บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)

เลี้ยงยุงลายบ้านภายใต้อุณหภูมิ 28^{0}C จนเป็นตัวเต็มวัย ความชื้น 70-80% ณ ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 เครื่อง Autoclave (Hirayama HA-3D, Japan)

2.2 ปิเปตอัตโนมัติ (Auto-pipette, Eppendorf)

2.3 เครื่องปั่น (Centrifuge 5804 R: Eppendorf)

2.4 กรงเลี้ยงยุง ขนาด 9×9×9 นิ้ว

2.5 ถ้วยพลาสติกพร้อมฝาปิด

2.6 หลอดหยด (Dropper)

2.7 ที่ดูดยุง (Manual suction)

2.8 เครื่องชั่งระบบดิจิตอล (Digital balancing, Satorius; Scientific Promotion Co. LTD)

2.9 เครื่องปรับค่า pH (Orion 420A+, USA)

2.10 เตาอบไมโครเวฟ (Intellowave; LG)

2.11 ตู้เย็น 4^{0}C และ-20^{0}C

2.12 เครื่อง Votex mixer (FineVotex)

2.13 เครื่องปั่น microcentrifuge (MICRO-12; Hanli Science Industrial, Co. Ltd)

2.14 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Bio-Rad)

2.15 เครื่อง Thermal cycler (2720 Thermal cycler, Applied Biosystem)

2.16 เครื่องอิเล็คโตรฟอเรซีส (SUB-Cell GT; BIO-RAD)

2.17 เครื่องถ่ายภาพเจล Gel Photodocumentation system (BIO-RAD)

2.18 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope

2.19 กล้องจุลทรรศน์ confocal

2.20 กล้องจุลทรรศน์ Dark field

2.21 กระป๋องพลาสติกเพื่อเก็บตัวโม่ง

2.22 กระดาษกรองขนาด 80 แกรม

2.23 Petri dish

2.24 Tray

2.25 LightCycler Instrument (LightCycler 1.5 Instrument, Roche)

2.26 Ice box

2.27 Safety carbinet (Augustin ™)

2.28 Ocular lens

2.29 อุปกรณ์นับอสุจิ

2.30 กล้องดิจิตอล

3. **สารเคมี** (Appendix)

3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมมีเดียชนิด Lueria-Bertani broth (LB), LB agar, SOB Solution และ Soc medium

3.2 สารเคมีสำหรับเตรียม competence cell

3.3 สารเคมีสำหรับการ Cloning

3.4 สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอของ *Wolbachia*

3.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอีเล็คโตรฟอเรซีส

3.6 ชุดสกัดพลาสมิด (Qia Spin Miniprep Kit); QIAGEN

3.7 สารเคมีสำหรับเตรียม Polymerase Chain Reaction (PCR); Invitrogen

3.8 สารเคมีสำหรับ DNA ligatioin

3.8 สารเคมีสำหรับ Fluorescence *in Situ* Hybridization

3.9 สารเคมีสำหรับเตรียมสีย้อมจิมซ่า (Giemsa stain)

3.10 สารเคมีสำหรับเตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับ Fluorescence *in Situ* Hybridization

4. วิธีการทดลอง (Methods)

4.1 การเลี้ยงยุงลายบ้าน

สายพันธุ์ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ได้มาจากฝ่ายชีววิทยาและนิเวศวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข หนูขาว (mice) ได้มาจากศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล

ทำการฟักไข่ยุงในถาดพลาสติกที่มีขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติ.เมตร เติมน้ำปริมาณ 1 L เพื่อให้ยุงฟักออกจากไข่เป็นลูกน้ำภายในเวลาประมาณ 30 – 60 นาทีหรือแล้วแต่อายุของไข่ หลังจากที่ลูกน้ำถูกฟักออกจากไข้แล้ว ให้อาหารเม็ดที่บดให้ได้ขนาดพอประมาณและเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 28P^{0}PC จนเป็นตัวเต็มวัย ความชื้น 70-80%

4.2 การผสมพันธุ์ยุงลายบ้าน เพื่อให้มีการส่งถ่ายเชื้อ

นำยุงที่ได้รับการติดเชื้อ *Wolbachia* จากเรือด มาทำการทดลอง เพื่อทดสอบการส่งถ่ายเชื้อ (Crosses of Transinfected Lines) และสมรรถนะ (Fitness cost) ของยุงที่ติดเชื้อเปรียบเทียบยุงตามธรรมชาติ ดังนี้

4.2.1) นำไข่ยุง (Eggs) บนกระดาษกรองมาฟักไข่ในกระบะขนาด 6 × 12 นิ้ว ที่มีน้ำสะอาดปริมาตร 1.5 L ที่อุณหภูมิ 28^{0}C ประมาณ 30 นาที - 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาอัตราการฟักไข่โดยการนับปริมาณลูกน้ำทั้งหมดต่อกระดาษกรอง 1 แผ่น

4.2.2) ให้อาหารลูกน้ำ (Lavae) วันละครั้งนับตั้งแต่ฟักไข่ระยะที่ 1 จนกระทั่งระยะที่ 4 ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 5-6 วัน หลังจากฟักไข่ยุงประมาณ 3 วัน ใช้หลอดหยดนับปริมาณลูกน้ำทั้งหมดต่อ 1 กระบะเพื่อศึกษาอัตราการฟักและอัตราการตายของตัวอ่อน

4.2.3) หลังจากเลี้ยงลูกน้ำจนระยะที่ 4 ลูกน้ำได้พัฒนาเป็นระยะตัวโม่ง (Pupae) แล้วเก็บแยกไว้ในกระป๋องพลาสติกเพื่อแยกเพศของยุง หลังจากนี้จะพัฒนากลายเป็นยุงตัวเต็มวัยโดยใช้เวลาประมาณ 2 วัน ระยะนี้ไม่ต้องให้อาหาร

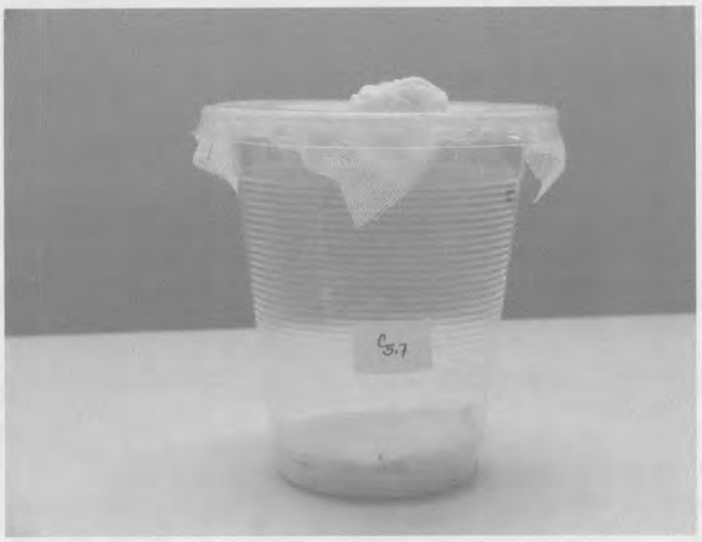
4.2.4) หลังจากยุงพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยแล้ว เก็บยุงเข้ากรงเลี้ยงที่มีขนาด 9×9×9 นิ้วโดยแยกเพศและกลุ่มดังนี้

กรงที่ 1 คือ ยุงเพศเมียติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F
กรงที่ 2 คือ ยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F
กรงที่ 3 คือ ยุงเพศเมียปลอดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F
กรงที่ 4 คือ ยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ *Wolbachia* สายพันธุ์ F

และให้สำลีชุบน้ำหวาน (10% กลูโคส) เป็นอาหารซึ่งเปลี่ยนสำลีใหม่ทุกวัน ในขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 วัน

4.2.5) อดอาหารยุงประมาณ 3-5 ชั่วโมง แล้วนำยุงไปกินเลือดหนูขาว (Mice) เพื่อให้ยุงเพศเมียได้รับโปรตีนเพื่อใช้สร้างไข่ที่สมบูรณ์ [4] ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

4.2.6) ดูดยุงออกจากกรงเพื่อให้จับคู่ผสมพันธุ์ยุงในแก้วพลาสติกที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำอยู่ส่วนล่างในแก้ว (ภาพที่ 3.1) ดังนี้



ภาพที่ 3.1 ภาชนะกระป๋องพลาสติกสำหรับจับยุงผสมพันธุ์เป็นคู่

กลุ่ม A คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Infected pair of parent)

กลุ่ม B คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ *Wolbachia* (Infected female)

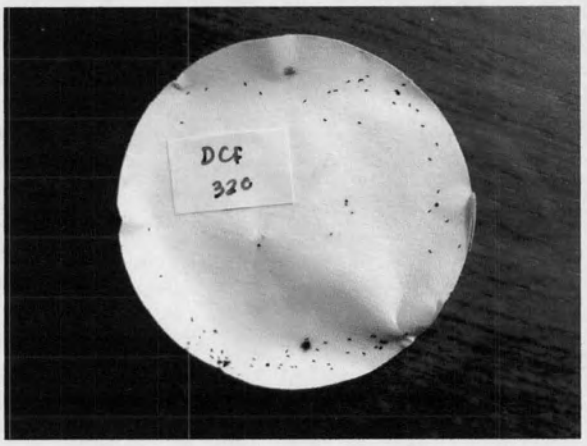
กลุ่ม C คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Control / wild type) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบ CI จากคู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียปลอดเชื้อกับยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* (Infected male) เนื่องจากมีรายงานมาแล้วว่าเกิด CI ได้ [43] [55]

และให้อาหารยุงด้วยสำลีชุบน้ำหวาน (10% กลูโคส) ด้านบนแก้วพลาสติกซึ่งต้องเติมน้ำหวานทุกวัน

4.2.7) ยุงสามารถวางไข่ (ภาพที่ 3.2) หลังจากผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3-5 วัน บนกระดาษกรอง จากนั้นเตรียมสิ่งตัวอย่างใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปดังนี้ คือ นำแก้วพลาสติกไปแช่แข็งที่ -20^{0}C ประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้ยุงตาย แล้วคัดแยกยุงออกเป็นกลุ่มดังเช่นเดิม และเก็บแช่แข็งยุงที่-20^{0}C เพื่อรอสกัด DNA และตรวจการติดเชื้อด้วย PCR ในลำดับต่อไป

นำไข่ยุงมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วันแล้วนับจำนวนไข่ยุงบนกระดาษกรองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus SZ 60 กำลังขยาย 2 เท่า และบันทึกผล

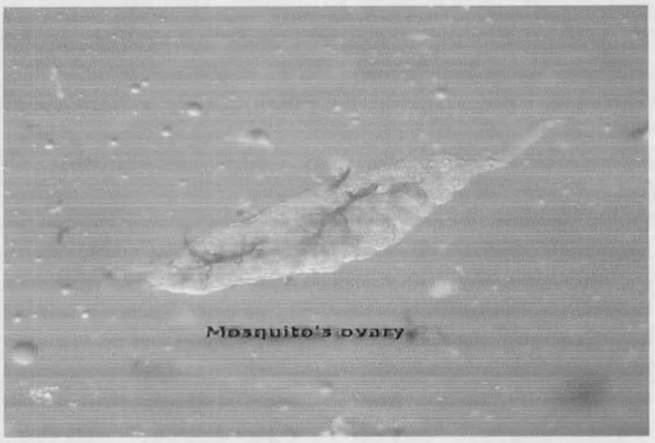


ภาพที่ 3.2 ไข่ยุงตากแห้งบนกระดาษกรองที่เตรียมนับจำนวนไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์

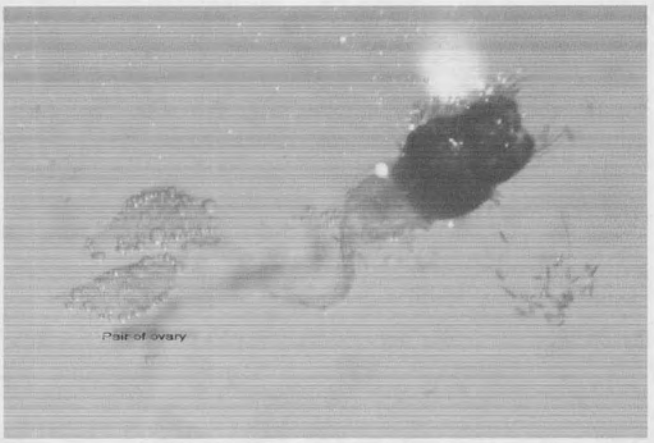
4.3 การเตรียมสิ่งตัวอย่าง

4.3.1) เตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)

4.3.1.1) นำยุงเพศเมีย ที่วางไข่บนกระดาษกรองเรียบร้อยแล้ว พร้อมกับยุงเพศผู้ ซึ่งมีอายุ 10 วัน มาสกัดรังไข่และอัณฑะ (ภาพที่ 3.3, 3.4 และ 3.5) ออกมาในสารละลาย 1x PBS บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น SZ60



ภาพที่ 3.3 รังไข่หนึ่งข้างของยุงเพศเมียในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้ว



ภาพที่ 3.4 รังไข่ 1 คู่ของยุงเพศเมีย สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุง ลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพที่ 3.5 อัณฑะ 1 คู่ของยุงเพศผู้ สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุงลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วางชิ้นรังไข่บนสไลด์ Super-force one plus (ภาพที่ 3.6) พร้อมทั้งเด็ดปีก 1 ข้างวางลงบนสไลด์แก้วเพื่อใช้ศึกษาขนาดของยุง (Body size) ส่วนอวัยวะยุงที่เหลือเก็บในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ไว้ที่ตู้เย็น –20^{0}C สำหรับตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

ภาพที่ 3.6 รังไข่ (แถวบน) และอัณฑะ (แถวล่าง) บนสไลด์ super-force one plus

ภาพที่ 3.1 ภาชนะกระป๋องพลาสติกสำหรับจับยุงผสมพันธุ์เป็นคู่

กลุ่ม A คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Infected pair of parent)

กลุ่ม B คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F กับยุงเพศผู้ปลอดเชื้อ *Wolbachia* (Infected female)

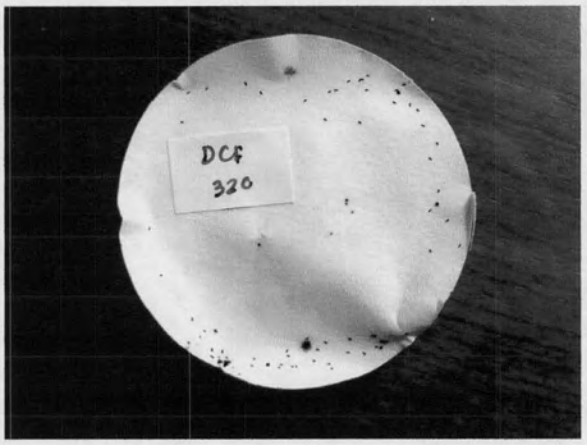
กลุ่ม C คือ คู่ผสมพันธุ์ของยุงที่ไม่ติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* สายพันธุ์ F ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Control / wild type) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบ CI จากคู่ผสมพันธุ์ของยุงที่มีตัวเมียปลอดเชื้อกับยุงเพศผู้ติดเชื้อ *Wolbachia* (Infected male) เนื่องจากมีรายงานมาแล้วว่าเกิด CI ได้ [43] [55]

