บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเลี้ยงขยายจำนวนแมลง (mass rearing)

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้

ถั่วเขียว

ขวดแก้ว

กล่องพลาสติก

ด้วงถั่วเขียว *Callosobruchus maculatus* F.

ตู้ Incubator

กระดาษกรอง

กาว

เครื่องชั่งละเอียด

3.1.2 วิธีการ

1. นำถั่วเขียวพอประมาณใส่ในกล่องพลาสติกหรือขวดแก้วที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว
2. ใส่ด้วงถั่วเขียว *Callosobruchus maculatus* ลงไป เพื่อเลี้ยงให้ด้วงออกไข่และฟักเป็นตัวในตู้ Incubator
3. เมื่อด้วงฟักออกเป็นตัวก็เก็บทั้งเพศผู้ และเพศเมีย ไปใส่ในถั่วเขียวใหม่
4. ทำการเลี้ยงขยายต่อเนื่องจนกระทั่งได้ด้วงมากพอประมาณสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

3.2 การทดสอบด้วงถั่วกับสะเดา

การทดลองนี้ใช้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างสมบูรณ์(completely randomized design ; CRD) 4 กลุ่มการทดลอง มีจำนวนหน่วยการทดลอง 5 ซ้ำ

จึงมีกลุ่มการทดลองย่อยรวม 20 กลุ่มการทดลอง เทียบกับกลุ่มควบคุม

3.2 ในการทดลองแต่ละกลุ่มการทดลอง มีดังนี้

T_1 - กลุ่มควบคุม

T_2 - ด้วงถั่วในถั่วเขียวที่คลุกด้วยสารสกัดสะเดา ความเข้มข้น 10 ppm Azadirachtin

T_3 - ด้วงถั่วในถั่วเขียวที่คลุกด้วยสารสกัดสะเดา ความเข้มข้น 30 ppm Azadirachtin

T_4 - ด้วงถั่วในถั่วเขียวที่คลุกด้วยสารสกัดสะเดา ความเข้มข้น 50 ppm Azadirachtin

3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

สารสกัดจากสะเดา 0.4% Azadirachtin จากกองวัตถุมีพิษ

Methanol

แท่งแก้วสำหรับคน

กระดาษกรองเบอร์ 4

ขวดแก้วสำหรับเลี้ยงแมลง

กาวสำหรับติดกระดาษกรองปิดฝาขวด

ปิเปต ขนาด 2 , 5 , 10 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ ขนาด 50 , 100 มิลลิลิตร

ขวดปรับปริมาตร (Volummetric flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 10 , 50 , 100 มิลลิลิตร

Magnetic stirrer

ปากคีบ

ถุงมือยาง

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.2.2 วิธีการทดลอง

1. เจือจางสารสกัดจากสะเดาด้วย Methanol ให้ได้ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ppm
2. ชั่งถั่วเขียวน้ำหนัก 100 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว
3. นำสารจากความเข้มข้นต่าง ๆ จากข้อ 1 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในถั่วเขียวแล้วใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วถึง
4. ทิ้งไว้จนแห้ง
5. ใส่ด้วงลงในขวดที่มีถั่วเขียวคลุกสารสกัดสะเดาความเข้มข้น 10 ,30 และ 50 ppm Azadiractin
6. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษกรอง ตั้งทิ้งไว้ให้ด้วงผสมพันธุ์และวางไข่ และฟักออกเป็นตัวและเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัยลูกรุ่นที่ 1 เพื่อเตรียมนำไปหาเอนไซม์

3.3 การทดสอบด้วงถั่วกับสะเดาผสมกับ Synergists

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างสมบูรณ์(completely randomized design;CRD)5 กลุ่มการทดลอง มีจำนวนหน่วยการทดลอง 5 ซ้ำ (replications) จึงมีกลุ่มการทดลองย่อยรวม 25 กลุ่มการทดลอง แต่ synergists ที่ใช้มี 3 ชนิด จึงมีกลุ่มการทดลองย่อยรวม 75 กลุ่มการทดลอง ทุก ๆ การทดลองทำเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่ม synergists

synergists ที่ใช้ 3 ชนิด คือ

1. triphenyl phosphat (TPP)
2. diethyl maleate (DEM)
3. piperonyl butoxide (PB)

