ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

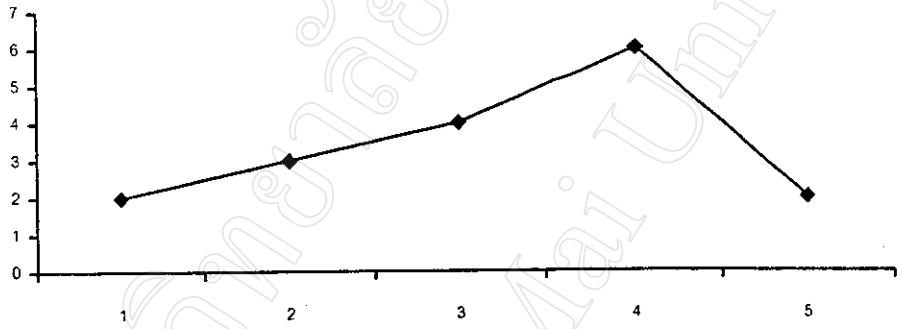
Appendix A

Appendix A-1 การหาพื้นที่ใต้กราฟโดยโปรแกรมสำเร็จรูป AutoCad R. 13

มีวิธีการ ดังนี้ (เมฆฉาย, 2539)

ตัวอย่าง ต้องการหาพื้นที่ใต้กราฟ ที่มีจุดคือ

X	0	1	2	3	4	5
Y	0.1	2	3	4	6	2



Command : point (Enter)

Point : 0,0 (Enter)

Command : area (Enter)

<First point>/Enter/Add/Substract : nod (Enter)

of : 0,0 (Enter)

Next point : 0,0.1 (Enter)

Next point : 1,2 (Enter)

Next point : 2,3 (Enter)

Next point : 3,4 (Enter)

Next point : 4,6 (Enter)

Next point : 5,2 (Enter)

Next point : 5,0 (Enter) (Enter)

Area = 16.050

Appendix A-2 การหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม (working titer).

Working Titer Protocol:

1. Adding 100 ul/well of chicken serum in coating buffer.
2. Incubate at 370C, 16 hr.
3. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
4. Blocking with 1% gelatin in coating buffer 100 ul/well
5. Incubate at 370C, 1 hr.
6. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
7. Applying the dilution of Rabbit-anti-chicken antiserum-pCRP conjugated at 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 and 1:1,000,000 in diluting buffer.
8. Incubate at 370C, 1 hr.
9. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
10. Applying substrate in substrate buffer 100 ul/well.
11. Incubate at room temperature, 30 min in dark condition.
12. Stopping with 50 ul/well 4N H_2SO_4.
13. Reading A490.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix A-3 Indirect ELISA.

Indirect ELISA Protocol:

1. Coating plate with 100 ug/ml Cholesterol-3-pKLH conjugated 100 ul/well.
2. Incubate 40C, 16 hr.
3. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
4. Blocking with 1% gelatin in coating buffer 100 ul/well.
5. Incubate 370C, 1 hr.
6. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
7. Applying serial diluting of chicken serum in diluting buffer 100 ul/well.
8. Incubate 370C, 1 hr.
9. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
10. Applying Rabbit-anti-chicken antiserum-pCRP conjugated 100 ul/well.
11. Incubate 370C, 1 hr.
12. Washing with washing buffer 150 ul/well and vigorous shaking with microtiter plate mixture 1 min, 3 times.
13. Applying substrate in substrate buffer 100 ul/well.
14. Incubate at room temperature, 30 min in dark condition.
15. Stopping with 50 ul/well 4N H_2SO_4.
16. Reading A490.

*** Background as pKLH.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix A-4 Serum cholesterol determination.

Serum Cholesterol Protocol:

1. Adding 100 ul chicken serum in 25 X 150-ml glass tube.
2. Adding alc. KOH 10 ml.
3. Incubate 37^0C, 1 hr.
4. Adding petroleum ether 10 ml and vigorous shaking with Vortex 1 min.
5. Adding 5 ml distilled water.
6. Vigorous shaking 1 min with Vortex.
7. Collecting petroleum ether phase.
8. Dryness
9. Applying substrate and incubate 30 min.
10. Reading A_{560}.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix A-5. Egg yolk cholesterol determination.

Egg Yolk Cholesterol Protocol:

Egg Yolk Preparation.

1. Egg boiling 10 min.
2. Weighing shell, Egg White and Yolk.
3. Storing in plastic bag with air tight, 4^0C.

Yolk Cholesterol.

1. Weighing yolk about 0.8 grams.
2. Grounds with pumice stone (50 mesh).
3. Adding 18-ml petroleum ether: ethanol (2:1) and 6 ml distilled water.
4. Vigorous shaking with Vortex 1 min.
5. Centrifuge 1,000 round per minute 10 min.
6. Collecting petroleum ether: ethanol phase and dryness.
7. Adding 10 ml alc. KOH and 5 ml distilled water.
8. Incubate 70^0C, 90 min.
9. Adding 12 ml petroleum ether and 6 ml distilled water.
10. Vigorous shaking 1 min.
11. Centrifuge 1,000 rounds per minute 10 min.
12. Collecting petroleum ether phase and dryness
13. Applying substrate and incubate 30 min.
14. Reading A_{560}.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Appendix B

Appendix B-1. การเตรียมสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต

ละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่นปริมาณที่มากพอบน hot plate ละลายจนกระทั่งแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก แล้วให้เติม $(NH_4)_2SO_4$ 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 กรัมและ KCl 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับความความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.4

Appedix B-3. การเตรียมสารละลาย EDTA เข้มข้น 500 มิลลิโมลล่าร์

ชั่ง $EDTA.2H_2O$ 186 กรัมลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดร็อกไซด์เล็กน้อย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 เพื่อให้ EDTA ละลาย

Appendix B-4. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (coating buffer)

ชั่ง Na_2CO_3 1.59 กรัมและ $NaHCO_3$ 2.93 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9.6 โดยใช้ monobasic หรือ dibasic

Appendix B-5. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer)

ใช้ normal saline ที่มี 0.05% (v/v) ของ Tween-20

Appendix B-6. **การเตรียมสารละลาย 1% เจลาติน**

ชั่งเจลาติน 1 กรัมละลายในสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ 80 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแม่เหล็กบนเตาให้ความร้อน (hot plate with magnetic stirrer) คนจนกระทั่งเจลาตินละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

Appendix B-7. **การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง** (diluting buffer)

ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 0.05% (v/v) Tween-20

Appendix B-8. **การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ** ELISA

ชั่ง *O*-phenylenediamine acetate 18 มิลลิกรัมในสารละลายสารตั้งต้น (substrate buffer) 12 มิลลิลิตร และ H_2O_2 เข้มข้น 35% ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

Appendix B-9. **การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น** (substrate buffer)

ชั่ง citric acid 7.3 กรัมและ $NaHPO_4.2H_2O$ 11.86 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0

Appendix B-10. **การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของการหาปริมาณโคเลสเตอรอล**

1 ส่วนของ glacial acetic acid, 1 ส่วนของน้ำกลั่นและ 3 ส่วนของสารละลาย A ประกอบด้วย $FeCl_3$ 6 มิลลิลิตรใน H_3PO_4 94 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายนครินทร์ พริบไหว
วัน เดือน ปีเกิด	2 ธันวาคม 2516
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทรา-ชูทิศพายัพ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2534
	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2538

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University