บทที่ 3
วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง
   หนอนเยื่อไผ่ จากป่าไผ่ อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง
   2.1 กล่องพลาสติก พร้อมฝาปิดที่มีรู
   2.2 เยื่อกระดาษชุบน้ำพอหมาด

3. สารที่ใช้กับสัตว์ทดลอง
   3.1 อะซีโตน (acetone)
   3.2 ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (S-methoprene), Zoecon Company, USA

4. อุปกรณ์ที่ใช้หยดฮอร์โมนและการเก็บฮีโมลิมพ์
   4.1 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe)
   4.2 ไมโครปิเปต
   4.3 กรรไกรปลายแหลม
   4.4 แผ่น parafilm
   4.5 หลอด microcentrifuge
   4.6 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
   4.7 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixer)
   4.8 scintillator
   4.9 เมธานอล (methanol)

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัดสัตว์ทดลอง

5.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

5.2 ชุดเครื่องมือผ่าตัด ได้แก่ ถาดผ่าตัด กรรไกร ปากคีบขนาดเล็ก

5.3 เข็มปักแมลง เบอร์ 3 (insect pins No.3)

5.4 ไดเอทิล อีเธอร์ (diethyl ether)

5.5 สารละลายริงเกอร์ (Ringer 's solution)

6.อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อและย้อมสีเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology)

6.1 ขวด vial

6.2 กระดาษ label

6.3 ตู้อบ (hot oven)

6.4 กระจกสไลด์

6.5 เครื่อง microtome

6.6 หลอดหยด

6.7 ตะเกียงบุนเสน

6.8 ปากคีบปลายแหลม

6.9 สไลด์หลุม (hole slide)

6.10 Bouin 's fixative

6.11 absolute ethanol

6.12 ไซรีน (xylene)

6.13 ปิโตรเลียม อีเธอร์ (petroleum ether)

6.14 paraplast

6.15 haematoxylin

6.16 eosin

6.17 permount

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

7.1 ชุดสำหรับทำอิเลคโตรโฟเรซิส ประกอบด้วยแผ่นแก้ว (กว้างประมาณ 16 เซนติเมตร ยาวประมาณ 16-20 เซนติเมตร) spacer , comb และ chamber

7.2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

7.3 บีกเกอร์

7.4 ไมโครปิเปต

7.5 scintillator

7.6 โปรตีนมาตราฐาน (protein marker)

7.7 30% อะคริลาไมด์ (acrylamide), 0.8% บิสอะคริลาไมด์ (bisacrylamide)

7.8 4X Tris-Cl/acrylamide pH 8.8

7.9 4X Tris-Cl/acrylamide pH 6.8

7.10 10% (wt/vol) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

7.11 TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine)

7.12 2X SDS/sample buffer

7.13 5X SDS/electrophoresis buffer

7.14 น้ำกลั่น

8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจฮอร์โมนโดยวิธี radioimmunoassay (RIA)

8.1 ไมโครปิเปต

8.2 เครื่องผสมเขย่า

8.3 หลอดทดลอง

8.4 เครื่องวัดรังสีเบต้า (scintillation counter)

8.5 ฮอร์โมนเอกไดโซนติดฉลาก (H^3-labeled ecdysone, New England Neuclear, Boston, USA)

8.6 แอนติบอดี (anti-ecdysone rabbit antibody)

8.7 แอมโมเนียมซัลเฟต

8.8 Aquasal II (scintillator)

9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บโปรตีน

9.1 ไมโครปิเปต

9.2 กรรไกรผ่าตัด

9.3 petri dish

9.4 หลอด microcentrifuge

9.5 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง

9.6 เครื่องผสมเขย่า

9.7 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline)

9.8 ฟีนิลไธโอยูเรีย (phenylthiourea)

10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจระดับโปรตีน

10.1 หลอดทดลอง

10.2 ไมโครปิเปต

10.3 กระดาษกรอง

10.4 ขวดรูปชมพู่ (flask)

10.5 กรวยกรอง

10.6 เครื่องผสมเขย่า

10.7 spectrophotometer

10.8 bovine serum albumin

10.9 Bio-Rad protein assay kit

10.10 deionized water

10.11 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติม 0.05 กรัม/ลิตร ของฟีนิลไธโอยูเรีย

11. อุปกรณ์ในการบันทึกผล

11.1 กล้องถ่ายรูป

11.2 กล้องจุลทรรศน์

12. สถานที่ทำวิจัย

-Endocrinology Research Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

วิธีการวิจัย

การเตรียมหนอนเยื่อไผ่เพื่อใช้ในการทดลอง

ทำการเลี้ยงหนอนเยื่อไผ่ในห้องปฏิบัติการโดยจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม โดยนำเยื่อกระดาษชุบน้ำพอหมาดวางไว้ภายในกล่องพลาสติคที่ฝาปิดผ่านการเจาะรูเรียบร้อยแล้วจึงนำหนอนเยื่อไผ่ออกจากกระบอกไม้ไผ่มาเลี้ยงไว้ภายในกล่อง จากนั้นนำไปเลี้ยงไว้ภายในตู้อบปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 1

การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นต่าง ๆที่สามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเข้าดักแด้ โดยแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 8 กลุ่ม ๆละ 20 ตัว ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มขนาดเล็ก หยดฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นต่าง ๆที่ละลายในอะซีโตน การหยดฮอร์โมนจะหยดลงด้านบนของตัวหนอน โดยเริ่มหยดจากประมาณกึ่งกลางลำตัวเรื่อยไปยังด้านท้ายของลำตัว การทดลองนี้ทำการหยดฮอร์โมนลงบนตัวหนอน จำนวน 1 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซีโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.0001	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.0005	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.001	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.005	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 6 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.025	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 7 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.05	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 8 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.1	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว

<u>การสังเกตและบันทึกผล</u> สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จะเกิดขึ้น โดยบันทึกผลทุกวัน เป็นเวลา 60 วัน ตามระดับการเปลี่ยนสี 5 ระดับดังนี้

G 0	หมายถึง	สีปกติ
G 1	หมายถึง	เริ่มเห็นจุดสีส้ม กระจายตามผิวลำตัว
G 2	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มเข้มมากขึ้นทั่วผิวลำตัว
G 3	หมายถึง	ผิวลำตัวมีสีส้มอมน้ำตาลทั่วตัวหรือเปลี่ยนเข้าดักแด้

G 4	หมายถึง	ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้ม
G 5	หมายถึง	ผิวลำตัวมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ

การทดลองที่ 2

การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์ โดยทำการหยดฮอร์โมนลงบนตัวหนอน 1 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ใช้หนอนเยื่อไผ่จำนวน 60 ตัว หยดอะซีโตน 5 ไมโครลิตร/ตัว

กลุ่มที่ 2 ใช้หนอนเยื่อไผ่ จำนวน 100 ตัว หยดฮอร์โมนจูวีไนล์ 1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว

จากนั้นทำการเก็บฮีโมลิมพ์ของหนอนทั้ง 2 กลุ่ม เก็บครั้งละ 5 ตัว ทุกๆ 2 วัน ทำเช่นนี้ไปจนพบหนอนเยื่อไผ่ในกลุ่มที่ 2 เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีลำตัว จากนั้นเริ่มเก็บฮีโมลิมพ์จากหนอนกลุ่มที่ 2 ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะในแต่ละระดับสี ระดับละ 5 ตัว จนครบ

วิธีการเก็บฮีโมลิมพ์

1. ทำการชั่งน้ำหนักหนอน
2. ใช้กรรไกรปลายแหลมขลิบตรงบริเวณ abdominal segment เพื่อให้ฮีโมลิมพ์ไหลออกมาแล้วหยดลงบนแผ่น parafilm
3. ใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิมพ์ 30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge
4. จากนั้นเติมเมธานอล 270 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture 3 วินาที
5. นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
6. ดูด supernatant 250 ไมโครลิตรแล้วถ่ายลงในหลอดใหม่
7. นำหลอด microcentrifuge ที่ได้ไปวางไว้ใน scintillator เพื่อทำให้แห้ง
8. หลังจากนั้นนำเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาระดับฮอร์โมนเอกไดโซน

การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโดยวิธี radioimmunoassay

1. เตรียม standard ตามลำดับความเข้มข้นดังนี้ 400 200 100 50 25 12.5 6.25 3.125 1.5625 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร

2. ใส่น้ำกลั่น 10 ไมโครลิตรลงในหลอดแก้ว หลังจากนั้นเติม standard หรือตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

3. เติม H^3-labeled ecdysone 100 ไมโครลิตรและ anti-ecdysone rabbit antibody 100 ไมโครลิตร

4. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture แล้ว incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5. เติม 100% แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 200 ไมโครลิตร

6. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture แล้ว incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. ดูดเอา supernatant ออก

