บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

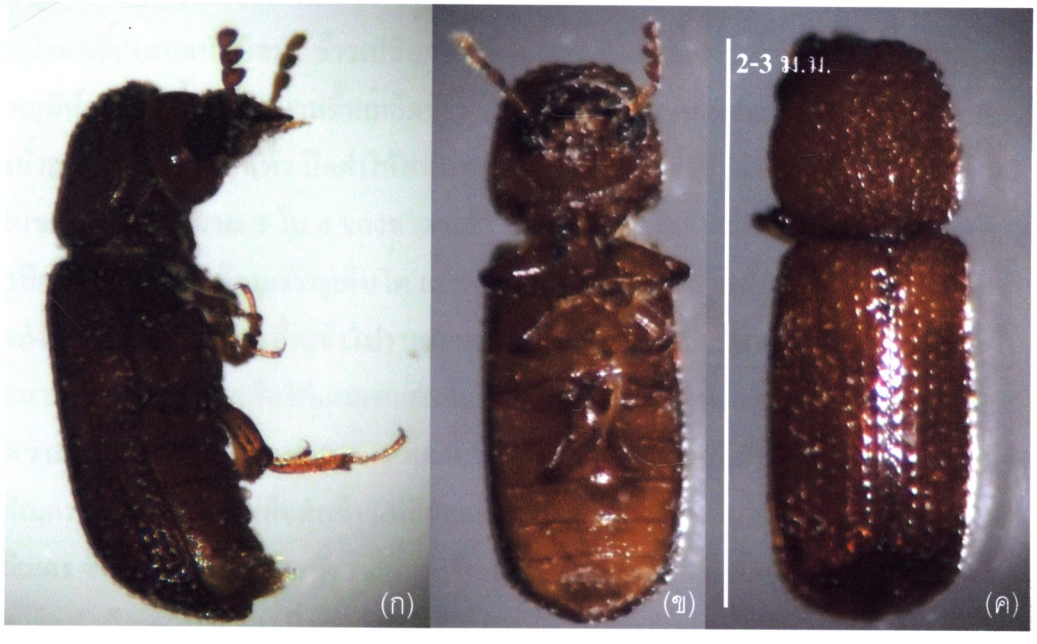
3.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณมอดหัวป้อม

3.1.1 การสำรวจ และเก็บตัวอย่างมอดหัวป้อม

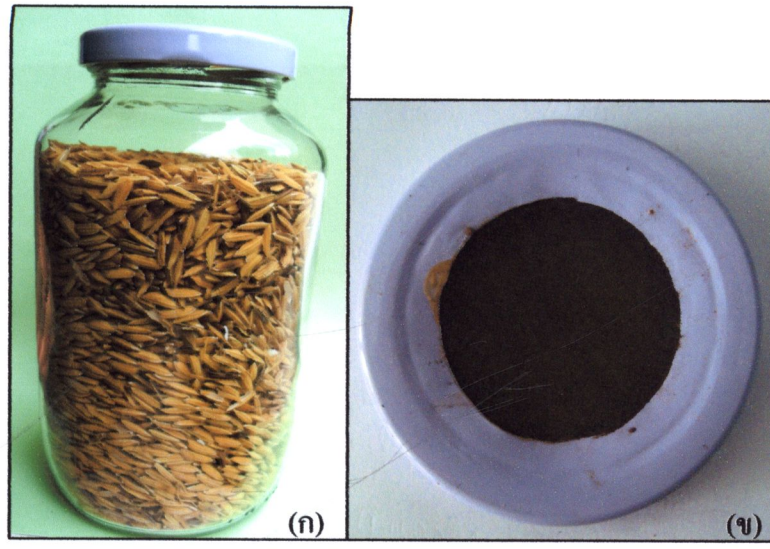
สำรวจแมลงศัตรูในโรงเก็บที่พบบริเวณยุ้งฉาง โรงเก็บอาหารสัตว์ และโรงสีข้าวในจังหวัดเชียงใหม่ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูในโรงเก็บแล้วนำมาแยกชนิด คัดเลือกเฉพาะมอดหัวป้อมตัวเต็มวัย (ภาพ 3.1) มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.1.2 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณมอดหัวป้อมในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงมอดหัวป้อมใช้ขวดโหลแก้วสีใสมีฝาปิด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร บริเวณฝาเจาะช่องระบายอากาศ และปิดทับด้วยผ้าตาข่ายเพื่อป้องกันแมลงหลบหนี เป็นภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงมอดหัวป้อม (ภาพ 3.2)

