ภาคผนวก ก

ข้อมูลการวิจัย

ตาราง 2 แสดงขนาดความกว้างและความยาว รวมทั้งปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกคู่หน้าและคู่หลัง ในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

เดือน	ปุ่มปีก	แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		ความกว้าง (mm.)	ความยาว (mm.)	ปริมาณโปรตีน (μg)
กันยายน	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.61±0.05	0.81±0.05	0.74±0.25
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.59±0.03	0.80±0.06	0.69±0.34
ตุลาคม	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.52±0.03	0.75±0.03	1.15±0.59
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.49±0.04	0.71±0.03	0.95±0.66
พฤศจิกายน	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.72±0.16	0.97±0.13	2.13±0.49
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.68±0.17	0.95±0.14	1.81±0.87
ธันวาคม	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.61±0.10	0.86±0.11	2.38±1.45
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.60±0.08	0.88±0.11	2.68±0.88
มกราคม	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.67±0.14	0.94±0.16	3.88±2.04
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.63±0.12	0.93±0.13	3.48±1.40
กุมภาพันธ์	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.90±0.14	1.12±0.09	4.90±3.06
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.82±0.12	1.05±0.10	5.14±2.02
มีนาคม	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.87±0.15	1.00±0.13	3.28±1.14
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.82±0.16	1.01±0.12	3.96±1.36
เมษายน	ปุ่มปีกคู่หน้า	0.72±0.15	0.96±0.16	6.65±4.73
	ปุ่มปีกคู่หลัง	0.66±0.12	0.94±0.14	6.26±5.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 การวิเคราะห์ความแตกต่างขนาดความกว้างของปุ่มปีกคู่หน้าในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	2	4	1	5	3	8	7	6
0.5219	Grp. 2								
0.6116	Grp. 4	*							
0.6182	Grp. 1	*							
0.6754	Grp. 5	*							
0.7215	Grp. 3	*	*	*					
0.7287	Grp. 8	*	*	*					
0.8704	Grp. 7	*	*	*	*	*	*		
0.9035	Grp. 6	*	*	*	*	*	*		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตาราง 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างขนาดความกว้างของปุ่มปีกคู่หลังในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	2	1	4	5	8	3	7	6
0.4992	Grp. 2								
0.5961	Grp. 1	*							
0.6013	Grp. 4	*							
0.6338	Grp. 5	*							
0.6643	Grp. 8	*							
0.6838	Grp. 3	*	*	*					
0.8236	Grp. 7	*	*	*	*	*	*		
0.8261	Grp. 6	*	*	*	*	*	*		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 การวิเคราะห์ความแตกต่างขนาดความยาวของปุ่มปีกคู่หน้าในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	2	1	4	5	8	3	7	6
0.7507	Grp. 2								
0.8125	Grp. 1								
0.8697	Grp. 4	*							
0.9497	Grp. 5	*	*	*					
0.9646	Grp. 8	*	*	*					
0.9711	Grp. 3	*	*	*					
1.0086	Grp. 7	*	*	*					
1.1251	Grp. 6	*	*	*	*	*	*	*	

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตาราง 6 การวิเคราะห์ความแตกต่างขนาดความยาวของปุ่มปีกคู่หลังในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	2	1	4	5	8	3	7	6
0.7170	Grp. 2								
0.8092	Grp. 1	*							
0.8820	Grp. 4	*	*						
0.9367	Grp. 5	*	*						
0.9401	Grp. 8	*	*						
0.9523	Grp. 3	*	*						
1.0101	Grp. 7	*	*	*	*				
1.0595	Grp. 6	*	*	*	*	*	*		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 การวิเคราะห์ความแตกต่างปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกคู่หน้าในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	1	2	3	4	7	5	6	8
0.7486	Grp. 1								
1.1533	Grp. 2								
2.1329	Grp. 3								
2.3887	Grp. 4								
3.2800	Grp. 7	*	*						
3.8829	Grp. 5	*	*						
4.9093	Grp. 6	*	*	*	*				
6.6590	Grp. 8	*	*	*	*	*	*		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตาราง 8 การวิเคราะห์ความแตกต่างปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกคู่หลังในหนอนเยื่อไผ่ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงเดือนเมษายน 2547

Mean	Treatment	1	2	3	4	5	7	6	8
0.6925	Grp. 1								
0.9579	Grp. 2								
1.8094	Grp. 3								
2.6858	Grp. 4	*	*						
3.4863	Grp. 5	*	*						
3.9600	Grp. 7	*	*	*					
5.1440	Grp. 6	*	*	*	*				
6.2675	Grp. 8	*	*	*	*	*	*		

* = มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 แสดงขนาดความกว้างและความยาวของปุ่มปีกคู่หน้าและคู่หลังในหนอนเยื่อไผ่หลังจากที่ได้รับ JHA ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มทดลอง	วันที่ทำการทดลอง	แสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของขนาดปุ่มปีก (มิลลิเมตร/ปีก)			
		ปุ่มปีกคู่หน้า		ปุ่มปีกคู่หลัง	
		ความกว้าง	ความยาว	ความกว้าง	ความยาว
กลุ่มควบคุม	0	0.52±0.04	0.73±0.06	0.51±0.04	0.66±0.08
	5	0.61±0.05	0.88±0.06	0.59±0.06	0.86±0.05
	10	0.59±0.05	0.88±0.06	0.59±0.06	0.86±0.09
	15	0.57±0.04	0.83±0.07	0.58±0.11	0.80±0.04
	20	0.59±0.09	0.79±0.04	0.56±0.06	0.77±0.02
JHA 0.1 µg	0	0.49±0.06	0.73±0.07	0.48±0.05	0.70±0.04
	5	0.52±0.05	0.72±0.07	0.51±0.04	0.71±0.08
	10	0.81±0.14	1.09±0.20	0.74±0.10	0.99±0.19
	15	0.90±0.10	1.13±0.17	0.87±0.16	1.05±0.13
	20	0.95±0.30	1.07±0.13	0.89±0.26	0.99±0.12
JHA 0.5 µg	0	0.49±0.05	0.69±0.05	0.46±0.06	0.66±0.06
	5	0.53±0.06	0.79±0.07	0.52±0.04	0.75±0.07
	10	0.80±0.15	1.07±0.17	0.82±0.16	1.05±0.19
	15	0.91±0.14	1.12±0.13	0.81±0.09	1.09±0.12
JHA 1.0 µg	0	0.55±0.06	0.76±0.06	0.54±0.05	0.70±0.06
	5	0.68±0.03	0.93±0.10	0.65±0.04	0.89±0.07
	10	1.05±0.33	1.24±0.19	0.99±0.35	1.18±0.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 10 แสดงปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกคู่หน้าและคู่หลังในหนอนเยื่อไผ่หลังจากที่ให้ JHA แก่หนอนเยื่อไผ่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มทดลอง	วันที่ทำการทดลอง	ปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ (ไมโครกรัม/ปีก)	
		ปุ่มปีกคู่หน้า (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ปุ่มปีกคู่หลัง (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
กลุ่มควบคุม	0	1.19±0.24	0.93±0.15
	5	1.98±0.16	1.91±0.37
	10	2.67±0.30	1.86±0.33
	15	1.38±0.04	1.30±0.04
	20	2.93±0.21	2.87±0.17
JHA 0.1 µg	0	1.53±0.25	0.76±0.34
	5	1.54±0.17	1.15±0.17
	10	5.33±0.65	5.82±2.99
	15	7.34±0.20	5.84±0.40
	20	7.37±0.17	7.09±0.71
JHA 0.5 µg	0	0.48±0.13	0.67±0.27
	5	0.71±0.07	1.97±0.27
	10	5.18±2.26	5.33±2.44
	15	8.81±0.63	6.28±1.76
JHA 1.0 µg	0	1.00±0.27	1.65±0.72
	5	3.52±0.88	4.06±0.90
	10	11.78±1.31	7.92±2.43

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 แสดงปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ หลังจากที่นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 20E ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มทดลอง	วันที่ทำการทดลอง	ปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ (ไมโครกรัม/ปีก) (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
กลุ่มควบคุม	0	3.92±2.95
	2	4.11±1.16
	4	3.89±2.23
	6	3.75±2.44
	8	4.31±1.00
	10	4.13±3.18
20E 0.05 µg	0	3.84±1.92
	2	7.89±2.34
	4	10.94±2.12
	6	6.83±3.97
	8	4.39±1.85
	10	4.32±4.21
20E 0.10 µg	0	3.86±0.95
	2	7.11±1.75
	4	8.49±2.68
	6	7.33±4.31
	8	7.26±3.13
	10	-
20E 0.25 µg	0	3.74±0.47
	2	6.29±2.42
	4	7.45±3.11
	6	6.82±0.95
	8	7.21±2.64
	10	8.13±2.86

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มทดลอง	วันที่ทำการทดลอง	ปริมาณโปรตีนของปุ่มปีกในหนอนเยื่อไผ่ (ไมโครกรัม/ปีก) (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
20E 0.50 µg	0	3.69±1.23
	2	7.33±4.40
	4	5.46±1.68
	6	7.63±3.02
	8	8.14±2.46
	10	7.64±2.97