9. เติม 50% แอมโมเนียมซัลเฟต 250 ไมโครลิตร

10. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

11. ดูดเอา supernatant ออก

12. เติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตรลงในหลอด

13. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture

14. เติม 9 volume ของ Aquasal II

15. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture

16. นำเข้าเครื่องวัดรังสี scintillator counter

17. นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนโดยเปรียบเทียบกับ standard curve

การทดลองที่ 3

การศึกษากลไกการทำงานของฮอร์โมนจูวีไนล์ที่สามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่เกิดการเข้าดักแด้ โดยการผ่าตัดเอาสมองของหนอนออก ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงผิวหนังบริเวณรอยต่อระหว่าง head capsule และโปรทอแรกซ์ (prothorax) ให้ขาด จากนั้นใช้ปากคีบปลายแหลมถ่างรอยแผลให้กว้างออกจนมองเห็นตำแหน่งของสมองทั้ง 2 พู (lobe) อยู่ตรง

กลางของ head capsule ใช้ปากคีบปลายแหลมอีกข้างหนึ่ง สอดเข้าไปดึงเอาสมองทั้งคู่ออกมาอย่างระมัดระวัง จากนั้นใช้พาราฟินปิดบาดแผลนั้นอย่างรวดเร็ว นำหนอนไปพักไว้ เพื่อรอการหยดฮอร์โมน แบ่งหนอนเยื่อไผ่ที่ผ่าตัดเอาสมองออกแล้ว เป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทำการหยดฮอร์โมนลงบนตัวหนอน จำนวน 1 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หยดอะซีโตน	5	ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 2 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.005	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 3 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.025	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 4 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.05	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 5 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.1	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 6 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.25	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 7 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	0.5	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว
กลุ่มที่ 8 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์	1	ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร/ตัว

<u>การสังเกตและบันทึกผล</u> เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4

การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้นสูงและต่ำต่อการเปลี่ยนแปลงของสมองและต่อมโปรทอแรกซิก ทางสัณฐานวิทยาและทางเนื้อเยื่อวิทยา แบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 2 กลุ่ม ทำการหยดฮอร์โมนลงบนตัวหนอน จำนวน 1 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์ 0.05 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

กลุ่มที่ 2 หยดฮอร์โมนจูวีไนล์ 1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตร/ตัว

สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีผิวลำตัว หากหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G3 จึงนำหนอนทั้ง 2 กลุ่มมาผ่าตัดสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสมองและต่อมโปรทอแรกซิก จากนั้นผ่าเอาทั้งสมองและต่อมโปรทอแรกซิกออกเพื่อนำไปผ่านขั้นตอนการทำ paraffin section เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบผลที่ได้กับหนอนในกลุ่มควบคุมที่หยดอะซีโตน 5 ไมโครลิตร/ตัวและดักแด้จากธรรมชาติ

<u>การสังเกตผล</u> สังเกตและบันทึกผลโดยการถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเนื้อเยื่อวิทยา

การทดลองที่ 5

การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดโปรตีนในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะต่าง ๆในเพศผู้และเพศเมีย ทำการหยดฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/5 ไมโครลิตร ลงบนตัวหนอน จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นเริ่มทำการเก็บฮีโมลิมพ์ตามขั้นต่าง ดังนี้

1) วันที่ 5 ของการทดลอง
2) วันที่ 10 ของการทดลอง
3) วันที่ 15 ของการทดลอง
4) ระยะ prepupa
5) ระยะ G1
6) ระยะ G2
7) ระยะ G3
8) ระยะดักแด้

แต่ละระยะจะเก็บจากทั้งเพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 3 ตัวอย่าง การตรวจสอบเพศจะใช้วิธีผ่าตัดหาตำแหน่งของอัณฑะหรือรังไข่ บริเวณด้านล่าง (ventral) ของส่วนท้องปล้องที่ 5

การเก็บตัวอย่างฮีโมลิมพ์สำหรับตรวจโปรตีน

1. ทำการชั่งน้ำหนักหนอน
2. ใช้กรรไกรปลายแหลมชลิบตรงบริเวณ abdominal segment เพื่อให้ฮีโมลิมพ์ไหลออกมา แล้วหยดลงบนแผ่น parafilm
3. ใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิมพ์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge
4. จากนั้นเติมสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ที่เติมฟีนิลไธโอยูเรียความเข้นข้น 0.05 กรัม/ลิตร 200 ไมโครลิตร
5. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture 3 วินาที
6. นำไปปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 5,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
7. ดูด supernatant ไปใส่ลงในหลอดใหม่
8. จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมนำไปแยกโปรตีน

ก่อนนำตัวอย่างฮีโมลิมพ์ไปแยกโปรตีน ต้องผ่าน **การตรวจระดับโปรตีน** ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม protein standard จากสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ตามลำดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. เตรียม working reagent ในอัตราส่วน dye reagent : deionized water (DDI)= 1:4 ส่วน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง

3. เตรียม unknown protein sample โดยใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิมพ์ที่เตรียมไว้แล้วนำมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติม 0.05 กรัม/ลิตรของฟีนิลไธโอยูเรียให้เป็น 40 เท่า

4. เตรียม Blank โดยใช้ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เติม 0.05 กรัม/ลิตรของฟีนิลไธโอยูเรีย 2 มิลลิลิตรและ working reagent 2 มิลลิลิตร

5. ดูด 80 ไมโครลิตรของแต่ละ protein standard และ unknown protein sample ลงในหลอดทดลองที่สะอาด

6. เติม 4 มิลลิลิตรของ working reagent ลงในแต่ละหลอดแล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture

7. incubate ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

9. นำค่า protein standard ที่ได้ไปทำ standard curve โดยพล็อตระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโปรตีน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของ unknown protein sample มาเทียบกับ standard curve เพื่อหาระดับโปรตีน

วิธีเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิสและการเตรียมตัวอย่างโปรตีน

1. ต่อชุดแผ่นแก้วโดยใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามต้องการ (0.75-1.0 มม.)

2. เตรียมสารละลาย 10% ของเจล (separating gel) ที่ยังไม่ polymerize โดยผสมสารต่าง ๆต่อไปนี้เข้าด้วยกัน คือ 30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide 5 มิลลิลิตร 4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8 3.75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 6.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางใน scintillator เพื่อดูดฟองอากาศออกจากสารละลาย ประมาณ 15 นาที แล้วเติม 10% ammonium persulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลนี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้มีความสูงห่างจากขอบบนแผ่นแก้ว ประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นหยอดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและสารละลายที่คลุมผิวเจลอยู่อย่างชัดเจน

4. เตรียม stacking gel โดยผสมสารดังต่อไปนี้เข้าด้วยกัน คือ 30% acrylamide/ 0.8% bisacrylamide 0.65 มิลลิลิตร 4X Tris-Cl/SDS , pH 6.8 1.25 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 3.05

มิลลิลิตร แล้วเติม 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. เทน้ำกลั่นที่อยู่ส่วนบนของแผ่นเจลออก แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลาย stacking gel ที่เตรียมไว้ใส่ลงบนเจลให้เต็มขอบแผ่นแก้ว จากนั้นสอด comb ลงไปในชั้นของ stacking gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

6. ผสมตัวอย่างที่เตรียมไว้กับ 2X sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีแล้วทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล

7. ต่อชุดอิเลคโตรโฟเรซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม 5X electrophoresis buffer ลงใน chamber ทั้งบนและล่าง จากนั้นค่อย ๆดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างที่ต้องการแยกบนเจล

8. ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่างและขั้วลบเข้ากับ chamber บนและเปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 1-2 นาที จากนั้นปิดสวิทช์

9. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องที่เตรียมไว้ของแผ่นเจล

10. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าอีกครั้ง ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ ที่ 67-68 โวลต์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนเกือบถึงปลายล่างของเจล จึงปิดสวิทช์

11. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาดที่มี staining solution นำถาดเจลไปวางบนแท่นของ orbital shaker ทำที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 1.30 ชั่วโมง

12. fix โปรตีนในเจลด้วย fixing solution เขย่าเบา ๆ ประมาณ 1-2 นาทีแล้วรินทิ้ง

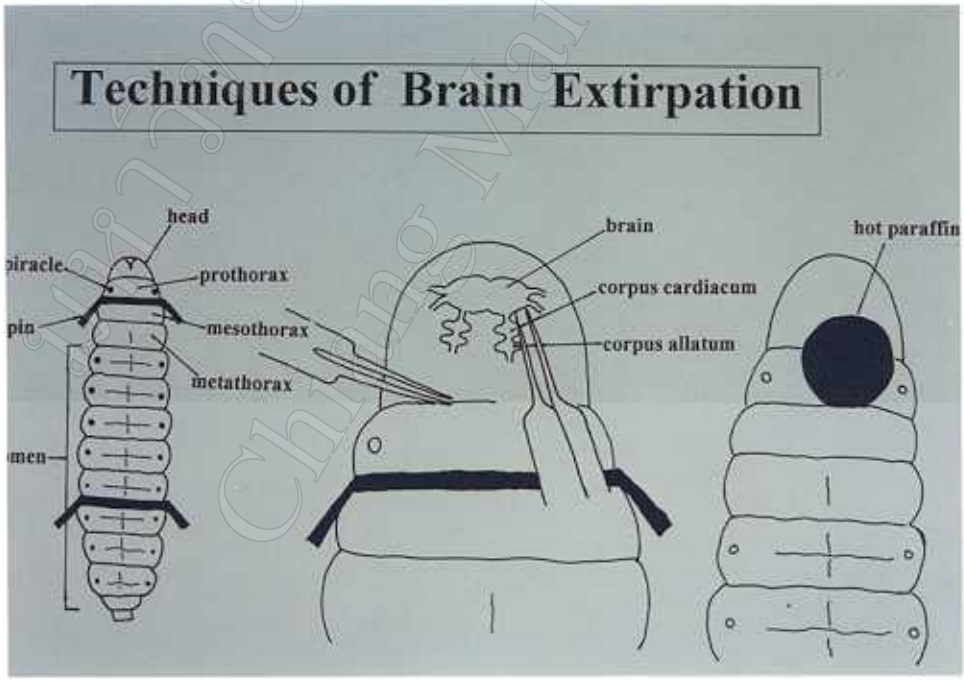
13. เติม destain solution แล้วเขย่าเบา ๆ ควรเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ destain หลาย ๆครั้งจนเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

14. นำแผ่นเจลที่ย้อมสีเสร็จแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของโปรตีนในฮีโมลิมพ์โดยใช้โปรแกรม Gel Plotting Macros ของ NIH Image ในการวิเคราะห์ความหนาแน่น (densitometric image) ของแถบโปรตีนและใช้ Kaleida Graph Ver. 3.01 ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)

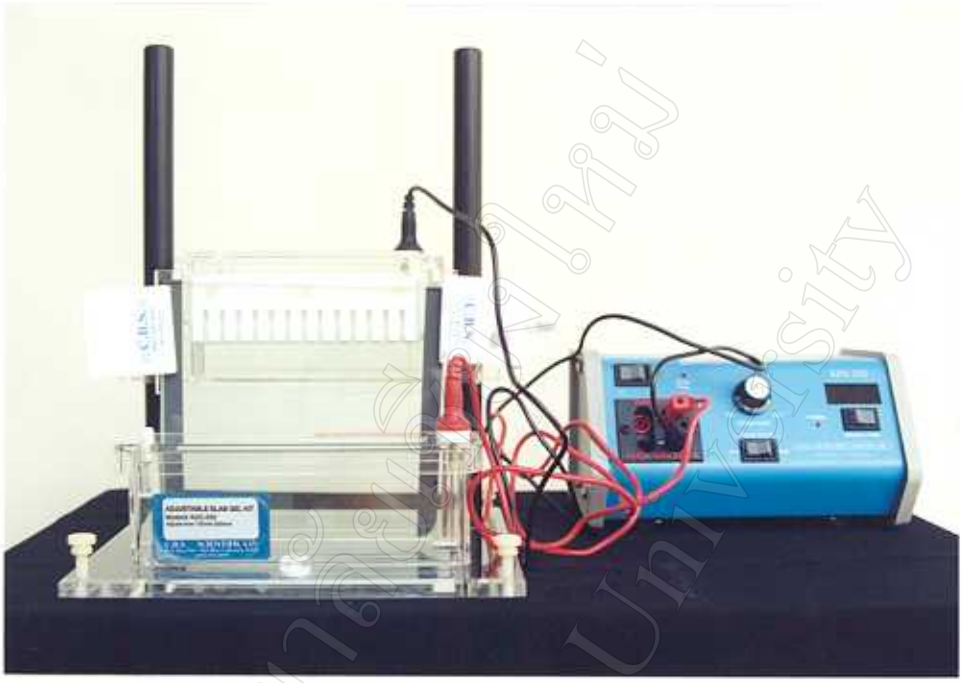
ภาพ 6 แสดงลักษณะการเลี้ยงหนอนเยื่อไผ่ภายในตู้อบอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ 7 แสดงการหยดฮอร์โมนลงบนตัวหนอน



ภาพ 8 แสดงการผ่าตัดเอาสมองของหนอนเยื่อไผ่ออก (brain extirpation)



ภาพ 9 แสดงอุปกรณ์แยกโปรตีนโดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University