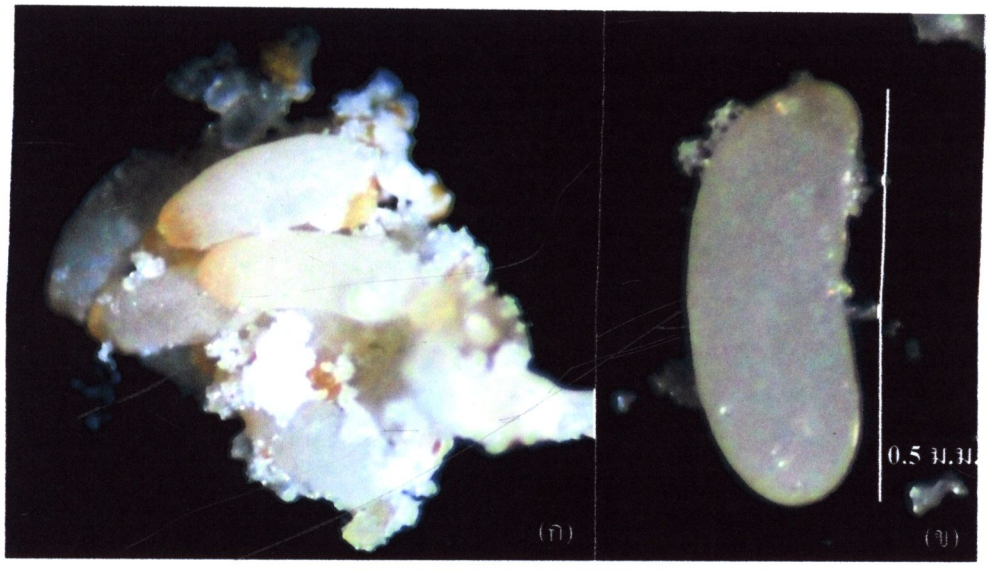


ภาพ 3.1 มอดหัวป้อม (*Rhyzopertha dominica*) ระยะตัวเต็มวัย
(ก) ด้านข้าง (ข) ด้านใต้ท้อง (ค) ด้านบน



ภาพ 3.2 (ก) ขวดโหลแก้วมีฝาปิดเป็นตาข่ายถี่ ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตรเพื่อใช้เลี้ยงแมลง (ข) ฝาปิดเป็นตาข่ายถี่

นำมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยมาเพาะเลี้ยงด้วยข้าวเปลือกโดยนำข้าวเปลือกมาแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแมลงอื่น ๆ ที่อาจปนเปื้อนมากับข้าวเปลือกก่อนนำมาเลี้ยงมอดหัวป้อม ข้าวเปลือกที่นำออกจากช่องแช่แข็งควรพักไว้เพื่อคลายความเย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับความชื้นเมล็ดข้าวเปลือกให้มีความชื้น (moisture content) 15 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำสะอาดแล้วคลุกให้ทั่ว ปิดฝาให้สนิทพักไว้ 48 ชั่วโมง ตวงข้าวเปลือกที่ปรับความชื้นแล้วใส่ลงในขวดโหล ประมาณ 3 ใน 4 ของขวด แล้วจึงปล่อยมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยจำนวน 100 ตัวลงไป แล้วปิดฝาให้มอดหัวป้อมเจริญเติบโต และสืบพันธุ์อยู่ภายใน จากนั้นนำไปจัดวางไว้บนชั้นวางป้องกันมด และแมลงศัตรูอื่นเข้าไปรบกวนระหว่างการเพาะเลี้ยง มอดหัวป้อมจะอยู่ภายในขวดโหลนานประมาณ 5 วันเพื่อให้แมลงผสมพันธุ์ และวางไข่ จากนั้นร่อนแยกแมลงด้วยตะแกรงร่อนที่มีความถี่ช่องตะแกรงขนาด 2.5 และ 0.5 มิลลิเมตร วางซ้อนกันให้ตะแกรงร่อนขนาด 2.5 มิลลิเมตร วางอยู่ด้านบนเพื่อดักข้าวเปลือกแล้วให้มอดหัวป้อมหล่นลงบนตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่ด้านล่างพร้อมทั้งวางถาดหรือภาชนะรองพื้นเพื่อเก็บเศษผงจากการร่อน รวมทั้งไข่ของมอดหัวป้อม (ภาพ 3.3) ที่หลุดลอดลงไปในระหว่างการร่อน เมื่อร่อนแยกข้าวเปลือกออกจากมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยแล้ว นำข้าวเปลือกที่แยกได้พร้อมทั้งเศษผงต่าง ๆ ที่มีไข่ของแมลงปะปนอยู่ใส่ในขวดโหลเดิมพร้อมกับข้าวเปลือก หลังจากไข่ฟักเป็นตัวอ่อน (ภาพ 3.4) จะเจาะเข้าไปกัดกินภายในเมล็ดข้าวเปลือกจนกระทั่งเข้าดักแด้ (ภาพ 3.5) และเป็นตัวเต็มวัยในที่สุด ระยะจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์



ภาพ 3.3 ไข่ของมอดหัวป้อม
(ก) กลุ่มไข่ของมอดหัวป้อมบนเศษเมล็ดพืช (ข) ไข่มอดหัวป้อมขนาด 0.5 มิลลิเมตร

ภาพ 3.4 มอดหัวป้อมระยะตัวอ่อน

ภาพ 3.5 มอดหัวป้อมระยะดักแด้ที่ได้จากการผ่าเมล็ดข้าวเปลือก

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพสารไซเปอร์เมทรินในการควบคุมมอดหัวป้อม

ทำการทดสอบค่าความเป็นพิษทางการสัมผัส ค่าความเข้มข้นของสารไซเปอร์เมทรินที่ทำให้มอดหัวป้อมตัวเต็มวัยตาย 50 % หรือ median lethal concentration (LC_{50}) ที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยจัดความเข้มข้นของสารไซเปอร์เมทรินจำนวน 6 ความเข้มข้น นำสารไซเปอร์เมทรินละลายในน้ำตามความเข้มข้นดังกล่าว ฉีดพ่นบนเมล็ดข้าวเปลือกอัตรา 1.5 มิลลิลิตรต่อข้าวเปลือก 500 กรัม คลุกให้ทั่วแล้วทิ้งไว้ให้สารระเหยจนแห้งซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นนำข้าวเปลือกที่ผ่านการคลุกเมล็ดด้วยสารไซเปอร์เมทรินประมาณ 150 กรัม บรรจุลงในแก้วพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร แล้วปล่อยมอดหัวป้อมตัวเต็มวัย 20 ตัวต่อแก้ว ปิดฝาแก้วพลาสติกด้วยผ้าขาวบางรัดด้วยยางรัดให้แน่นเพื่อป้องกันแมลงหลบหนี ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยในแต่ละความเข้มข้นของสารไซเปอร์เมทรินใช้มอดหัวป้อมตัวเต็มวัยจำนวน 20 ตัว

ความเข้มข้นของสารไซเปอร์เมทรินที่ใช้คลุกกับข้าวเปลือก 500 กรัม ในแต่ละกรรมวิธีมีดังนี้ (สารไซเปอร์เมทริน 25% EC)

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม	น้ำกลั่น
กรรมวิธีที่ 2 สารไซเปอร์เมทริน	อัตราสารออกฤทธิ์ 6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 3 สารไซเปอร์เมทริน	อัตราสารออกฤทธิ์ 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 4 สารไซเปอร์เมทริน	อัตราสารออกฤทธิ์ 18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 5 สารไซเปอร์เมทริน	อัตราสารออกฤทธิ์ 24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 6 สารไซเปอร์เมทริน	อัตราสารออกฤทธิ์ 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