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bio-Rad Protein Assay Kit

1. เตรียมโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
2. เตรียม dye reagent ในอัตราส่วน dye reagent : น้ำกลั่น เท่ากับ 1 : 4 ส่วน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
3. เตรียมตัวอย่างของปุ่มปีกและ dye reagent สำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีน
4. ปิเปตโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างของปุ่มปีกตัวอย่าง อย่างละ 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง ในการวัดค่าจะทำการวัด 2 ซ้ำ
5. เติม diluted dye reagent 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดแล้ว vortex
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อยที่สุด 5 นาที แต่ไม่ควรทิ้งไว้เกิน 1 ชั่วโมง
7. นำโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่างของปุ่มปีกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปุ่มปีกมาเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานเพื่อทำการหาระดับโปรตีน

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงของแมลง (Grace's insect culture medium)

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงของแมลง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
   1.1 ชั่ง Grace's medium (44.5 กรัม/ ลิตร) ปริมาตร 4.45 กรัม
   1.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร
   1.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.5
   1.4 จากนั้นย้ายลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
   1.5 นำไปกรองในสภาพปลอดเชื้อ
2. การเตรียม antibiotic
   2.1 ทำการเตรียม antibiotic 3 ชนิด คือ penicilin, streptomycin และ kanamycin ที่อัตราส่วน antibiotic : Grace's medium เท่ากับ 50 มิลลิกรัม : 1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 นำ antibiotic ทั้ง 3 ชนิดมาอย่างละ 100 ไมโครลิตรเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

2.3 นำอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม antibiotic แล้วไปกรองโดยใช้ membrane filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.24 ไมครอน ในสภาพปลอดเชื้อ

3. แยกอาหารเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ส่วน

3.1 กลุ่มควบคุมใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมฮอร์โมน

3.2 กลุ่มทดลองใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่เติมฮอร์โมนเอคไดโซนทั้งหมด 4 ความเข้มข้น ดังนี้

3.2.1 0.05 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

3.2.2 0.10 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

3.2.3 0.25 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

3.2.4 0.50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้ในการสกัด RNA และการทำ PCR

1. การเตรียมเจลอิเลกโตรโฟเรซิส

1.1 เตรียมเจลขนาดเล็ก 1.3%

ชั่ง agarose S	0.26	กรัม
เติม 0.5X TAE buffer	20	มิลลิลิตร

1.2 เตรียมเจลขนาดใหญ่ 0.7%

ชั่ง agarose S	0.28	กรัม
เติม 0.5X TAE buffer	40	มิลลิลิตร

ทำให้ละลายด้วยความร้อน ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเทลงในถาดเตรียมเจล

2. การเตรียม 6X Gel-loading buffer สำหรับ agarose S gel

1% Bromophenol blue	12.5	มิลลิลิตร
1% Xylene cyanol FF	12.5	มิลลิลิตร
500 mM EDTA	0.1	มิลลิลิตร
Glycerol	15	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเตรียม 50X TAE buffer

Tris	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม 10X Tris EDTA buffer (TE)

1M Tris-HCL (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร
500 mM EDTA (pH 8.0)	0.4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	197.6	มิลลิลิตร

5. การเตรียม 1M Tris-HCL (pH 8.0)

Tris	121.1	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย HCL (ปล่อยให้สารละลายเย็นตัวลงแล้ววัด pH อีกครั้ง)

เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เวลา 15 นาที

6. การเตรียม 500 mM EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
NaOH	20	กรัม

ปรับ pH ด้วย 5N NaOH

เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

7. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ (ethydium bromide) (10 mg/ml)

เอธิเดียมโบรไมด์	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การเตรียม DEPC (diethylpyrocarbonate) – treated water

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
DEPC	100	ไมโครลิตร

- เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (เขย่าขวดบ่อยๆ เพื่อให้ RNase ที่อยู่ในขวดเสียสภาพไป)
- นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เวลา 20 นาที เพื่อทำการระเหย DEPC ออกให้หมด (ถ้ายังได้กลิ่น DEPC ให้นำไป autoclave อีกครั้ง)
- ห่อขวดด้วยพลาสติกใสแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. การเตรียม 3 M Sodium acetate (NaOAc), pH 5.2

Sodium acetate	408.3	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid

เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi เวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล กิตติ ต้นเมืองปัก

วัน เดือน ปี เกิด 24 ตุลาคม 2523

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น
จากโรงเรียนปักธงชัยประชานิรมิต ปีการศึกษา 2538
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
จากโรงเรียนปักธงชัยประชานิรมิต ปีการศึกษา 2541
สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาชีววิทยาจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีการศึกษา 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved