหล่าที่ไม่ใช้ในการคัดเลือก (nonselective mutant gene) เช่น ยีนเพื่อความทนทานหรืออ่อนไหวต่อสารปฏิชีวนะหรือไวรัสของ *E. coli* ในขณะนี้ เป็นต้น ความถี่ในการที่เครื่องหมายซึ่งไม่ใช้ในการคัดเลือกได้ติดไปด้วยกับเครื่องหมายในการคัดเลือกที่รวมตัวกันใหม่ในลูกผสมต่าง ๆ เป็นสิ่งชี้แสดงถึงแนวโน้มที่จะเป็นมรดกถูกถ่ายทอดรวมกัน เช่น ระดับของการเชื่อมต่อกันระหว่างยีนทั้งสอง

3. ในปี ค.ศ. 1952 Hayes เป็นคนแรกที่ได้เสนอหลักฐานความแตกต่างทางเพศของ *E. coli* คือ เซลล์เพศผู้จะมีชิ้นของ DNA เป็นวงกลมขนาดเล็กนอกเหนือจากโครโมโซมปกติของตนเรียกว่า fertility, sex หรือ F factor และให้เครื่องหมายเป็น F^+ เซลล์เหล่านี้จัดเป็นเซลล์ผู้ให้ (donor) ในการผสมพันธุ์ เซลล์เพศเมียถูกให้เครื่องหมายเป็น F^- และไม่มีปัจจัยดังกล่าวข้างต้น เซลล์เหล่านี้จัดเป็นเซลล์ผู้รับ (recipient) ในการผสมพันธุ์ จากการสังเกตพบว่า

(ก) การผสมพันธุ์กันระหว่าง F^- สองสายพันธุ์ไม่อาจจะกระทำได้หรือเป็นหมัน

(ข) การผสมพันธุ์กันระหว่าง $F^+ \times F^-$ เท่านั้นที่เกิดขึ้นได้ แต่ในบางกรณีซึ่งน้อยมากก็อาจเป็นการผสมพันธุ์กันระหว่าง $F^+ \times F^+$ ลูกผสมที่ได้จะมีอัตราต่ำมาก คือระหว่าง 10^{-5} ถึง 10^{-6} ต่อคู่ของเซลล์

(ค) เซลล์ F^- อาจถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ F^+ ได้โดยการผสมพันธุ์กันระหว่างทั้งสอง Sex-factor DNA สามารถคัดลอกจำลองตัวเองขึ้นมาใหม่ได้โดยอิสระจากโครโมโซมปกติของเซลล์ โดยทั่วไปจะมี sex-factor DNA เพียงหนึ่งชุดต่อหนึ่งจีโนมของแบคทีเรียเท่านั้น และมีขนาดเป็นเศษหนึ่งส่วนร้อยของโครโมโซม Sex-factor DNA มีขนาดเพียงพอที่จะเป็นยีนได้ประมาณ 40 ยีน เพื่อควบคุมการคัดลอกจำลองตัวเองและการสังเคราะห์ sex pili ในระหว่างการเชื่อมต่อกันของเซลล์แบคทีเรีย sex-factor อีกชุดหนึ่งจะถูกสังเคราะห์ขึ้นแล้วถูกส่งออกจากเซลล์ F^+ ไปยังเซลล์ F^- ซึ่งเป็นผู้รับในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ F^- เป็นเซลล์ F^+ sex-factor DNA ยังคงเป็นอิสระไม่เข้าไปรวมอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย ในการเชื่อมต่อกันของเซลล์แบคทีเรียมีผลทำให้เซลล์เกิดการรวมตัวกันใหม่ทางพันธุกรรมอย่างแท้จริงนั้นน้อยมาก น้อยกว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ F^- เป็น F^+ ถึง 1,000 เท่า อย่างไรก็ตาม sex factor

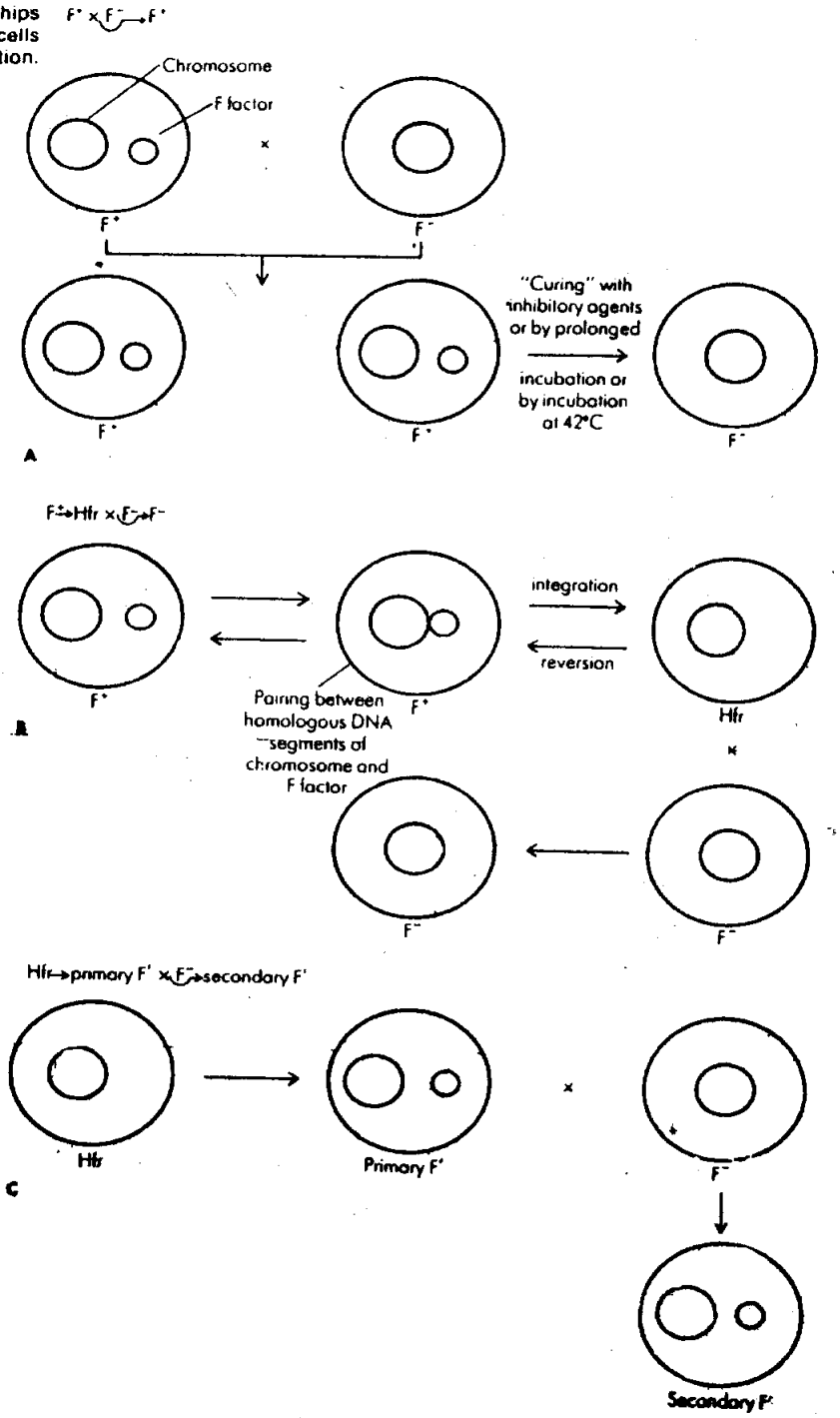
อาจถูกเลือกกำจัดได้โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพซึ่งมี acridine orange หรือสิ่งยับยั้งอย่างอื่น ขบวนการนี้ถูกเรียกว่า curing และทำให้เซลล์ F^+ ถูกเปลี่ยนเป็นเซลล์ F^- สูญเสียลักษณะการเป็นผู้ให้ ดังรูปที่ 12-14 A การถ่ายทอด sex factor จากเซลล์ F^+ ไปยังเซลล์ F^- นั้นง่ายมากดังกล่าวมาแล้ว แต่การถ่ายทอดยีนจากโครโมโซมของเซลล์ F^+ ไปยัง F^- นั้นยากมาก จึงมีผลทำให้เกิดเซลล์ลูกผสมได้ในอัตราต่ำมาก

(ง) ถ้าเซลล์มี F factor รวมอยู่ในเส้นโครโมโซมของตนจะถูกเรียกว่า Hfr (high frequency of recombination) ดูรูปที่ 12-14 จะทำให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ทางเพศกับเซลล์ F^- ได้เซลล์ลูกผสมอย่างแท้จริงมากกว่าเซลล์ $F^+ \times F^-$ ถึง 1,000 เท่า Hfr ทำตัวคล้ายกับเซลล์ผู้ให้หรือตัวผู้ แต่ Hfr สูญเสียความสามารถในการทำให้ F^- cell เปลี่ยนเป็น F^+ cell เป็นอย่างมาก Hfr cell อาจเปลี่ยนกลับเป็น F^+ cell ได้คือ sex factor ถูกปลดปล่อยหลุดออกจากโครโมโซมของเซลล์และมีการคัดลอกจำลองเพิ่มจำนวนตัวเองได้อย่างอิสระ ในบางครั้งการหลุดแยกเป็นอิสระของ F factor อาจมียีนบางส่วนของโครโมโซมหลุดติดมาด้วย ดังนั้นจึงเรียกปัจจัยแบบนี้ว่า F′ เซลล์ซึ่งมีปรากฏการณ์แบบนี้ ถูกเรียกว่า primary F′ cell ดังรูปที่ 12-14 C เมื่อ primary F′ cell ผสมพันธุ์ F^- recipient ส่วนซึ่งเป็น sex factor จะถูกถ่ายทอดไปได้อย่างมีประสิทธิภาพมากพร้อมทั้งยีนบางส่วนของแบคทีเรียซึ่งเกาะติดอยู่ เซลล์ผู้รับจะกลายเป็น secondary F′ cell และมียีนบางส่วนเป็น diploid คือ ยีนใหม่ที่ได้รับมากับยีนเดิมที่ตัวมีอยู่ Secondary F′ cell อาจแสดงคุณสมบัติของยีนใหม่ออกมาได้เมื่อมีโอกาส เช่น ถ้ายีนเดิมซึ่งทำหน้าที่อย่างเดียวกันได้รับความเสียหาย ยีนใหม่ที่ได้รับมาก็จะทำหน้าที่แทนและลูกหลานของ secondary F′ cell อาจคัดลอกยีนใหม่เข้าไปอยู่ในโครโมโซมของตนแทนยีนเก่าได้ ปรากฏการณ์ซึ่งยีนของแบคทีเรียถูกถ่ายทอดจากผู้ให้ไปยังผู้รับโดยเป็นส่วนหนึ่งของ sex factor นั้นถูกเรียกว่า sexduction โดย Jacob และ Wollman ดังรูปที่ 12-14 C

(จ) F factor ถูกทำให้สูญเสียไปจาก F^+ cell ได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อบ่มเป็นระยะเวลานานหรือบ่มที่อุณหภูมิสูงถึง 42° เซลเซียส เซลล์จะกลายเป็น F^- ดังนั้น สายพันธุ์ F^- ในธรรมชาติจึงมีจำนวนมากกว่า F^+ มาก ดูรูปที่ 12-14 A

4. จึงอาจสรุปจากข้างต้นได้ว่า ขบวนการเชื่อมต่อหรือผสมพันธุ์กันของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับ F factor F factor คือ episome ซึ่งเป็น plasmid แบบพิเศษ (จะอธิบายต่อไปในข้อที่ 5) Episome เป็นชิ้นของ DNA มีขนาดเป็นเศษหนึ่งส่วนพันของแบคทีเรียโครโมโซมและมักเกาะติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ Episome ในบางครั้งอาจเพิ่มจำนวนตัวเองโดยอิสระในไซโต-

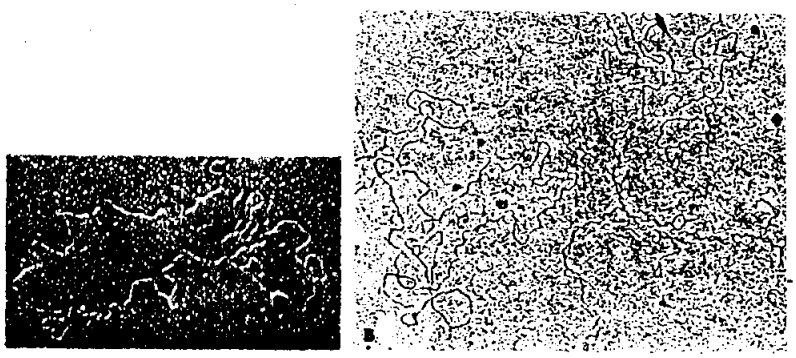
รูปที่ 12-14 Relationships of the F factor among cells in bacterial conjugation.



พลาสซึ่ม แต่ในบางครั้งอาจรวมเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้าน (host) และเพิ่มจำนวนได้พร้อม ๆ กัน ในกรณีหลังนี้ episome ถูกสอดเข้าไปอยู่ในจีโนมของเจ้าบ้าน ดังรูปที่ 12-14 และยีนต่าง ๆ ของ episome ก็กลายไปดังประหนึ่งว่าเป็นยีนของโครโมโซม พฤติการณ์เช่นนี้ ทำให้ episome แตกต่างจาก plasmid เนื่องจาก plasmid ไม่มีการรวมเข้าไปอยู่ในโครโมโซม

5. ในท่ามกลางสายพันธุ์ต่าง ของ *E. coli* และแบคทีเรียในช่องท้อง (enteric bacteria) บางชนิดจะพบได้ว่ามี plasmid หรือสารพันธุกรรมต่าง ๆ ที่นอกเหนือจากโครโมโซมอาศัยอยู่ภายในเซลล์ด้วย plasmid คือชิ้นของ DNA มีขนาดเพียงไม่กี่เปอร์เซ็นต์ของ DNA ในแบคทีเรียจีโนม ดังรูปที่ 12-15 ในชิ้นของ plasmid มียีนส่วนเกินซึ่งไม่จำเป็นสำหรับแบคทีเรีย แต่บางครั้งก็ช่วยให้เซลล์ซึ่งมี plasmid อาศัยอยู่ได้เปรียบเซลล์อื่น ๆ เช่น แบคทีเรียซึ่งมี plasmid ที่เรียกว่า colocin หรือ col factor จะขับสาร colicin ซึ่งเป็นโปรตีนฆ่าทำลายแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ แบคทีเรียบางชนิดก็มี plasmid พวกอื่น เช่น R factor ทำให้เซลล์มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิด plasmid บางชนิดอาจไม่สามารถถูกถ่ายทอดได้ แต่อาจทราบได้ว่ามีอยู่ภายในเซลล์จากการสูญเสียไป อย่างไรก็ตาม plasmid บางพวก ก็มีความสามารถถ่ายทอดตัวเองได้จากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง โดยทั่วไป plasmid สามารถถ่ายทอดตัวเองได้ เนื่องจากมียีนบางยีนซึ่งกำหนดการสร้าง pili หรือ fimbriae เพื่อการถ่ายทอดโดยเฉพาะ pili หรือ fimbriae เพื่อการถ่ายทอด plasmid มีลักษณะเป็นท่อโปรตีนขนาดเล็กติดอยู่บนผิวเซลล์ซึ่งสามารถเกาะติดกับผิวเซลล์อื่นได้ภายในท่อโปรตีนมีรูกลวงโตขนาดพอให้ DNA ของ plasmid ลอดผ่านไปได้ Plasmid มักเกาะติดอยู่ที่ผิวภายในบางแห่งของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อ pilus ได้สัมผัสเชื่อมต่อกับเซลล์อื่น Plasmid จะถูกกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนตัวเองแล้วส่งชุดหนึ่งลอดผ่าน pilus เข้าไปในเซลล์ใหม่ มีหลักฐานเพิ่มเติมว่า plasmid ส่ง DNA ของตนเพียงเส้นเดียวลอดผ่าน pilus เข้าไปในเซลล์ใหม่แล้วเซลล์ใหม่ซึ่งเป็นผู้รับจะทำการสังเคราะห์ DNA เส้นซึ่งเป็นคู่ประกอบเพิ่มเติมขึ้นเป็น plasmid ที่สมบูรณ์ได้ โดยวิถีทางเช่นนี้ plasmid จึงถ่ายทอดตัวเองไปในประชากรเซลล์แบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว เป็นที่น่าสังเกตว่า การถ่ายทอดในแต่ละกรณีเป็นไปในทิศทางเดียวคือ จากผู้ให้ไปยังผู้รับ และ Pili ซึ่งใช้ในการถ่ายทอดถูกเรียกว่า sex pili ดังรูปที่ 12-13

6. ในระหว่างการเชื่อมต่อของ Hfr กับ F^- Hfr cell จะถ่ายทอดจีโนมของตนชุดหนึ่งเข้าไปใน F^- cell โดยเริ่มต้นที่ปลายข้างหนึ่ง ดังนั้น ยีนของ Hfr จึงถูกฉีดเข้าไปใน F^- cell ตามลำดับที่เรียงอยู่ในจีโนมของ Hfr นั้น ถ้าใช้สายพันธุ์ซึ่งมีการผ่าเหล่าแตกต่างกัน ก็จะทำ



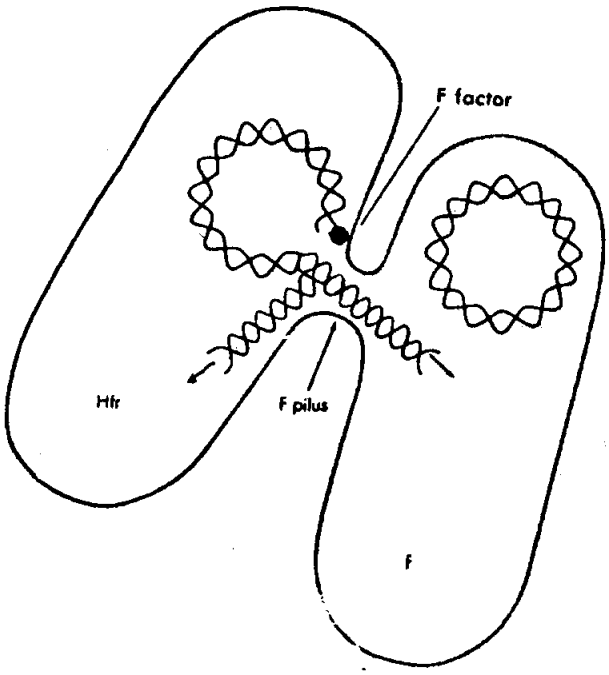
รูปที่ 12-15 Bacterial plasmids shown as molecules of looped DNA. (A) Drug-resistant DNA molecule called R28K, carrying ampicillin resistance, has a length of 21 μm. *(Courtesy of Michiko Egel-Mitani.)* (B) Open circular (left) and supercoiled (right) molecules isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2) strain 1098. × 23,000. *(Courtesy of D. A. Hopwood and J Bacteriol. 121:416–421, 1975.)*

ให้ทราบถึงลำดับของยีนซึ่งเรียงกันอยู่ในจีโนมหรือโครโมโซมได้โดยการทำให้การเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ทั้งสองหลุดออกจากกันที่ระยะเวลาต่าง ๆ แล้วตรวจสอบดูว่ายีนใดได้ถูกส่งเข้าไปในเซลล์ F^- แล้ว โดยตรวจสอบจากความสามารถของยีนนั้นซึ่งจะไปปรากฏอยู่ในเซลล์ผู้รับ ภายหลังจากเวลาที่ได้เข้าไปแล้ว ดังรูปที่ 12-16 ยีนแต่ละยีนจะเข้าสู่เซลล์ F^- ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน แผนที่แสดงตำแหน่งของยีนต่าง ๆ ในจีโนมของ Hfr สามารถสร้างขึ้นได้จากเวลาที่เข้าไปซึ่งเปรียบเหมือนไม้วัดความยาว วิธีการพื้นฐานเช่นนี้ทำให้ทราบถึงตำแหน่งยีนของแบคทีเรียในจีโนมได้ (สายพันธุ์ F^- ก็มีแผนที่ยีนเช่นเดียวกันกับ Hfr เนื่องจากมาจากแหล่งเดียวกัน)