3.3.1 ใน synergists แต่ละชนิดมีกลุ่มการทดลอง ดังต่อไปนี้

T_1 - กลุ่มควบคุม

T_2 - สะเดาความเข้มข้น 10 ppm ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร + synergists ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร

T_3 - สะเดาความเข้มข้น 30 ppm ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร + synergists ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร

T_4 - สะเดาความเข้มข้น 50 ppm ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร + synergists ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร

T_5 - synergists

3.3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

แท่งแก้วสำหรับคน

กระดาษกรองเบอร์ 4 แมลง

กาวลาเท็กสำหรับติดกระดาษ

ขวดแก้วสำหรับเลี้ยง

ปิเปต ขนาด 1 , 5 , 10 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ ขนาด 50 ,100 มิลลิลิตร

ขวดปรับปริมาตร (Volummetric flask) ขนาด 50 มิลลิเมตร

ถุงมือยาง

กระบอกตรวงขนาด 10 , 50 , 100 มิลลิลิตร

Magnetic stirrer

ปากคีบ

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง

Magnetic bar

ลูกยาง

สารเคมี

สารสกัดจากสะเดา 0.4 % Azadirachtin จากกองวัตถุมีพิษ

Methanol

Piperonyl butoxide

Triphenyl phosphate

Diethyl maleate

3.3.3 วิธีการทดลอง

1. เจือจางสารสกัดจากสะเดาให้ได้ความเข้มข้น 10 , 30 และ 50 ppm
2. นำสารสกัดจากข้อ 1 มาผสมกับ synergists ปริมาณ 10% โดยปริมาตรของสารสกัดจากสะเดา
3. ชั่งถั่วเขียวน้ำหนัก 100 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว
4. นำสารจากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในถั่วเขียว ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วถั่วเขียว
5. ทิ้งไว้จนแห้ง
6. ใส่ด้วงถั่วลงไป 200 ตัว ในขวดข้อ 5
7. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษกรอง นำไปเลี้ยงใน Incubator เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จนกระทั่งมีลูกรุ่นที่ 1 ออกมา
8. นำลูกตัวเต็มวัย รุ่นที่ 1 ไปวัดปริมาณเอนไซม์

3.4 การทดสอบด้วงถั่วกับ synergists

3.4.1 วิธีทดสอบ

1. ละลาย synergists ใน Methanol ให้ได้ 10% โดยปริมาตร
2. ชั่งถั่วเขียว 100 กรัม ใส่ในขวดที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว
3. ใส่สาร synergists ปริมาณ 0.5 ml จากข้อ 2 ลงในขวดถั่วเขียว

5. ทิ้งไว้จนแห้ง
6. ใส่ด้วงถั่ว 200 ตัว ลงในถั่วเขียว
7. ปิดฝาขวดด้วยกระดาษกรอง
8. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน จนกระทั่ง ออกลูกรุ่นที่ 1
9. นำลูกตัวเต็มวัย รุ่นที่ 1 ไปตรวจวัดระดับเอนไซม์

3.5 วิธีการวิเคราะห์เอนไซม์จากด้วงถั่ว

นำด้วงถั่วที่ได้จากการทดลองทั้ง 4 ลักษณะ คือ

1. ด้วงในกลุ่มควบคุม (control)
2. ด้วงถั่ว + สะเดาในความเข้มข้นต่าง ๆ
3. ด้วงถั่ว + (สะเดา + synergists) ในความเข้มข้นต่าง ๆ ของสะเดา
4. ด้วงถั่ว + synergists

มาทำการวิเคราะห์หาเอนไซม์โดยขั้นตอนการวิเคราะห์หาเอนไซม์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน

1. การสกัดเอ็นไซม์จากด้วงถั่ว
2. การตรวจวัดระดับเอนไซม์ของด้วงถั่ว

3.5.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

อุปกรณ์

โกร่งบด

โฟมใส่น้ำแข็ง

น้ำกลั่น

น้ำแข็ง

Cuvette

Microsyring

Magnetic stirrer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17434890

ปากคีบ

กระดาษทิชชูสำหรับเช็ด Cuvette

Parafilm

กระดาษ Thermal paper

Pasteur Pipette

หลอด Centrifuge ขนาด 10 ml

ลูกยาง

กระบอกตวงขนาด 10, 50 , 100 มิลลิลิตร

กระดาษกราฟ

Pipette tip ขนาด 10 , 100 , 1000 ไมโครลิตร

Microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ขวดแก้วสำหรับใส่สารเคมี

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 4 องศา

ถัง Liquid Nitrogen

เครื่องปั่น Ultra centrifuge

เครื่อง Gas Liquid Chromatography

เครื่อง Spectrophotometer

สารเคมี

Glucose 6-phosphate dehydrogenase

NADP

Glucose 6-phosphate

Hexane

glycerol

EDTA

0.1 M phosphate buffer pH 7.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารฆ่าแมลง Aldrin

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone)

Dichloronitrobenzene (DCNB)

Paranitrophenyl acetate (PNPA)

Methanol (HPLC grade)

3.5.2 ขั้นตอนการสกัดเอ็นไซม์จากด้วงถั่ว

1. ชั่งน้ำหนักด้วงถั่วตัวเต็มวัย ตัวอย่างละ 0.5 กรัม
2. นำด้วงจากข้อ 1 มาบดรวมกับ PVPP กรัม ในโกร่งบดแช่เย็น ระหว่างการบดเติม 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทีละน้อย ๆ
3. เมื่อบดด้วงจนละเอียดแล้ว ใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนน้ำใส่ในหลอดทดลองไว้
4. นำส่วนที่เป็นน้ำในข้อ 3 ไปปั่นโดยใช้เครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ แล้วแบ่ง เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้เพื่อนำไปตรวจวัดเอ็นไซม์ esterase อีกส่วนหนึ่งนำมาปั่นตามข้อ 5
5. นำส่วนหนึ่งของสารละลายที่ได้ในข้อ 4 ไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 52,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายที่ได้จากการปั่นส่วนบน (supernatant) เพื่อนำไปตรวจวัดเอ็นไซม์ glutathione-S-transferase และส่วนที่ตกตะกอน (pellet) เก็บไว้เพื่อนำมาตรวจวัดเอนไซม์ monooxygnase

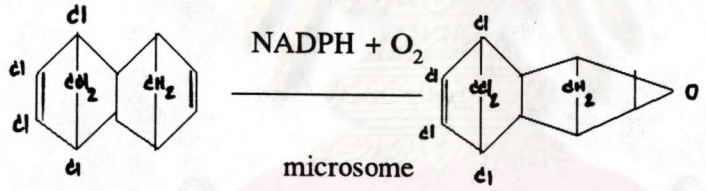
3.5.3 การตรวจวัดระดับเอนไซม์จากด้วงถั่ว

จากการทดลองทำการตรวจวัดระดับเอ็นไซม์ที่มีผลทำให้แมลงเกิดการต้านทานต่อสารสกัดจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ esterase, glutathione-S-transferase และ monooxygenase เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัด และชนิดของสารตั้งต้น ดังแสดงไว้ในตาราง

ชนิดของเอนไซม์ที่ทำการตรวจวัด	เครื่องมือที่ใช้ตรวจ	ชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้
monooxygenase	Gas-Liquid-chromatography	Aldrin
glutathione-S-transferase	Spectrophotometer (344 nm)	DCNB
esterase	Spectrophotometer (400 nm)	PNPA

3.5.3.1 การตรวจวัดระดับเอนไซม์ monooxygenase

ใช้วิธี Aldrin epoxidation ของ Wolff และคณะ (1979) โดยอาศัยหลักการที่เอ็นไซม์ monooxygenase สามารถเร่งการเกิดปฏิกริยา oxidation เปลี่ยนแปลง Aldrin ให้เป็น dieldrin ดังไดอะแกรมด้านล่าง



