สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

T039889

นายสุวัฒน์ มงคลวราภรณ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 39889
วัน, เดือน, ปี 11 ก.ค. 2544

.b..........
.i..........

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studies on the Optimal Time Period for Harvesting *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) Produced in *Spodoptera exigua* Cell Line (SE-1)

Mr. Suwat Mongkolvaraporn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส หนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

นักศึกษา นายสุวัฒน์ มงคลวราภรณ์ รหัสประจำตัว 40053075

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.... **หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์**

(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

.... ประธานกรรมการ

(ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล)

.... กรรมการ

(ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์)

.... กรรมการ

(ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)
นักศึกษา	นายสุวัฒน์ มงคลวราภรณ์ รหัสประจำตัว 40053075
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตของไวรัส โดยใช้นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) และเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเกรซ ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว (FBS) โดยทำการปลูกเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ซม ^{2} จำนวนเซลล์ที่ปลูกเท่ากับ 2 x 10 ^{5} เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตรเซลล์แขวนลอยทั้งหมดเท่ากับ 5 มิลลิลิตร และปลูกเชื้อ *Se*MNPV passage ที่ 3 ค่า MOI เท่ากับ 1 plaque-forming unit (PFU) ต่อ เซลล์ ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่พบผลึกโปรตีน (OBs) จำนวนผลึกโปรตีน (OBs) ต่อมิลลิลิตรและต่อเซลล์ และค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัสอิสระ (ECV) ซึ่งพบใน SE-1 หลังจากปลูกเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อสูงสุด (49.63%) พบในการเพาะเลี้ยงซึ่งเก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อนาน 5 วัน ส่วนเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อที่เก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อนาน 3 วัน และ 7 วัน คือ 14.51% และ 34.99% ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร (และต่อเซลล์) ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวภายหลังการปลูกเชื้อ 3 5 และ 7 วัน ได้แก่ 1.78 x 10 ^{5} ผลึกต่อมิลลิลิตร (2.22 ผลึกต่อเซลล์) 7.95 x 10 ^{6} ผลึกต่อมิลลิลิตร (30.90 ผลึกต่อเซลล์) และ 7.667 x 10 ^{6} ผลึกต่อมิลลิลิตร (35.85 ผลึกต่อเซลล์) ตามลำดับ และผลผลิต OBs ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อ 5 วันและ 7 วัน ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลผลิตที่เป็นไวรัสอิสระ ค่าไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน (1.95 x 10 ^{7} PFU ต่อ มิลลิลิตร) และ 7 วัน (1.92 x 10 ^{7} PFU ต่อ มิลลิลิตร) ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถิติเช่นกัน จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว *Se*MNPV ควรจะเป็นช่วงหลังจากการปลูกเชื้อนาน 5 วัน และ 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Studies on the Optimal Time Period for Harvesting *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) Produced in *Spodoptera exigua* Cell Line (SE-1)

Name Mr. Suwat Mongkolvaraporn Student ID. 40053075

Special Project Advisor Dr. Ounruan Petcharawan

Department Applied Biology

Academic Year 2000

Abstract

The optimal time period for harvesting the production of virus was conducted by using *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) and *Spodoptera exigua* cell line (SE-1) cultivated in Grace' s medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The TC- 25 cm^2 flask was planted with 5 milliliters of cell suspension at 2×10^5 cells per milliliter and infected with *Se*MNPV at a multiplicity of infection of 1 plaque-forming unit (PFU) per cell from the third passage in tissue culture. Cell cultures were examined for the percentage of cells possessing occlusion bodies (OBs), the number of occlusion bodies per milliliter and per cell and the titer of extracellular virus (ECV) in SE-1 cells at 3, 5, and 7 days postinfection.

The results showed that the highest percentage of infected cells (49.63 %) was found in culture harvested at 5 days postinfection. The percentage of infected cells in cultures harvested at 3 days and 7 days postinfection were 14.51 % and 34.99 %, respectively. The average number of occlusion bodies per milliliter (and per cell) were harvested at 3, 5, and 7 days postinfection and the results were 1.78×10^5 OBs per milliliter (2.22 OBs per cell), 7.95×10^6 OBs per milliliter (30.90 OBs per cell), and 7.667×10^6 OBs per milliliter (35.85 OBs per cell), respectively. It was not significantly different between the yields of OBs in harvesting at 5 days and 7 days postinfection. For the titer of extracellular virus production, the results

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

showed that it was not significantly different between the production in harvesting at 5 days (1.95x 10^{7} PFU per milliliter) and 7 days (1.92 x 10^{7} PFU per milliliter) postinfection. These studies indicated that the optimal time period for harvesting *Se*MNPV should be harvested at 5 days and 7 days postinfection.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม และ ดร.สุดาวรรณ เชยชมศรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) และนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่เป็นประธานกรรมการและคณะกรรมการในโครงงานพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร และคุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สุวัฒน์ มงคลวราภรณ์

มิถุนายน 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	46
ภาคผนวก	48
เอกสารอ้างอิง	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและชนิดของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แมลงติดเชื้อ 4

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงของ Wyatt....................................8

ตารางที่ 2.3 อาหารของเกรซ..9

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง..........................11

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของอาหารชนิด Mitsuhashi and Moramorosch's MM medium..14

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. จำนวนเซลล์ตาย/มล. และเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส..............................30

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)..................................35

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (virus titer, pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)..36

ตารางผนวกที่ 1 ผลของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ SE-1 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรของสิ่งทดลองและผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.05)........................52

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ SE-1 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร...52

ตารางผนวกที่ 3 ผลของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ SE-1 ที่ตายต่อมิลลิลิตรของสิ่งทดลองและผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.05)........................53

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ SE-1 ที่ตายต่อมิลลิลิตร.....53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ตารางผนวกที่ 5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์ SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.05)....................54
ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เซลล์ SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV ต่อมิลลิลิตร....................54
ตารางผนวกที่ 7 แสดงค่า Log ของจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของ *Se*MNPV ต่อมิลลิลิตร (ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.01)....................55
ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log จำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อมิลลิลิตรของ *Se*MNPV....................55
ตารางผนวกที่ 9 แสดงค่า Log ของจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของ *Se*MNPV ต่อเซลล์ (ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.01)....................56
ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log จำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อเซลล์ของ *Se*MNPV....................56
ตารางผนวกที่ 11 แสดงค่า Log ไวรัสไตเตอร์ของ *Se*MNPV (PFU/ml) (ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.01)....................57
ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log ไวรัสไตเตอร์ของ*Se*MNPV (PFU/ml)....................57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของบาคูโลไวรัส (baculovirus)....................................17
ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะ 1 ช่องใหญ่ (primary square) บนฮีโมไซโตมิเตอร์และเซลล์แมลงที่ย้อมสีทริปแพนบลู เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ตายติดสีน้ำเงิน.......................21
ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของช่องใหญ่ (primary square)ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ 5 ช่อง และสัญญลักษณ์เซลล์ที่เป็นวงกลมสีดำจะทำการนับ ส่วนวงกลมสีขาวจะไม่นับ...22
ภาพที่ 3.3 แผนภูมิแสดงวิธีการเก็บเกี่ยวผลึกโปรตีนของ *Se*MNPV จากนิวเคลียสของ SE-1...23
ภาพที่ 3.4 แผนภาพแสดงวิธีการหาค่า end-point dilution และจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส...25
ภาพที่ 3.5 แผนภาพแสดงการเตรียมสิ่งทดลอง....................................29
ภาพที่ 4.1 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 4 วัน (กำลังขยาย 400 X)
(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 3 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X)....................38
ภาพที่ 4.2 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 6 วัน (กำลังขยาย 400 X)
(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 5 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X)....................39
ภาพที่ 4.3 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 8 วัน (กำลังขยาย 400X)
(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 7 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400X)....................40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400X)
(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่มิได้ทำการเจือจาง (pure)
(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-1}..................41

ภาพที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)
(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-2}
(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-3}..................42

ภาพที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดย ใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)
(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-4}
(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-5}................43

ภาพที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)
(A.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-6}
(B.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-7}...............................44

ภาพที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)
(A.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-8}
(B.) แสดงเซลล์ไลน์ซึ่งไม่ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-9}.........................45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

หนอนกระทู้หอม (beet armyworm) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Spodoptera exigua* (Hübner) เป็นผีเสื้อกลางคืนจัดอยู่ในวงศ์นอคทูอิดี (Family Noctuidae) อันดับเลพิดอปเทอรา (Order Lepidoptera) คลาสอินเซคตา (Class Insecta) และไฟลัมอาร์โทรโปดา (Phylum Arthropoda) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญมีการระบาดกว้างขวางทั่วโลก (อุทัย, 2540; Trumble และ Baker, 1984) การใช้สารเคมีกำจัดแมลงเพื่อควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอมมักจะไม่ได้ผล ทั้งนี้เพราะหนอนมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงอย่างรวดเร็ว ต่อมาได้มีการสำรวจพบว่านิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, *Se*MNPV) ทำให้หนอนกระทู้หอมซึ่งระบาดในธรรมชาติเกิดโรคและตาย ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนกระทู้หอมที่ระบาดในแปลงปลูกพืช สำหรับการผลิต *Se*MNPV ในปัจจุบันทำการเพิ่มปริมาณในตัวหนอนโดยตรง และเก็บเกี่ยวไวรัสจากหนอนที่ตายแล้ว (อุทัย, 2540; Gelernter และ Federici, 1986) ซึ่งต้องทำการเพาะเลี้ยงแมลงจำนวนมาก ตลอดจนพื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงและเจ้าหน้าที่จำนวนมากเพื่อเลี้ยงแมลงและผลิตอาหารเทียม นอกจากนี้ไวรัสที่ได้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์หลายชนิด จึงมีความจำเป็นต้องทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะได้ผลึกโปรตีนของไวรัสที่บริสุทธิ์ต่อไป (อุทัย, 2539) ความต้องการผลิตไวรัสในระดับอุตสาหกรรมนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมสภาวะต่างๆ ตลอดจนวิธีการผลิต และไวรัสที่ผลิตได้ต้องมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ดังนั้นการผลิตไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง (*in vitro*) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่กระทำได้ง่ายและสามารถเพิ่มปริมาณไวรัสได้ดี

สำหรับโครงงานพิเศษนี้จะทำการเพิ่มปริมาณ *Se*MNPV โดยใช้เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมชนิด UCR-SE-1 เป็นเซลล์ไลน์ที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อของหนอนกระทู้หอมวัยแรกเกิด (neonate larva) โดย Gelernter และ Federici (1986) เป็นผู้พัฒนาเซลล์ชนิดนี้ และศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว *Se*MNPV ในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมเพื่อให้ได้ปริมาณมากและมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนกระทู้หอมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

2. เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตของ *Se*MNPV ทั้ง 2 รูปแบบคือไวรัสในรูปแบบอิสระ (extracellular virus, ECV) และไวรัสที่อยู่ในรูปผลึกโปรตีน (occluded virus, OV) ซึ่งเก็บเกี่ยวภายหลังการปลูกเชื้อนาน 3 5 และ 7 วันตามลำดับ

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) โดยใช้ไวรัสรูปแบบ ECV passage ที่ 3 ในการทำให้เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมติดเชื้อ และเก็บเกี่ยว *Se*MNPV ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วันตามลำดับ ผลผลิตที่ได้เป็นไวรัส 2 รูปแบบคือ ECV และ OV ซึ่งเป็นผลึกโปรตีน (polyhedra หรือ occlusion body, OB) จากนั้นทำการคำนวณหาค่าการทำให้เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมติดเชื้อ 50% (median tissue culture infective dose, $TCID_{50}$) และจำนวนผลึกโปรตีน (OB) ที่ได้ทั้งหมดในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยว สำหรับการทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทราบช่วงเวลาที่นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมจำลองตัวเองมากที่สุด โดยสามารถทราบได้จากค่า $TCID_{50}$ ในกรณีของ ECV และทราบช่วงเวลาที่ได้ผลผลิตในรูปของผลึกโปรตีน (OB) สูงสุด

2. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต *Se*MNPV โดยใช้เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)ในระดับถังหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. เซลล์ไลน์ของแมลง

เซลล์ไลน์ของแมลงพัฒนามาจากเนื้อเยื่อหลากชนิดของแมลง ซึ่งอยู่ในระยะต่างๆ เช่น ตัวอ่อนภายในไข่ (embryonated egg) ระยะหนอน (larval stage) ระยะดักแด้ (pupal stage) และตัวเต็มวัย (adult) เซลล์ไลน์ที่ได้สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้อย่างต่อเนื่องในอาหารเหลวที่ปลอดเชื้อ สำหรับเนื้อเยื่อของแมลงที่นำมาใช้สร้างเซลล์ไลน์ ได้แก่ เนื้อเยื่อของรังไข่ (ovary) เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ตัวอ่อน (embryo) หนอนแรกเกิด (neonate larva) เนื้อเยื่อไขมัน (fat body) และ imaginal discs เป็นต้น (Vaughn, 1994; Sohi, 1995) ความพยายามในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของแมลงเริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1915 โดย Goldschmidt ทำการเพาะเลี้ยง spermatocytes ในน้ำเกลือผสมกับเลือด (hemolymph) ของแมลงในกลุ่มผีเสื้อ ต่อมา Trager (1935) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในกลุ่มผีเสื้อเช่นกัน แต่ใช้อาหารที่มีส่วนประกอบซับซ้อนกว่า Goldschmidt ได้แก่ balanced salt solution มอลโตส (maltose) egg albumin digest และเลือดหนอนไหม (silkworm hemolymph) ซึ่งเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อของรังไข่ผีเสื้อหนอนไหมสามารถเจริญได้หลายสัปดาห์ และไวรัสโรคแมลงสามารถทำการจำลองตัวเอง (replication) เพิ่มจำนวนได้ในเซลล์แมลงชนิดนี้ นับว่าเป็นครั้งแรกที่เซลล์เพาะเลี้ยงมีชีวิตรอดได้นานและไวรัสโรคแมลงจำลองตัวเองได้ ต่อมา Gaw และคณะ (1959) รายงานถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งได้จากเนื้อเยื่อของผีเสื้อหนอนไหมเช่นกัน อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงยังไม่แพร่หลายกว้างขวาง จนกระทั่ง Grace (1962) ได้รายงานผลการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในอันดับเลพิดอปเทอรา (Order Lepidoptera) และสามารถสร้างเซลล์ไลน์ชนิดแรกจาก Australian emperor gum moth (*Antheraea eucalypti*) ต่อมา Lynn (1991) รายงานถึงจำนวนของเซลล์ไลน์แมลงมีมากกว่า 150 ชนิด

สำหรับเซลล์ไลน์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้คือเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม UCR-SE-1 ซึ่งพัฒนามาจากเนื้อเยื่อของหนอนวัยแรกเกิด (neonate larva) โดยนำหนอนวัยแรกเกิดมาผ่านการปลอดเชื้อ จากนั้นทำการสับตัวหนอนให้เป็นชิ้นเล็กๆ และย่อยด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) และเลี้ยงในอาหารชนิด TNM-FH มีค่า osmotic pressure เท่ากับ 400 mOsm เซลล์ไลน์ที่ได้มี 2 รูปแบบ ได้แก่ เซลล์รูปร่างคล้ายเซลล์ผิว (epithelial-like cells) และเซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped cells) การเจริญของเซลล์ไลน์ชนิดนี้มีค่า population doubling time เท่ากับ 56 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบความอ่อนแอต่อการติดเชื้อ *Se*MNPV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Ac*MNPV (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) พบว่าเซลล์รูปกระสวยติดเชื้อไวรัสได้ดีกว่า (Gelernter และ Federici, 1986) ตัวอย่างเซลล์ไลน์ของแมลงและความจำเพาะเจาะจงของไวรัสโรคแมลงชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและชนิดของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แมลงติดเชื้อ (Granados และ McKenna, 1995)