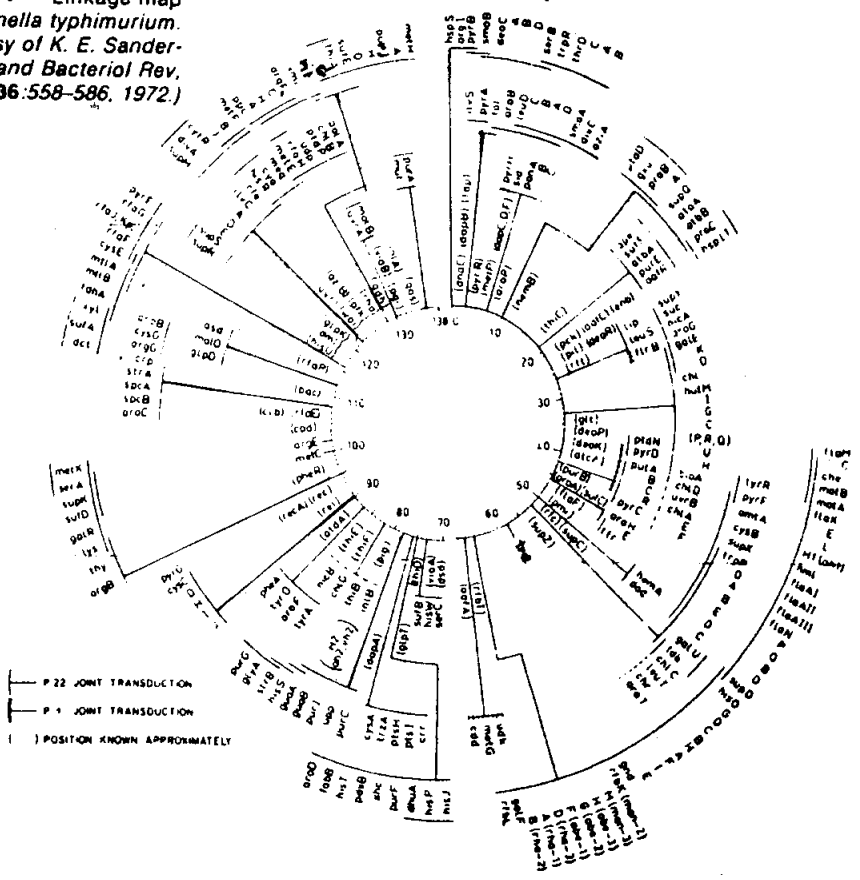
7. Hfr ต่างสายพันธุ์กันอาจมี factor เชื่อมต่ออยู่ที่ตำแหน่งแตกต่างกันในจีโนม อย่างไรก็ตามเมื่อ Jacob และ Wollman ใช้ Hfr cell ของ *E. coli* หลายชุด ซึ่งได้จาก F^+ cell ชนิดเดียวกัน พบว่ายีนที่ถูกส่งเข้าไปในเซลล์ F^- มีลำดับเหมือนกัน แสดงว่าเส้นวงกลมของจีโนมถูกตัดขาดออกเป็นเส้นยาวที่จุดเดียวกันทุกครั้งสำหรับ Hfr cell ชนิดเดียวกันและแสดงว่าจีโนมของ *E. coli* มีลักษณะเป็นวงกลมอย่างแท้จริง โดยวิถีทางการทำให้เซลล์สองเซลล์ผสมพันธุ์เชื่อมต่อกัน จึงอาจวาดรูปแผนที่จีโนมของ *E. coli* ได้ แผนที่จีโนมของแบคทีเรียหลายชนิดถูกวาดขึ้นได้อย่างสวยงามรวมทั้งของแบคทีเรียพวก streptomycete และมีลักษณะเป็นวงกลมทั้งสิ้น รูปที่ 12-17 แสดงถึงแผนที่จีโนมของ *Salmonella typhimurium* ก่อนมีการฉีดจีโนมเข้าไป เส้นวงกลมจีโนมจะขาดออกเป็นเส้นยาวตรงจุดที่มี F factor แทรกเข้าไป ดังรูปที่ 12-16

8. การฉีดจีโนมชุดหนึ่งทั้งหมดของ *E. coli* เข้าไปในเซลล์ผู้รับต้องใช้เวลาประมาณ 100 นาที แต่เนื่องจากการเชื่อมต่อผสมพันธุ์กันระหว่างสองเซลล์ มักถูกรบกวนให้ขาดหลุด

รูปที่ 12-16 Suggested mechanism for DNA transfer during conjugation. One of the two new DNA strands formed in the Hfr cell, passes through a conjugation bridge (F pilus) into the F^- cell.



รูปที่ 12-17 Linkage map of *Salmonella typhimurium*. *(Courtesy of K. E. Sanderson and Bacteriol Rev, 36:558–586, 1972.)*



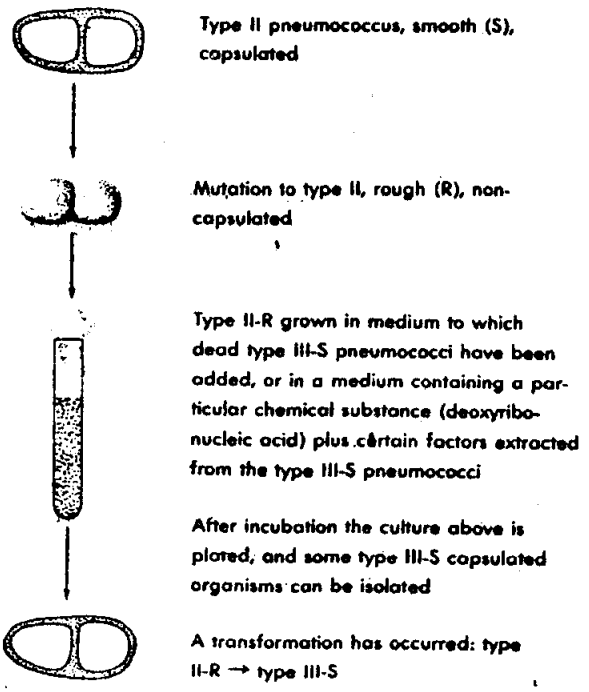
ออกจากกันก่อนที่จีโนมทั้งชุดจะเข้าไปได้ ดังนั้น F factor ซึ่งติดอยู่ที่ปลายข้างท้ายของจีโนมจึงมักไม่มีโอกาสได้ถูกส่งออกไป เนื่องจากเซลล์ F^- จะต้องได้รับยีนทั้งหมดของ F factor จึงจะกลายเป็นเซลล์เพศผู้ Hfr ได้ ดังนั้น เซลล์ผู้รับส่วนใหญ่หลังจากผสมพันธุ์เชื่อมต่อ Hfr cell ก็ยังคงเป็นเซลล์ F^- อยู่ แต่อย่างไรก็ตาม จะกลายเป็นเซลล์ F^+ ได้อย่างรวดเร็วเมื่อผสมพันธุ์กับเซลล์ F^+ มีโอกาสน้อยมากเท่านั้นที่โครโมโซมทั้งหมดรวมทั้ง sex factor ซึ่งติดอยู่ที่ปลายข้างท้ายถูกส่งไปได้ด้วยกันทั้งหมด ในกรณีเช่นนี้ เซลล์ลูกผสม F^- จะกลายเป็น Hfr cell

นอกจากแบคทีเรียในจีนัส (genus) *Escherichia* แล้ว การเชื่อมต่อผสมพันธุ์กันยังเกิดขึ้นได้ในแบคทีเรียจีนัสต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ *Salmonella, Pseudomonas* และ *Serratia* และยังมีหลักฐานแสดงว่าอาจเกิดขึ้นในแบคทีเรียจีนัส *Vibrio* อีกด้วย อีกทั้งยังได้มีรายงานแจ้งว่าแบคทีเรียต่างจีนัสต่อไปนี้ *Escherichia-Shigella, Salmonella-Vibrio, Escherichia-Serratia, Salmonella-Serratia, Shigella-Salmonella* และ *Escherichia-Salmonella* ยังสามารถผสมข้ามพันธุ์กันได้ การผสมข้ามพันธุ์กันได้แบบนี้อาจช่วยให้เกิดแนวความคิดใหม่ในการจัดแบ่งหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน

การเปลี่ยนแปลงพันธุ์ (TRANSFORMATION)

การเชื่อมต่อผสมพันธุ์กันเป็นแบบหนึ่งของการรวมยีนกันใหม่ มีผลทำให้เกิดเซลล์ใหม่ ซึ่งมียีนจากพ่อแม่ทั้งสอง Transformation เป็นอีกกลวิธีหนึ่งซึ่งทำให้ยีนมีการรวมตัวกันใหม่ สารพันธุกรรมของแบคทีเรียอาจถูกถ่ายทอดออกมานอกเซลล์ได้ แบคทีเรียบางชนิดเมื่อเจริญเติบโตอยู่ในสภาพซึ่งมีซากเซลล์ที่ตายแล้วปนอยู่ แบคทีเรียอาจได้รับและแสดงลักษณะบางอย่างของเซลล์ที่ตายไปแล้วได้ ทั้งที่เซลล์เหล่านี้ไม่ใช่พ่อแม่หรือสายพันธุ์เดียวกับตน หลักการเกี่ยวกับเรื่องนี้เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วได้สลายตัวปลดปล่อยสารพันธุกรรมหรือ DNA ของตนออกเป็นอิสระแล้วแบคทีเรียก็รับเอาไว้เข้าไปในเซลล์เป็นยีนหรือสารพันธุกรรมใหม่ของตน ในปี ค.ศ. 1928 Griffith ได้ทำการทดลองโดยฉีดหนูด้วยส่วนผสมซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย rough pneumococci (type II – R) มีชีวิตซึ่งผ่าเหล่ามาจาก type II – S smooth culture และเซลล์จำนวนมากของ type III – S smooth culture ซึ่งถูกฆ่าตายแล้วด้วยความร้อน พบว่าส่วนผสมนี้ทำให้หนูเจ็บป่วยแล้วตายในเวลาต่อมา และในร่างกายของหนูมีเซลล์ของ pneumococci type III – S อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งที่ถ้าฉีดแต่ type II – R ซึ่งมีชีวิตแต่เพียงอย่างเดียวหรือฉีดแต่ type III – S ที่ตายแล้วแต่เพียงอย่างเดียวจะไม่ทำให้หนูเจ็บป่วยหรือตาย อย่างไรก็ตามในขณะนั้น Griffith ยังไม่ได้ศึกษาค้นคว้าต่อไปว่ามีบางอย่างจากซากเซลล์แบคทีเรีย

pneumococci (Type III – S) ซึ่งตายแล้วถูกรับเอาไว้ด้วยเซลล์ของ pneumococci (Type II – R) ซึ่งมีชีวิตแล้วทำให้ Type II – R เปลี่ยนแปลงกลายเป็น Type III – S ได้ สารนั้นก็คือ DNA ซึ่งเป็นมรดกตกทอดให้แก่ Type II – R ต่อมาในปี 1944 Avery, MacLeod และ Mc Carty ได้ทำการพิสูจน์ว่า DNA เป็นสารพันธุกรรมซึ่งทำให้ Type II – R กลายพันธุ์ได้โดยเพาะเลี้ยง pneumococci (Type II – R) ในอาหารซึ่งมีซากเซลล์ที่ตายแล้วของ pneumococci (Type II – S) ผสมอยู่หรือในอาหารที่ผสมด้วย DNA และปัจจัยบางอย่างที่สกัดได้จาก Type III – S พบว่าภายหลังจากบ่มแล้วมีจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งเป็น Type III – S ซึ่งสร้างแคปซูลได้ ดังรูปที่ 12-18 แสดงว่ายีนหรือ DNA อิสระจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถเข้าไปรวมอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรียอื่นได้ และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานของเซลล์แบคทีเรียที่รับเอาไว้ได้



รูปที่ 12-18 Type transformation in the pneumococcus. The substance responsible for this change is a nuclear constituent, DNA. Type II-R organisms are able to incorporate DNA from type III-S bacteria into their genetic structure and be transformed into type III-S pneumococci.

เรื่องราวความจริงบางอย่างของ pneumococci ซึ่งจะต้องทราบเพื่อช่วยให้เข้าใจถึงขบวนการเปลี่ยนแปลงพันธุ์ได้ดียิ่งขึ้น

1. Pneumococci เป็นแบคทีเรียซึ่งสร้างแคปซูล
2. โคโลนีของจุลินทรีย์ซึ่งสร้างแคปซูลมีลักษณะเป็นเมือก (M) และเรียบ (S)
3. Pneumococci มีหลายประเภท (type)

4. Pneumococci ประเภทต่าง ๆ ถูกจัดแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีของแคปซูลแต่ละประเภทมีสารแคปซูลเป็นลักษณะของตนเอง

5. Pneumococci ประเภทที่เป็นเมือกอาจผ่าเหล่าเป็นพวกที่ไม่สร้างแคปซูลจึงเจริญเติบโตเป็นโคโลนีผิวหยาบ (R)

6. พวกที่ไม่สร้างแคปซูล (R form) จะไม่กลับกลายเป็นพวกที่สร้างแคปซูล (S form) ได้เอง

7. R form เมื่อเจริญเติบโตในสภาพซึ่งมี DNA จาก S type จะกลายเป็น S form ตามประเภทของจุลินทรีย์ที่นำเอา DNA มา

นอกจากการเปลี่ยนแปลงประเภทของ pneumococci แล้ว ยังมีการเปลี่ยนแปลงยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหมักและความทนทานต่อสารปฏิชีวนะอีกด้วย แบคทีเรียซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงพันธุ์ได้ นอกจากนี้ได้แก่จีนัส *Bacillus* โดยเฉพาะ *B.subtilis, Haemophilus, Neisseria, Streptococcus* และ *Rhizobium* เป็นต้น

ในการตระเตรียม DNA เพื่อการแปลงพันธุ์ตามปกตินั้น โครโมโซมของแบคทีเรียแตกหักเป็นชิ้นเล็ก ๆ อย่างสะเปะสะปะมีขนาดประมาณหนึ่งในสองร้อยของความยาวโครโมโซม ชิ้นส่วนของยีนที่ถูกนำเข้าไปในเซลล์ถูกเรียกว่า exogenote จะทำการรวมตัวกันใหม่กับโครโมโซมแทนที่ส่วนหนึ่งของ DNA หรือยีนประเภทเดียวกัน (homologus gene) ได้

ภาวะซึ่งเหมาะสมต่อการนำเอา DNA อิสระเข้าไปในเซลล์ผู้รับเกิดขึ้นได้เฉพาะในช่วงระยะเวลาอันสั้น คือ ในช่วงท้ายของ log phase เท่านั้น ในช่วงระยะเวลานี้ แบคทีเรียซึ่งกลายพันธุ์ได้ หรือเรียกว่า competent จะนำเอา DNA อิสระจากผู้ให้ไปในเซลล์ มีสมมติฐานสองอย่างซึ่งใช้อธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นแก่เซลล์ผู้รับอย่างหนึ่ง กล่าวว่า เซลล์ผู้รับมีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ ทำให้สารโมเลกุลใหญ่ลอดผ่านเข้าไปได้ อีกอย่างหนึ่งกล่าวเซลล์ผู้รับมีการสังเคราะห์สิ่งเพื่อใช้ในการรับโดยเฉพาะ (specific receptor) บนผิวเซลล์ ขบวนการรับเอา DNA เข้าไปเป็นกลไกซึ่งต้องใช้พลังงาน เนื่องจากพบว่าถ้ายับยั้งการเมตาโบลึซึมของพลังงานจะพลอยยับยั้งการรับเอา DNA เข้าไปในเซลล์ด้วย

TRANSDUCTION

Bacteriophage ส่วนใหญ่มักมีวงจรการเจริญเติบโตแบบทำให้เซลล์เจ้าบ้านแตกอย่างรวดเร็ว (rapid lytid growth cycle) Phage จะฉีดกรดนิวคลีอิกซึ่งปกติคือ DNA เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วพร้อมทั้งบงการการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับ phage

ใหม่เป็นจำนวนมาก DNA ใหม่และโปรตีนใหม่ จะรวมตัวกันเป็นธุลี (particle) ของ phage ที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 10 ถึง 20 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของ phage แล้วถูกปลดปล่อยออกมาโดยทำให้เซลล์แตก (lysis) ด้วยการทำลายผนังเซลล์ อย่างไรก็ตาม ไวรัสของแบคทีเรียบางชนิดซึ่งเรียกว่า temperate phage โดยปกติจะไม่ทำให้เซลล์แตก DNA ของ phage ที่ถูกฉีดเข้าไป จะมีพฤติการณ์คล้ายกับ episome ชนิดหนึ่งในแบคทีเรีย เช่น F factor คือ จีโนมของไวรัสสามารถเข้าไปรวมอยู่ในจีโนมของแบคทีเรียได้ และแล้วจึงเรียกว่า prophage แบคทีเรียซึ่งมี prophage อาศัยอยู่ (เรียกว่า lysogenic bacteria) อาจถูกกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลตหรือสิ่งอื่น ทำให้ prophage เริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและเข้าสู่วงจรการเจริญเติบโตแบบทำให้เซลล์แตก มีผลทำให้เซลล์แตก ปลดปล่อยธุลีของ phage ใหม่ออกมาเป็นจำนวนมาก ในกรณีของการ transduction อาจถือได้ว่าคือการนำพาชิ้นส่วนของ DNA จากแบคทีเรียหนึ่งไปให้แก่อีกแบคทีเรียหนึ่ง โดย bacteriophage เป็นพาหะหรือสื่อ

ปรากฏการณ์เรื่องนี้ได้ถูกค้นพบโดย Zinder และ Lederberg ในปี ค.ศ. 1952 เขาได้ศึกษาถึงการเชื่อมต่อผสมพันธุ์กันทางเพศของ *Salmonella* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยผสม auxotrophic mutant ต่าง ๆ เข้าด้วยกันแล้วคัดแยกโคโลนีของลูกผสมซึ่งเป็น prototroph จากอาหารซึ่งมีโภชนาการต่ำ ต่อมาเมื่อเขาใช้หลอดแก้วรูปตัว "ยู" ทำการทดลองโดยใส่สายพันธุ์ auxotroph แตกต่างกันคนละข้างและมีแผ่นแก้วพรุนขวางกั้นไม่ให้เซลล์ของสายพันธุ์ทั้งสองสัมผัสกัน แต่สิ่งอื่นซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ สามารถลอดผ่านไปมาหากันได้ ปรากฏว่ามีเซลล์ซึ่งเป็น prototroph เกิดขึ้นในหลอดข้างหนึ่ง แสดงว่าปรากฏการณ์นี้ไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากการเชื่อมต่อผสมพันธุ์กัน ต่อมาเมื่อได้มีการเติมเอนไซม์ DNase เพื่อย่อยสลาย DNA อิสระที่อยู่นอกเซลล์ พบว่าไม่อาจยับยั้งปรากฏการณ์นี้ได้ แสดงว่าปรากฏการณ์นี้ไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงพันธุ์โดยการรับเอา DNA อิสระเข้าไป (Transformation) อีกด้วย ต่อมาจึงได้มีการค้นคว้าพบว่า Bacteriophage เป็นตัวการนำยีนจากเซลล์หนึ่งไปให้แก่อีกเซลล์หนึ่ง โดยพฤติการณ์ดังต่อไปนี้

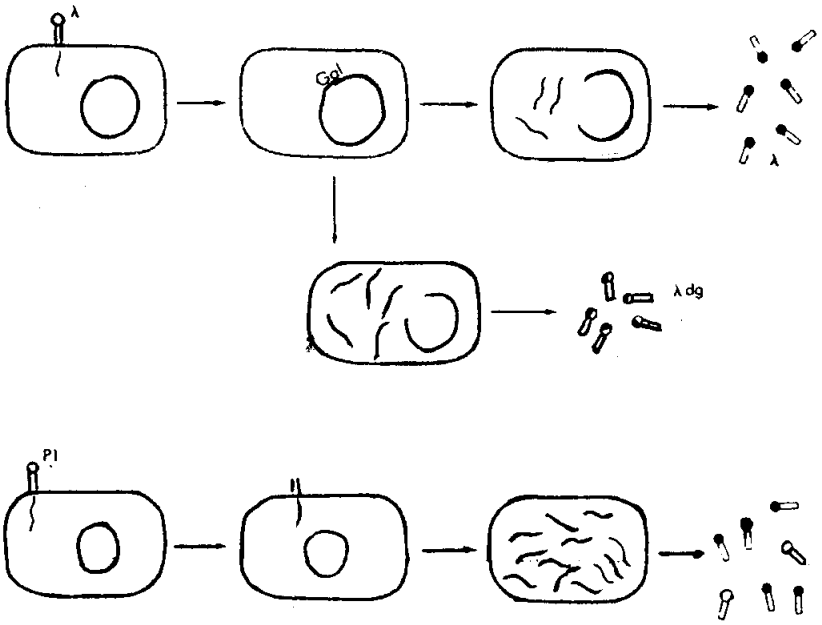
เมื่อ bacteriophage หลุดออกจาก lysogenic culture ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผู้รับผ่านแผ่นแก้วพรุนแล้วเข้าไปเจริญเติบโตและทำลายอีกสายพันธุ์หนึ่งซึ่งเป็นผู้ให้ ในระหว่างที่มีการเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ของสายพันธุ์ผู้ให้ phage ใหม่บางธุลีก็บังเอิญรวมเอาบางส่วนของโครโมโซมแบคทีเรียเข้าไว้ด้วย เมื่อผ่านแผ่นแก้วพรุนกลับมาแล้วเข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์ของสายพันธุ์ผู้รับก็พลอยนำเอายีนบางส่วนที่ติดมาจากสายพันธุ์ผู้ให้เข้ามารวมอยู่ในเซลล์ของสายพันธุ์ผู้รับด้วย

โดยปกติยีนเพียงอันเดียวเท่านั้นจากแบคทีเรียเซลล์หนึ่งที่ temperate phage หนึ่งธุลีนำไปได้ในหนึ่งครั้ง อย่างไรก็ตามในบางครั้งถ้ายีนอยู่ชิดติดกันมากบนโครโมโซมของผู้ให้ยีนทั้งสองอาจถูกรวมอยู่ใน phage ธุลีเดียวกันและถูกถ่ายทอดเป็นหน่วยเดียวกันหรือด้วยกัน

การ transduction มีหลายแบบ ในกรณีซึ่ง temperate phage สามารถถ่ายทอดยีนใดยีนหนึ่งก็ได้บนโครโมโซมของแบคทีเรียถูกเรียกว่า generalized transduction Generalized transduction ไม่สู้แตกต่างจากการ transformation มากนัก เพียงแต่ชิ้นส่วน DNA ของแบคทีเรียชิ้นเล็ก ๆ เท่านั้นที่ถูกถ่ายทอดไปได้ และมีขนาดซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงมาก ทั้งนี้เนื่องจากขนาดความจุของเปลือกหุ้ม phage มีปริมาณจำกัด เปลือกหุ้มนี้จะโอบล้อมชิ้นส่วนเล็ก ๆ ของโครโมโซมเจ้าบ้านเอาไว้ในขณะที่ temperate phage เริ่มทำให้เซลล์แตกภายหลังจากที่ DNA ได้ถูกฉีดเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียแล้ว ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ผู้รับก็เช่นเดียวกันกับขบวนการ transformation Generalized transduction อาจเกิดขึ้นได้ทั้งใน *Salmonella* และ *Escherichia coli* ไวรัส P1 เป็น lysogenic coliphage สามารถนำพา (transduce) ยีนต่าง ๆ ในจีโนมของแบคทีเรียได้ Phage บางส่วนจำนวนเล็กน้อยที่ได้จากการเจริญเติบโตในเซลล์แบคทีเรียอาจนำเอาแต่ DNA ของแบคทีเรียไว้ภายในธุลีของตนได้ ดังรูป 12-19 Phage เหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับธุลีของ phage P1 ปกติที่เจริญเติบโตได้ Phage อื่นนอกจากนี้ เช่น P22 เป็น generalized transducing phage ของ *S. typhimurium* มีกลวิธีการ transduction คล้ายคลึงกับ P1 phage ในกรณีของ specialized หรือ restricted transduction Phage จะนำเอาแต่เฉพาะยีนของแบคทีเรียที่อยู่ใกล้ชิดกับ prophage ในโครโมโซมแบคทีเรียเท่านั้น ยีนที่ถูกนำเอามาจะรวมอยู่ในจีโนมของ phage เนื่องจากการตัดขาดอย่างผิดปกติของ prophage ตัวอย่าง เช่น phage lambda (λ) ของ *E.coli* ซึ่งสามารถนำพายีนได้แต่มีกิจกรรมจำกัดเฉพาะต่อยีนต่าง ๆ ที่ควบคุมการหมักน้ำตาลกาแลคโตส (gal genes) เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 12-19 ธุลีของไวรัสเกือบทั้งหมดซึ่งมี gal genes รวมอยู่ด้วย จะถ่ายทอดยีนไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่คุณสมบัติในการเป็นไวรัสของตนกลับไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในธุลีไวรัสพวกนี้ขาดยีนส่วนใหญ่ของตนแต่เก็บเอา gal gene ต่าง ๆ ไว้แทน ดังนั้น จึงเรียกว่า λ dg (defective, galactose-transducing) phage

Transduction อาจเกิดขึ้นได้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ คุณสมบัติอันนี้เป็นเครื่องมือที่สำคัญในการทำให้เกิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ การทำแผนที่ของยีนซึ่งอยู่ใกล้ชิดกันมากและการทดลองทางพันธุศาสตร์อื่น ๆ ขบวนการทั้งสามอย่างคือ transduction, transformation

และ conjugation ได้ช่วยให้ได้รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียเป็นอย่างมากในช่วงยี่สิบกว่าปีที่ผ่านมา

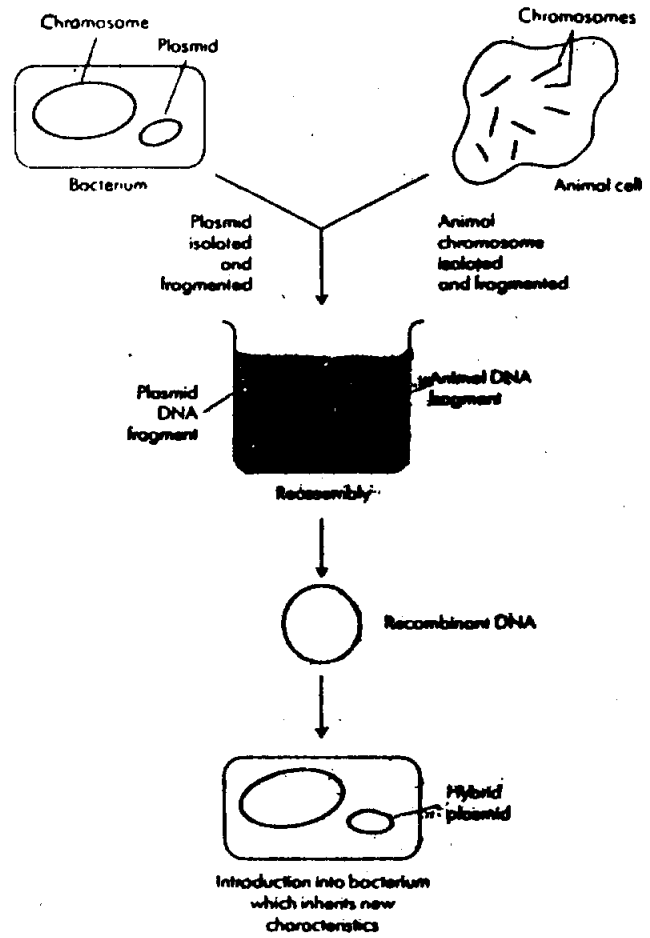


รูปที่ 12-19 When phage λ infects a cell, its DNA is inserted into the bacterial genome next to the genes for galactose metabolism (*gal* genes). Usually when such a cell is induced, the λDNA comes out, replicates, and makes normal phage. However, occasionally the λDNA comes out imperfectly, taking *gal* genes with it and leaving some of itself behind, leading to λdg phage (defective, galactose-transducing). The phage P1 genome does not insert itself, but when it is induced to replicate, the host DNA is broken into small pieces, some of which are accidentally incorporated into P1 phage.

วิศวกรรมยีน (Genetic engineering) ของจุลินทรีย์

ความก้าวหน้าเกี่ยวกับยีนในปัจจุบันนี้ได้มีกลวิธีการคัดแยกและเชื่อมต่อชิ้นของ DNA ซึ่งแตกต่างกันให้เป็นอันเดียวกันได้ในหลอดทดลอง ดังนั้น จึงสามารถทำให้เกิดโมเลกุล DNA ลูกผสมทางชีววิทยานอกร่างกาย (in vitro) ได้ โมเลกุลเหล่านี้สามารถนำไปใส่ไว้ในเซลล์แบคทีเรีย เช่น *E.coli* และสามารถเพิ่มจำนวน (repticate) ได้เช่นเดียวกันกับ DNA ปกติในเซลล์ เอนไซม์เฉพาะซึ่งเรียกว่า DNA-restriction endonuclease เป็นเอนไซม์ที่ช่วยทำให้ชิ้นส่วนของ DNA มีปลายซึ่งเหนียว สามารถเชื่อมต่อกันได้ จึงถูกนำมาใช้ทำให้เกิด plasmid แบบใหม่ในแบคทีเรียต่าง ๆ เช่น plasmid ซึ่งมียีนทนทานต่อสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ตัวอย่าง เช่น ยีนทนทานต่อเพ็นนิซิลลินจาก *Staphylococcus aureus* สามารถนำไปปลูกใส่ (transplant) ใน *E.coli* ทำให้ *E.coli* ทนทานต่อเพ็นนิซิลลินได้ ในทำนองเดียวกันได้มีการทดลองแสดงให้เห็นว่า DNA ของสัตว์ (ribosomal DNA จากคางคก *Xenopus laevis* ในอัฟริกาใต้) สามารถเชื่อมต่อกับ plasmid DNA ของ *E.coli* ได้ และชิ้นส่วน chromosomal DNA ของแมลง *Drosophila* ได้ถูกทำให้ไปรวมอยู่ได้ทั้งใน DNA ของ plasmid และ bacteriophage เป็นโมเลกุลลูกผสมซึ่ง

สามารถเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ของ *E.coli* วิศวกรรมเกี่ยวกับยีนเช่นนี้อาจแสดงเป็นแผนภูมิได้ ดังในรูปที่ 12-20



รูปที่ 12-20 Genetic engineering with bacterial plasmids.

การที่โมเลกุลของ DNA ซึ่งรวมตัวกันใหม่อย่างผิดธรรมชาติและสามารถทำงานได้ในร่างกาย (in vivo) เป็นเครื่องชี้แสดงถึงอันตรายอย่างมหาศาลทางชีววิทยา เช่น ถ้าทำให้สิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีการแลกเปลี่ยนยีนกันได้อย่างกว้างขวาง ดังตัวอย่างในแบคทีเรีย จะทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตซึ่งมีลักษณะและความสามารถที่ไม่อาจทำนายได้ จุลินทรีย์อาจได้รับยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้มีความทนทานต่อยาและสารปฏิชีวนะต่าง ๆ หรือมีความสามารถในการสังเคราะห์แสงสารพิษต่าง ๆ ซึ่งไม่เคยปรากฏในเผ่าพันธุ์ของตนมาก่อน มนุษย์อาจมีลักษณะของสิ่งมีชีวิตอื่นและเผ่าพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายก็อาจผสมปนเปกันอย่างยุ่งเหยิง

ในแง่ที่เป็นประโยชน์อาจทำให้แบคทีเรียมียีนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์สารพิเศษต่าง ๆ เป็นการค้าหรืออุตสาหกรรมได้ เช่น ฮอร์โมนของพืชและสัตว์ต่าง ๆ เป็นต้น ในด้านการเกษตรก็อาจทำให้พืชได้รับยีนจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการจับยึดแก๊สไนโตรเจนอิสระจากอากาศมาใช้ได้เอง นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์บางท่านยังได้เคยคิดรักษาคนที่เป็นโรคทางพันธุกรรมโดยเปลี่ยนทดแทนยีนที่เลวด้วยยีนที่ดีอีกด้วย หรือแม้แต่จัดการเปลี่ยนแปลงยีนของคน ตั้งแต่เริ่มปฏิสนธิถ้าได้ตรวจสอบพบว่ามีความผิดปกติของยีนเกิดขึ้น จะเห็นได้ว่า วิศวกรรมยีน (Genetic engineering) ได้สร้างความหวังในภายภาคหน้าของมนุษย์อย่างแจ่มใส แต่ก็มีอันตรายอย่างมหันต์ถ้าปราศจากการควบคุม อย่างไรก็ตามในด้านนี้ก็ควรต้องมีการสำรวจต่อไป