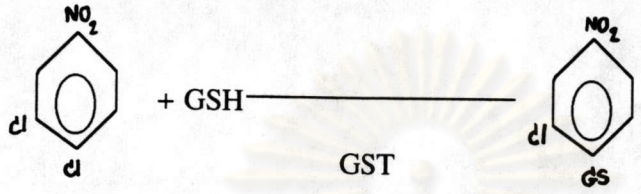
adrin dieldrin

และทำการตรวจวัดปริมาณ dieldrin ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ซึ่งมีสภาวะของเครื่องดังนี้

- เครื่อง GC รุ่นShimadzu รุ่น GC-6AM
- detector : electron capture detector
- glass column : 2 m. long x 2 mm. diameter, บรรจุด้วย 1.5% - SP-2250+1.95% SP 2401 on 100/120 suplecoport
- injection temperature : 300 °c
- column temperature : 230 °c
- detector temperature : 300 °c
- N flow rate 40 ml/min

3.5.3.2 การตรวจวัดระดับเอ็นไซม์ glutathio-S transferase

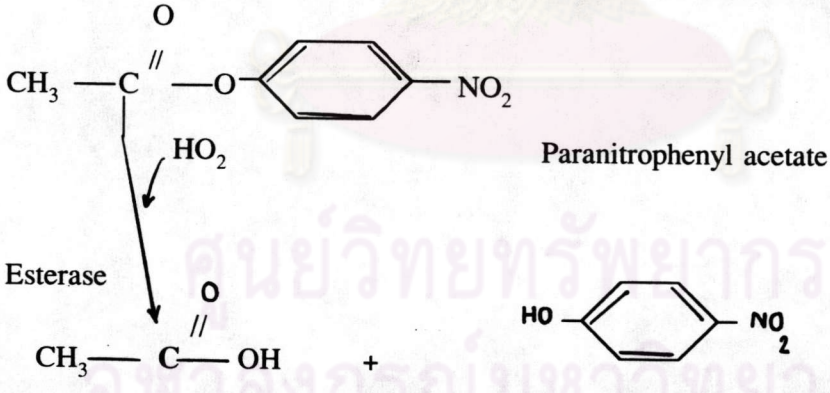
ใช้วิธี DCNB assays ของ Booth et al. (1961) โดยอาศัยหลักการคือ DCNB + glutathion (GSH) มี glutathione-S-transferase เป็นตัวเร่ง ทำการวัดผลิตภัณฑ์ (product) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ระดับความยาวคลื่น 344 นาโนเมตร ปฏิกริยาการรวมตัวของ DCNB กับ GSH เขียนได้ดังไดอะแกรม



Dichloronitrobenzene (DCNB) Monochloronitrobenzene-glutathion

3.5.3.3 การตรวจวัดระดับเอ็นไซม์ esterase

ใช้วิธี PNPA assay ของ Mackness et. al. (1983) โดยอาศัยหลักการคือเอ็นไซม์ esterase เร่งการเกิดปฏิกริยา hydrolysis ของสารตั้งต้นคือ Phenylacetate หรือ PNPA ไปเป็น Paranitrophenol ซึ่งจะเกิดเป็นสารละลายสีเหลือง ดังไดอะแกรม



Paranitrophenyl acetate

acetic acid Paranitrophenol (yellow in akali solution)

การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของParanitrophenolที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 วิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวเลข เช่น ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่า enzyme activity เทียบกับกลุ่มควบคุม

2. สถิติวิเคราะห์ ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One Way Analysis of Variance หรือ One Way ANOVA) ใช้ทดสอบความแตกต่างของระดับเอนไซม์ของแต่ละตัวอย่างในการทดลอง เมื่อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ละตัวอย่างจะทำการทดสอบโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ซึ่งจะทดสอบให้ทราบว่าการทดลองใดที่แตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย