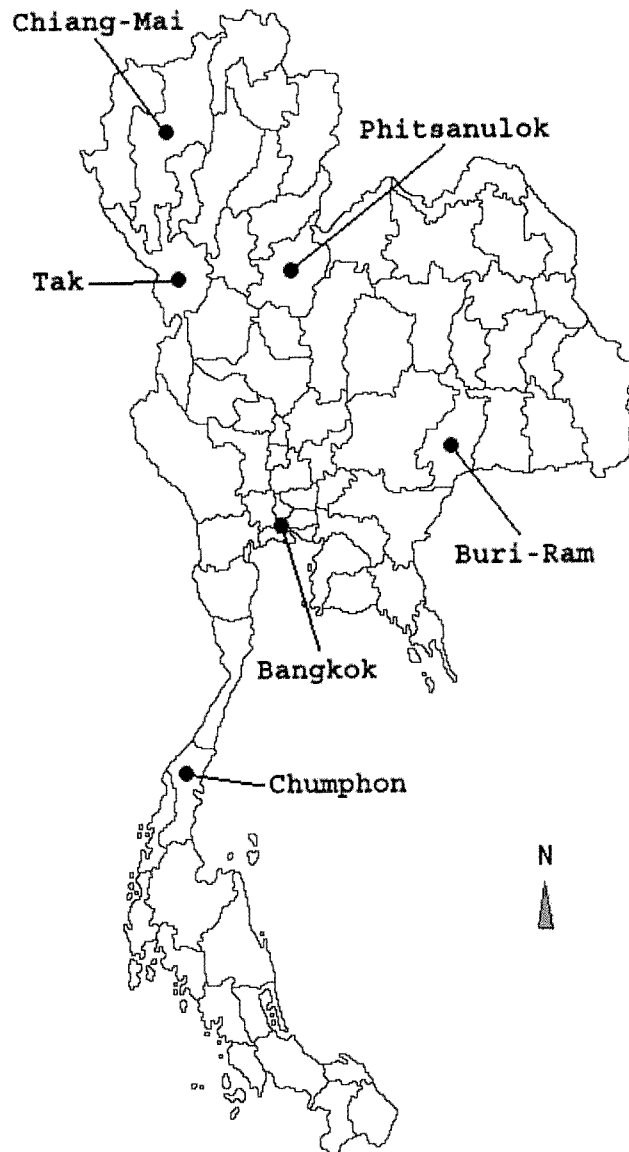


ผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยจากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ, พิษณุโลก, เชียงใหม่, ตาก, ชุมพร และบุรีรัมย์ (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) โดยใช้วิธี fly trap ซึ่งมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ เริ่มจากการใช้ดักหมูปั้นเหยื่อล่อในถุงพลาสติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้แมลงวันมาตอม แมลงวันที่จับได้จะถูกสลับโดยใช้ความเย็นที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการจำแนกสปีชีส์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (รุ่น SZX9, Olympus, Tokyo, Japan) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ที่บรรยายโดย Crosskey และ Lane (Crosskey and Lane, 1993) เมื่อทำการระบุสปีชีส์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว แมลงวันหัวเขียวจะถูกเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มี 70% ethanol ที่ความเย็น 4 องศาเซลเซียสก่อนทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งที่มีการจับแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัย

การสกัดดีเอ็นเอ

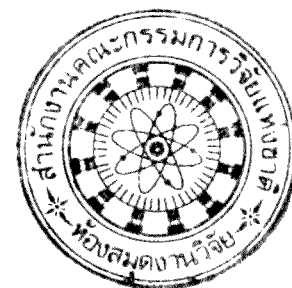
ทำการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนอกและขาของตัวอย่างแมลงวันหัวเขียวโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) ทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตได้ชี้แจง ดีเอ็นเอของแมลงวันที่สกัดได้จะถูกเก็บระยะยาวที่ความเย็น -20 องศาเซลเซียส และทำการหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรด้วย

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และทำการเจือจางให้ได้ค่าความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณยีน mitochondrial cytochrome oxidase I-II โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอนก่อนหน้านี้เป็นแม่พิมพ์ (template) และใช้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้: forward primer (5' GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT 3') และ reverse primer (5' GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT 3') (Wells and Sperling, 2001; Schroeder et al, 2003) ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 150 นาโนกรัม, forward และ reverse primer อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์, $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ และ Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 ยูนิต โดยใช้เครื่อง GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) ภายใต้อุณหภูมิดังต่อไปนี้: initial denaturation 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที, 30 รอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที, 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที, final extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

Blowfly species	Sex	Location	Accession no.
<i>Chrysomya megacephala</i>			
A01	♂	Tak	FJ153258
A02	♀	Chiang-Mai	FJ153259
A03	♂	Chiang-Mai	FJ153260
A04	♂	Chiang-Mai	FJ153261
A05	♂	Chiang-Mai	FJ153262
A06	♀	Buri-Ram	FJ153263
A07	♀	Buri-Ram	FJ153264
A08	♀	Phitsanulok	FJ153265
A09	♂	Phitsanulok	FJ153266
A10	♂	Chumphon	FJ153267
A11	♂	Chumphon	FJ153268
A12	♀	Bangkok	FJ153269
<i>Chrysomya rufifacies</i>			
B01	♀	Bangkok	FJ153270
B02	♂	Bangkok	FJ153271
B03	♀	Phitsanulok	FJ153272
B04	♀	Chiang-Mai	FJ153273
B05	♂	Chiang-Mai	FJ153274
<i>Lucilia cuprina</i>			
C01	♀	Chiang-Mai	FJ153275
C02	♀	Chiang-Mai	FJ153276
C03	♂	Chiang-Mai	FJ153277
<i>Musca domestica</i> (outgroup)			
D01	♂	Bangkok	FJ153278



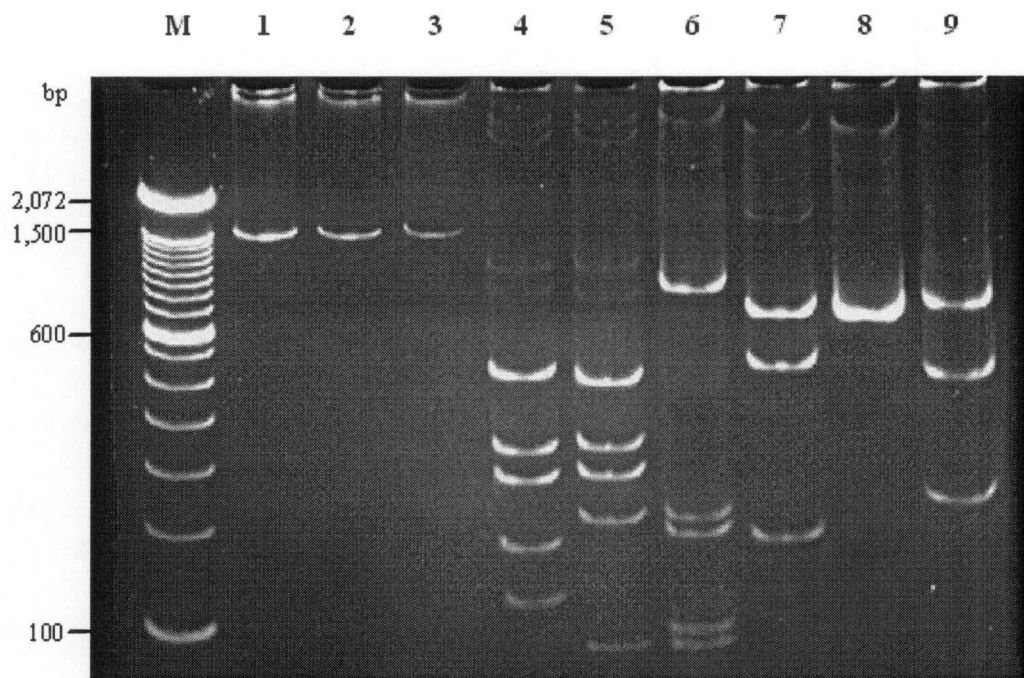
ตารางที่ 1 หมายเลข Code, เพศ, ตำแหน่งที่ทำการจับ และ accession number ของแมลงวันหัวเขียว