หลังจากปล่อยมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยลงสัมผัสกับข้าวเปลือกที่คลุกสารไซเปอร์เมทรินในแก้วพลาสติกแล้ว ทำการบันทึกอัตราการตายของมอดหัวป้อมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม Logis PC

เมื่อได้ค่า median lethal concentration (LC_{50}) จะใช้ค่าดังกล่าวเป็นค่ามาตรฐาน เพื่อนำมาปรับใช้ในการคัดเลือก (selection) มอดหัวป้อมและกระตุ้นให้เกิดการสร้างความต้านทานต่อสารไซเปอร์เมทรินกับมอดหัวป้อมขึ้น

3.3 การคัดเลือกมอดหัวป้อมที่ต้านทานต่อสารไซเปอร์เมทรินในห้องปฏิบัติการ

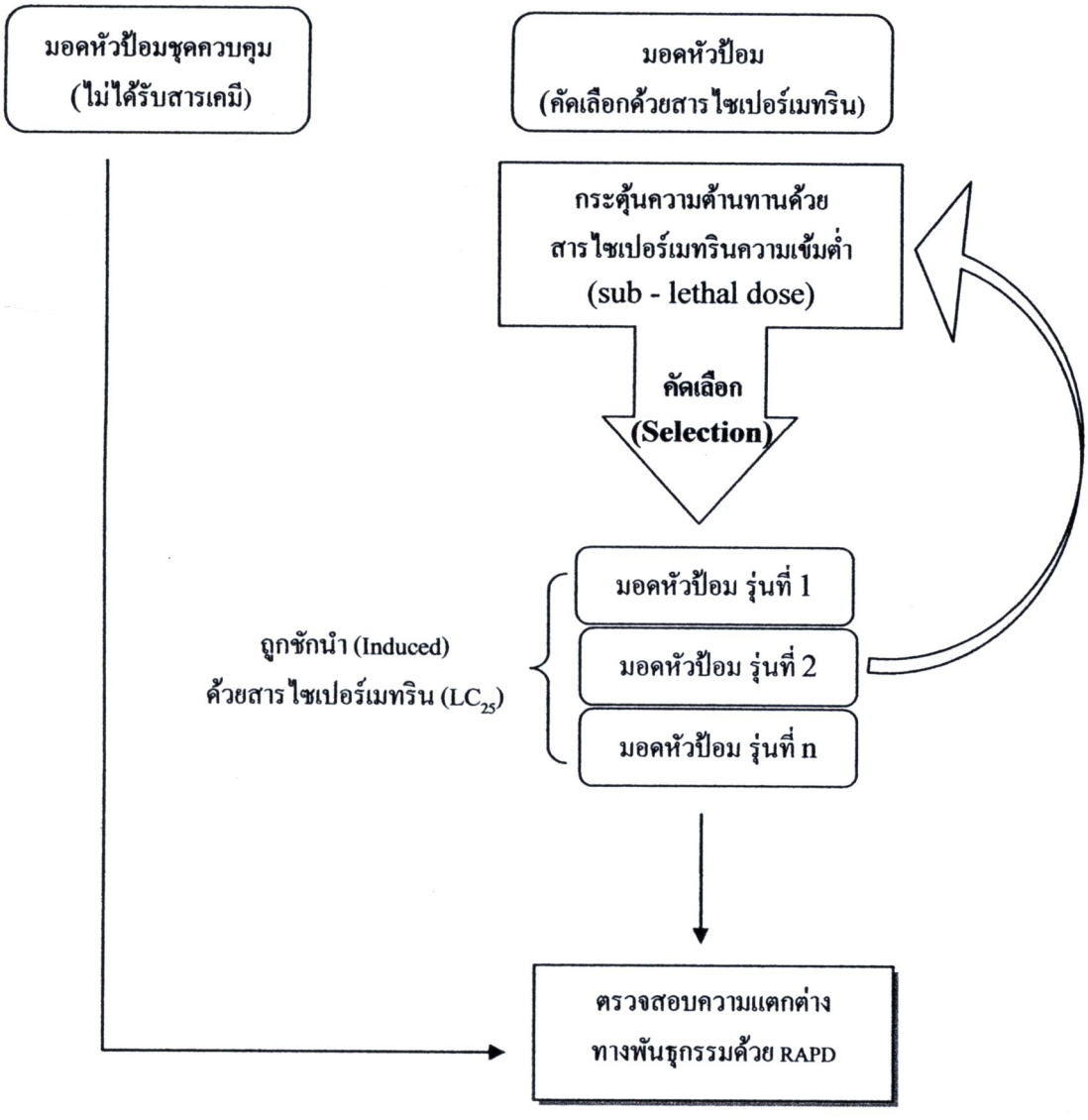
ทำการคัดเลือกมอดหัวป้อมที่ต้านทานต่อสารไซเปอร์เมทริน ที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) คัดแยกมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยออกจากข้าวเปลือกโดยใช้ตะแกรงร่อน จากนั้นเตรียมข้าวเปลือกความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก 2 กิโลกรัมมาคลุกกับสารไซเปอร์เมทรินใช้ความเข้มข้นที่ระดับ LC_{25} เพื่อเป็นการคัดเลือกให้แมลงปรับตัวต้านทาน (selection pressure) ต่อสารไซเปอร์เมทริน โดยใช้สารไซเปอร์เมทรินอัตรา 6 มิลลิลิตรต่อข้าวเปลือก 2 กิโลกรัม นำข้าวเปลือกคลุกสารไซเปอร์เมทรินแล้วนำมาเลี้ยงมอดหัวป้อม

2) มอดหัวป้อมอาศัยอยู่ในข้าวเปลือกที่คลุกด้วยสารไซเปอร์เมทรินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแยกมอดหัวป้อมที่มีชีวิตออกจากข้าวเปลือกโดยใช้ตะแกรงร่อน นำมาเพาะเลี้ยงในข้าวเปลือกปกติ (ไม่ปนเปื้อนสารฆ่าแมลง) ต่อไป โดยนำไปเก็บไว้ในกล่องที่ควบคุมความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ ภายในกล่องพลาสติก นำแมลงที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

3) ในชุดควบคุมมอดหัวป้อมปกติจะนำมาแยกเลี้ยงด้วยข้าวเปลือกที่ไม่ได้คลุกด้วยสารเคมี

4) ประชากรมอดหัวป้อมที่ได้รับการคัดเลือก (selection pressure) ด้วยสารไซเปอร์เมทริน นำมาคัดเลือกอีก 5 รุ่น ด้วยสารไซเปอร์เมทรินอัตราความเข้มข้นที่ระดับ LC_{25} จากนั้นนำมอดหัวป้อมที่ถูกคัดเลือกไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับมอดหัวป้อมประชากรปกติที่ไม่ได้รับสารเคมี (ภาพ 3.6)



ภาพ 3.6 แผนภาพแสดงการคัดเลือกมอดหัวป้อมด้วยสารไซเปอร์เมทรินเพื่อใช้ในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธีอาร์เอพีดี (RAPD)

3.4 การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างมอดหัวป้อมปกติกับมอดหัวป้อมที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารไซเปอร์เมทริน

3.4.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอของมอดหัวป้อม

ตัวอย่างมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยถูกสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Nishiguchi *et al.* (2002) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำมอดหัวป้อมตัวเต็มวัยทั้งมอดหัวป้อมปกติที่เลี้ยงด้วยข้าวเปลือก และไม่ได้รับสารฆ่าแมลงกับมอดหัวป้อมที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารไซเปอร์เมทรินทั้ง 5 รุ่น จำนวน 10 ตัวต่อตัวอย่าง มาบดใน microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตรที่เติม lysis buffer 30 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 ไมโครลิตร ด้วย lysis buffer

2) เติม 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ proteinase k แช่เย็นความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3) บ่มสารจากข้อ (2) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

