ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix A-1 Indirect ELISA

Indirect ELISA potocol

1. Coating plate with 100 μg/ml somatostatin-pKLH conjugated 100 μl/well.
2. Incubate 4 °C, 16 hr.
3. Washing with washing buffer 150 μl/well and shaking plate 1 min, 5 times.
4. Blocking with 1% gelatin in coating buffer 100 μl/well.
5. Incubate 37 °C, 1 hr.
6. Washing with washing buffer 150 μl/well and shaking plate 1 min, 3 times.
7. Applying serial diluting of chicken serum in diluting buffer 100 μl/well.
8. Incubate 37 °C, 1 hr.
9. Washing with washing buffer 150 μl/well and shaking plate 1 min, 3 times.
10. Applying rabbit-anti-chicken antiserum-HRP conjugated 100 μl/well.
11. Incubate 37 °C, 1 hr.
12. Washing with washing buffer 150 μl/well and shaking plate 1 min, 3 times.
13. Applying substrate in substrate buffer 100 μl/well.
14. Incubate at room temperature, 30 min in dark condition.
15. Stopping with 50 μl/well 4N H_2SO_4.
16. Reading A490.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix B

Appendix B-1 การเตรียมสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต

ละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บน hot plate ละลายจนกระทั่งแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปอีกเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมาใช้ได้

Appendix B-2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline)

ชั่ง NaCl 8.0 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 2.8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.4

Appendix B-3 การเตรียมสารละลาย EDTA เข้มข้น 500 มิลลิโมล่าร์

ชั่ง $EDTA.2H_2O$ 186 กรัม ลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 8.0 ด้วย 1*N* NaOH

Appendix B-4 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (coating buffer)

ชั่ง Na_2CO_3 4.29 กรัม, $NaHCO_3$ 2.93 กรัม, NaN_3 0.20 กรัม เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 9.6 ด้วย 1*N* NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Appendix B-5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer)

ใช้ polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80) 500 ไมโครลิตร และเติม PBS ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Appendix B-6 การเตรียมสารละลาย 1 % เจลาติน

ละลายเจลาติน 1 กรัม ในสารละลายสำหรับการเคลือบ 80 มิลลิลิตร คนบน hot plate ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

Appendix B-7 การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น (citrate-phosphate buffer)

ชั่ง citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 18.16 กรัม เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.0 ด้วย 1*N* NaOH หรือ 1*N* HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

Appendix B-8 การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (stopping solution)

การเตรียม 4*N* H_2SO_4 ประกอบด้วยเติม H_2SO_4 (98%) 21.36 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

Appendix B-9 การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA

ชั่ง O-phenylenediamine acetate (OPD) 0.048 กรัม ละลายใน citrate-phosphate buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วย อะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ Vortex-mixer เมื่อ OPD ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 10 ไมโครลิตร (การเตรียม OPD จะเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้นเนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Appendix C

การวัดขนาดวัตถุด้วยกล้องจุลทรรศน์

อุปกรณ์ที่ใช้วัดขนาดวัตถุด้วยกล้องจุลทรรศน์ เรียกว่า micrometer ซึ่งสามารถวัดได้ละเอียดถึงไมครอน (micron, μ) คือ 1/1000 มิลลิเมตร โดย micrometer ประกอบด้วยอุปกรณ์ 2 ชิ้นคือ

1. Stage micrometer มีลักษณะเป็นแผ่นสไลด์ที่มีแผ่นแก้วบางๆ ขนาดเล็กติดอยู่ตรงกลางซึ่งที่แผ่นแก้วบางนี้จะมีแนวเส้นที่แบ่งเป็นช่องเล็กๆ 100 ช่อง โดยมีขีดยาวกั้นแบ่งทุกๆ 10 ช่อง แต่ละช่องมีระยะห่างเท่ากับ 0.01 มิลลิเมตร
2. Ocular micrometer มีลักษณะเป็นแผ่นแก้วเล็กกลมขนาดพอดีที่จะใส่ลงในกระบอกของ eye-piece ตรงกลางของแผ่นแก้วมีแนวเส้นที่แบ่งเป็นช่องเล็กๆ 100 ช่อง โดยมีขีดยาวกั้นแบ่งทุกๆ 10 ช่อง แต่ละช่องห่างเท่ากัน ซึ่งแนวเส้นของ ocular micrometer นั้นจะทำหน้าที่คล้ายไม้บรรทัดที่สามารถใช้วัดขนาดวัตถุได้

การวัดขนาดโดยใช้ micrometer มีขั้นตอนดังนี้

1. ใส่ ocular micrometer ลงในกระบอก eye-piece ของกล้องจุลทรรศน์ โดยถอดกระบอก eye-piece ออกจากกล้องแล้วคลายเกลียว lens ออก เมื่อส่องดูที่ eye-piece จะเห็นแนวเส้นที่มี scale คล้ายไม้บรรทัดบนพื้นภาพ
2. นำ stage micrometer มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ก็จะเห็นแนวเส้น scale อีกชุดหนึ่งบนพื้นภาพ
3. เลื่อนแนวเส้น scale ทั้งสองชุดให้ทับกัน โดยให้จุดเริ่มต้นที่ 0 ให้ทับกัน
4. จากจุด 0 ที่ทับกันนี้ ให้ไล่หาเส้นที่ scale ทั้งสองชุดทับกันอย่างพอดี และอยู่ใกล้จุด 0 มากที่สุด
5. คำนวณระยะห่างของ scale บน ocular micrometer ดังนี้

   สมมุติว่า 40 ช่อง ocular micrometer ทับกับ 10 ช่อง stage micrometer

   1 ช่อง ocular micrometer = 10/40 ช่อง stage micrometer

   = 0.25 x 0.01 มิลลิเมตร

   = 0.0025 มิลลิเมตร

   = 2.5 ไมครอน

6. นำสไลด์วัตถุมาส่องดูปรับภาพให้ชัด หมุน eye-piece ให้แนวเส้น scale ของ ocular micrometer ทาบไปบนภาพของวัตถุ นับจำนวนช่องบน scale ที่พอดีกับขนาดวัตถุแล้วนำมาคำนวณ ดังนี้ สมมุติว่าวัดขนาดวัตถุได้ 17 ช่อง

ความกว้างของวัตถุ = 17 x 0.0025 มิลลิเมตร

= 0.0424 มิลลิเมตร

= 42.5 ไมครอน

Appendix D

การคำนวณหาการเชื่อมติดระหว่าง SRIF กับ pHMCN

ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm เท่ากับ 0.02

ค่าดูดกลืนแสงที่ 214 nm เท่ากับ 3.01

$$\text{protein concentration} = \frac{1.55 \times \text{absorbance at 280 nm}}{0.77 \times \text{absorbance at 214 nm}} \text{ mg/ml.}$$

$$\text{protein concentration} = \frac{1.55 \times 0.02}{0.77 \times 3.01} \text{ mg/ml.}$$

protein concentration = 0.013 mg/ml.

แสดงว่ามี SRIF ที่ไม่เชื่อมกับ pHMCN เท่ากับ 0.013 mg/ml. หรือ 13 μg/ml.

สารละลาย 50 mM NaCl ปริมาตร 100 ml.

ดังนั้นมี SRIF ที่ไม่เชื่อมกับ pHMCN เท่ากับ 1,300 μg

จาก SRIF ปริมาณ 3,200 μg เป็นส่วนที่ไม่เชื่อมกับ pHMCN เท่ากับ 1,300 μg แสดงว่ามี SRIF ประมาณ 1,900 μg ที่เชื่อมติดกับ pHMCN คิดเป็น 59.37 %

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นาย บัณฑิต กีรติการกุล
วัน เดือน ปีเกิด	19 มกราคม 2519
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาขั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2536
	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University