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำนายตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ให้บริสุทธิ์จาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัด Perfectprep[®] Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตได้ชี้แจง และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct DNA sequencing จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกบริสุทธิ์นี้ ด้วยชุด ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA) โดยใช้ไพรเมอร์เดียวกับเทคนิค PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง automated ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Foster City, CA) และทำการหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้โปรแกรม NEBcutter V2.0 web-based programme (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ซึ่งการวิเคราะห์พบว่า *Taq*^αI และ *Vsp*I เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันหัวเขียวได้

การแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตัดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*^αI และ *Vsp*I (New England Biolabs, Ipswich, USA) โดยทำการตัดแยกหลอด ปฏิกริยาการตัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม, 10X บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ยูนิตและทำการปรับปริมาตรให้ครบ 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่น (DNase-free water) และทำการตัดภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ *Taq*^αI และ 37 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ *Vsp*I เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยวิธี 6% native polyacrylamide gel electrophoresis (6% gel concentration (T), 3.3% crosslinking (C), 1X TBE buffer (89 mM Tris-base, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) (Maniatis et al, 2001) ภายใต้อุณหภูมิ 100 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) และตรวจดูภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Doc EQ system (Bio-Rad, CA, USA) ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4 และตารางที่ 2



รูปที่ 4 6% native polyacrylamide gel แสดงรูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ของแมลงวันหัวเขียวเมื่อทำการตัด COI-COII PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ $Taq^{\alpha}I$ และ $VspI$ จากซ้ายไปขวาดังนี้: undigested PCR products from *C. megacephala*, *C. rufifacies* and *L. cuprina* respectively (lane 1-3); *C. megacephala/Taq^{\alpha}I* (lane 4); *C. rufifacies/Taq^{\alpha}I* (lane 5); *L. cuprina/Taq^{\alpha}I* (lane 6); *C. megacephala/VspI* (lane 7) ; *C. rufifacies/VspI* (lane 8); *L. cuprina/VspI* (lane 9). Lane M is 100 bp DNA standard marker.

Blowfly species	<i>Taq</i> ^α I digestion	<i>Vsp</i> I digestion
<i>Chrysomya megacephala</i>	30, 111, 156, 264, 307 and 456 bp	4, 12, 160, 495 and 653 bp
<i>Chrysomya rufifacies</i>	30, 81, 186, 264, 307 and 456 bp	12, 653 and 659 bp
<i>Lucilia cuprina</i>	30, 81, 86, 177, 188 and 762 bp	210, 450 and 664 bp

ตารางที่ 2 รูปแบบของ PCR-RFLP ที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์แมลงวันหัวเขียว

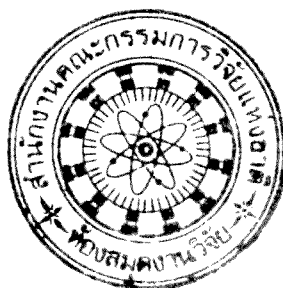
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

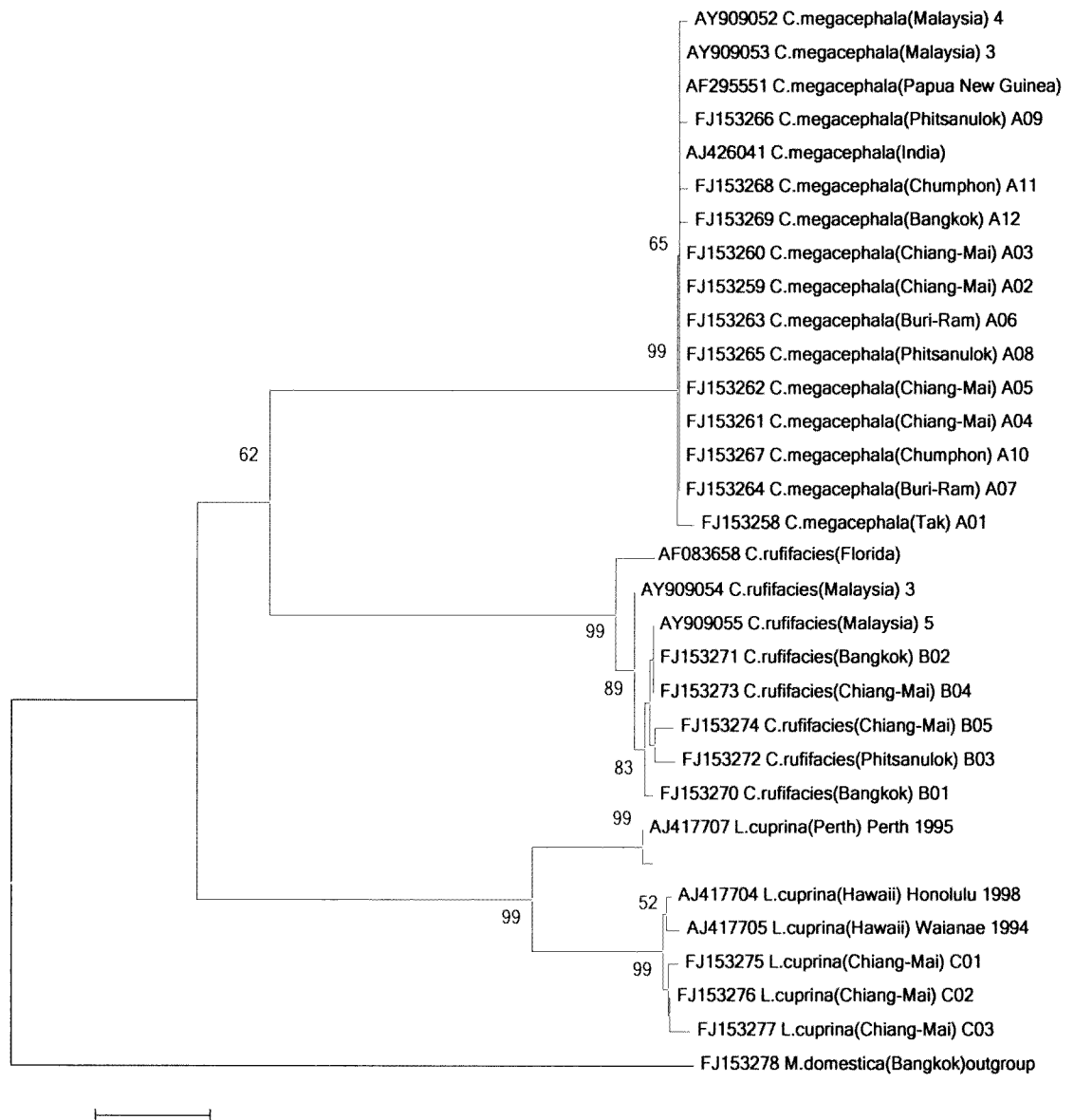
ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) และ โปรแกรม BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>) เพื่อการจำแนกสปีชีส์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมดจะถูกส่งเพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลของ GenBank database (accession number FJ153258-FJ153278) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม Clustal W algorithm (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ G+C และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองตัวอย่าง (รูปที่5) ด้วยโปรแกรม Bioedit จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (รูปที่6) ด้วยวิธี neighbor-joining (Kimura's 2-parameter model) โดยใช้โปรแกรม MEGA[©] version 3.1 และทดสอบความถูกต้องด้วย 1000 bootstrap replicates (Kumar et al, 2004)

Code	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	B01	B02	B03	B04	B05	C01	C02	C03
A01																				
A02	99.8																			
A03	99.8	100																		
A04	99.8	100	100																	
A05	99.8	100	100	100																
A06	99.8	100	100	100	100															
A07	99.8	100	100	100	100	100														
A08	99.8	100	100	100	100	100	100													
A09	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9												
A10	99.8	100	100	100	100	100	100	100	99.9											
A11	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9										
A12	99.7	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8									
B01	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2								
B02	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8							
B03	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.6						
B04	93.1	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.2	93.3	93.2	93.2	99.8	100	99.6					
B05	93	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93	93.1	93	93	99.6	99.8	99.6	99.8				
C01	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60	60	60.1	60.2	60.1	60.1			
C02	60.2	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60	60.1	60.2	60	60.1	60.2	60.3	60.2	60.2	99.9		
C03	60.1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60.1	60	60	60.1	60.2	60.1	60.1	99.7	99.8	
D01	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	57.4	58.4	58.4	58.3	58.4	58.3	53.3	53.2	53.4

A01–A12, *Chrysomya megacephala*; B01–B05, *Chrysomya rufifacies*; C01–C03, *Lucilia cuprina*; D01, *Musca domestica*.

รูปที่ 5 Identity matrix แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสองตัวอย่าง



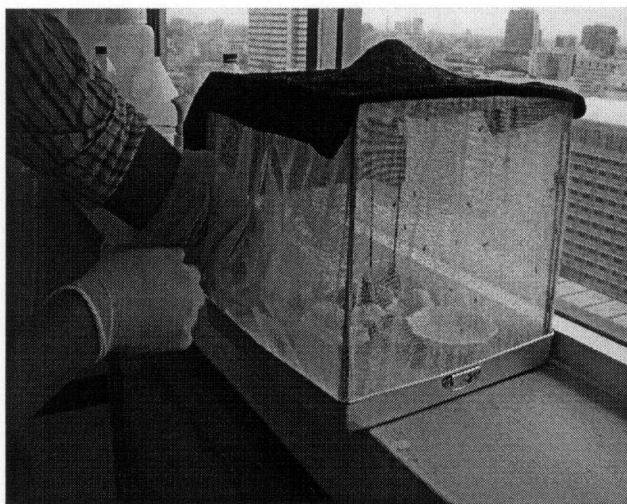


รูปที่ 6 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างแมลงวันของทั้ง 3 สปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI-COII

การเลี้ยงหนอนแมลงวันและเทคนิควิธีปราศจากเชื้อ

การก่อตั้งสายพันธุ์แมลงวันหัวเขียว (เนื่องจากการสำรวจไม่พบ *L. sericata* จึงใช้ *C. megacephala* แทน)

- วางพลาสติกหนึ่งชั้นไว้ในกรงของแมลงวันแล้วรอเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง เพื่อรอให้แมลงวันวางไข่



รูปที่ 7 การล่อให้แมลงวันหัวเขียววางไข่

- ใส่จีลีสื่อหรือขุยจากไม้/ขุยมะพร้าว ในกรงให้ได้ปริมาตร 1/3 ของพื้นที่กรงที่มีความยาว 15 เซนติเมตร ฝาปิดกรงตาข่ายเหล็ก (metal netting) ควรมีความกว้างพอสมควร
- นำดักที่มีไข่แมลงวันมาวางไว้ด้วยกันกับดักสดน้ำหนัก 50 กรัม อีกชิ้นหนึ่ง แล้วห่อด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นนำไปวางไว้ด้านบนของกรงที่บรรจุจีลีสื่อหรือขุยมะพร้าว
- บ่ม (Incubate) เอาไว้ในที่อุณหภูมิ 25-26°C เป็นเวลา 5-6 วันเพื่อรอให้หนอนแมลงวันเข้าสู่ระยะดักแด้ หลังจากพบว่าการเปลี่ยนแปลงระยะแล้ว ให้เอาชิ้นดักที่ยังเหลืออยู่ออกจากกรง
- เก็บดักแด้ของแมลงวันและขุยมะพร้าวอันเดิมใส่ลงในแก้วพลาสติกหรือภาชนะบรรจุพลาสติกที่มีความสูง 5 เซนติเมตร กว้าง 9 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้ในกรงเพื่อรอการ

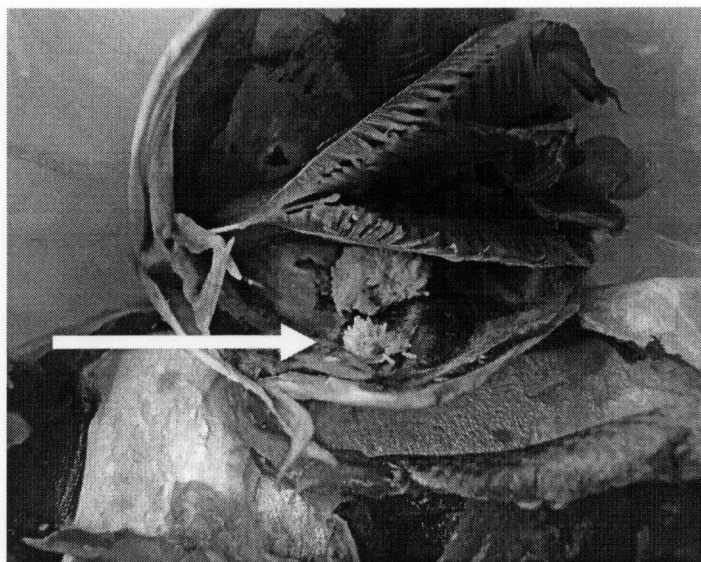
ออกจากคักแต่เป็นแมลงวัน กรงควรมีขนาด 30×30×30 เซนติเมตร เพื่อให้รองรับแมลงวัน
จำนวน 1,000-1,500 ตัวได้

-การเลี้ยงแมลงวันตัวเต็มวัย ใช้น้ำหวานวางในกรงตลอดเวลาและดับสัปดาห์ละสองครั้ง

-แมลงวันตัวเมียพร้อมเริ่มวางไข่หลังจากเป็นตัวเต็มวัยแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ และ
แมลงวันสามารถวางไข่ได้ปริมาณมาก เมื่อแมลงมีอายุ 1 เดือนแรก ดังนั้นถ้าหากต้องการ
เลี้ยงแมลงวันรุ่นต่อไปควรจะต้องทราบว่าแมลงวันสามารถวางไข่ได้ถึง 1 เดือนครึ่ง

-ควรทำความสะอาดกรงแมลงวันเพื่อใช้เลี้ยงรุ่นต่อไปทุก 1 เดือนครึ่งถึงสองเดือน

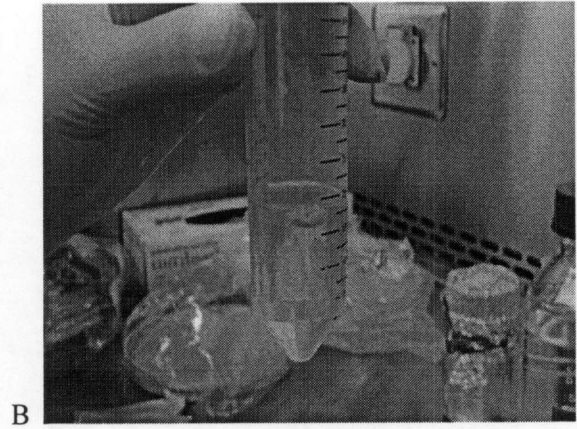
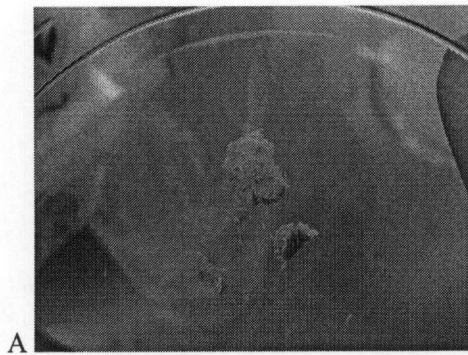
การเก็บไข่แมลงวันและการทำการปราศจากเชื้อ (Collection and Sterilization of the eggs)



รูปที่ 8 ไข่แมลงวันหัวเขียว (ลูกศร)

-วาง Petri dish ที่มีพลาสติก ในกรงแมลงวัน

-จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ให้เอาดักที่มีไข่ของแมลงวันออกจากกรง



รูปที่ 9 ไข่แมลงวันหัวเขียวเมื่อแยกไว้ในจานปลอดเชื้อ (A) และในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์

-เก็บไข่ออกจากปลาใส่ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตรเพื่อแยกไข่ที่ติดกันเป็นกลุ่มออกจากกัน แล้วเขย่าประมาณ 15 นาที ด้วยมือ และวางไว้ 1 นาทีกระทั่งไข่ตกลงไปนอนที่ก้นหลอดทดลอง จากนั้นค่อยๆ เทสารละลายออกอย่างระมัดระวัง แล้วเติมสารละลาย 5% ฟอร์มาลดีไฮด์ ปริมาตร 35 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม แล้วเขย่าสารละลายด้วยมือ ประมาณ 5 นาที

-ล้างไข่ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3-4 ครั้ง ในตู้ปราศจากเชื้อ (Hood)

-เก็บไข่จากหลอดทดลองประมาณ 500 ฟอง มาวางใน อาหารเลี้ยงหนอนแมลงวันที่เตรียมจากตับ

-ใช้คีบ (Forceps) กรีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆทาง เพื่อให้หนอนแมลงวันหลังฟักจาก ระยะไข่สามารถที่จะไขเข้าไปในอาหารได้

-ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Petri dish ให้แน่นด้วยแผ่นพาราฟิล์ม

การทำหนอนแมลงวันให้ปราศจากเชื้อ

-อบไข่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30°C ตลอดทั้งคืน

-หนอนแมลงวันจะเริ่มฟักตัวหลังจากนั้นประมาณ 10-12 ชั่วโมง

-แล้วนำหนอนแมลงวันมาอบที่ 25-30°C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar, Chocolate agar และ Thioglycollate broth เพื่อทดสอบว่าการล้างที่ผ่านมาปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นหรือไม่



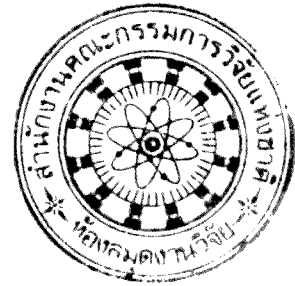
รูปที่ 10 หนอนแมลงวันหัวเขียวที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเหี้ยม

- หนอนแมลงวันในจานอาหารเลี้ยงที่ยังไม่นำมาใช้ ให้เก็บไว้ที่ตู้เย็น 5-6°C ทันที ซึ่งทำให้แมลงวันยังมีชีวิตรอดอยู่ได้ 5-6 วัน
- หนอนแมลงวันที่ต้องการนำมาใช้ควรรอต่อประมาณ 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 30-35°C กระทั่งหนอนมีขนาดโตพอกระทั่งสามารถนำหนอนออกจากจานอาหารเลี้ยงเพื่อนำไปใส่กล่องพลาสติกที่บรรจุขุยมะพร้าวต่อไป สำหรับอาหารและหนอนสามารถจะถ่ายไปยังจาน Petri dish ใหม่ได้เพื่อให้หนอนได้รับอาหารและออกซิเจนที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ก่อนที่จะนำหนอนดังกล่าวไปวางในกล่องขุยมะพร้าว วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ป้องกันการเกิดกลิ่นจากการเน่าของอาหารที่มีดับเป็นส่วนประกอบ

การเก็บตัวหนอนแมลงวันจากอาหารเลี้ยง (Harvesting of maggots from the medium)

- เทน้ำกลั่นลงบนจานอาหารที่มีหนอนแมลงวัน

- ตัดวุ้นอาหารออกเป็น 4 ชิ้น แยกออกจากจานแล้วแกะเอาหนอนลงในน้ำจนหมด
- ถ่ายหนอนทั้งหมดลงในภาชนะที่ปราศจากเชื้อใบใหม่โดยที่ส่วนฐานภาชนะถูกแบ่งออกเป็น 8 ช่อง เพื่อให้ง่ายต่อการแบ่งจำนวนของหนอน
- รินน้ำออกแล้วเติมน้ำสะอาดลงใหม่ ขั้นตอนการล้างดังกล่าวให้ทำซ้ำกระทั่งเศษวุ้นอาหารและเปลือกไข่ถูกชะล้างออกจากตัวหนอนจนหมด
- ใช้คีบคีบและใช้ Pasteur pipette คูด เศษวุ้นอาหาร เปลือกไข่ และตัวหนอนที่ตายออก
- นับจำนวนหนอนแมลงวัน
- กรองตัวหนอนที่อยู่ใต้ภาชนะด้วยตาข่ายในลอน
- รินน้ำกลั่นลงไปอีกแล้วกรองอีกครั้ง
- ซับน้ำส่วนเกินด้วยกระดาษที่ปราศจากเชื้อ
- เก็บหนอนที่ล้างสะอาดแล้วด้วยคีบปราศจากเชื้อ ใส่หลอดทดลองปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- หากยังไม่ใช้หนอนควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $5-10^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทันที



สารละลายและอาหารเลี้ยงหนอนแมลงวันและแมลงวัน

1. น้ำหวาน

- เติมสารละลายน้ำหวาน 20% Sugar water ใน 100 Erlenmeyer flask และปิดจุกขวดด้วยไส้ตะเกียงขด

2. โซเดียมไฮโปคลอไรด์

0.05% โซเดียมไฮโปคลอไรด์

- เติม 10% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 5% ฟอรั่มัลดีไฮด์

- เติม 35% ฟอรั่มัลดีไฮด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงใน น้ำกลั่น ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

4. สารละลาย กานามัยซินซัลเฟต

-ละลาย Kanamycin monosulfate (Sigma, Kanamycin A, K-1377) 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

-ทำการปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน ฟิลเตอร์ (millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร) แล้วแบ่งใส่หลอดละ 4.2 มิลลิลิตรและเก็บด้วยการแช่แข็ง

5. โพลีมัยซินบีซัลเฟต (Polymycin B sulfate)

-ละลาย โพลีมัยซินบีซัลเฟต (Sigma, Polymycin B sulfate, P-1004) 500 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

-ทำการปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน ฟิลเตอร์ (millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร) แล้วแบ่งใส่หลอดละ 4.2 มิลลิลิตรและเก็บด้วยการแช่แข็ง

6. วุ้นอาหารเลี้ยงหมอนเตรียมจากตับ (Liver Agar Medium)

-อุปกรณ์

-ตับ เครื่องปั่น แท่งคน จานพลาสติกใช้ครั้งเดียว กระบอกตวงใช้สำหรับตวง สารละลายปริมาตรไม่เกิน 2 ลิตร ตาชั่ง ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไม้ตะเกียบ เข็กลูก ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร แถบกาบ (autoclave tape) กรวยพลาสติกขนาดเล็กและขนาดใหญ่ปากกว้าง ปากกา เขียนฉลาก

-วิธีเตรียม

-ล้างตับหมู น้ำหนัก 2000 กรัม ด้วยน้ำเพื่อเอาไขมันและเส้นเลือดเวนออก

-ปั่นบดตับน้ำหนัก 2000 กรัม เทลงในขวดชมพู่ขนาด 3000 หรือ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไป 2526 มิลลิลิตร

-เติมผงวุ้น (3.5%) สำหรับกรณีดังกล่าวเติม 88.4 กรัม ลงในน้ำ จากนั้นนำไปตั้งบน Hot plate ใช้แท่งแก้วคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) คนกระทั่งวุ้นละลายหมด (ข้อสังเกต: เติมน้ำลงไปในหม้อและ not vice versa) แล้วเติมน้ำลงในบีกเกอร์ขนาดปริมาตร 5000

มิลลิลิตร ที่มีระดับละเอียด ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งเทลงขวดชมพู่ขนาด 1 ลิตร ด้วย ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ต่อขวด และแบ่งเทลงขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต่อขวด จากนั้นปิดจุกขวดแต่ละขวดด้วยขดผ้าซึ่งหุ้มด้วยผ้าก๊อซอีกชั้น คลุม ด้วยกระดาษและมัดด้วยเชือก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยตู้อบความร้อนสูงด้วยไอน้ำ (Autoclave) หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงแล้วนำไปเก็บแช่เย็นที่ตู้เย็น เมื่อต้องการจะนำไปใช้ให้นำมาอบฆ่าเชื้อประมาณ 15 นาที แล้วผสมให้เข้ากันเพื่อให้สัดส่วนที่ติดอยู่ด้านข้างขวด ผสมกับส่วนอื่นๆได้ ปล่อยให้เย็นกระทั่งสามารถเทลงในจาน Petri dish ได้ ก่อนนำไปเลี้ยง หนองให้เติมยา Kanamycin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และยา Polymycin B sulfate ต่ออาหาร เลี้ยงหนอง 100 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

- เทอาหารวุ้นลงในจาน Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นลงแล้วนำไปเก็บด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C อาหารวุ้นที่เตรียมใน Petri dish แต่ละครั้งเมื่อแช่เย็นสามารถเก็บได้ 2-3 สัปดาห์
- อาหารวุ้นในขวดชมพู่ที่ยังไม่ต้องการใช้สามารถเก็บแช่เย็นไว้ได้หลายเดือน