4) เติม RNaseI (20 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5) เติม phenol pH 8.0 ปริมาตรต่อปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน 5 – 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

6) ดูดส่วนของเหลวสีใสที่อยู่ด้านบนของหลอดใส่ในหลอดใหม่และทำซ้ำจนได้สารละลายใส

7) เติม chloroform ปริมาตรต่อปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

8) ดูดส่วนที่เป็นของเหลวสีใสด้านบนของหลอด ใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม 100 % ethanol แช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาแล้วนำไปแช่ในตู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งเก็บตะกอนไว้

10) ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

11) เทส่วนของเหลวทิ้ง ให้เหลือเพียงส่วนที่เป็นตะกอน จากนั้นตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

12) ละลายตะกอนด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

13) ตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอด้วย Electrophoresis ใน 1% agarose gel หรือวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอคำนวณได้จาก :

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = ค่า OD ที่ 260 nm × 50 µg/ml × 100

โดยที่ ค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ

50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ OD_{260} เท่ากับ 1

100 คือ dilution factor (ดีเอ็นเอเจือจางด้วย TE buffer อัตราส่วน 1:100)

การตรวจสอบคุณภาพสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ คำนวณจากอัตราส่วนของค่า OD_{260} : OD_{280} โดยดีเอ็นบริสุทธิ์จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.4.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD มีวิธีการดังนี้

1) การสุ่มเลือกไพรเมอร์

การทดลองเบื้องต้นต้องตรวจหาไพรเมอร์ที่มีความสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยสุ่มใช้ arbitrary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (ตาราง 3.1)

ตาราง 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

NO.	Primer	Nucleotide Sequence
1	OPD 01	5'-ACC GCG AAG G-3'
2	OPD 07	5'-TTG GCA CGG G-3'
3	OPD 16	5'-AGG GCG TAA G-3'
4	OPD 18	5'-GAG AGC CAA C-3'
5	OPD 19	5'-CTG GGG ACT T-3'
6	OPF 02	5'-GAG CAT CCC T-3'
7	OPF 05	5'-CCG AAT TCC C-3'
8	OPF 06	5'-GGG AAT TCG G-3'

ตาราง 3.1 (ต่อ)

NO.	Primer	Nucleotide Sequence
9	OPF 11	5'-GGG AAT TCG G-3'
10	OPF 12	5'-ACG GTA CCA G-3'
11	OPF 20	5'-GGT CTA GAG G-3'
12	AP-A 01	5'-TAC AAC GAG G-3'
13	AP-A 05	5'-GGA ACC AAT C-3'
14	AP-A 06	5'-AAA CTC CGT C-3'
15	AP-A 07	5'-TCG ATA CAG G-3'
16	AP-A 10	5'-GGT ACT AAG G-3'
17	OPAB 11	5'-GTG CGC AAT G-3'
18	OPAB 14	5'-AAG TGC GAC C-3'
19	OPAB 17	5'-TCG CAT CCA G-3'
20	OPAB 18	5'-CTG GCG TGT C-3'

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เติมสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาที่ระดับความเข้มข้นหนึ่ง เมื่อเลือกได้ไพรเมอร์ที่ต้องการแล้วจึงทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิกับเวลาที่ใช้ในพีซีอาร์ เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับตัวอย่างที่ทดลอง โดยใส่สารต่าง ๆ ดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ปริมาตร	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. ดีเอ็นเอ (Template)	1.0 ไมโครลิตร	20 ng/µl
2. บัฟเฟอร์	1.0 ไมโครลิตร	10 เท่า
3. MgCl2	1.0 ไมโครลิตร	25 mM
4. dNTP	2.0 ไมโครลิตร	1 mM
5. ไพรเมอร์	0.8 ไมโครลิตร	10 pmole
6. Taq polymerase	0.1 ไมโครลิตร	5 unit/µl
7. น้ำกลั่น	4.1 ไมโครลิตร	
ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร		

ถ้าใช้เครื่องพีซีอาร์ที่ไม่มีระบบให้ความร้อนที่ฝาปิด ให้เติม paraffin oil 1-2 หยด ถ้าเป็นเครื่องพีซีอาร์ที่มีระบบให้ความร้อนที่ฝาไม่ต้องหยดน้ำมันปิดหน้าสารละลายนำมาทำพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาตามเงื่อนไขดังนี้

	96 องศาเซลเซียส	90 วินาที	
denature	96 องศาเซลเซียส	30 วินาที	ทำซ้ำ 45 รอบ
annealing	42 องศาเซลเซียส	60 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	150 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	5 นาที (เพื่อให้เกิด primer extension สมบูรณ์)	

แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.3 การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยอาร์เอพีดีตรวจสอบได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) มีวิธีการทำดังนี้

- การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบ และหวี (comb)

2) ชั่งผงอะกาโรส 1.2 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (1x TAE buffer) 100 มิลลิลิตร

3) หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด

4) ตั้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงไปตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

5) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร

6) ดูดสารละลายดีเอ็นเอหรือสารละลายที่ผ่านการทำพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้

7) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 5-10 โวลต์ต่อเซนติเมตร

8) ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ โดยดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที แล้วจึงปิดเครื่อง

9) นำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 10-20 นาที ควรระวังการสัมผัสเอธิเดียมโบรไมด์ด้วยมือเปล่า เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)

10) นำเจลมาใส่ในกล่องพลาสติก ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออกโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านเบา ๆ ประมาณ 5-10 นาที

11) นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation) พร้อมบันทึกข้อมูลภาพถ่ายในคอมพิวเตอร์

- การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์เจล

1) ล้างทำความสะอาดแผ่นกระจกที่ใช้เตรียมเจล ซึ่งเป็นกระจกใสขนาดต่างกัน 2 แผ่น ประกบกันแล้วเช็ดด้วย 95% ethanol ให้สะอาดทั่วกระจก ทั้ง 2 แผ่น

2) ใส่ clear view บนกระจกแผ่นเล็ก เช็ดให้ทั่วกระจก ทำ 3 ครั้ง เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก จากนั้นใส่ bind silane ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร บนกระจกแผ่นใหญ่เพื่อให้เจลติดกับกระจก แล้วเช็ดให้ทั่ว ทำ 2 ครั้ง

3) นำกระจกทั้ง 2 แผ่น มาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer หนา 0.3 มิลลิเมตร ไว้ที่ขอบทั้งสองข้างของกระจกเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองโดยหันด้านที่ทา bind silane และ

clear view เข้าหากัน แล้วใช้ที่หนีบกระดาษ หนีบยึดกระจกให้อยู่กับที่ทั้งสองด้าน เพื่อรอเทเจลต่อไป

4) เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 6 % มีส่วนผสมดังนี้

urea	29.4	กรัม
40 % polyacrylamide	10.5	มิลลิลิตร
10 % TBE	7.0	มิลลิลิตร
10 % APS	400.0	ไมโครลิตร
TEMED	30.0	ไมโครลิตร

ชั่ง urea 29.4 กรัม เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ ให้ urea ละลาย เมื่อ urea ละลายแล้ว ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 10xTBE และ 40 % polyacrylamide ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติม 10% ammonium persulphate (APS) ปรับปริมาตรให้ได้ 70 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น เติม TEMED เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นนำมาเทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หวีลงไปด้านบน วางกระจกในแนวนอน เจลจะแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

รูปถ่ายของเจลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GeneTools ยี่ห้อ Syngene ซึ่งเป็นโปรแกรมการวิเคราะห์ภาพเจล สามารถตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมอดหัวป้อม ซึ่งโปรแกรมดังกล่าวสามารถบอกขนาดของดีเอ็นเอแต่ละแถบโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ marker คือ 100 bp Plus DNA ladder จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างมอดหัวป้อมที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารไซเปอร์เมทรินและมอดหัวป้อมชุดควบคุมมาหาลำดับเบส (DNA sequencing) แล้วนำไปเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรมใน Gene bank เพื่อหาความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง