ภาคผนวก ก

1. สูตรเตรียม ELISA บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร (Roistacher, 1991)

1.1 Coating buffer

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
NaN_3	0.20	กรัม

(pH 9.6)

1.2 Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.00	กรัม
KH_2PO_4	0.20	กรัม
$Na_2HPO_412H_2O$	2.90	กรัม
KCl	0.20	กรัม

(pH 7.2 – 7.4)

1.3 Washing buffer (PBS-T)

PBS	1.0	ลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร

1.4 Conjugate buffer

PBS-T	1.0	ลิตร
Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000	20	กรัม

1.5 Substrate buffer

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
NaN_3	0.2	มิลลิลิตร

(ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl)

1.6 Reaction stopping solution

NaOH	120	กรัม

2. วิธีการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค Plate Trapped ELISA (Roistacher, 1991)

2.1 บดเส้นกลางใบหรือเปลือกซึ่งลอกจากกิ่งของตัวอย่างส้มในบัฟเฟอร์(coating buffer) ในอัตรา 1:10 ด้วยครกบดจนได้น้ำคั้น (sap extract) นำน้ำคั้นไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

2.2 ใส่น้ำคั้นลงในหลุม (Polystyrene ELISA plate) ตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง (หรือหนึ่งคืน)

2.3 เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำคั้นทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

2.4 ใส่แอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัส (ผลิตโดย DSMZ ประเทศเยอรมันนี) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ให้มีระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบัพเฟอร์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มแอนติเซรัมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง

2.5 เมื่อครบกำหนดเวลาเทแอนติเซรัมทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

2.6 ใส่เอ็นไซม์ (Goat antirabbit conjugate with alkaline phosphatase, ZYMED) ซึ่งเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ (conjugate buffer) ในอัตรา 1:4,000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.7 เมื่อครบกำหนดเวลาเทเอ็นไซม์ทิ้งแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (washing buffer, PBS-T) 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที

2.8 ใส่ substrate (p – nitrophenyl phosphate, ZYMED) ซึ่งละลายด้วยบัฟเฟอร์ (substrate buffer) ในอัตราความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรบัฟเฟอร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ (stopping reagent) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ก่อนนำปฏิกิริยา ELISA ไปดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (OD405) ด้วยเครื่อง ELISA Reader

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ (ANOVA analysis)

ปัจจัย[1/]	df	SS	MS	F	Pr>F[2/]
ปัจจัย A	1	0.0432	0.0432	2.11	0.1654^{ns}
ปัจจัย B	1	0.0994	0.0994	4.86	0.0425*
ปัจจัยสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B	1	0.0001	0.0001	0.01	0.9387^{ns}
ความคลาดเคลื่อน	16	0.3275	0.0205		
รวม	19	0.4703			

[1/] ปัจจัย A ชนิดของเซลลูโลสเมมเบรน A1 = CN 140, A2 = CN 95

ปัจจัย B ขนาดของ colloidal gold (CG) B1 = CG 15 nm, B2 = CG 30 nm

[2/] ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, * = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05