และให้อาหารยุงด้วยสำลีชุบน้ำหวาน (10% กลูโคส) ด้านบนแก้วพลาสติกซึ่งต้องเติมน้ำหวานทุกวัน

4.2.7) ยุงสามารถวางไข่ (ภาพที่ 3.2) หลังจากผสมพันธุ์แล้วประมาณ 3-5 วัน บนกระดาษกรอง จากนั้นเตรียมสิ่งตัวอย่างใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปดังนี้ คือ นำแก้วพลาสติกไปแช่แข็งที่ -20^{0}C ประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้ยุงตาย แล้วคัดแยกยุงออกเป็นกลุ่มดังเช่นเดิม และเก็บแช่แข็งยุงที่-20^{0}C เพื่อรอสกัด DNA และตรวจการติดเชื้อด้วย PCR ในลำดับต่อไป

นำไข่ยุงมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วันแล้วนับจำนวนไข่ยุงบนกระดาษกรองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus SZ 60 กำลังขยาย 2 เท่า และบันทึกผล



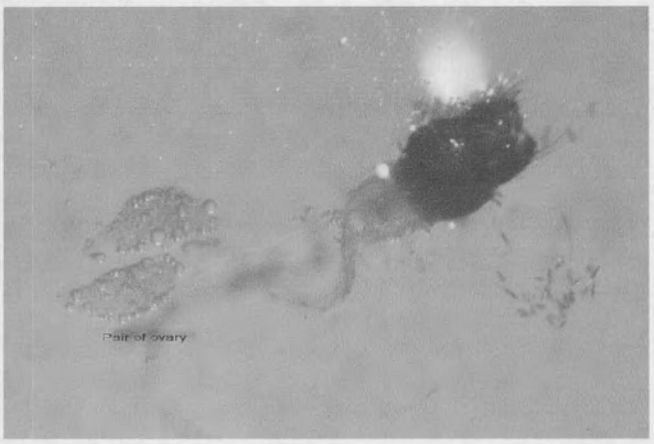
ภาพที่ 3.2 ไข่ยุงตากแห้งบนกระดาษกรองที่เตรียมนับจำนวนไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.3 การเตรียมสิ่งตัวอย่าง

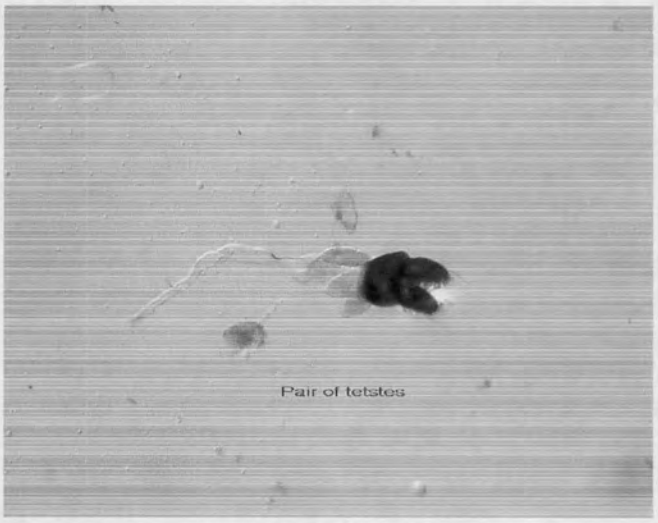
4.3.1) เตรียมสิ่งตัวอย่างสำหรับการทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)

4.3.1.1) นำยุงเพศเมีย ที่วางไข่บนกระดาษกรองเรียบร้อยแล้ว พร้อมกับยุงเพศผู้ ซึ่งมีอายุ 10 วัน มาสกัดรังไข่และอัณฑะ (ภาพที่ 3.3, 3.4 และ 3.5) ออกมาในสารละลาย 1x PBS บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น SZ60

ภาพที่ 3.3 รังไข่หนึ่งข้างของยุงเพศเมียในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้ว

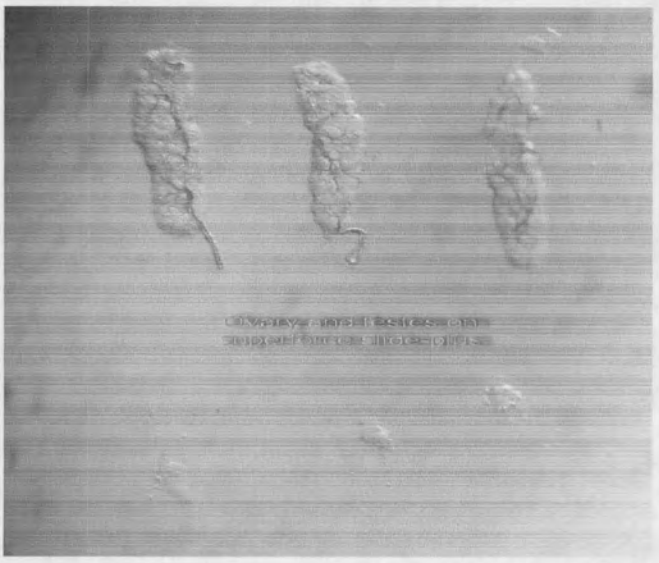


ภาพที่ 3.4 รังไข่ 1 คู่ของยุงเพศเมีย สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุง ลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 3.5 อัณฑะ 1 คู่ของยุงเพศผู้ สกัดจากบริเวณสองปล้องสุดท้ายจากส่วนท้องของยุง ลงในสารละลาย 1xPBS ที่สกัดบนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วางชิ้นรังไข่บนสไลด์ Super-force one plus (ภาพที่ 3.6) พร้อมทั้งเด็ดปีก 1 ข้างวางลงบนสไลด์แก้วเพื่อใช้ศึกษาขนาดของยุง (Body size) ส่วนอวัยวะยุงที่เหลือเก็บในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ไว้ที่ตู้เย็น -20^{0}C สำหรับตรวจหาการติดเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป



ภาพที่ 3.6 รังไข่ (แถวบน) และอัณฑะ (แถวล่าง) บนสไลด์ super-force one plus

4.3.1.2) วางสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงและอบที่ 37^0C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีน้ำบนสไลด์

4.3.1.3) นำสไลด์มาแช่ 4% Formaldehyde ใน coupling jar เวลา 15 นาที

4.3.1.4) ล้างสไลด์ด้วย 0.1% tween 20 in 1x PBS (1:1) จำนวน 5 ครั้งๆละ 3 นาทีแล้วเก็บสไลด์ที่ตู้เย็น -20^0C เพื่อรักษาสภาพของDNA [60]

4.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธี Modified salt

4.3.1) นำยุงที่แช่ในตู้เย็น -20°C ใน 1.5 ml. eppendorf แล้ว homogenize ยุงใน 100 µl extraction buffer [0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA, pH 9.1 และ 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)]

4.3.2) จากนั้นนำไปแช่ใน Water bath ที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติม 15 µl 8M KAC (potassium acetate) ผสมให้เข้ากัน (mix by vortex)

4.3.3) แช่ลงใน ice box นาน 45 นาที แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ ที่ 12000 rpm 4°C นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสลงใน 1.5 µl eppendorf ที่เตรียมไว้ใหม่

4.3.4) หลังจากนั้นตกตะกอน DNA ด้วย 250 ml 100% ethanol ผสมกันเบาๆและ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

4.3.5) แล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนที่ 12000 rpm 4°C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอด eppendorf คว่ำบนกระดาษทิชชู (dry pellet)

4.3.6) หลังจากนั้น resuspend ด้วย 10 µl 0.1x SSC (15 mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate) และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 µl แล้วผสมกันเบาๆ [38] แล้วเก็บรักษาสภาพดีเอ็นเอที่ -20^0C [29]

4.4 การตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี Semi-nested Polymerase Chain Reaction

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแล้วตรวจหา *Wolbachia* ด้วยเทคนิค Semi-nested Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ primer 2 คู่ ดังนี้

Primer ***คู่ที่หนึ่ง*** ซึ่งเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ 16S rRNA gene ขนาด 438 bp

1) WSpecF; 5'-CATACCTATTCGAAGGGATAG-3'

2) WSpecR; 5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'

Primer ***คู่ที่สอง*** ซึ่งเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ16S rRNA gene ขนาด 241 bp

1) INTF2; 5'-AGTCATCATGGCCTTTATGGA-3'

2) WSpecR; 5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATTC-3'

[45] [63]

โดยปริมาณสารผสม PCR ทั้งหมด 25 µl ประกอบด้วยส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารผสมของ PCR

Component (Invitrogen)	Volume (µl)
10X PCR buffer	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5
2 mM dNTP	2.5
0.5 µM Primer Forward	1.25
0.5 µM Primer Reverse	1.25
5U/µl *Taq* DNA polymerase	0.19
DNA template	5
Deionized water	9.81
ปริมาตรสารผสมรวม	25

เพื่อทดสอบการติดเชื้อด้วยเครื่อง ABI thermal cycler (2720 Thermal cycler, Applied Bisystem ภายใต้สภาวะของ PCR ดังนี้

ตารางที่ 3.2 สภาวะอุณหภูมิและเวลาของ PCR

1. อุณหภูมิ Denaturation เริ่มต้น	:	95^0C, 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. ส่วนประกอบ PCR จำนวน 40 รอบ		
2.1) Denaturation	:	95^0C, 1 นาที
2.2) Annealing	:	55^0C, 1 นาที
2.3) Extension	:	72^0C, 1 นาที
3. อุณหภูมิ Extension สุดท้าย	:	720C, 5 นาที จำนวน 1 รอบ

4. สำหรับ PCR product เก็บไว้ที่ 4^0C

แล้วนำ PCR product จากการทำ PCR รอบแรกซึ่งมีขนาด 438 bp ได้จาก Primer คู่ที่ 1 มาเจือจางที่ 200 เท่าด้วย Deionized water แล้วทำ PCR รอบที่สองภายใต้สภาวะอุณหภูมิและเวลาตามตารางที่ 3.2 เหมือนกับรอบแรกแต่เปลี่ยนเป็นใช้ Primer คู่ที่ 2 ปริมาตรของ DNA ต้นแบบจาก 5 µl เป็น 1 µl และเพิ่มปริมาตร Deionized water จาก 9.81 µl เป็น 13.81 µl ซึ่งจะได้ปริมาตรของสารผสม PCR เท่ากับ 25 µl ดังเช่นเดิม สุดท้ายจะได้ PCR product ขนาด 241 bp

จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ขนาด 241 bp มาแยกวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย 2% วุ้นอะกาโรส อีเล็คโตรฟอเรซีส แล้วนำแผ่นวุ้นมาย้อมสีด้วย ethidium bromide และตรวจวิเคราะห์แถบ DNA ด้วยแสงยูวี โดยโปรแกรม Gel Photodocumentation System (Bio-rad) และเทียบกับแถบ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp จากนั้นจึงตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) เพื่อตรวจยืนยันผลของ PCR ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia*

4.5 DNA Cloning and Sequencing

4.5.1 การเตรียม competent cells จาก *E. coli* สำหรับการทำ transformation

วัตถุประสงค์ของการเตรียม Competent cells เพื่อส่งถ่ายพลาสมิด จากนอกเซลล์ของแบคทีเรีย ให้เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ DH5-alpha เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณพลาสมิดให้ได้จำนวนมากเพียงพอ competent cells คือเซลล์ของแบคทีเรียที่ถูกทำให้เกิดรูขนาดเล็กด้วยแคลเซียมที่ความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสม ดีเอ็นเอที่ต้องการส่งถ่ายเข้า competent cells สามารถเข้าไปในเซลล์ด้วยการ incubate และ แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไป heat shock ที่ 42^0C อย่างรวดเร็วเป็นเวลา 45 วินาทีแล้ววางบนน้ำแข็งอีกครั้ง จึงทำให้ competent cells สามารถรับดีเอ็นเอนอกเซลล์ได้ [25]

4.5.1.1 นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ DH5-alpha ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลมาเพาะเชื้อบนเพลท LB-agar แล้วบ่มที่ 37^0C ข้ามคืน

4.5.1.2 จากนั้น Pick 1 โคโลนีจากเพลท ลงในสารละลาย SOB แล้วนำไปบ่มที่ 37^0C ข้ามคืน เพื่อทำสตาร์ตเตอร์ (starter)

4.5.1.3 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสตาร์ตเตอร์ปริมาตร 5 µl ลงใน flask ขนาด 1 ลิตรที่มีสารละลาย SOB ปริมาตร 250 ml แล้วนำไปเขย่า (shake) ที่อุณหภูมิ 16^0C เพื่อให้ได้เซลล์ที่เติบโตที่ Log phase ระยะเริ่มต้นซึ่งเมื่อนำสารละลายนี้ไปวัด OD_{600} มีค่าอยู่ในช่วง 0.4-0.5 ใช้เวลาประมาณ 24-36 ชั่วโมงโดยประมาณ

4.5.1.4 เมื่อได้ค่า OD ที่เหมาะสมแล้วนำ Flask ออกจากเครื่องเขย่าแล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที

4.5.1.5 นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ ความเร็วรอบ 4000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อคัดเลือกเซลล์แบคทีเรีย

4.5.1.6 เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลาย TB ที่เย็น ปริมาตร 80 ml ***แล้วผสมกันเบา ๆบนน้ำแข็ง*** เพื่อให้ตะกอนเซลล์แยกออกจากกัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 10 นาที

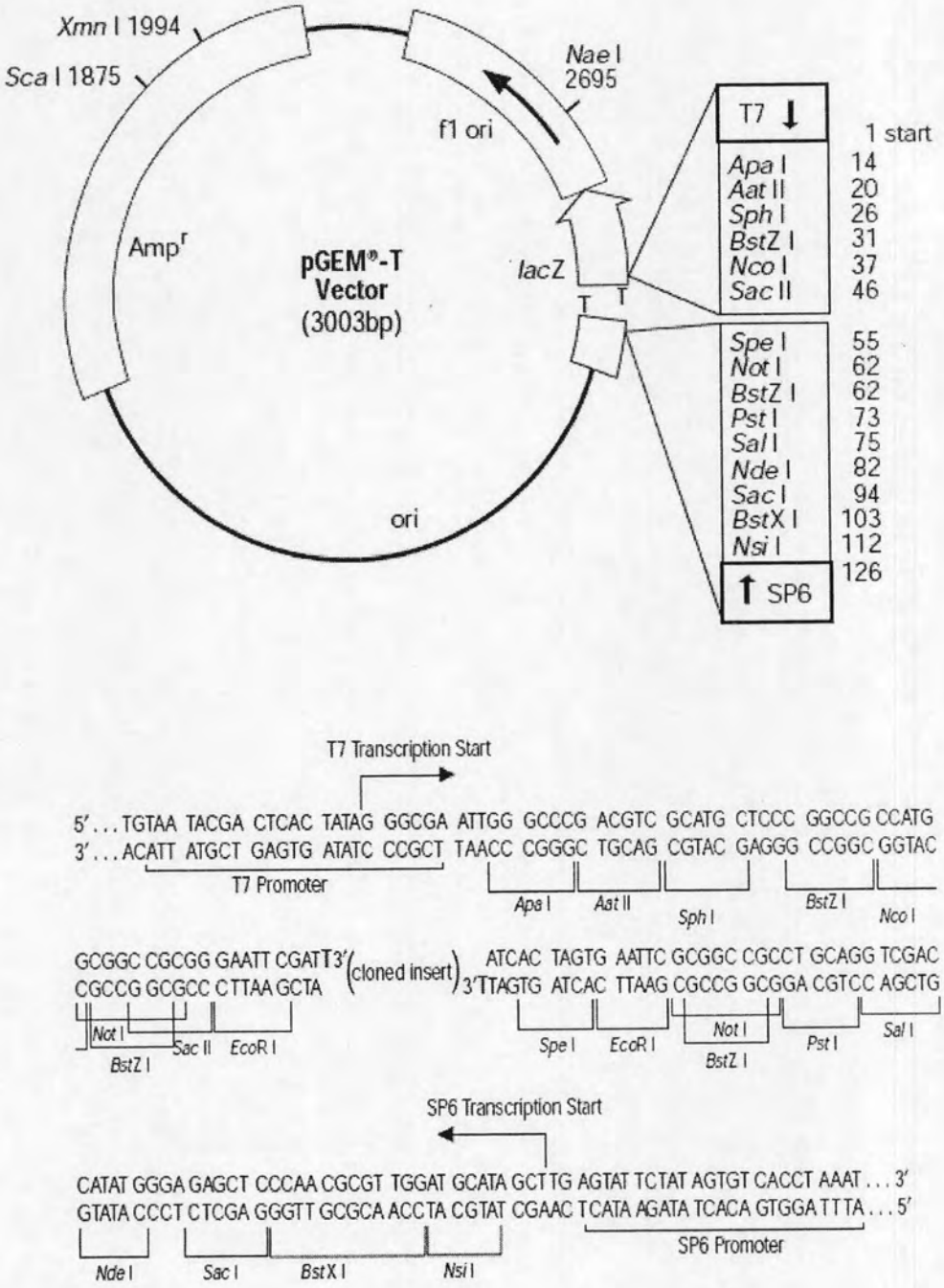
4.5.1.7 นำมาปั่นตกตะกอนที่ 4000 rpm ที่ 4^0C เป็นเวลา 10 นาที

4.5.1.8 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย TB ที่เย็น ปริมาตร 20 ml ***แล้วผสมกันอย่างเบาและนุ่มนวลที่สุดบนน้ำแข็ง*** แล้วตามด้วยการเติม สารละลาย DMSO (เก็บที่-20^0C ข้ามคืนก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 1.4 ml

4.5.1.9 แบ่งเซลล์ใส่หลอดเล็กเป็น Aliquot ปริมาตร 200 µl ต่อ 1 หลอด 1.5 ml Eppendorf แล้วนำไปเก็บที่ -70^0C อย่างระมัดระวัง

4.5.2 pGEM®-T Easy vector

pGEM®-T Easy vector ยี่ห้อ Promega ได้จากบริษัท Madison



ภาพที่ 3.7 pGEM®-T Easy vector และ ภาพแสดงบริเวณแทรกดีเอ็นเอเป้าหมาย (cloned insert) ที่ต้องการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5.3 DNA ligation

ในการทำโคลนนิ่ง PCR product ถูกเชื่อมเข้ากับ pGEM®-T Easy vector (Promega) (ภาพที่ 3.7) และถูกส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์ competent *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha โดยตรง ดังขั้นตอนต่อไปนี้

4.5.3.1 นำ PCR product จากขั้นตอนที่ 4.4 มาเชื่อมต่อเข้า 50 ng/µl pGEM®-T Easy vector (Promega) ในหลอดทดลอง Eppendorf ขนาด 0.5 ml ดังที่ได้อธิบายในตารางที่ 3.3

4.5.3.2 ผสมเบาๆ แล้วเก็บไว้ที่ 4^0C ข้ามคืน (Overnight) แล้วนำไปทำการส่งถ่ายเข้ากับเซลล์ competent จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของเชื่อม Insert DNA เข้ากับ pGEM®-T Easy vector

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
5X Ligation buffer	2
pGEM®-T Easy vector	1
T4 DNA ligase	1
PCR product	5
Deionised water	1
Total reaction mixture	10

4.5.4 การส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ Competent

4.5.4.1 ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเซลล์ Competent ที่เตรียมได้จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ปริมาตร 25 µl ลงในหลอดทดลอง Eppendorf ขนาด 1.5 ml

4.5.4.2 เติมสารผสม ligation reaction ปริมาตร 5 µl จากขั้นตอนที่ 4.5.3 แล้ววางไวในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

4.5.4.3 นำไป Heat shock ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42^{0}C เป็นเวลา 45 วินาที

4.5.4.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ลงไป 970 µl ให้ได้ปริมาตรครบ 1 ml

4.5.4.4 นำไป Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37^{0}C เวลา 1.30 ชั่วโมง

4.5.4.5 เตรียมเพลท โดย ผสม X-gal, IPTG และ LB-broth ในอัตราส่วน 30:30:40 µl ในหลอด Eppendorf แล้ว spread ลงบน LB-agar ที่มียาแอมพิซิลิน 120 µg/ml ให้แห้งหรือนำไป อบที่ 37^{0}C ประมาณ10 นาทีก่อน

4.5.4.6 จากนั้นนำออกจาก Incubator shaker แล้วปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm เวลา 3 นาทีแล้วดูดส่วนใสทิ้ง 900 µl ที่เหลือ 100 µl ดูด spread บนเพลทที่เตรียมไว้แล้ว และนำไปอบใน incubator ข้ามคืนที่ 37^{0}C

4.5.4.7 ตรวจวิเคราะห์โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จากการส่งถ่ายพลาสมิดโดยวิเคราะห์ Blue-white colonies

4.5.5 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยการทำสตาร์ตเตอร์และการตรวจยืนยันการส่งถ่ายพลาสมิด

เพื่อเป็นการตรวจเช็คว่ามีการเชื่อมกันของพลาสมิดเข้ากับดีเอ็นเอที่สนใจ และเลือกโดยเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวบนเพลท เนื่องจากเซลล์ของ *E. coli* ที่รับเอาพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป จะมียีนที่ดื้อต่อยาแอมพิซิลินและพลาสมิดที่เชื่อมดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับบริเวณยีน *lacZ* ทำให้ไม่สามารถแสดงออก จึงปรากฏโคโลนีสีขาวขึ้นบนเพลท ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมอยู่กับพลาสมิดที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปจะปรากฏโคโลนีสีน้ำเงินปนขาวบนเพลท ดังขั้นตอนต่อไปนี้

4.5.5.1 เลือกโคโลนีสีขาวจากเพลท 1 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth 3 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่มียาแอมพิซิลินความเข้มข้น 120 µg/ml ผสมอยู่ 3 µl

4.5.5.2 นำไป เขย่าที่ 37^{0}C ข้ามคืน

4.5.5.3 ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการดูดสารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 µl มาทำ PCR ซึ่งใช้ Primer คู่ที่ 2 โดยสภาวะและเงื่อนไขของการทำ PCR ตามรอบแรกของการทำในขั้นตอนที่ 4.4 จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 241 bp

4.5.6 การสกัดพลาสมิด (Plasmid mini preparation)

หลังจากตรวจวิเคราะห์ว่าเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการส่งพลาสมิดเข้าเซลล์มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมอยู่ จากนั้นนำสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียส่วนที่เหลือมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Nucleospin® Plasmid (MN) ดังต่อไปนี้

4.5.6.1 ดูดสารละลายที่มีเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอน 4.5.5 ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 5 นาที ภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.5.6.2 ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย A_1 buffer ปริมาตร 250 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture

4.5.6.3 เติมสารละลาย A_2 buffer ปริมาตร 250 µl แล้วผสมกันด้วยการกลับหลอดทดลองไปมา 6-8 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.5.6.4 เติมสารละลาย A_3 buffer ปริมาตร 300 µl แล้วผสมกันด้วยการกลับหลอดทดลองไปมา 6-8 ครั้ง แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 10 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.5.6.5 ดูดส่วนใสลงใน spin column เพื่อ bind DNAแล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.5.6.6 เติมสารละลาย A_4 buffer ปริมาตร 600 µl ผสมด้วยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปตอัตโนมัติแล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.5.6.7 ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 2 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ Column แห้ง จากนั้นเปลี่ยนหลอดใหม่แล้วเติมสารละลาย AE buffer ปริมาตร 50 µl และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที

4.5.6.8 ปั่นละลาย DNA จาก column ด้วยความเร็วรอบ 13,000 rpm เวลา 1 นาทีภายใต้อุณหภูมิห้อง

4.5.6.9 เก็บสารละลายที่มีพลาสมิดที่ – 20^0 C

4.5.7 การตรวจหาลำดับเบส (Sequence analysis)

เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดข้อมูลในการสร้างโปรตีนโดยผ่านทาง mRNA ทั้งนี้โปรตีนจะเป็นตัวกำหนดลักษณะที่แสดงออกในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตทั้งร่างกาย การหาลำดับเบสของยีนที่มีอยู่ร่วมกันในสิ่งที่มีชีวิตต่างชนิดกัน เช่น small subunit ribosome RNA gene นั้นสามารถนำมาเปรียบเทียบความใกล้ชิดและการจัดหมวดหมู่ในเชิงอนุกรมวิธานตลอดจนการศึกษาสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ดีขึ้น

สำหรับการยืนยันการติดเชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) จากการทดลองมีวิธีการดังต่อไปนี้

4.5.7.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากเพลท 3 โคโลนีเดี่ยวเพื่อให้มั่นใจว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายที่เชื่อมอยู่กับพลาสมิด จากนั้นนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนแล้วสกัดบริสุทธิ์ ดังเช่นในขั้นตอนที่ 4.5.6

4.5.7.2 วัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยค่า OD_{260} เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้น 100 – 500 ng/ul จากนั้นนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสด้วยเครื่อง ABI 3730 Sequencer (Applied Biosystems) ที่บริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malasia โดยนำส่งผ่านบริษัท Ward Medic Ltd., Part, Thailand

4.5.7.3 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสโดยใช้โปรแกรม NCBI BLAST (HThttp://www.ncbi.nlm.nhi.gov/BLAST/blastTH) และโปรแกรม Cluster algorithm (CLUSTALX) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เบสกับ Gen Bank นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม GenDoc MFC application (GENDOC) เพื่อแปลรหัสจาก ลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเป็นโปรตีน

4.6 การแสดงการติดเชื้อด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นเพื่อศึกษาการแสดงออกของทั้ง DNA และ RNA โดยที่โครงสร้างเซลล์ไม่ถูกทำลายทั้งนี้ยังสะดวก รวดเร็วและปลอดภัยต่อผู้ศึกษาทดลอง **หลักการ**: ส่วนของ DNA สายเดี่ยวที่ติดฉลาก (labeled single-stranded fragment of DNA) ที่เรียกว่า "labeled probe" มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสคู่สมกับ DNA เป้าหมายสามารถจับกับ DNA เป้าหมายนั้นเกิดเป็น "hybrids" ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีการนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน 16s rDNA (Gene expression) รวมถึงการแสดงออกของโครงสร้างประชากร (Population structure) พลวัตการกระจายเชื้อ (Dynamics)

และการเกิดปฏิสัมพันธุ์ระหว่างเซลล์ (cell–cell interaction) ของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในรังไข่ซึ่งอาจมีผลต่อลักษณะกลไกทางพันธุกรรม สรีระวิทยา วงจรชีวิต และการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของยุงลายบ้าน ด้วย Fluorescence in situ DNA-DNA hybridization (FISH) [21] [30]

4.6.1 **การคำนวณอุณหภูมิสำหรับ** Hybridization **และอุณหภูมิสำหรับขั้นตอนการล้าง**

การคำนวณอุณหภูมิสำหรับ Hybridization สามารถทำได้ด้วยสูตรดังนี้

Melting Temperature

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log. Na^+) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%formamide) - (500/n)$$

Probe แรก

$$VK\text{-}INTF = 81.5 + 16.6 (\log 195\times10^{-3}M) + 0.41(42.86\%) - 0.61(20) - (500/21)$$

$$= 51.27^0C$$

Probe ที่สอง

$$VK\text{-}INTR = 81.5 + 16.6 (\log 195\times10^{-3}M) + 0.41(45.45\%) - 0.61(20) - (500/22)$$

$$= 53.24^0C$$

Hybrydization Temperature

T_{hyb} = Tm – 15

Probe แรก

VK-INTF = 51.27 - 15 = 36.27^0C

Probe ที่สอง

VK-INTF = 53.42 - 15 = 38.42^0C

ดังนั้นค่าเฉลี่ยของ Hybridization temperature เท่ากับ 37^0C

Washing Temperature ควรเหนือกว่าอุณหภูมิ Hybridization ประมาณ 5 – 20 ^{0}C ฉะนั้นจึงเท่ากับอยู่ในช่วง 42-57^0C

4.6.2 ขั้นตอนของการทำ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Dako denmark A/S)

หลังเตรียมสิ่งตัวอย่างตามหัวข้อที่ 4.3.1 แล้วทดลองดังขั้นตอนต่อไปนี้

1) ตากสไลด์ให้แห้งและมั่นใจว่าไม่มีหยดน้ำเกาะบนสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง

2) ล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

3) วางสไลด์ไว้ใน Moist chamber ย่อยชิ้นเนื้อเยื่อของมดลูกของยุงด้วยเอ็นไซม์เป็ปซินเป็นเวลา 3 นาที (หยดเป็ปซินพอให้ท่วมบริเวณชิ้นเนื้อเยื่อ) ที่อุณหภูมิ 37^0C

4) แล้วแช่สไลด์ใน 10% Formalin เป็นเวลา 1 นาที

5) ล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

6) แช่สไลด์ใน 70%, 80%, 95% และ 100% เอทธานอลตามลำดับที่ความเข้มข้นละ 1 นาที เพื่อกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7) เพื่อหยด VK INTF probe (5' fluoro TCC ATA AAG GCC ATG ACT) และ VK INTR probe (5' fluoro TCA TGT ACT CGA ATT GCA GAG T) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเขียว ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ปริมาณ 5-8 µl ต่อสไลด์ ปิดด้วย Cover slip และ seal ด้วยกาวแล้ววางสไลด์ในที่มืด

8) เตรียมตั้งโปรแกรมของเครื่องไฮบริไดเซอร์ ใช้อุณหภูมิ Denaturation ที่ 94^{0}C เป็นเวลา 5 นาทีและอุณหภูมิ hybridization ที่ 37^{0}C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง (Overnight)

9) นำสไลด์ออกจากเครื่อง Hybridizer แล้วแช่ใน stringent wash buffer ที่อุณหภูมิห้อง และเพื่อล้างให้กาวที่ปิดขอบ cover slip หลุด

10) แช่ใน Stringent wash buffer ที่วางในเครื่อง Water bath ที่ 55^{0}C เป็นเวลา 10 นาทีพร้อมปิดฝาเครื่อง Water bath

11) จากนั้นล้างสไลด์ด้วย Wash buffer โดยการแช่ในขวดที่มีบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง

12) แช่สไลด์ใน 70% แช่สไลด์ใน 70%, 80%, 95% และ 100% เอทธานอล ตามลำดับที่ความเข้มข้นละ 1 นาที เพื่อกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

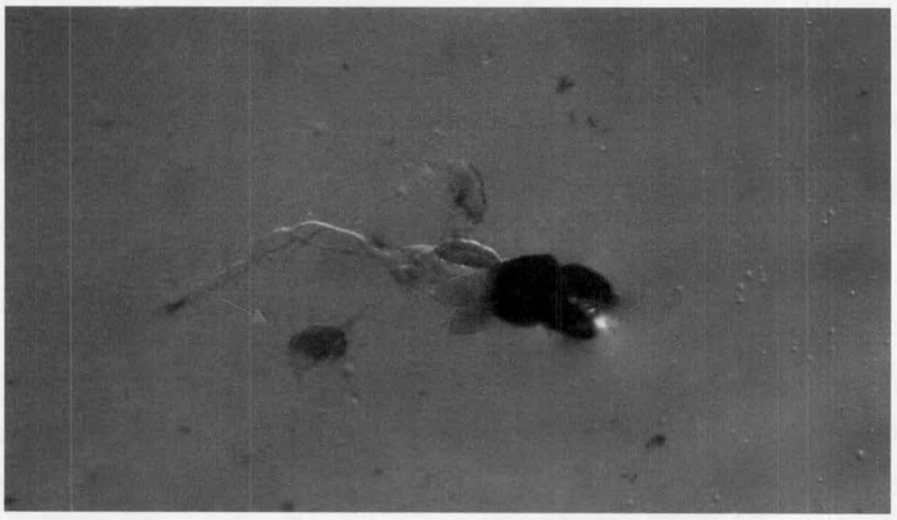
13) ปิด Cover slip และปิดขอบสไลด์ด้วยกาว

14) นำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ Olympus รุ่น SZX 9 โดยใช้ฟิวเตอร์ GFP ที่ความยาวคลื่น 488 nm

4.7 การประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้าน

4.7.1 การนับปริมาณอสุจิ (Sperm count) เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ponlawat และ Harrington

1) นำยุงเพศผู้ที่ไม่ได้ผสมพันธุ์อายุ 5 วัน และหลังจากผสมพันธุ์แล้วซึ่งมีอายุ 10 วันทั้งกลุ่ม A และ C (จากข้อ 4.2.6) มาสกัด Testes 2 พู และ seminal vesicle (ภาพที่ 3.8) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น SZ60 ลงในสารละลาย PBS ปริมาตร 50 µl ในหลุมที่เตรียมไว้แล้ว

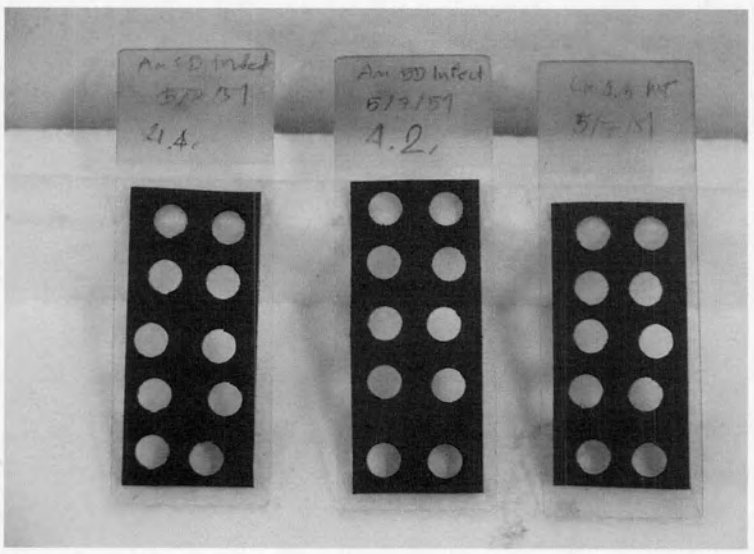


ภาพที่ 3.8 Testes 2 พู (*ลูกศรชี้*) และ seminal vesicle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น SZ60

2) บด Testes และ seminal vesicle ในหลุมโดยใช้ที่บดยุงเพื่อให้ตัวอสุจิออกจาก testes

3) ล้างที่บดยุงด้วย 50 µl PBS จำนวน 3 ครั้ง จะได้ปริมาตรในหลุมทั้งหมด 200 µl

4) ดูดสารละลายที่มีอสุจิผสมอยู่ด้วยปิเป็ตอัตโนมัติ และหยดลงบนสไลด์สำหรับนับอสุจิ 10 หลุมๆละ 1 หยดๆละ 5 µl (ภาพที่ 3.9) ต่ออัณฑะของยุง 1 ตัว



ภาพที่ 3.9 สไลด์สำหรับนับอสุจิของยุง

5) ตากสไลด์จนแห้งแล้วแช่ใน absolute methanol เวลา 1 นาที

6) ย้อมด้วยสีจิมซ่า (5% Giemsa stained) เวลาประมาณ 45-60 นาที

7) ล้างสีด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งแล้วตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

8) นำสไลด์ที่ไปนับปริมาณอสุจิด้วยกล้อง Dark field ที่กำลังขยาย 400 เท่า

9) การนับปริมาณอสุจิต้องนับปริมาณในแต่ละหลุมเพื่อเปรียบเทียบปริมาณก่อนแล้ว นำปริมาณอสุจิทั้ง 10 หลุมมารวมกัน จากนั้นหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณค่าเฉลี่ย ด้วย Factor เท่ากับ 40 เนื่องจากสารละลายอสุจิทั้งหมดต่อหนึ่งตัวเท่ากับ 200 µl และหยดลงสไลด์แต่ละหลุมมีปริมาตรเท่ากับ 5 µl ต่อหลุม แสดงว่าสารละลายอสุจิของยุงหนึ่งตัวหยดบนสไลด์ได้ทั้งหมด 40 หลุม ซึ่งจะได้ปริมาณอสุจิแทนปริมาณอสุจิทั้งหมดต่อยุงเพศผู้ 1 ตัว

ดังในสูตรต่อไปนี้

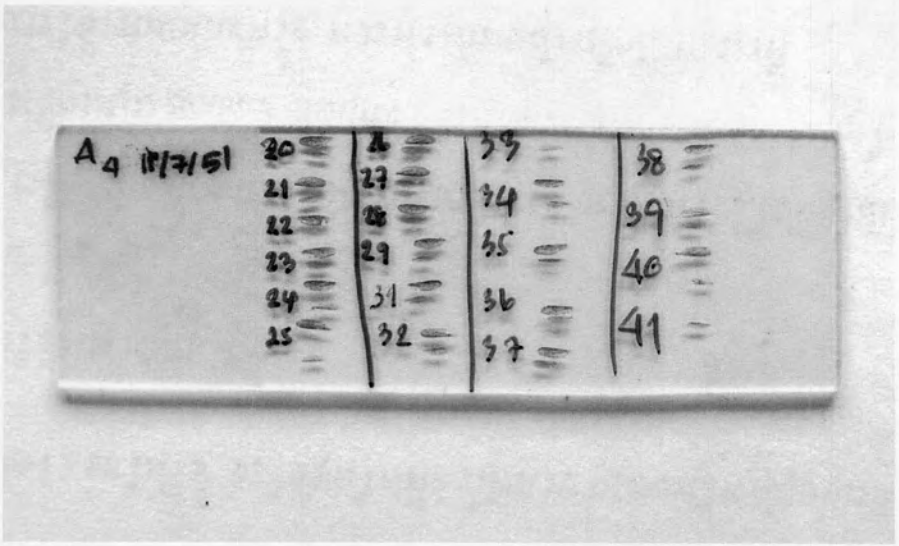
$$\frac{(\text{ผลรวมปริมาณอสุจิทั้ง 10 หลุม})}{10} \times 40$$

จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณอสุจิยุงที่ติดเชื้อและยุงจากธรรมชาติ กลุ่มละ 10 ตัว [40]

4.7.2) วัดขนาดของยุง (Wing length measure)

จากวิธีของ Ponlawat และ Harrington โดยนำยุงหลังสกัดอัณฑะและ รังไข่แล้ว

1) เด็ดปีก (3.11, 3.12 และ 3.13) ข้างขวา โดยเข็มสำหรับเด็ดปีกยุง จากนั้นปีกยุงบนสไลด์ (ภาพที่ 3.10) ที่เตรียมไว้แล้ว



ภาพที่ 3.10 การจัดปีกของยุงบนสไลด์

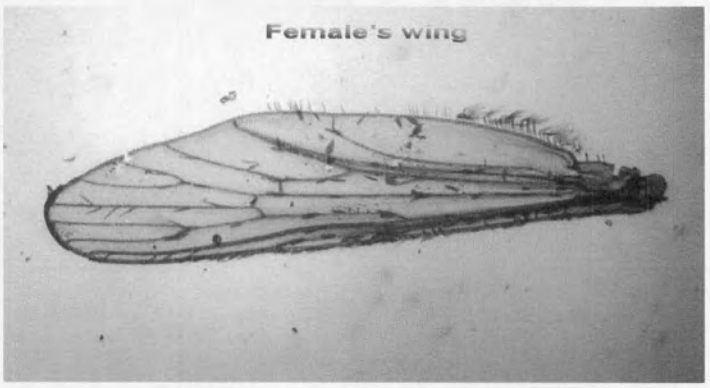
2) วัดความยาวของเส้นปีกด้วย Ocular lens ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH-2 และ/หรือ BH-2 ที่กำลังขยาย 40 เท่า

ดังในสูตรต่อไปนี้

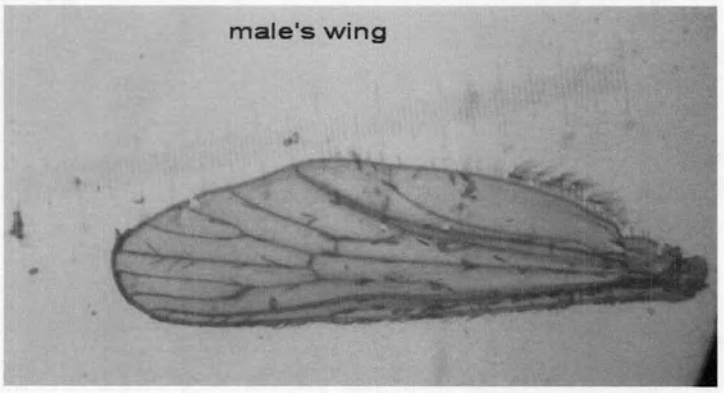
ความยาวเส้นปีกวัดจาก Ocular lens × 0.025 = **ความยาวเส้นปีก** (mm)

จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณอสุจิยุงที่ติดเชื้อและยุงจากธรรมชาติ

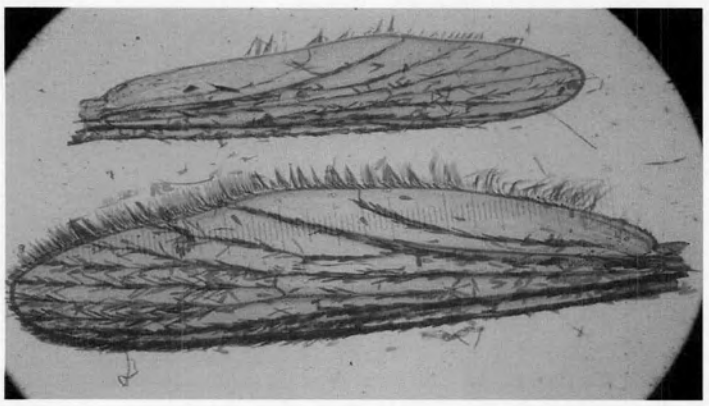
3) แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบขนาด (Body size) ของยุงระหว่างทั้ง A และ C (ตารางที่ 3.4) [40]



ภาพที่ 3.11 ปีกของยุงเพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า



ภาพที่ 3.12 ปีกของยุงเพศผู้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า



ภาพที่ 3.13 เปรียบเทียบขนาดของปีกของยุงเพศผู้ (บน) และเมีย (ล่าง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

4.7.3) เปรียบเทียบ อัตราการฟัก

นับจำนวนไข่ของยุง (ภาพที่ 3.14 และ 3.15) ที่ติดเชื้อและยุงธรรมชาติทั้งกลุ่ม A, B และ C แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างทั้ง 3 กลุ่มดังตารางที่ 3.5

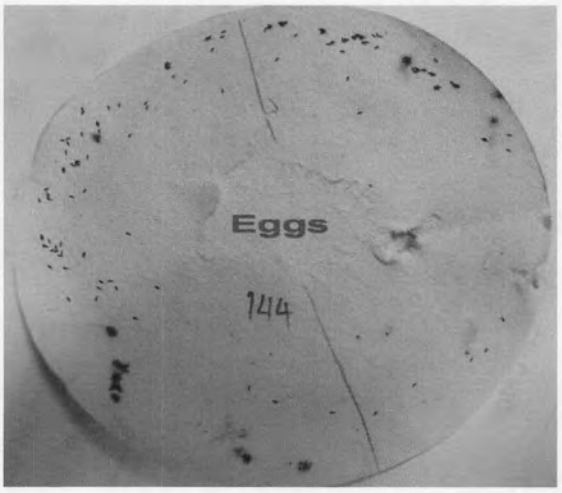
Groups	Mosquitoes
A	Infected male × Infected female
B	Uninfected male × Infected female
C	Uninfected male × Uninfected female

ตารางที่ 3.4 คู่ผสมพันธุ์ยุงในแก้วพลาสติกที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำอยู่ส่วนล่างในแก้ว

ดังในสูตรต่อไปนี้

** อัตราการวางไข่*

ผลรวมจำนวนไข่จากแม่ n ตัว = ค่าเฉลี่ยการวางของไข่
จำนวนแม่ n ตัว



รูปที่ 3.14 จำนวนไข่ยุงที่ต้องการนับภายใต้กล้องดิจิตอล นับจำนวนไข่ได้ 144 ฟอง

รูปที่ 3.15 จำนวนไข่ยุงที่ต้องการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า

* ***อัตราการฟัก***

<u>จำนวนลูกนำยุงจากแม่ n ตัว</u> × 100 = % การฟักไข่ n ตัว **จำนวนไข่จากแม่ n ตัว**

4.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistic analysis)

การประเมินสมรรถนะของยุงลายบ้านทุกหัวข้อใช้ค่าทางสถิติ Independent t-test จากโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 12