Cell line designation and/or species of origin	Baculovirus family / species
Lymantria dispar : Lymantridae	Saturnidae
	Antheraea pernyi MNPV
BTI-EAA	Noctuidae
Estigmene acrea : Arctidae	*Autographa californica* MNPV
IZD-MB503	
Mamestra brassicae : Noctuidae	
Manduca sexta : Sphingidae	
IPLB-SF1254	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
TN368, IPLB-TN-R, BTI-TN5B1-4	
Tricohplusia ni : Noctuidae	
UIV-SL-573, SPC-S1-48, SPC-S1-52	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
NIAS-LeSe-11	
Leucania separata : Noctuidae	
IPRI-MD-108	
Malacosoma disstria : Lasiocampidae	
IPLB-LD64BA	
Lymantria dispar : Lymantridae	
UCR-SE-1	
Spodoptera exigua : Noctuidae	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Cell line designation and/or species of origin	Baculovirus family / species
IPLB-SF21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	*Spodoptera frugiperda* MNPV
UIV-SL-573	*Spodoptera exemta* MNPV
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
IPLB-SF21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
IPLB-SF21	*Spodoptera littoralis* MNPV
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
UIV-SL-573, SPC-S1-52	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
UCR-SE-1	*Spodoptera exigua* MNPV
Spodoptera exigua : Noctuidae	
IPLB-SF21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
IPLB-SF21	*Trichoplusia ni* MNPV
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
TN368	
Trichoplusia ni : Noctuidae	
TN368	*Anticarsia gemmatalis* MNPV
Trichoplusia ni : Noctuidae	
Hz-AM	
Heliothis zea : Noctuidae	
IPLB-SF	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Cell line designation And/or species of origin	Baculovirus family / species
IAL-PiD	
Plodis interpunctella : Noctuidae	
IPLB-SF21 AEII	*Xestia c-nigrum* MNPV
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
CLS-79	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
BM-5	Bombycidae
Bombyx mori : Bombycidae	*Bombyx mori* MNPV
IPRI-01-12	
Orgyia leucostigma : Lymantridae	Lymantridae
TN368	*Orgyia pseudotsugata* MNPV
Trichoplusia ni : Noctuidae	
IPRI-CF-124	Pyralidae
Choristoneura fumiferana : Tortricidae	*Galleria mellonella* MNPV
IPRI-108	
Malacosoma disstria : Lasiocampidae	*Choristoneura fumiferana* MNPV
IZD-Cp58	
Cydia pomonella : Olethreutidae	*Choristoneura murinana* MNPV
IMC-HZ-1	Noctuidae
Heliothis zea : Noctuidae	*Heliothis zea* SNPV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Cell line designation And/or species of origin	Baculovirus family / species
BCIRL-HV-AMI *Heliothis virescens* : Noctuidae BCIRL-HZ-AM1, BCIRL-HZ-AM2, BCIRL-HZ-AM3 *Heliothis zea* : Noctuidae SIE-HA, SIE-HAH *Heliothis armigera* : Noctuidae	
IPRI-01 *Orgyia leucostigma* : Lymantridae	*Orgyia leucostigma* SNPV
BTI-TN5B1-4 *Trichoplusia ni* : Noctuidae	*Trichoplusia ni* SNPV

2. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีการพัฒนาสูตรต่างๆ มากมาย เพื่อให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแต่ละชนิด Wyatt (1956) ได้ทำการศึกษาถึงส่วนประกอบของเลือดหนอนผีเสื้อ (hemolymph) และทำการพัฒนาสูตรอาหารให้มีส่วนประกอบใกล้เคียงกับเลือดของแมลง เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในกลุ่มผีเสื้อ ส่วนประกอบของอาหารที่ Wyatt ปรับปรุงมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงของ Wyatt (Vaughn และ Weiss, 1991)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / ลิตร)	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / ลิตร)
NaH_2PO_4	1,100	L-Glutamic acid	600
$MgCl_2.6H_2O$	3,040	L-Glutamine	600
$MgSO_4.7H_2O$	3,700	Glycine	650
KCl	2,980	DL-Serine	1,100
$CaCl_2$	810	DL-Alanine	450
Glucose	700	β-Alanine	200
Fructose	400	L-Proline	350
Sucrose	400	L-Tyrosine	50
Malic acid	670	DL-Threonine	350
α-Ketoglutaric acid	370	DL-Methionine	100
Succinic acid	60	L-Phenylalanine	150
Fumaric acid	55	DL-Valine	200
L-Arginine HCl	700	DL-Isoleucine	100
DL-Lysine HCl	1,250	DL-Leucine	150
L-Histidine	2,500	L-Tryptophan	100
L-Aspartic acid	350	L-Cystine	25
L-Asparagine	350	Cysteine HCl	80

ต่อมา Grace (1962) ปรับปรุงสูตรอาหารของ Wyatt โดยเติมวิตามินบีรวมลงในอาหารของ Wyatt และให้ชื่ออาหารชนิดใหม่ว่า Grace's medium ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.3 สูตรอาหารเกรซสามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้ และเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่ Grace (1962) สร้างขึ้นคือเซลล์ไลน์ของ Australian emperor gum moth (*Antheraea eucalypti*) โดยทำการปลูกเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อรังไข่ของระยะดักแด้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 อาหารของเกรซ (Grace's medium) (Vaughn และ Weiss, 1991)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / 100 มล.)	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / 100 มล.)
$NaH_2PO_4.2H2O$	114.00	L-Threonine	17.50
$NaHCO_3$	35.00	L-Tryptophan	10.00
KCl	224.00	L-Tyrosine	5.00
$MgCl_2.6H_2O$	228.00	L-Valine	10.00
$MgSO_4.7H_2O$	278.00	Sucrose	2,268.00
$CaCl_2$	100.00	Fructose	40.00
L-α-Alanine	22.50	Glucose	70.00
β-Alanine	20.00	Malic acid	67.00
L-Arginine.HCl	70.00	α-Ketoglutaric acid	37.00
L-Asparagine	35.00	Succinic acid	6.00
L-Aspartic acid	35.00	Fumaric acid	5.50
L-Cystine HCl	70.00	Thiamine.HCl	0.002
L-Glutamic acid	60.00	Riboflavin	0.002
L-Glutamine	60.00	Calcium pantothenate	0.002
Glycine	65.00	Pyridoxine.HCl	0.002
L-Histidine	250.00	*p*-Aminobenzoic acid	0.002
L-Isoleucine	5.00	Folic acid	0.002
L-Leucine	7.50	Niacin	0.002
L-Lysine HCl	62.50	Isoinositol	0.002
L-Methionine	5.00	Biotin	0.001
L-Phenylalanine	15.00	Choline chloride	0.02
L-Proline	35.00	Penicillin G, sodium salt	3.00
DL-Serine	110.00	Streptomycin sulfate	10.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันอาหารของเกรซนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในอันดับเลพิดอปเทอรา สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.1 อาหารที่เติมซีรัม (serum-containing medium) อาหารชนิดนี้พัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยความรู้พื้นฐานทางสรีรวิทยาของแมลง และองค์ประกอบพื้นฐานของเลือดแมลง และใช้ซีรัมของสัตว์มีกระดูกสันหลังแทนเลือดของแมลง เติมโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) เพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์แมลงและไวรัสโรคแมลง การพัฒนาสูตรอาหารเริ่มจาก Hink (1970) ได้พัฒนาสูตรอาหาร TNM-FH จากสูตรอาหารพื้นฐานของเกรซ โดยเสริมด้วยแลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate) และยีสโตเลท (yeastolate) อย่างละ 3.3 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งวิตามินบีรวม นอกจากนี้ยังเสริมด้วยซีรัม 10% (10% fetal bovine serum,FBS) แทนเลือดแมลง นอกจากนี้ยังมีสูตรอาหารที่ใช้สูตรอาหารของเกรซเป็นพื้นฐาน ได้แก่ TC-100 หรือ BML-TC/10 (Gardiner และ Stockdale, 1975) เป็นสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เพียงชนิดเดียว คือ กลูโคส (glucose) ไม่เติมกรดอินทรีย์ แต่เติม FBS และ tryptose extract (Cameron และคณะ, 1989) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่นิยมใช้กันอีกชนิดหนึ่งคือ IPL-41 (Weiss และคณะ, 1981) ซึ่งพัฒนามาจากสูตรอาหารเริ่มต้นคือ IPL (Goodwin, 1991) เมื่อเทียบสูตรอาหาร IPL-41 กับอาหารของเกรซ พบว่า IPL-41 มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) ชนิดต่างๆ วิตามิน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น การเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Grace's medium, IPL-41, และ TC-100 ดังตารางที่ 2.4

2.2 อาหารที่ไม่เติมซีรัม (serum-free medium) ปัจจุบันอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีทั้งที่เติมซีรัมปริมาณน้อยและไม่เติมซีรัม อาหารที่ไม่เติมซีรัมซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงได้แก่ Mitsuhashi and Maramorosch's MM medium ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.5 (Mitsuhashi, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง (O'Reilly และคณะ, 1992)

ส่วนประกอบ	Grace's (มก. / ลิตร)	IPL-41 (มก. / ลิตร)	TC-100 (มก. / ลิตร)
Inorganic salts			
$CaCl_2$ (anhyd)	750.00	500.00	996.49
$CoCl_2.6H_2O$		0.05	
$CuCl_2.2H_2O$		0.20	
$FeSO_4.7H_2O$		0.55	
KCl	4,100.00	1,200.00	2,870.00
$MgCl_2.6H_2O$	2,280.00		
$MgCl_2$			1,067.95
$MgSO_4.7H_2O$	2,780.00		
$MgSO_4$		918.00	1,357.67
$MnCl_2.4H_2O$		0.02	
NaCl		2,850.00	500.00
$NaHCO_3$	350.00	350.00	
$NaH_2PO_4.H_2O$	1,013.00	1,160.00	1,008.36
$(NH_4)(Mo_7O_{24}.4H_2O)$		0.04	
$ZnCl_2$		0.04	
Sugars , Other			
D(-)-Fructose	400.00		
Fumaric acid, free acid	55.00	4.40	
D(+)-Glucose	700.00	2,500.00	1,100.00
α-Ketoglutaric acid	370.00	29.60	
L(-)-Malic acid	670.00	53.60	
Maltose		1,000.00	
Succinic acid	60.00	4.80	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	Grace's (มก. / ลิตร)	IPL-41 (มก. / ลิตร)	TC-100 (มก. / ลิตร)
Sucrose	26,680.00	1,650.00	
Amino acids			
β-Alanine	200.00	300.00	
L-Alanine	225.00		225.00
L-Arginine HCl	700.00	800.00	665.11
L-Asparagine	350.00	1,300.00	350.00
L-Aspartic acid	330.00	1,300.00	350.00
L-Cystine	22.00		
L-Cysteine.2Na		119.40	28.68
L-Glutamic acid	600.00	1,500.00	600.00
L-Glutamine	600.00	1,000.00	600.00
Glycine, free base	650.00	200.00	650.00
L-Histidine	2,500.00	200.00	
L-Histidine HCl.H_2O			3,697.89
L-Isoleucine	50.00	750.00	50.00
L-Leucine	75.00	250.00	75.00
L-Lysine.HCl	625.00	700.00	625.00
L-Methionine	50.00	1,000.00	50.00
L-Phenylalanine	150.00	1,000.00	150.00
L-Proline	350.00	500.00	350.00
Hydroxy-L-Proline		800.00	
DL-Serine	1,100.00	400.00	
L-Serine			550.00
L-Threonine	175.00	200.00	175.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	Grace's (มก. / ลิตร)	IPL-41 (มก. / ลิตร)	TC-100 (มก. / ลิตร)
L-Tryptophan	100.00	100.00	100.00
L-Tyrosine	50.00		
L-Tyrosine.2Na.2H_2O		360.40	72.08
L-Valine	100.00	500.00	100.00
Vitamins			
p-Aminobenzoic acid	0.02	0.32	0.02
Biotin	0.01	0.16	0.01
D-Ca pantothenate	0.02	0.008	0.11
Choline chloride	0.20	20.00	
Folic acid	0.02	0.08	0.02
Isoinositol	0.02	0.40	0.02
Niacin	0.02	0.16	0.02
Pyridoxine HCl	0.02	0.40	0.02
Riboflavin	0.02	0.08	0.02
Thiamine.HCl	0.02	0.08	0.52
Vitamin B_{12}		0.24	0.01
Undefined Ingredients			
Tryptose			2,000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของอาหารชนิด Mitsuhashi and Maramorosch's MM medium (Mitsuhashi, 1994)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / 100 มล.)	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มก. / 100 มล.)
NaCl	700.00	$CaCl_2.2H_2O$	20.00
$NaH_2PO_4.H_2O$	20.00	D-Glucose	400.00
$NaHCO_3$	12.00	Lactalbumin hydrolysate	650.00
KCl	20.00	TC-Yeastolate	500.00
$MgCl_2.6H_2O$	10.00	Fetal bovine serum	0-20 มล.

Note: pH: 6.5, Osmolarity: 413 mOsm/kg.

นอกจากนี้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่ไม่เติมซีรัมซึ่งเตรียมได้ง่ายอีกชนิดหนึ่งคือ ISFM (Inlow และคณะ, 1989) โดยเติมยีสโตเลท (yeastolate) และไขมันลงในอาหาร IPL-41 ซึ่งไขมันที่ใช้ประกอบด้วย cholesterol, α-tocopherol acetate, cod liver oil, fatty acid methyl ester โดยมี Tween 80 และ Pluronic F-68 เป็น emulsifying agent สารแขวนลอยไขมันดังกล่าวมีจำหน่ายในรูปการค้าเช่น Inserum I (J.R.H. Bioscience), chemical defined lipid concentrate (CDLC) (GIBCO) เป็นต้น

ปัจจุบันอาหารที่ไม่เติมซีรัมมีจำหน่ายหลายชนิด ได้แก่ Ex-Cell 400, Ex-Cell 401, Sf 900, และ Sf 900 II เป็นต้น อาหารเหล่านี้เป็นอาหารที่ปราศจากโปรตีนหรือมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนเพียงเล็กน้อย โดยมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร IPL-41 สำหรับอาหารเกรซได้มีการดัดแปลงเพื่อใช้เป็นอาหารที่ไม่เติมซีรัมเช่นกัน โดยทำการเติม Pluronic F-68 และ low-protein lipid supplement (Ex-Cyte VLE) ลงในอาหารเกรซซึ่งเสริมด้วยแลคทาลบูมินไฮโดรไลเสท และ ยีสโตเลท อาหารชนิดนี้คือ SFM-LP (สุดาวรรณ, 2543)

3. การเจริญของเซลล์แมลง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสามารถกระทำได้ 2 แบบได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) และการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย (suspension culture) โดยใช้ภาชนะเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน กรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเป็นขวดแก้วหรือขวดพลาสติกก็ได้ แต่ต้องมีพื้นผิวเพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อการเจริญและการเกาะติดของเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ซม.^{2} และ 75 ซม.^{2} ปริมาตรของอาหารที่ใช้กับขวดเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4-6 มล. และ 15 มล. ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยในปริมาณที่ไม่มากนัก เช่น 50-500 มล. นั้น ส่วนใหญ่ใช้ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlermeyer flask) โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ปรับความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 135-150 rpm นอกจากนี้นิยมเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยใช้ขวดแก้วที่มีใบพายพร้อมแท่งแม่เหล็ก เรียกขวดเพาะเลี้ยงชนิดนี้ว่า spinner flask ซึ่งต้องใช้ควบคู่กับเครื่องกวนสารที่ควบคุมความเร็วรอบได้ (stirring platform) สำหรับความเร็วรอบที่ใช้กับ spinner flask เท่ากับ 90-100 rpm ซึ่งในแต่ละสภาวะจะต้องทำการควบคุมปัจจัยให้เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์แมลงแต่ละชนิด สำหรับเซลล์ไลน์ของแมลงในกลุ่มผีเสื้อต้องบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-30°ซ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์แมลง เช่น Mitsuhashi (1982) รายงานถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของ *Papilio xuthus* (NIAS-PX-58), *Mamestra brassicae* (NIAS-MB-32) และ *Aedes albopictus* (NIAS-AeAl) เท่ากับ 25°ซ ส่วน Vaughn (1976) ใช้อุณหภูมิ 26°ซ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ *Spodoptera frugiperda* (IPLB 21 และ IPLB-1254) ส่วน Hara และคณะ (1995) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ *Spodoptera exigua* (*Se*3FH) ที่อุณหภูมิ 27°ซ แต่ Gelernter และ Federici (1986) สามารถสร้างเซลล์ไลน์ *Spodoptera exigua* (UCR-SE-1) และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ จากการรายงานของ Hink และ Strauss (1976) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แมลงในกลุ่มผีเสื้อเท่ากับ 28-30°ซ ส่วนสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าของ osmolarity ของอาหารเพาะเลี้ยงนั้นมีผลน้อยมากต่อการอยู่รอดของเซลล์และการจำลองตัวเองของไวรัสโรคแมลง แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แมลงอยู่ในช่วง pH 6.0-6.7 และค่า osmolarity เท่ากับ 290-360 mOsm/kg (Goodman และ McIntosh, 1994) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเซลล์แมลงแต่ละชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของ *Spodoptera frugiperda* ซึ่ง O'Reilly และคณะ (1992) รายงานไว้ คือต้องปรับค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.2 และค่า osmolarity เท่ากับ 350 mOsm/kg ส่วน Lee และ Hua (1996) เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ชนิด PX-1187 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับค่า pH เท่ากับ 6.4 จึงจะเจริญได้ดี

4. นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus, *Se*MNPV)

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) เป็นไวรัสที่ระบาดตามธรรมชาติในแหล่งปลูกพืชที่มีหนอนกระทู้หอมระบาด ไวรัสชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระทู้หอม ไวรัส*Se*MNPV จัดอยู่ในวงศ์บาคูโลวิริดี้ (Family Baculoviridae) และสกุล (genus) นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus) อนุภาคของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส มี 2 รูปแบบ ได้แก่ อนุภาคไวรัสอิสระ (budded virion, BV หรือ extracellular virion, ECV) และอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน (polyhedra-derived virion, PDV หรือ occluded virion, OV) (Vialard และคณะ, 1995) ลักษณะที่สำคัญของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส คือ อนุภาคของไวรัสหรือนิวคลีโอแคปสิด (nucleocapsid) มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod-shaped) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิคชนิด ดี เอ็น เอ สายคู่ ลักษณะเป็นวงกลม (circular double-stranded DNA) (Caballero และคณะ, 1992) นิวคลีโอแคปสิดถูกห่อหุ้มด้วยผนังซึ่งเป็นลิโพโปรตีน 3 ชั้น (triple layered lipoprotein) วิริออนของ *Se*MNPV ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดเป็นกลุ่ม 3-5 อันใน 1 อนุภาค จึงจัดเป็น multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus (MNPV) ขนาดของผลึกโปรตีนมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 640-1,050 นาโนเมตร (Hungspruke, 1981; Gelernter และ Federici, 1986)

5. การเพิ่มปริมาณไวรัสในแมลงอาศัย (*in vivo*)

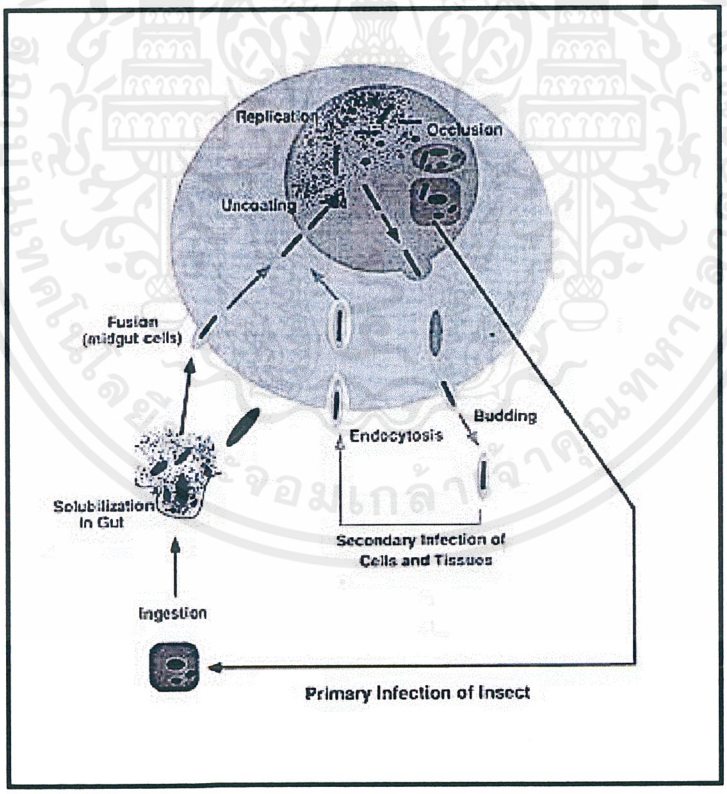
นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสทำให้เกิดโรคในแมลงได้โดยแมลงกินอาหารที่มีไวรัสในรูปผลึกโปรตีน (occlusion bodies, OBs)ปนเปื้อนอยู่เข้าไป Obs จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของแมลง (midgut) ซึ่งมีสภาพเป็นด่างสูงมาก (pH=10-12) อนุภาคไวรัส PDV จะถูกปลดปล่อยออกมาจากผลึก และสามารถทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (midgut epithelial cells) ติดเชื้อได้ดีกว่าเนื้อเยื่อชนิดอื่น (Volkman และ Summers, 1977) หลังจากที่ PDV จับกับผิวเซลล์ (binding) PDV จะเข้าไปในเซลล์โดยการเชื่อมรวม (fusion) ระหว่าง envelope กับเยื่อหุ้มเซลล์แบบ directed plasma membrane fusion เมื่อ PDV ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารติดเชื้อแล้ว จะมีการจำลองตัวเอง (replication) ของดีเอ็นเอเพื่อสร้าง progeny ของไวรัสขึ้นมาใหม่ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) อนุภาคของไวรัสที่แตกหน่อ (budding) ออกจากเซลล์จะเข้าทำลายเซลล์อื่นๆต่อไป โดยเข้าไปในระบบเลือด (hemocoel) เพื่อเข้าไปทำลายเม็ดเลือด เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อ ระบบหายใจ และผนังลำตัว เป็นต้น เมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อมีปริมาณผลึกโปรตีนมากจนอัดแน่นในนิวเคลียส เซลล์เหล่านั้นจะแตกและหนอนตาย ผลึกโปรตีนจะออกจากตัวแมลงแพร่กระจายไปในสภาพแวดล้อม พร้อมที่จะเข้าไปในตัวแมลงตัวใหม่ต่อไป เป็นไปตามวงจรชีวิตของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในภาพที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

6. การเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง (*in vitro*)

การเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง กระทำโดยใช้ ECV เป็น inoculum ซึ่ง ECV ได้จากเลือดของแมลงที่ติดเชื้อ (infectious hemolyph) และ ECV เข้าสู่เซลล์โดยวิธี adsorptive endocytosis โดยใช้โครงสร้างที่เรียกว่า peplomer จับกับตัวรับ (receptor) บนเยื่อหุ้มเซลล์แมลง (Volkman, 1986) ปล่อยให้นิวคลีโอแคปสิดเข้าสู่เซลล์ และทิ้งส่วน envelope ไว้ด้านนอก จากนั้นไวรัสจะเพิ่มปริมาณในนิวเคลียสของเซลล์ สำหรับช่วงแรกของการเข้าทำลาย ไวรัสจะสร้าง ECV ออกสู่ภายนอกเซลล์จำนวนมากเพื่อให้ ECV เข้าทำลายเซลล์อื่นๆต่อไป หลังจากนั้นไวรัสจะสร้างโปรตีนโพลีฮีดริน (polyhedrin) มาห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (virion) ที่อยู่ภายในนิวเคลียส และมี polyhedral calyx ซึ่งมีส่วนประกอบพวกน้ำตาลและฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) มาห่อหุ้มเป็นผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์อยู่ภายในนิวเคลียส และจะถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์เมื่อเซลล์แตก



ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของบาคูโลไวรัส (baculovirus) (Vialard และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
39889

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.1 เซลล์แมลงและไวรัส

3.1.1 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* cell line, SE-1)

312 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารชนิดเกรซ (Grace's medium)

3.2.2. ซีรัม (fetal bovine serum)

3.2.3 ยีสโตเลท (yeastolate)

3.2.4 แลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate)

3.2.5 พลูโรนิค เอฟ-68 (Pluronic F-68)

3.2.6 1 N NaOH

3.2.7 1 N HCl

3.2.8 70% เอทานอล (ethanol)

3.2.9 0.5%โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodiumdodecylsulphate, SDS)

3.2.10 0.5 M NaCl

3.2.11 0.25%ทริปแพนบลู (trypan blue)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติค ขนาด 25 ซม^2

3.3.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล.

3.3.3 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 28° ซ

3.3.4 กล้องจุลทรรศน์ inverted

3.3.5 กล้องจุลทรรศน์ compound

3.3.6 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)

3.3.7 ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5, 10 และ 25 มล.

3.3.8 เครื่องดูดสารแบบอัตโนมัติ (pipette boy)

3.3.9 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.3.10 ปิเปตต์ ทิป (pipette tip)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.11 เครื่องขูดเซลล์ (rubber policeman)

3.3.12 เครื่องเขย่า (shaker)

3.3.13 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

3.3.14 หลอดทดลองขนาด 10 มล.

3.3.15 หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มล. (1.5-ml Microcentrifuge tube)

3.3.16 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar flow cabinet)

3.3.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.3.18 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave)

3.3.19 เครื่องอบชนิดลมร้อน (hot air oven)

3.3.20 ชุดกรองที่ประกอบด้วยแผ่นเมมเบรนซึ่งมีขนาดช่องผ่าน 0.22 และ 0.45 ไมครอน

3.3.21 ขวดแก้วสำหรับใส่สาร ขนาด 50, 100, 500 มล. และ 1 ลิตร

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเกรซ นำเกรซชนิดผงละลายในน้ำกลั่นที่ทำการปลอดเชื้อแล้วในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำการกรองด้วยชุดกรองที่มีเมมเบรนขนาด 0.45 และ 0.22 ไมครอน แบ่งอาหารที่กรองแล้ว 500 มล.ใส่ขวดขนาด 1 ลิตร จำนวน 2 ขวด กรองส่วนผสมต่อไปนี้ เจนตาไมซิน (2มล./อาหาร 500 มล) 1X ยีสโตเลท (10 มล./อาหาร 500 มล.) 1X แลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (10 มล./อาหาร 500 มล.) ซีรัม (fetal bovine serum, FBS) 10% กรองส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นด้วยชุดกรองที่มีเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นผสมลงในอาหารแต่ละขวดที่เตรียมไว้ ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ 1N NaOH หรือ 1N HCl ที่ทำการปลอดเชื้อแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงคือ pH=6.2 เก็บรักษาอาหารที่เตรียมทั้งหมดไว้ในอุณหภูมิ 4 °ซ

3.4.2 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

ทำการเพิ่มปริมาณของเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นขวดพลาสติคขนาด 25 ซม^2 โดยทำการปลูก (seed) เซลล์ SE-1 จำนวน 2 x 10^5 เซลล์/มล. ปริมาตรทั้งหมด 5 มล./1 ขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 10 ขวด อาหารที่ใช้คือ เกรซ เสริมด้วย 10% FBS และเติม 0.1% พลูโรนิค เอฟ-68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำขวดเพาะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 28° ซ เป็นเวลา 6 วัน สังเกตเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการถ่ายเซลล์ต่อไป

การถ่ายเซลล์ (subculture หรือ passage) ในกรณีที่เพาะเลี้ยงแบบ monolayer ต้องทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ โดยใช้ปิเปตต์ดูดพ่นให้กระแทกบริเวณพื้นผิวที่มีเซลล์เกาะอยู่ หลังจากที่เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะแล้ว ควรตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อินเวอร์ตเตท ทำการดูดเซลล์แขวนลอยใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 0.4 มล.และเติมสีสำหรับย้อมเซลล์คือ 0.25% ทริปแพนบลู (trypan blue) ปริมาตร 0.1 มล.ลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเซลล์จากหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ใส่ลงที่ด้านข้างของฮีโมไซโตมิเตอร์ 1 ด้าน ซึ่งมี cover slip ปิดอยู่ ทำการนับจำนวนเซลล์บนฮีโมไซโตมิเตอร์ จำนวน 5 ช่องใหญ่ (primary squares) รวมนับทั้งหมด 5 ช่องใหญ่ การนับจะใช้เครื่องกดนับ (hand counter) โดยนับทั้งเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสี) และเซลล์ตาย (ติดสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน) ดังแสดงในภาพที่ 3.1

3.4.3 การคำนวณจำนวนเซลล์

นับจำนวนเซลล์จากช่องใหญ่ (primary square) 5 ช่องบนฮีโมไซโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.2 และคำนวณหาจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล. ดังนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล. = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต x 10^4 x แฟคเตอร์ความเจือจาง

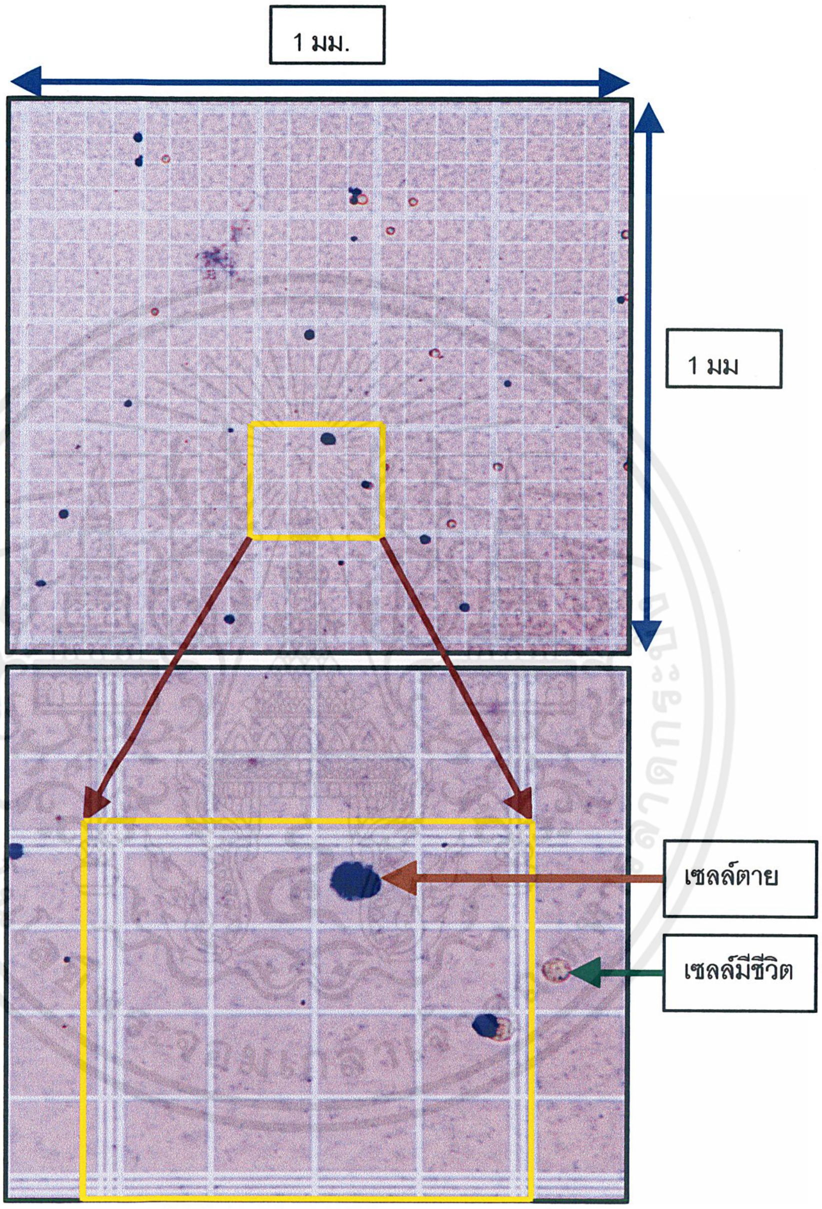
3.4.4 การเตรียมนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus)

3.4.4.1 เตรียมเซลล์ไลน์ SE-1 โดยการปลูกเซลล์จำนวน 2 x 10^5 เซลล์/มล. ปริมาตร ทั้งหมด 5 มล.ขวดเพาะเลี้ยง จำนวน 3 ขวด จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 1 คืน

3.4.4.2 ดูดอาหารเดิมออก และเติมไวรัสในรูปของ Extracelluar virus (ECV) 1 มล. ซึ่งทราบค่าปริมาณไวรัส (virus titer) จากการคำนวณหาค่า $TCID_{50}$ ตามวิธีการของ Karber (Akoury, 1995) ซึ่งทดลองโดยใช้ไมโครไตเตอร์ เพลท (microtiter plate) ก่อนที่จะนำ ECV ไปเพาะเชื้อ (inoculate) ลงในเซลล์สำหรับการทดลองต่อไปนั้น จะต้องทำการปรับค่าของ MOI (multiplicity of infection) ให้เท่ากับ 1 หมายความว่าเติมไวรัส 1 อนุภาค (particle) ต่อเซลล์ 1 เซลล์ (PFU/cell) โดยคำนวณจากสูตรต่อไปนี้ (Summer and Smith, 1988)

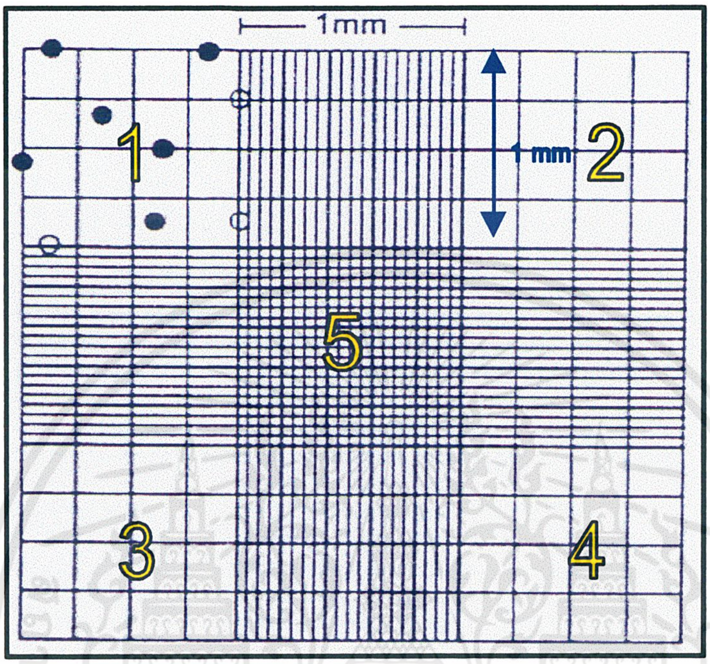
ปริมาตรของ inoculum (มล.) = ปริมาณไวรัสที่ใช้ต่อเซลล์ (MOI) x จำนวนเซลล์ / ไวรัสไตเตอร์ (PFU/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะ 1 ช่องใหญ่ (primary square) บนฮีโมไซโตมิเตอร์และเซลล์แมลงที่ย้อมสีทริปแพนบลู เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ตายติดสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของช่องใหญ่ (primary square)ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ 5 ช่อง และสัญญลักษณ์เซลล์ที่เป็นวงกลมสีดำจะทำการนับ ส่วนวงกลมสีขาวจะไม่นับ

3.4.4.3 วางขวดเพาะเลี้ยงที่ปลูกเชื้อแล้วบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำสุด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดไวรัสออกทั้งหมด และเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มล.ต่อ 1 ขวด และเก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจะทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตไวรัส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.4.4 การเก็บเกี่ยวไวรัส (ภาพที่ 3.3) ทำการขูดเซลล์โดยใช้อาหารเดิม จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จำนวนเซลล์ตาย จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายซึ่งติดเชื้อ ดูดส่วนของเซลล์และอาหารเดิมใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 10 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ซึ่งส่วนนี้มีไวรัสในรูปของ ECV เป็น infectious medium ทำการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมครอน และเก็บในอุณหภูมิ –20° ซ เพื่อนำไปทดสอบค่า $TCID_{50}$ ต่อไป สำหรับตะกอนเซลล์ (pellet) นำมาทำให้เซลล์แตก โดยวิธีการของ O'Reilly และคณะ (1992) ดังนี้

นำตะกอนเซลล์ (pellet) ที่ได้จากการทำให้ติดเชื้อ

↓

ทำให้แขวนลอยโดยใช้ 0.5% SDS 1 มล.ต่อ ตะกอนเซลล์ที่ได้จาก 1 ฟลาสก์
ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

↓

ทำการปั่นแยกที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓

ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งและเติม 0.5 M NaCl 1 มล.ทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอย

↓

ทำการปั่นแยกที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓

ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ทำการปลอดเชื้อแล้ว 1 มล.
ทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยและนับจำนวนผลึกโปรตีนโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์

↓

บันทึกผลจำนวนผลึกโปรตีนเพื่อคำนวณค่า
จำนวนผลึกโปรตีน/มล. และจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์

ภาพที่ 3.3 แผนภูมิแสดงวิธีการเก็บเกี่ยวผลึกโปรตีนของ *Se*MNPV จากนิวเคลียสของ SE-1 (O'Reilly และคณะ, 1992)

3.4.5 คำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์ (virus titer) และจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *Se*NPV ผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยวไวรัสดังกล่าวข้างต้นได้แก่ ส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) คือส่วนของไวรัสในรูปแบบที่เรียกว่า extracellular virus (ECV) และส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ (pellet) ซึ่งมีเซลล์ที่ติดเชื้อจะมีผลึกโปรตีน ซึ่งเรียกว่า occlussion bodies (OBs) อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.1 การคำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์

การคำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์ในที่นี้ใช้วิธีการหาค่า end-point dilution รายละเอียดดังภาพที่ 3.4 โดยการใช้ ECV ในระดับความเจือจางต่างๆกัน และปลูกเชื้อลงในแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท โดยปลูกไวรัส 1 ค่าความเจือจางต่อ 1 คอลัมน์ บ่มเชื้อนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28° ซ ทำการตรวจผลการติดเชื้อในแต่ละหลุมทุกค่าความเจือจาง ถ้าพบว่าหลุมใดมีเซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทราบได้จากการมีผลึกโปรตีนอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์แมลง จะบันทึกเป็นบวก (+) สำหรับหลุมนั้น แต่ถ้าหลุมใดไม่ติดเชื้อจะบันทึกเป็นลบ (-) นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของไวรัสที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อ 50% (50% tissue-culture infective dose) และค่าไวรัสไตเตอร์มีค่าเท่ากับ 10^x $TCID_{50}$ /มล. หรือมีค่าเท่ากับ 0.69 x 10^x PFU/มล. (PFU = Plaque-forming unit)

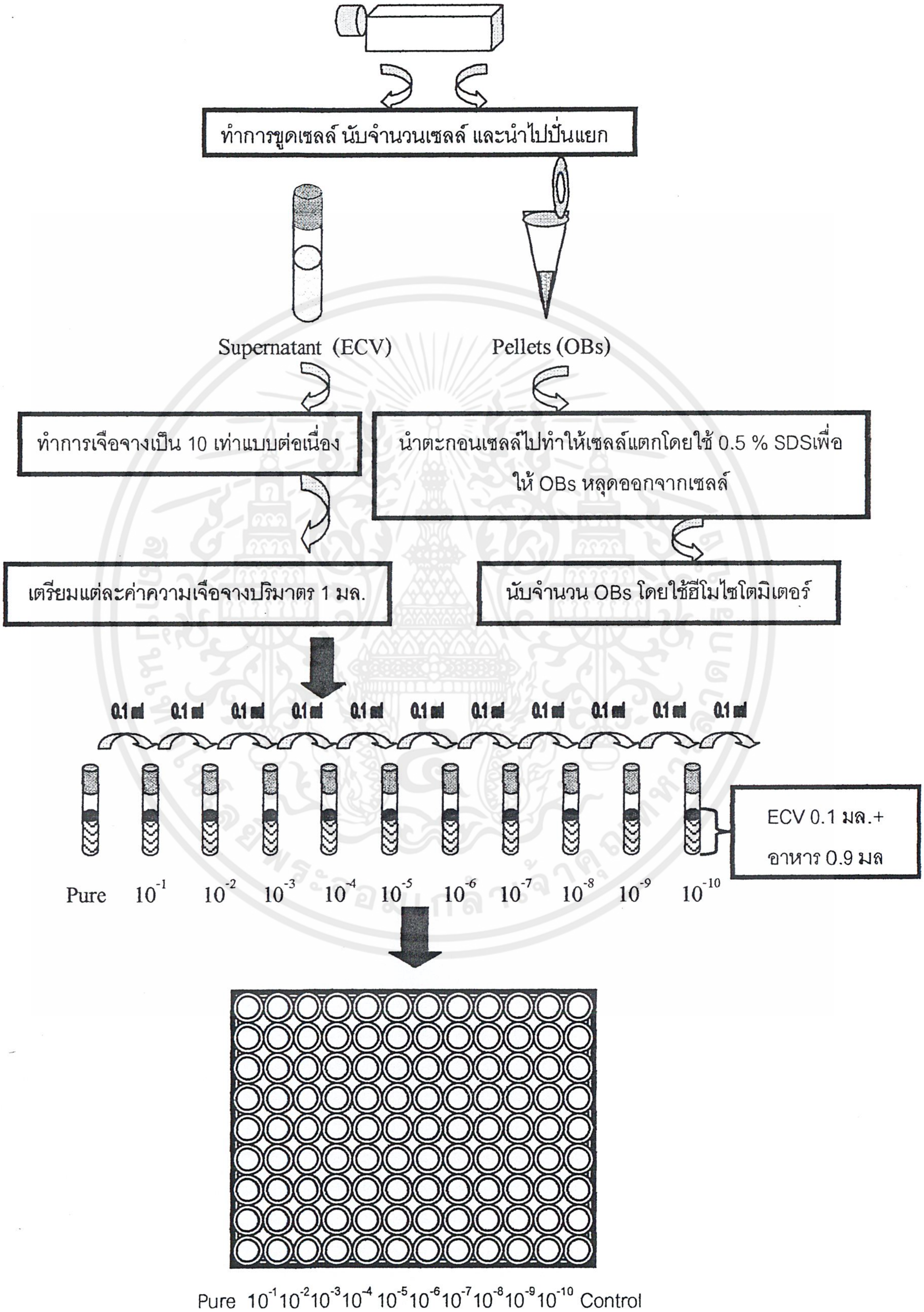
ขั้นตอนการหาค่าไวรัสไตเตอร์

1. นำส่วนของ ECV มาทำการเจือจาง 10 เท่าแบบต่อเนื่อง ได้แก่ Pure 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} 10^{-10} ตามลำดับ

2. ปลูกเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมลงในจานเพาะเลี้ยงพลาสติคที่มี 96 หลุม (96-well plate) โดยปลูกเซลล์จำนวน $2x10^5$ เซลล์/มล. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม และเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 1 คืน

3. ปลูกเชื้อที่ทำการเจือจางไว้ ลงในแต่ละคอลัมน์ (column) โดยเรียงจากไวรัสที่มีค่าความเจือจางน้อยที่สุด ไปยังไวรัสที่มีค่าความเจือจางมากที่สุดตามลำดับ ปริมาตรของไวรัสเท่ากับ 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม จากนั้นนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการติดเชื้อไวรัสโดยสังเกตผลึกโปรตีนที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลง ถ้าพบเซลล์ที่มีผลึกโปรตีนในหลุมใด จะบันทึกผลเป็นบวก (+) แต่ถ้าไม่พบจะบันทึกเป็นลบ (-) ในหลุมนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.4 แผนภาพแสดงวิธีการหาค่า end-point dilution และจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างวิธีการคำนวณค่าไวรัสไตเตอร์

ตัวอย่างผลการทดลองหาค่า end-point dilution ดังตารางต่อไปนี้

+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	
+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	
+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	
pure	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	control

บันทึกผลในตารางดังนี้

ความเจือจาง	หลุมที่ติดเชื้อ	หลุมที่ไม่ติดเชื้อ
10^{-4}	8	0
10^{-5}	6	2
10^{-6}	2	6
10^{-7}	1	7
10^{-8}	0	8

ความเจือจาง	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	%ติดเชื้อ
10^{-4}	17	0	100.00
10^{-5}	9	2	81.81
10^{-6}	3	8	27.27
10^{-7}	1	15	6.25
10^{-8}	0	23	0.00

ในกรณีนี้ระดับความเจือจางที่ให้ผลการติดเชื้อ 50%นั้นควรอยู่ระหว่าง 10^{-5} กับ 10^{-6} ความเจือจางที่จะให้ผลการติดเชื้อ 50%สามารถคำนวณโดย linear interpolation ระหว่างอัตราการทำให้ติดเชื้อ (infection rates) ซึ่งสังเกตได้จากค่าความเจือจางในตาราง

ก่อนอื่นต้องคำนวณหาค่า Proportionate distance (PD) ของ การตอบสนอง 50% (50% response) จากค่าที่มีการตอบสนองมากกว่า 50% ซึ่งคำนวณได้จากสูตร ต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$PD = (A-50) / (A-B)$$

PD = Proportionate distance

A = % การตอบสนองมากกว่า 50 % (% response above 50 %) = 81.81

B = % การตอบสนองต่ำกว่า 50 % (% response below 50 %) = 27.27

แทนค่า

PD = (81.81-50) / (81.81-27.27)

= 0.583

Dose ที่ทำให้เกิดการตอบสนองหรือทำให้ติดเชื้อ 50 % ($TCID_{50}$) คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Log } TCID_{50} = \text{log ของค่าความเจือจางที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อมากกว่า 50 \%} - PD$$

แทนค่า Log $TCID_{50}$ = -5 –0.583

= -5.583

$TCID_{50} = 10^{-5.583}$

สามารถเขียนในรูปของไวรัสไตเตอร์ดังนี้ 3.83×10^{5} $TCID_{50}$ / 10 ไมโครลิตร เนื่องปลูกเชื้อ 10 ไมโครลิตร/หลุม ต้องทำให้เป็นค่า $TCID_{50}$ /มล ต้องใช้ 100 คูณตลอด จะได้ผลลัพท์ดังนี้

$$3.83 \times 10^{7}\ TCID_{50}\text{/มล.}$$

จากค่า $TCID_{50}$ /มล. สามารถทำให้เป็นค่า PFU/มล. (Plaque-forming units/ml) ได้จากสูตรต่อไปนี้

$$PFU = TCID_{50} \times \mu$$

μ = 0.69

ดังนั้น

$$PFU = 3.83 \times 10^{7}\ TCID_{50} \times 0.69$$

Plaque-forming units (PFU) = 2.64×10^{7} PFU/ มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.2 การนับจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส

นำผลึกโปรตีนที่ได้จากการทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อแตกแล้ว มานับจำนวนโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound กำลังขยาย 400X ขั้นตอนการนับดังต่อไปนี้

1. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดผลึกโปรตีนที่แขวนลอยน้ำกลั่นออกมาปริมาตร 0.1 มล./1 หลอด ใช้ทั้งหมด 2 หลอด ต่อการนับแต่ละครั้ง ในกรณีที่มีผลึกโปรตีนปริมาณมาก จะต้องทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น ก่อนทำการนับต้องทำให้ผลึกโปรตีนแขวนลอย

2. ดูดผลึกโปรตีนที่แขวนลอยใส่ลงในแอ่งทั้งสองของฮีโมไซโตมิเตอร์ 1 หลอดตัวอย่างต่อ 1 แอ่ง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ผลึกโปรตีนตกลงสู่ระนาบล่างของฮีโมไซโตมิเตอร์

3. นับจำนวนผลึกไวรัสแอ่งละ 5 ช่องใหญ่ (primary squares) บันทึกจำนวนผลึกโปรตีน เพื่อทำการคำนวณ จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส/ มล. และจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ ดังนี้

จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัสต่อมล. = ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนที่นับได้ x 10^4 x ค่าความเจือจาง

$$\text{จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัสต่อเซลล์} = \frac{\text{จำนวนผลึกโปรตีนของไวรัสต่อมล.}}{\text{จำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อต่อมล.}}$$

3.4.6 การทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus)

1. เตรียมปลูกเซลล์ SE-1 จำนวน 18 ขวดเพาะเลี้ยง ขนาด 25 ซม ^{2} โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2 x 10 ^{5}เซลล์ต่อ มล. ปริมาตร 5 มล. ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 3.5

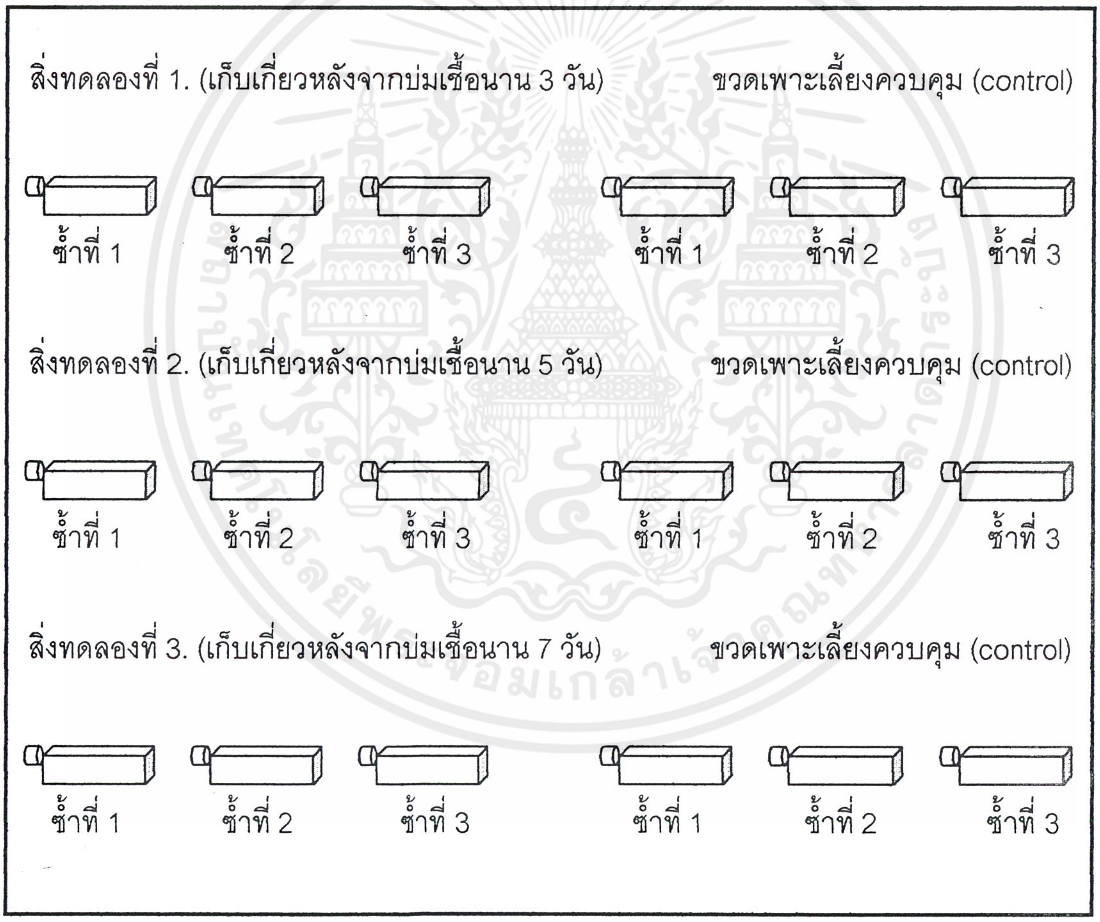
2. นำขวดเพาะเลี้ยงในข้อ 1. บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 28 $^\circ$ ซ เป็นเวลา 1 คืน

3. ดูดอาหารเดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากนั้นเติม *Se*MNPV ในรูปของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัสอิสระ (ECV) ซึ่งปรับค่า MOI = 1 โดยเติมปริมาตร 1 มล ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง และนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำสุด เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูด ECV ออกไปและเติมอาหารใหม่ 5 มล. ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ส่วนขวดควบคุมนั้นหลังจากดูดอาหารเดิมออกไปแล้ว จะต้องเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มล. ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง นำสิ่งทดลองทั้งหมดเก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 ° ซ

4. เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการบ่มนาน 3 5 และ 7 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์และไวรัส เพื่อคำนวณหาค่า จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย เซลล์มีชีวิตที่ติดเชื้อ และเซลล์ตายที่ติดเชื้อ ส่วนไวรัสเมื่อทำการเก็บเกี่ยวแล้ว จะทำการคำนวณหาค่าต่างๆ ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการทดลองในข้อ 3.4



ภาพที่ 3.5 แผนภาพแสดงการเตรียมสิ่งทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) เพื่อปลูกเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (SeMNPV) โดยปลูกเซลล์จำนวน $2x10^5$ เซลล์/มล ปริมาตรเซลล์แขวนลอยทั้งหมด 5 มล. เพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) สำหรับไวรัสที่ใช้อยู่ในรูปของไวรัสอิสระ (extracellular virus, ECV) passage ที่ 3 และค่า MOI=1 ทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 28 $^\circ$ ซ ต่อมาทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ และลักษณะของเซลล์ในสิ่งทดลองทั้งหมดแสดงในภาพที่ 4.1-4.3 ส่วนรายละเอียดผลการทดลองมีดังนี้

1. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. จำนวนเซลล์ตาย/มล. และเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. จำนวนเซลล์ตาย/มล. และเปอร์เซ็นต์เซลล์ ที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล. (x 10^5)	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตายต่อมล. (x 10^5)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1.	4.63 [c] [1/]	1.36 [d]	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	4.18 [c]	1.49 [d]	14.51 [c]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2.	7.38 [b]	2.16 [c]	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	2.75 [d]	2.53 [c]	49.63 [a]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3.	8.35 [a]	3.23 [b]	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	2.06 [d]	3.94 [a]	34.99 [b]

[1/] ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

1.1 จากการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล. ระหว่างสิ่งทดลองทั้งหมด ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรวน (coefficient of variation, C.V.) เท่ากับ 8.68 % จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple-range test ผลการวิเคราะห์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.1.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล. ระหว่างสิ่งทดลองที่เป็นกลุ่มของเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1 2 และ 3 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.เท่ากับ 4.63×10^{5} 7.38×10^{5} และ 8.35×10^{5} เซลล์/มล. ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นเวลา 8 วัน จะมีจำนวนเซลล์มีชีวิตมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงนาน 6 และ 4 วัน ตามลำดับ

1.1.2 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ระหว่าง กลุ่มสิ่งทดลองที่เก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังผ่านการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ซึ่งค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต เท่ากับ 4.18×10^{5} 2.75×10^{5} และ 2.06×10^{5} ตามลำดับ ผลที่ได้คือผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. มากกว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 และ 7 วัน โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อ 5 และ 7 วันนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

1.1.3 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล ระหว่างกลุ่มของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ กับกลุ่มของเซลล์ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสและเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ 1. เท่ากับ 4.63×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 4 วัน) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.18×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 4 วัน)

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ 2. เท่ากับ 7.38×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 6 วัน) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.75×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 6 วัน)

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปกติ 3. เท่ากับ 8.35 x 10 ^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 8 วัน) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล.ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.06 x 10 ^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 8 วัน)

1.2 ผลการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ระหว่างสิ่งทดลองทั้งหมด (ตารางที่ 4.1) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ระหว่างสิ่งทดลองทั้งหมด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเท่ากับ 12.91% นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. โดยวิธี Duncan's new multiple range test ผลการวิเคราะห์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1.2.1 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1. (1.36 x 10 ^{5} เซลล์/มล.) เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2. (2.16 x 10 ^{5} เซลล์/มล.) และเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3. (3.23 x 10 ^{5} เซลล์/มล.) นั้น มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ระดับความเป็นไปได้ .05) โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตายในสิ่งทดลองที่เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3. (เซลล์มีอายุ 8 วัน) มีการตายมากที่สุด รองลงมาคือ เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2. (เซลล์มีอายุ 6 วัน) และเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1. (เซลล์มีอายุ 5 วัน) ตามลำดับ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์นาน 8 วัน ช่วงนี้จำนวนเซลล์มีมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยง 1. และ 2. นอกจากนี้ยังไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่ใส่ลงไปแทนที่ ทำให้สารอาหารถูกใช้ไปเพื่อการเจริญและการแบ่งเซลล์ปริมาณมาก ดังนั้นช่วงนี้สารอาหารในภาชนะเพาะเลี้ยงจึงมีไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมมีปริมาณมากในช่วงนี้ด้วย ซึ่งของเสียที่เกิดขึ้นนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง จึงทำให้เซลล์ตายจำนวนมาก

1.2.2 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตายต่อมล. ระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่เก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ซึ่งได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ดังนี้ 1.49 x 10 ^{5} เซลล์/มล. 2.53 x 10 ^{5} เซลล์/มล. และ 3.94 x 10 ^{5} เซลล์/มล. ตามลำดับ พบว่าค่าดังกล่าวข้างต้นมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) แสดงว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ในสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (เซลล์มีอายุ 8 วัน) มีจำนวนเซลล์ที่ตายมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 และ 3 วัน ตามลำดับ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนาน 8 วัน จะมีจำนวนเซลล์มาก การใช้สารอาหารมากขึ้น ดังนั้นสารอาหารที่เหลือจึงไม่เพียงพอต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญและการแบ่งเซลล์ เซลล์จึงมีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม เมื่อเซลล์ติดเชื้อจะอ่อนแอจึงทำให้เซลล์แตกและตายง่ายกว่าเซลล์ปกติที่แข็งแรงมากกว่า สำหรับสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน พบจำนวนเซลล์ตายมากกว่า สิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน เพราะช่วงที่ทำการบ่มเชื้อนาน 5 วัน เซลล์มีอายุ 6 วัน จำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นในระยะนี้มีจำนวนมากกว่าและจำนวนไวรัสที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วันจะมีปริมาณมากกว่าการบ่มเชื้อนาน 3 วัน จึงทำให้เซลล์มีโอกาสติดเชื้อไวรัสได้ดีกว่า เมื่อเซลล์ติดเชื้อจะอ่อนแอและตายง่าย ดังนั้นกลุ่มที่ทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน จึงมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ตาย/มล. มากกว่ากลุ่มที่ทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน

1.2.3 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล ระหว่างกลุ่มของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ กับกลุ่มของเซลล์ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสและเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ 1. เท่ากับ 1.36×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 4 วัน) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล.ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.49×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 4 วัน)

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ 2. เท่ากับ 2.16×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 6 วัน) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล.ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.53×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 6 วัน)

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล.ของกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงปกติ 3. เท่ากับ 3.23×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 8 วัน) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ระดับความเป็นไปได้ .05) กับค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตาย/มล. ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.94×10^{5} เซลล์/มล. (เซลล์มีอายุ 8 วัน)

1.3 ผลการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ผลที่ได้คือมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ที่ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อของสิ่งทดลองทั้งหมด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 15.01% จากนั้นทำการตรวจสอบความแตกต่างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ/มล. โดยวิธี Duncan's new multiple range test ดังรายละเอียดต่อไปนี้

- ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ ระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (14.51%) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อในกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (49.63%) และ 7 วัน (34.99%)

- จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (49.63%) กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อของสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (34.99%) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ระดับความเป็นไปได้ .05) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน มีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อทำการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (เซลล์มีอายุ 8 วัน) เป็นช่วงที่มีความหนาแน่นของเซลล์มาก สารอาหารถูกใช้ไปในการเจริญและการแบ่งเซลล์จำนวนมากตามไปด้วย จึงทำให้เหลือสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ของเสียที่เกิดจากกระบานการเมแทบอลิซึมมีปริมาณมาก ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสและเซลล์แตกง่ายกว่าเซลล์ในสิ่งทดลองซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (เซลล์มีอายุ 6 วัน) ดังนั้นเมื่อทำการเก็บเกี่ยวจึงทำให้พบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อน้อยกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อซึ่งเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน

2. การเปรียบเทียบผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

2.1 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อมล. ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2 ซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อมล. มีค่าเท่ากับ 1.78×10^{5} ผลึก/มล. 79.50×10^{5} ผลึก/มล. และ 76.67×10^{5} ผลึก/มล. ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ของสิ่งทดลองทั้งหมด จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/มล. โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies)	
	ต่อมล. ($x10^5$)	ต่อเซลล์
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	1.78^{b} [1/]	2.22^{b}
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	79.50^{a}	30.90^{a}
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	76.67^{a}	35.85^{a}

[1/] ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2.1.1 ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (1.78×10^5 ผลึก/มล.) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ ผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (79.50×10^5 ผลึก/มล.) และ 7 วัน (76.67×10^5 ผลึก/มล.) โดยจำนวนผลึกโปรตีนที่ได้มีจำนวนน้อยที่สุด ทั้งนี้เพราะช่วงการบ่มเชื้อ 3 วัน จำนวนเซลล์และจำนวนไวรัสน้อยกว่าสิ่งทดลองที่ทำการบ่มเชื้อนาน 5 และ 7 วัน โอกาสติดเชื้อจึงมีน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงได้จำนวนผลึกโปรตีนน้อย

2.1.2 ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (79.50×10^5 ผลึก/มล.) ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (76.67×10^5 ผลึก/มล.) ดังนั้นถ้าต้องการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีนของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม สามารถเก็บผลผลิตได้ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน หรือ 7 วัน

2.2 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์ ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน (ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์เท่ากับ 2.22×10^5 30.90×10^5 และ 35.85×10^5 ผลึก/เซลล์ ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างสิ่งทดลองทั้งหมด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเท่ากับ 18.18% เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

2.2.1 จำนวนผลึกโปรตีนนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.22×10^5 ผลึก/เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (30.90×10^5 ผลึก/เซลล์) และ 7 วัน (35.85×10^5 ผลึก/เซลล์) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

2.2.2 สำหรับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ระหว่างผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 30.90×10^5 ผลึก/เซลล์ และ 7 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35.85×10^5 ผลึก/เซลล์ ผลที่ได้คือไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีน สามารถกระทำได้ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน หรือ 7 วัน

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (virus titer, pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) (ภาพที่ 4.4-4.8)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (virus titer, pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1)

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ($\times 10^6$)
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	0.73 [b] [1/]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	19.50 [a]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	19.20 [a]

[1/] ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

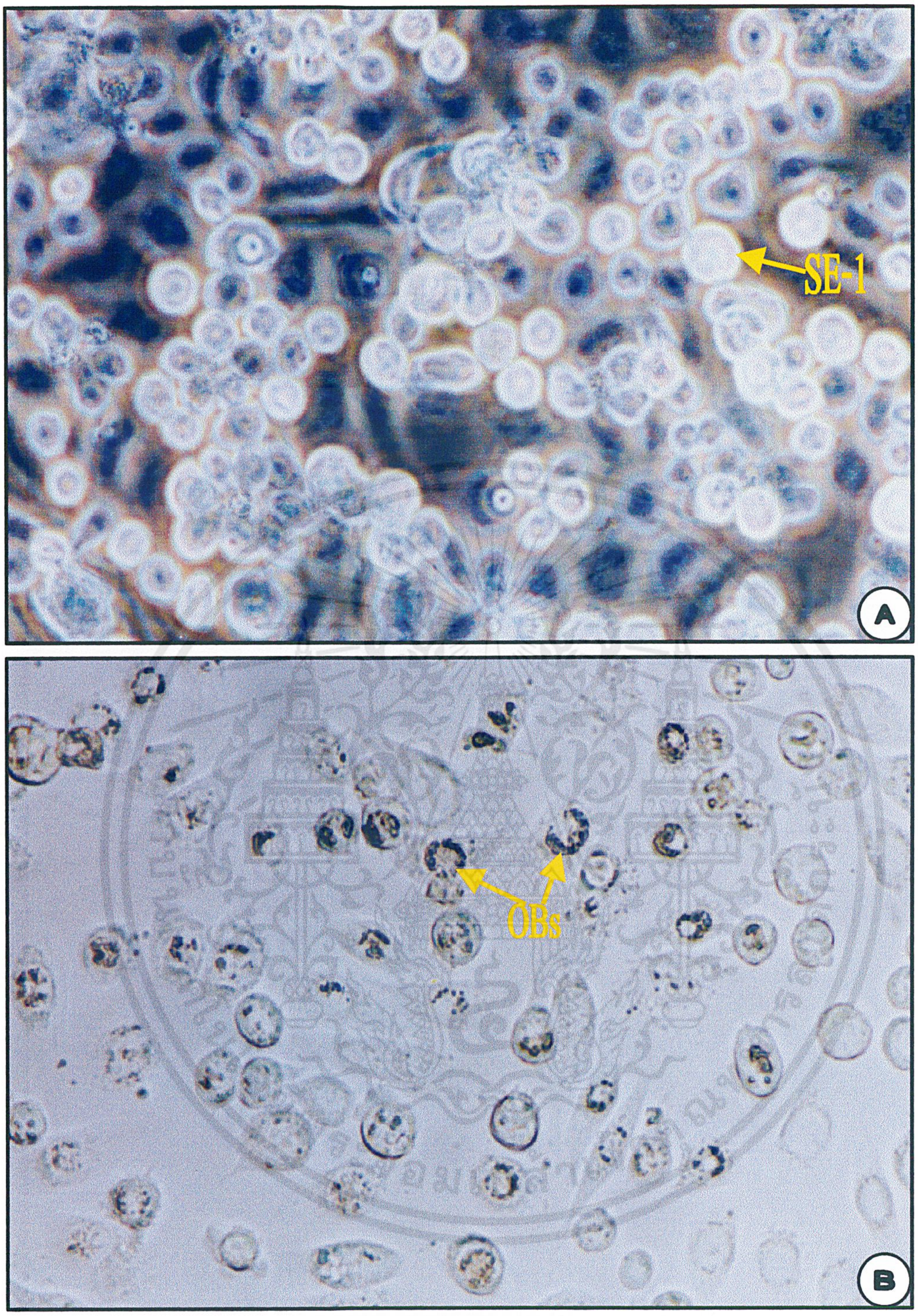
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.73 x 10^{6}) 5 วัน (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.50 x 10^{6}) และ 7 วัน (มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.20 x 10^{6}) ผลที่ได้คือไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของสิ่งทดลองทั้งหมด จากนั้นทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

3.1 ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (0.73x10^{6} pfu/ml) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (19.50 x 10^{6} pfu/ml) และ ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (19.20 x 10^{6} pfu/ml) โดยมีค่าไวรัสไตเตอร์น้อยที่สุด

3.2 จากการผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (19.50 x 10^{6} pfu/ml) กับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ซึ่งได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (19.20 x 10^{6} pfu/ml) ผลที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างผลผลิตทั้ง 2 สิ่งทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงว่าถ้าต้องการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งอยู่ในรูปไวรัสอิสระ (extracellular virus, ECV) สามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่อทำการบ่มเชื้อนาน 5 วัน หรือ 7 วัน ซึ่งจะได้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกัน

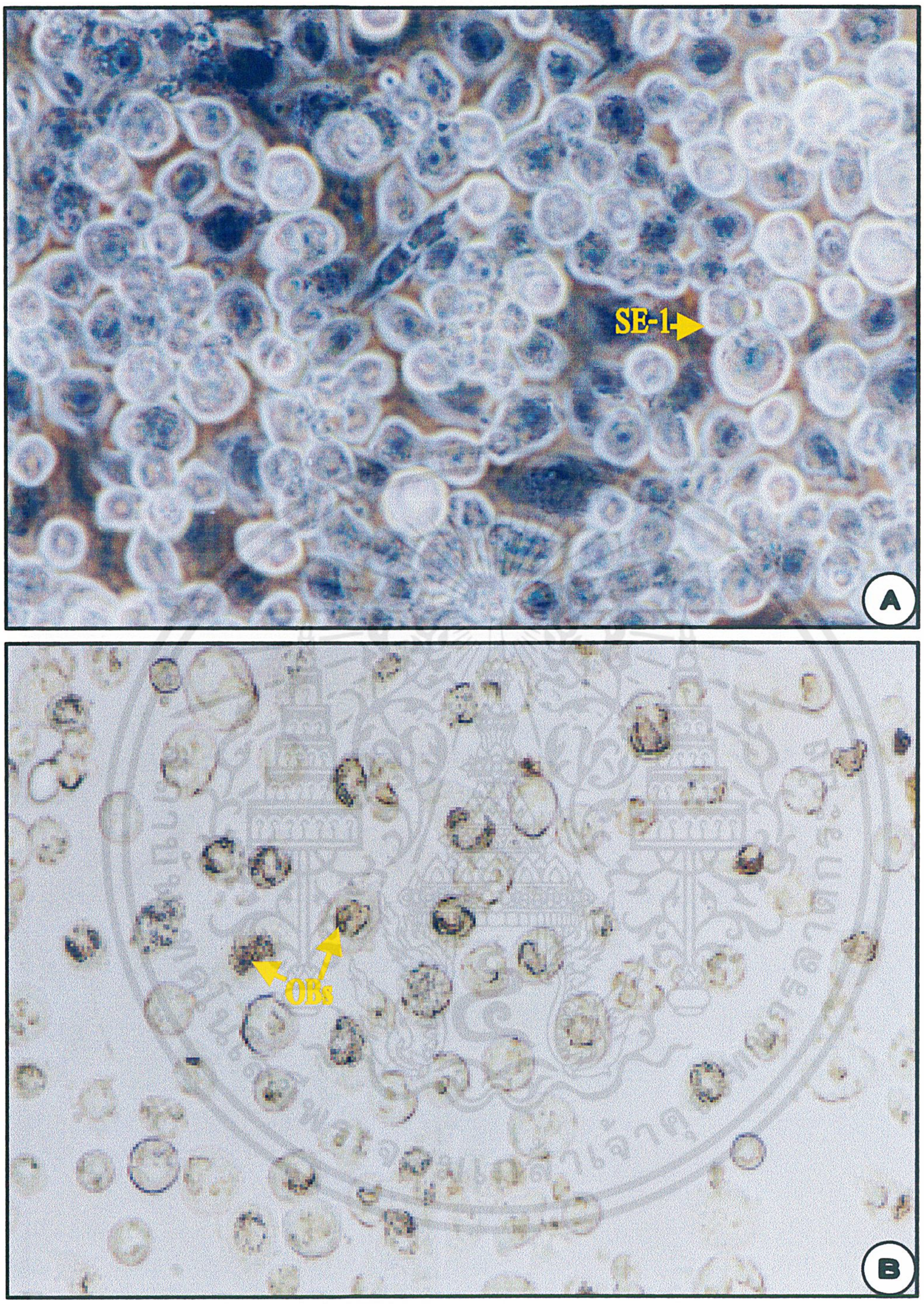
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 4 วัน (กำลังขยาย 400 X)

(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 3 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X)

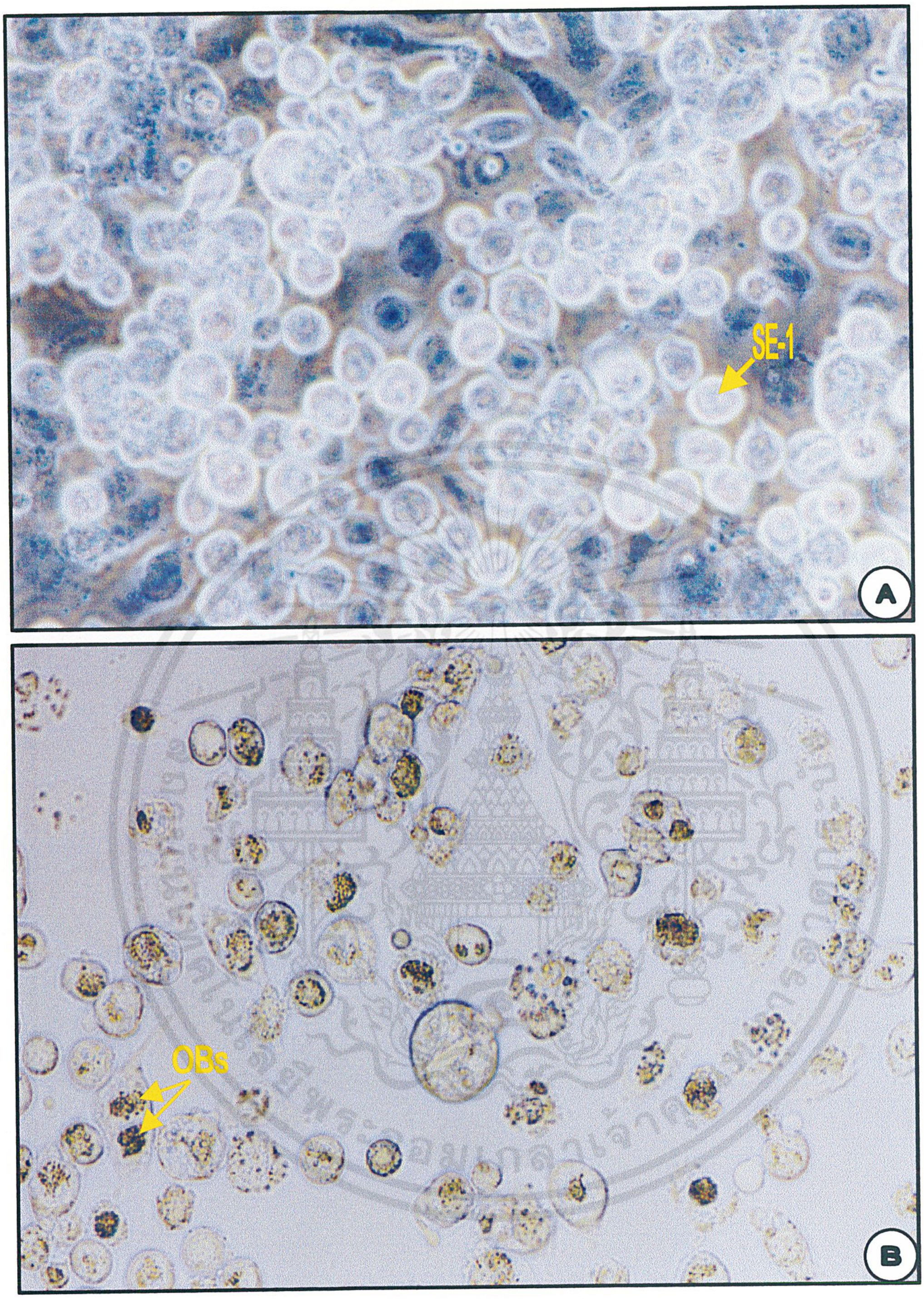
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 6 วัน (กำลังขยาย 400 X)

(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 5 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X)

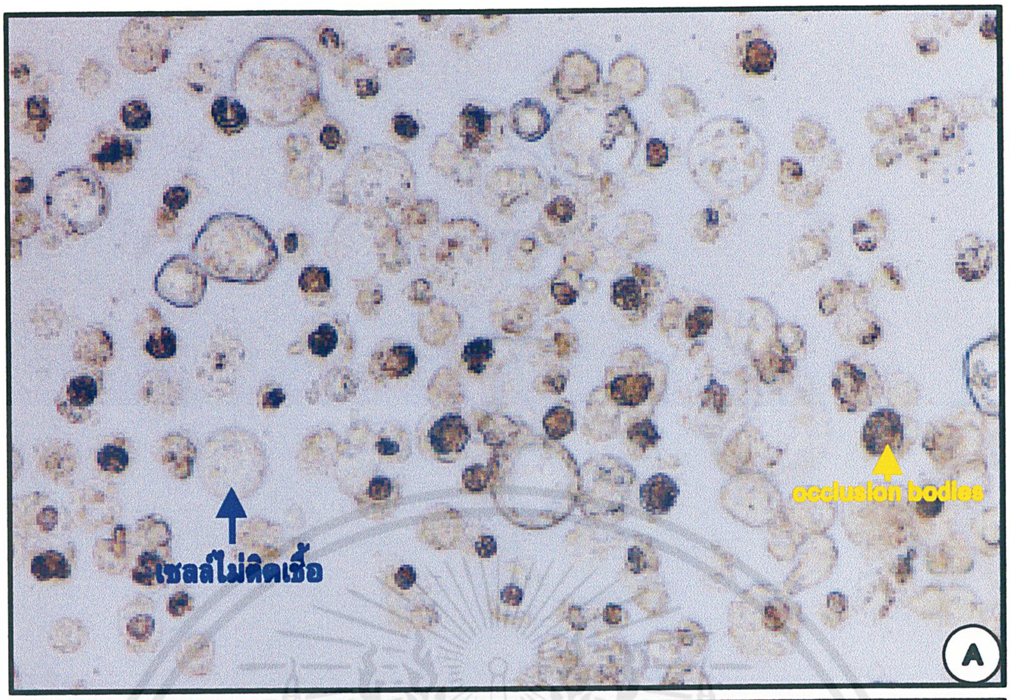
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

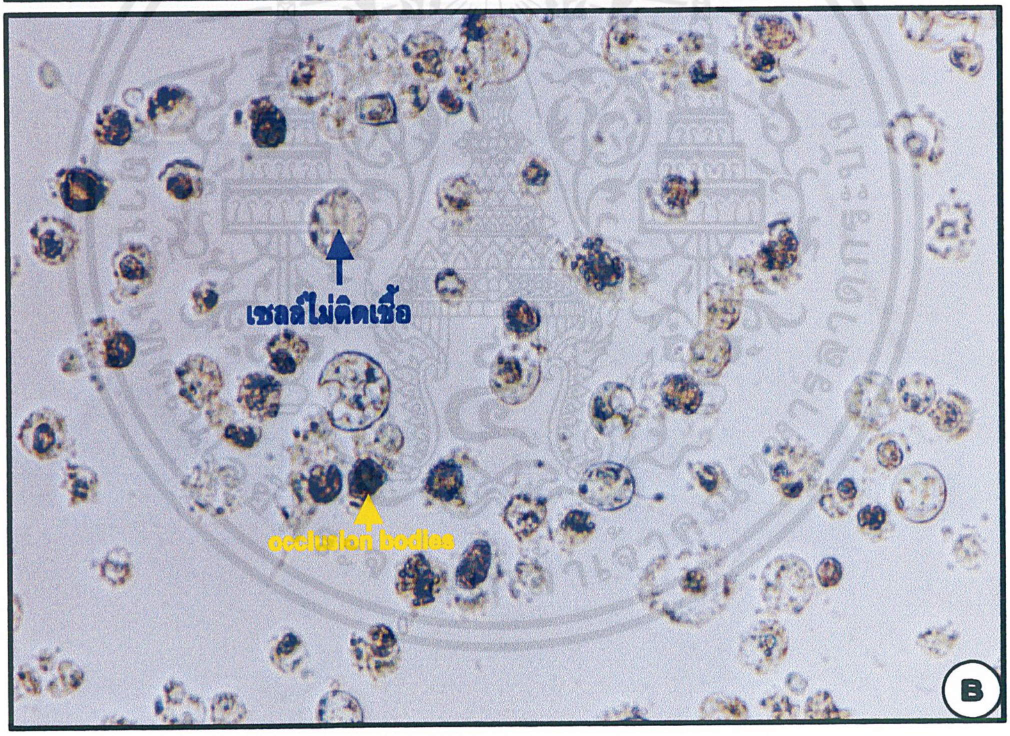


ภาพที่ 4.3 (A.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 8 วัน (กำลังขยาย 400X)

(B.) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 7 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



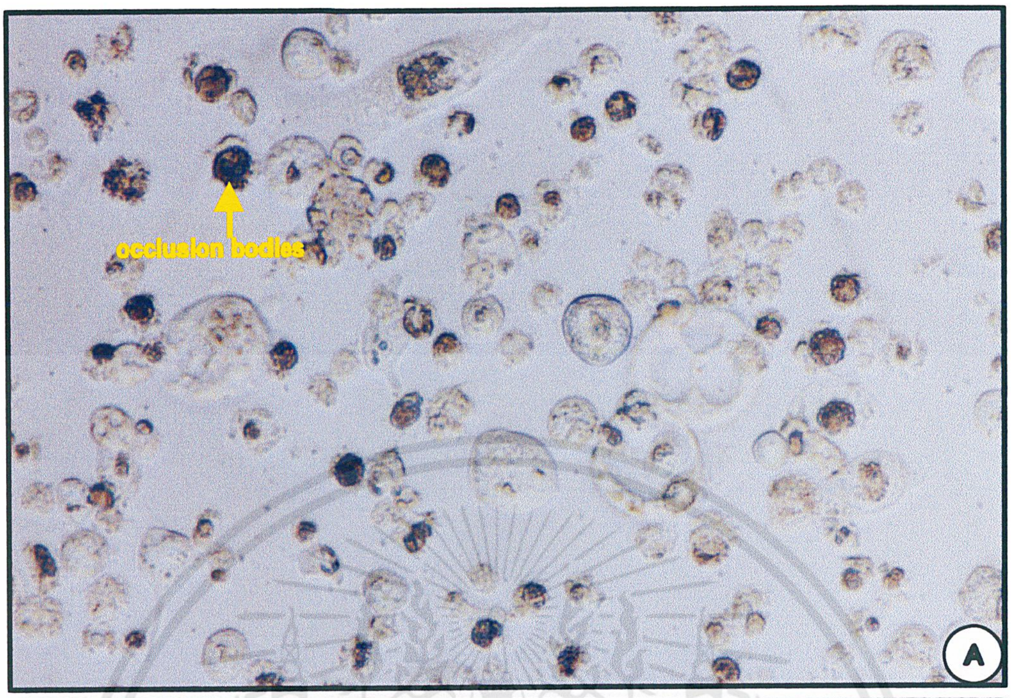


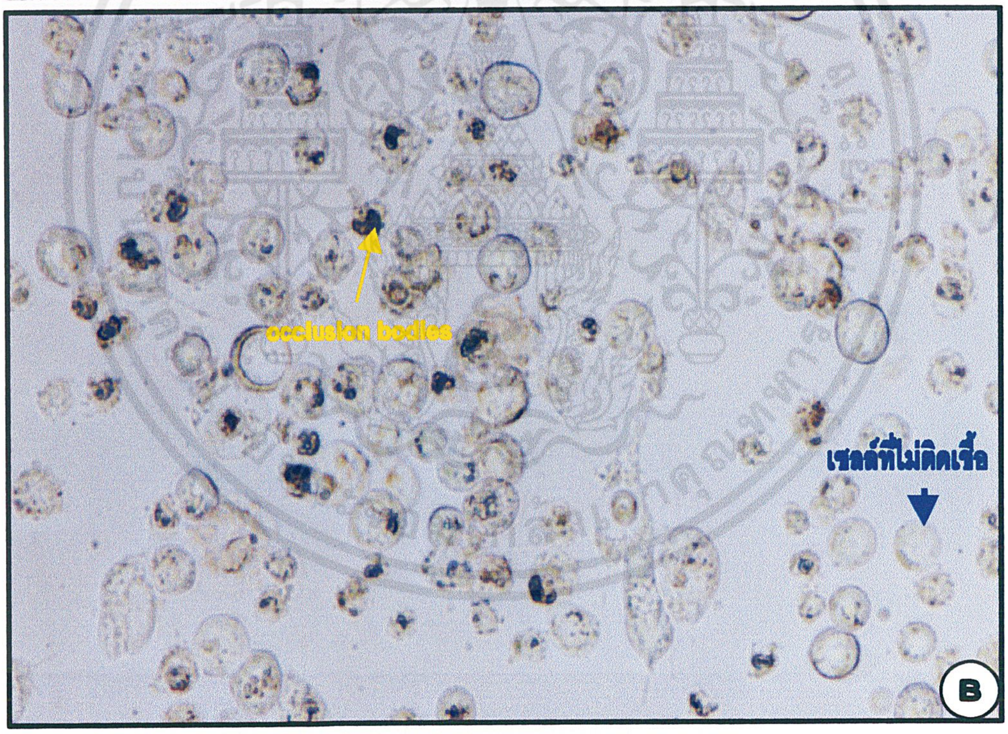
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400X)

(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่มิได้ทำการเจือจาง (pure)

(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-1}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



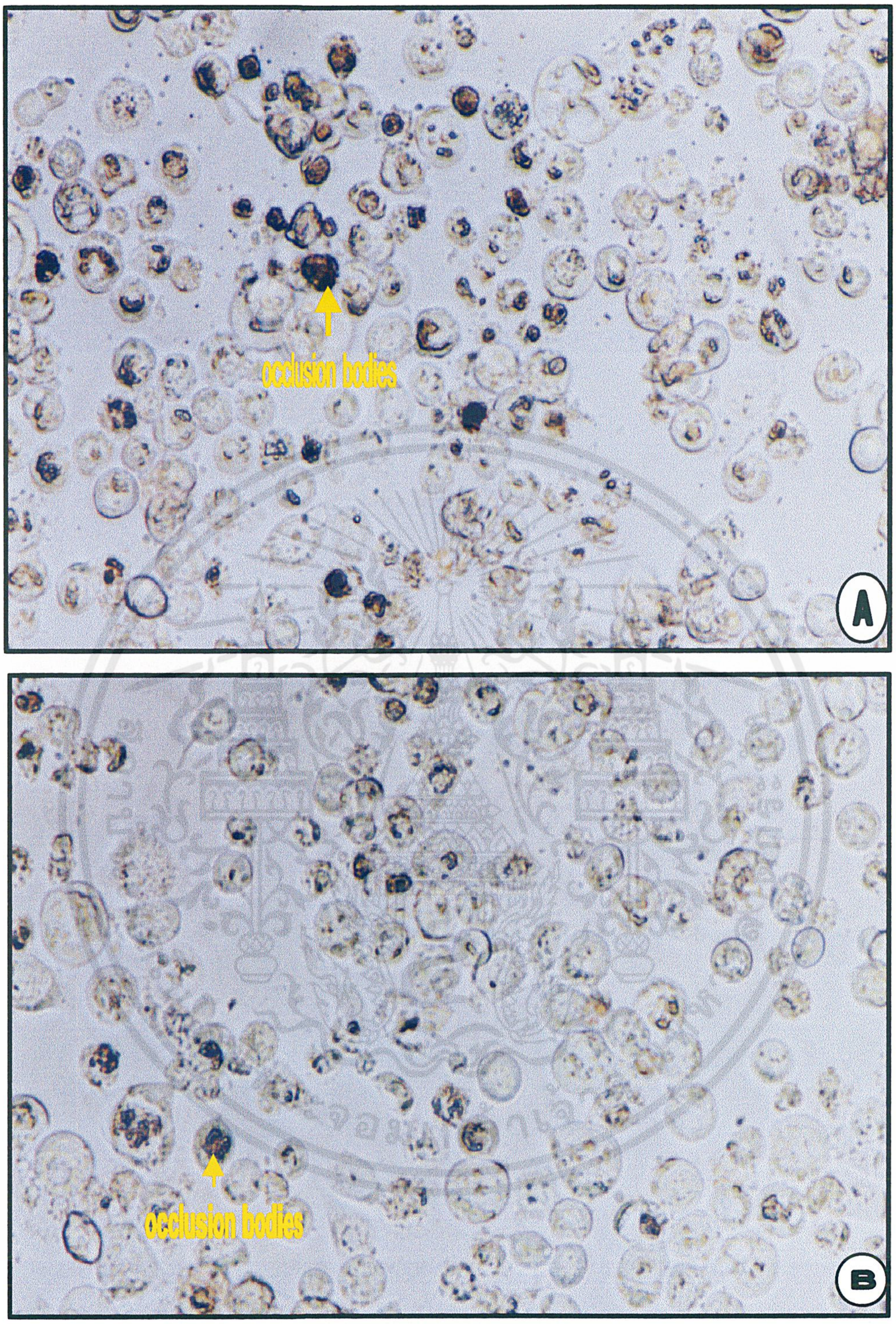


ภาพที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)

(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-2}

(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

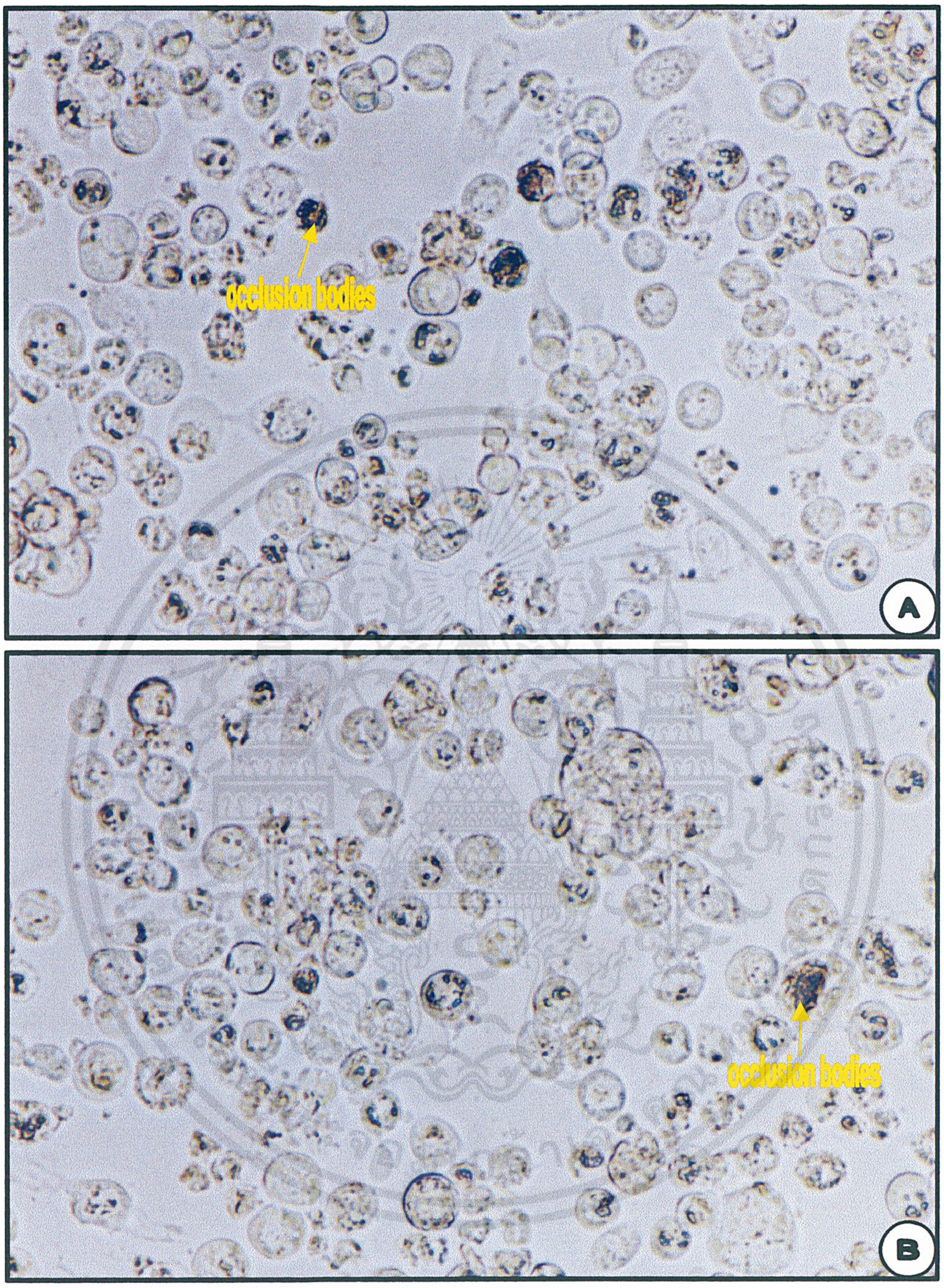


ภาพที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดย ใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)

(A.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-4}

(B.) แสดงเซลล์ SE-1 ซึ่งติดเชื้อ *Se*MNPV ที่ค่าความเจือจาง 10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

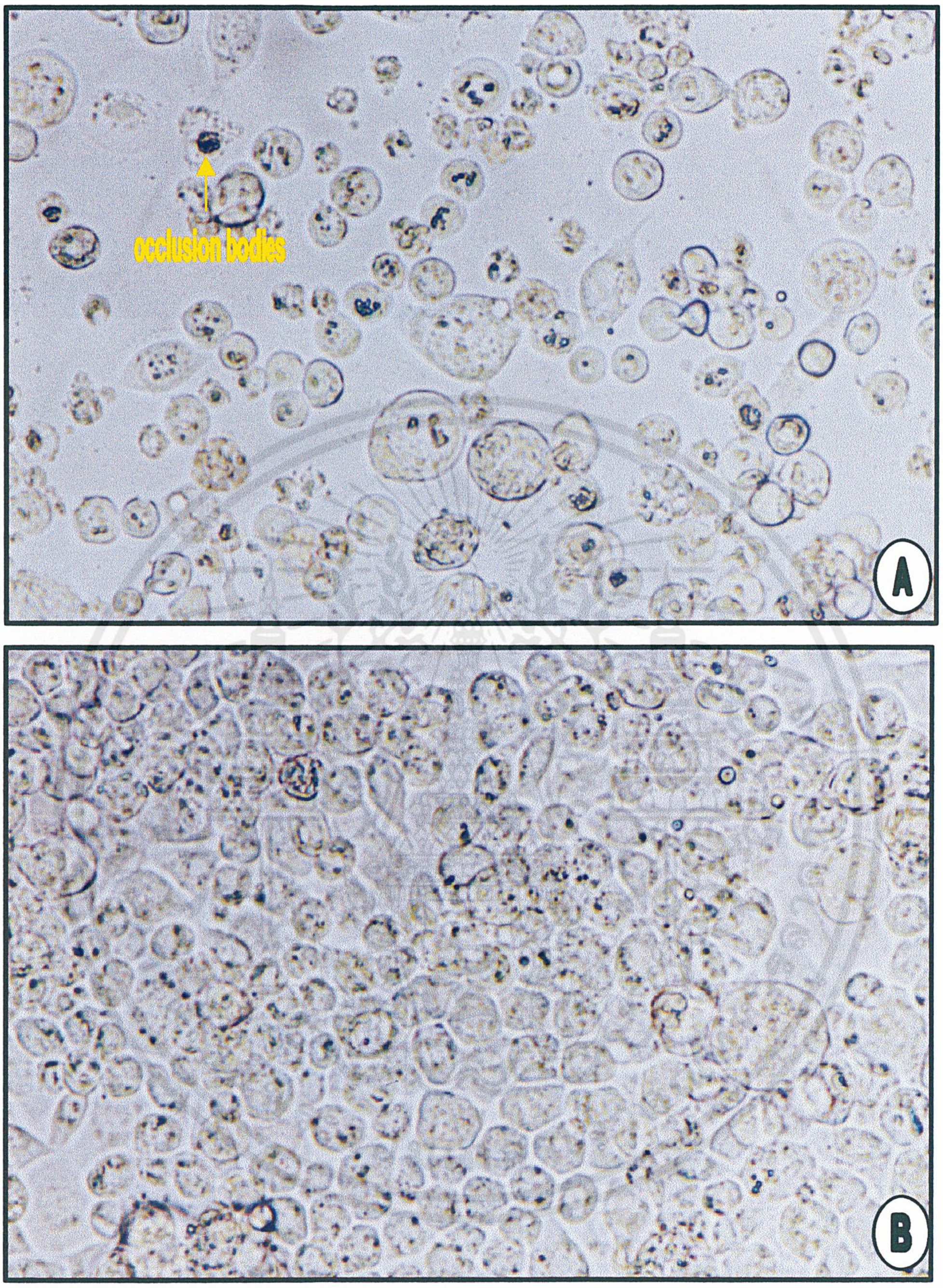


ภาพที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายใน นิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)

(A.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-6}

(B.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-7}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบค่า $TCID_{50}$ ของ *Se*MNPV โดยใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม ลักษณะเซลล์ที่ติดเชื้อจะพบผลึกโปรตีน (occlusion bodies) อยู่ภายในนิวเคลียส (กำลังขยาย 400 X)

(A.) แสดงเซลล์ไลน์ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-8}

(B.) แสดงเซลล์ไลน์ซึ่งไม่ติดเชื้อไวรัสที่ค่าความเจือจาง 10^{-9}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, *Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) โดยทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลาต่างกัน 3 ช่วง คือ 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเก็บเกี่ยวผลผลิตในสิ่งทดลองที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ทำให้ติดเชื้อ *Se*MNPV พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตและจำนวนเซลล์ตายที่นับได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 8 วัน มีจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ทำให้ติดเชื้อ *Se*MNPV นาน 5 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ

2. จากการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ไลน์ SE-1 ที่ทำให้ติดเชื้อ *Se*MNPV พบว่าจำนวนเซลล์มีชีวิตและจำนวนเซลล์ตายที่นับได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน มีจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มเชื้อ *Se*MNPV นาน 5 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ

3. เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์เซลล์ไลน์ SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV ซึ่งเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ

4. สำหรับผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีนของ *Se*MNPV เมื่อทำการเปรียบเทียบ จำนวนผลึกโปรตีน/มล. และจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ พบว่าผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (7.95×10^{6} ผลึก/มล.และ 30.90 ผลึก/เซลล์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (7.667×10^{6} ผลึก/มล. และ 35.85 ผลึก/เซลล์)

5. กรณีของผลผลิตที่เป็นไวรัสอิสระ (extracellular virus) ซึ่งเป็นค่าของไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (7.3×10^{5} pfu/ml) มีค่าน้อยที่สุด ส่วนค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (1.95×10^{7} pfu/ml) กับค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (1.92×10^{7} pfu/ml) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต *Se*MNPV ทั้งผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีนและไวรัสอิสระ ซึ่งปัจจัยที่ควรนำมาศึกษา เช่น ชนิดของอาหาร pH ของอาหาร เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลน์หนอนกระทู้หอมต่าง passage *Se*MNPV ต่าง passage และค่า MOI ของไวรัสที่ใช้ในการเพาะเชื้อ เป็นต้น

2. ควรศึกษาความรุนแรงในการทำให้หนอนกระทู้หอมเกิดโรคเนื่องจากการใช้ผลึกโปรตีนที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงจำนวนผลึกโปรตีนที่จะทำให้หนอนกระทู้หอมวัยต่างๆตายได้ โดยทำการเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการทำให้หนอนกระทู้หอมติดเชื้อและแยกผลึกโปรตีนจากตัวหนอนโดยตรง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สำหรับแผนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย เป็นแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองใช้วิธี Duncan 's new multiple-range test ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (สุรพล, 2528)

1. ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของ CRD

Source of Variation	d.f.	SS	MS	F-ratio
Treatment	t-1	$\frac{T_1^2 + \ldots + T_t^2}{r}$ - C.F.	$\frac{\text{Treatment SS}}{(t-1)} = M_2$	$\frac{M_2}{M_1}$
Error	t(r-1)	Total SS - Treatment SS	$\frac{\text{Error SS}}{t(r-1)} = M_1$	
Total	tr – 1	$\sum$ (each value)^2 - C.F.		

ความหมายของแต่ละเทอมในตารางมีดังนี้

Source of variation = แสดงถึงแหล่งความแปรปรวนที่แยกออกมาวิเคราะห์

d.f. (degree of freedom) = ระดับหรือองศาของความเป็นอิสระ

SS (sum of squres) = ผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย

MS (mean squares) = ผลเฉลี่ยของผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย

$$MS = \frac{SS}{d.f.}$$

(MS นี้เป็นค่าประมาณของความแปรปรวน ในแต่ละแหล่งของความแปรปรวน)

F = ค่า F ที่คำนวณจาก F-test หรืออัตราส่วนของ MS 2 ค่า ในที่นี้ใช้ Treatment MS หารด้วย Error MS

t = จำนวนสิ่งทดลอง

r = จำนวนซ้ำ

Error = ความคลาดเคลื่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนในการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ก. C.F. (correction factor) = ตัวปรับค่าสำหรับผลรวมกำลังสองของข้อมูล เพื่อจะแสดงในรูปผลรวมกำลังสองของค่าเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ย

$$C.F. = \frac{(\text{ผลรวมทั้งหมดในการทดลอง})^2}{\text{จำนวนข้อมูลทั้งหมด}}$$

$$= \frac{(G.T.)^2}{(t)(r)}$$

ข. Sum of squares

Total SS = ผลบวกของ (ข้อมูลของแต่ละหน่วยการทดลอง)^2 - C.F.

$$\text{Treatment SS} = \frac{\text{ผลบวกของ (ผลรวมของแต่ละสิ่งทดลอง)}^2}{\text{จำนวนซ้ำ}} - C.F.$$

$$= \frac{T_1^2 + \ldots + T_t^2}{r} - C.F.$$

Error SS = Total SS - Treatment SS

ค. Mean squares

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{t - 1}$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{t(r - 1)}$$

ง. F-value

$$F = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$$ ซึ่งมี d.f. ตาม d.f. ของตัวตั้งและตัวหาร

จ. เปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้กับค่า F ในตารางที่ d.f. ตัวตั้ง (n_1) และ d.f. ตัวหาร (n_2) โดยใช้ระดับความเป็นไปได้ 2 ระดับ คือ .05 และ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F คำนวณ > $F_{.05}$ จากตาราง ปกติใช้สัญญลักษณ์ * เหนือค่าที่ทดสอบ (significant at .05 level of probability)

F คำนวณ > $F_{.01}$ จากตาราง แสดงโดยใช้สัญญลักษณ์ ** เหนือค่าที่ทดสอบ (significant at .01 level of probability)

F คำนวณ < $F_{.05}$ จากตาราง แสดงโดยใช้ NS (non significant) หรือไม่ต้องใส่เครื่องหมายใด

ฉ. การทดสอบค่า F ของสิ่งทดลอง ถ้าพบว่าค่า F แสดงความแตกต่างทางสถิติ (significance) แสดงว่ามีความแปรปรวนแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองนั้นๆ ซึ่งต้องทำการทดสอบหาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองต่อไป

ช. คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V.) C.V. เป็นค่าแสดงถึงความแปรปรวนที่เกิดขึ้นในการทดลอง ซึ่งไม่สามารถทราบสาเหตุที่แน่นอน ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนนี้มีประโยชน์ในการวางแผนการทดลอง ตลอดจนการประเมินประสิทธิภาพของการทดลอง

C.V. คำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, S) ต่อค่าเฉลี่ย (mean)

$$C.V. = \frac{\text{standard deviation}}{\text{Mean}} \times 100 \%$$

$$= \frac{\sqrt{\text{error mean square}}}{\text{grand mean}} \times 100 \%$$

ซ. วิธีการวิเคราะห์เพื่อวัดความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ในที่นี้ใช้วิธี Duncan' s new multiple range test วิธีการเปรียบเทียบแบ่งเป็นขั้นๆ ดังนี้

1. จัดเรียงค่าเฉลี่ยตามลำดับ เช่น CRD

อันดับที่ (rank)	1	2	3	4
สิ่งทดลอง				
ค่าเฉลี่ย				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ($S_{\bar{y}}$)

$$S_{\bar{y}} = \sqrt{\frac{\text{error mean square}}{n}}$$

n คือจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการหาค่าเฉลี่ย สำหรับ CRD n ก็คือจำนวนซ้ำ

3. คำนวณค่า " least significant ranges " (LSR) สำหรับช่วงการเปรียบเทียบต่างๆ โดยอาศัยตาราง " Significant Studentized Ranges " (SSR) ในหนังสือสถิติทั่วไป ซึ่งอยู่ในรูปแบบดังตัวอย่างต่อไปนี้

error d.f.	Protection level	p = number of means for range being tested				
		2	3	4	5	 20
12	.05	3.08	3.23	3.33	3.36	3.48
	.01	4.32	4.55	4.68	4.76	5.26

p คือ จำนวนของค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ ซึ่งเท่ากับ (ผลต่างของอันดับ + 1)

สูตรสำหรับหาค่า least significant range (LSR)

$$LSR_{\alpha,p} = (SSR_{\alpha,p})(S_{\bar{y}})$$

4. เปรียบเทียบ (ผลต่างของค่าเฉลี่ยสูงสุดกับต่ำสุด) กับค่า LSR ที่ p = (ผลต่างของอันดับ + 1) ถ้าค่าที่ได้มากกว่า แสดงว่าสิ่งทดลองที่ทำการเปรียบเทียบนั้น แตกต่างกันทางสถิติ จากนั้นเปรียบเทียบผลต่างของค่าเฉลี่ยสูงสุดกับค่าเฉลี่ยรองต่ำสุด ในกรณีที่ผลต่างยังมากกว่าค่า LSR ก็ทำเช่นนี้ต่อไปอีก จะหยุดการเปรียบเทียบก็ต่อเมื่อผลต่างนั้นน้อยกว่าค่า LSR ที่เกี่ยวข้อง และสรุปได้ว่าค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่อยู่ในช่วงนั้นไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสูงสุดกับค่าเฉลี่ยอื่นๆหมดแล้ว ให้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรองสูงสุดกับค่าเฉลี่ยอื่นๆโดยวิธีการเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น จากนั้นทำการจัดกลุ่มค่าเฉลี่ยตามความแตกต่าง โดยใช้ตัวอักษรที่เหมือนกันใส่ลงเหนือค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางผนวกที่ 1 ผลของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ SE-1ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรของสิ่งทดลอง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.05)

สิ่งทดลอง	จำนวนเซลล์ SE-1ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ($\times 10^5$)			รวม	เฉลี่ย [1/]
	1	2	3		
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1.	4.38	4.55	4.95	13.88	4.63 [c]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	3.40	4.60	4.53	12.53	4.18 [c]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2.	7.35	7.35	7.45	22.15	7.38 [b]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	2.71	3.05	2.48	8.24	2.75 [d]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3.	8.83	7.93	8.28	25.04	8.35 [a]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	2.40	1.50	2.28	6.18	2.06 [d]
				88.02	4.89

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ SE-1ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	5	94.04	18.81 **
Error	12	2.14	0.18
Total	17	96.18	

C.V. = 8.68 %

$F.05_{(5,12)} = 3.11$ $F.01_{(5,12)} = 5.06$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ผลของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ SE-1ที่ตายต่อมิลลิลิตรของสิ่งทดลอง และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.05)

สิ่งทดลอง	จำนวนเซลล์ SE-1ที่ตายต่อมิลลิลิตร ($\times 10^5$)			รวม	เฉลี่ย [1/]
	1	2	3		
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1.	1.43	1.40	1.25	4.08	1.36 [d]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	1.33	1.73	1.40	4.46	4.18 [d]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2.	2.40	2.07	2.00	6.47	2.16 [c]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	2.35	2.85	2.40	7.60	2.53 [c]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3.	3.15	3.15	3.38	9.68	3.23 [b]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	4.50	4.03	3.28	11.81	3.94 [a]
				44.10	2.45

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเซลล์ SE-1ที่ตายต่อมิลลิลิตร

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	5	15.06	3.01 **
Error	12	1.15	0.10
Total	17	16.21	

C.V. = 12.91 %

$F.05_{(5,12)} = 3.11$ $F.01_{(5,12)} = 5.06$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์ SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.05)

สิ่งทดลอง	%เซลล์ SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV			รวม	เฉลี่ย [1/]
	1	2	3		
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	13.75	15.02	14.77	43.54	14.51 [c]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	55.73	49.58	43.59	148.90	49.63 [a]
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	40.22	36.36	28.38	104.96	34.99 [b]
				294.40	33.04

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เซลล์ SE-1ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV ต่อมิลลิลิตร

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	2	1867.09	933.55 **
Error	6	147.53	24.59
Total	8	2014.62	

C.V. = 15.01 %

$F.05_{(2,6)} = 5.14$ $F.01_{(2,6)} = 10.92$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 แสดงค่า Log ของจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของ *Se*MNPV ต่อมิลลิลิตร(ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.01)

สิ่งทดลอง	จำนวนผลึกโปรตีนของ*Se*MNPV ต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลดิบ)			รวม	เฉลี่ย 1/
	1	2	3		
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	5.26 (1.80×10^5)	5.27 (1.88×10^5)	5.22 (1.66×10^5)	15.75	5.25^{b} (1.8×10^5)
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	6.59 (39.00×10^5)	7.07 (117.50×10^5)	6.91 (82.00×10^5)	20.57	6.86^{a} (79.5×10^5)
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	7.08 (121.00×10^5)	6.59 (39.00×10^5)	6.85 (70.00×10^5)	20.52	6.84^{a} (76.67×10^5)
				56.84	6.32

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log จำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อมิลลิลิตรของ *Se*MNPV

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	2	5.11	2.56 **
Error	6	0.24	0.04
Total	8	5.35	

C.V. = 3.16 %

$F.05_{(2,6)} = 5.14$ $F.01_{(2,6)} = 10.92$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 9 แสดงค่า Log ของจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของ *Se*MNPV ต่อเซลล์ (ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.01)

สิ่งทดลอง	จำนวนผลึกโปรตีนของ*Se*MNPV ต่อเซลล์ (ข้อมูลดิบ)			รวม	เฉลี่ย [1/]
	1	2	3		
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	0.44 (2.77)	0.30 (1.98)	0.28 (1.90)	1.02	0.34 [b] (2.22)
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	1.14 (13.93)	1.60 (40.17)	1.59 (38.59)	4.33	1.44 [a] (30.90)
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	1.64 (43.60)	1.29 (19.50)	1.65 (44.44)	4.58	1.53 [a] (35.85)
				9.93	1.10

[1/] ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log จำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อเซลล์ ของ *Se*MNPV

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	2	2.63	1.32 **
Error	6	0.24	0.04
Total	8	2.87	

C.V. = 18.18 %

$F.05_{(2,6)} = 5.14$ $F.01_{(2,6)} = 10.92$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 11 แสดงค่า Log ไวรัสไตเตอร์ของ *Se*MNPV (PFU/ml) (ค่าที่แสดงในเครื่องหมายวงเล็บเป็นข้อมูลดิบ) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (LSR = 0.01)

สิ่งทดลอง	ค่า Log ไวรัสไตเตอร์ของ*Se*MNPV (ข้อมูลดิบ)			รวม	เฉลี่ย 1/
	1	2	3		
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	6.13 (1.35×10^{6})	5.59 (0.39×10^{6})	5.64 (0.44×10^{6})	17.36	5.79 [b] (0.73×10^{6})
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	7.43 (26.8×10^{6})	6.74 (5.5×10^{6})	7.42 (26.2×10^{6})	21.59	7.20 [a] (19.5×10^{6})
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	7.04 (10.9×10^{6})	7.45 (28.1×10^{6})	7.27 (18.6×10^{6})	21.76	7.25 [a] (19.2×10^{6})
				60.71	6.75

1/ ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Log ไวรัสไตเตอร์ของ *Se*MNPV (PFU/ml)

Source of Variation	d.f.	SS	MS
Treatment	2	4.15	2.08 **
Error	6	0.57	0.095
Total	8	4.72	

C.V. = 4.57 %

$F.05_{(2,6)} = 5.14$ $F.01_{(2,6)} = 10.92$

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งหรือที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2543. " การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง." *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรม การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงและการประยุกต์ใช้, 22-26 พฤษภาคม 2543, น. 1-30, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุรพล อุปดิสสกุล. 2528. สถิติการวางแผนการทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

อุทัย เกตุนุติ. 2539. " การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส." *ใน* เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน, น. 128-162, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพ.

อุทัย เกตุนุติ. 2540. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยไวรัส เอ็น พี วี. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพ.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Alvarez, C., and Vlak, J.M. 1992. " Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus." **Biocontrol Sci. Techno.** 2: 145-157.

Cameron, R., Possee, R.D., and Bishop, D.H. 1989. " Insect cell culture technology in baculovirus expression system." **TIBTECH.** 7: 66 - 70.

Gardiner, G.R. and Stockdale, H. 1975. " Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses." **J. Invertebr. Pathol.** 25: 263 - 270.

Gaw, Z.Y., Liu, M.T., and Zie, T.U. 1959. " Tissue culture methods for the cultivation of virus grasserie." **Acta. Virol. Engl. Ed.** 3: 55 - 60.

Gelernter, W.D., and Federici, B.A. 1986. " Continuous cell line from *Spodoptera xeigua* (Lepidoptera : Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*." **J. Invertebr. Pathol.** 48: 199 - 207.

Goldschmidt, R. 1915. " Some experiments on spermatogenesis *in vitro*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2: 220 - 222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goodman, C.L. and McIntosh, A.H. 1994. " Production of baculoviruses for insect control using cell culture," *In* Insect cell biotechnology, pp. 33 - 56, K. Maramorosch and A.H. McIntosh (eds.), Boca Raton, Florida.

Goodwin, R.H. 1975. " Insect cell culture : Improve media and methods for initiating attached cell lines from the Lepidoptera." **In Vitro**. 11: 396.

Grace, T.D.C. 1962. " Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*." **Nature**. 195: 788 - 789.

Granados, R.R. and McKenna, K.A. 1995. " Insect cell culture methods and their use in virus research," *In* Baculovirus expression systems and biopesticides, pp.13 - 40, M.L. Shuler, H.A. wood, R.R, Granados and D.A. Hammer (eds.), Wiley - Liss, Inc, New York.

Hara, K., Funakoshi, M., ans Kawarabata, T. 1995. " A cloned cell line of *spodoptera exigua* has a highly increased susceptibility to the *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus." **Can. J. microbiol.** 41: 1111 - 1116.

Hink, W.F. 1970. " Established cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*." **Nature**. 226: 466 - 467.

Hink, W.E., and Strauss, E. 1976. " Replication of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in the *Trichoplusia ni* (TN - 368) cell line," *In* Invertebrate tissue culture, applications in medicine, biology and agriculture, pp. 369 - 374, E. Kurstak, and K. Maramorosch (eds.), Academic Press, New York.

Hungsphruke, S. 1981. Studies on nuclear polyhedrosis viruses recovered from *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* larvae in Thailand. M.S. Thesis, Mahidol University.

Inlow, D., Shauger, A., and Maiorella, B. 1989. Insect cell culture and baculovirus propagation in protein - free medium. **J. Tissue - culture Meth.** 12: 13 - 16.

Lee, S.H., and Hou, R.F. 1992 . " Establishment of a cell line derived from embryos of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)." **J. Invertebr. Pathol.** 59: 174- 179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lynn, D.E. 1991. " Establishing invertebrate cell in culture : Continued need for new cell lines, " *In* Proceedings of the eighth international conference on invertebrate and fish tissue culture, pp.1 - 6 , Jr. M. J. Fraser (ed.), Tissue Culture Association, Columbia, MD.

Mitsuhashi, J. 1982. " Continuous cultures of insect cell lines in media free of sera." **Appl. Ent. Zool.** 17: 575 - 581.

Mitsuhashi, J. 1994. " Insect cell culture media," *In* Anthropod cell culture systems, pp. 2 - 17, K. Maramorosch and A.H. McIntosh (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K., and Luckow, V.A. 1992. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. W.H. Freeman and company, New York.

Sohi, S.S. 1995. " Development of lepidopteran cell lines," *In* Baculovirus expression protocols, pp. 397 - 412, C.D. Richardson (ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey.

Trager, W. 1935. " Cultivation of the virus of grasserie in silkworm tissue cultures." **J. Exp. Med.** 61: 501 - 503.

Trumble, J.T., and Baker, T.C. 1984. " Flight phenology and pheromone trapping of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) in southern and coastal California." **Environ. Entomol.** 13: 1278 - 1282.

Vaughn, J.L. 1976. " The production of nuclear polyhedrosis viruses in large volume cell cultures." **J. Invertebr. Pathol.** 28: 233 - 237.

Vaughn, J.L. 1994. " Lepidopteran cell culture," *In* Arthropod cell culture systems, pp. 37 - 50, K. Maramorosch and A.H. McIntosh (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida.

Vaughn, J.L. and Weiss, S.A. 1991. " Formulating media for the culture of insect cells." **BioPharm.** 4: 16 - 19.

Vialard, S.E., Arif, B.M., and Richardson, C.D. 1995. " Introduction to the molecular biology of baculoviruses, " *In* Baculovirus expression protocols, pp. 1-24, C.D. Richardson (eds.), Humana Press, New Jersey.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Volkman, L.E. 1986. " The 64-k envelope protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, " *In* Current tropics in microbiology and immunology, pp. 103-118, W. Doerfler and P. Boehm (eds.), Springer-Verlag, New York.

Volkman, L.E. and Summers, M.D. 1977. " *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded form, " **J. Invertebr. Pathol.** 30: 102 - 103

Weiss, S.A., Smith, G.C., Kalter, S.S., and Vaughn, J.L. 1981. " Improved method for the production of insect cell culture in large volume." **In Vitro**. 17: 495 - 502.

Wyatt, S.S. 1956. " Culture *in vitro* of tissue from the silkworm *Bombyx mori*." **J. Gen. Physiol.** 39: 841 - 852.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้