

## ภาคผนวก

### ก. การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

#### 1. การตั้งตำรับโวลบูลมินที่กักเก็บใน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

##### 1.1 Acetic acid ความเข้มข้น 1 % w/v pH -3.5 (1 L)

Glacial acetic acid	1	mL
น้ำปราศจากไอออน	950	mL

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เท่ากับ 3.5 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 mL

#### 2. BCA assay

##### 2.1 BCA reagent B

Cupric sulfate (5X hydrated)	0.4	g
น้ำปราศจากไอออน	10	mL

##### 2.2 BCA working reagent

BCA reagent A (Thermo scientific, Germany)	50	mL
BCA reagent B	1	mL

ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่บดแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 3. การปลดปล่อยแอนติเจนจากอนุภาคไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

##### 3.1 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	2.39	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.19	g
Sodium chloride	8.00	g
น้ำปราศจากไอออน	850	ml

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 mL

### 3.2 Phosphate buffer saline (PBS) pH 6.8 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	11.05	g
Glacial acetic acid	953.5	$\mu$ L
น้ำปราศจากไอออน	850	ml

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 mL

### 3.3 Phosphate buffer saline (PBS) pH 4.5 (1 L)

Potassium dihydrogen phosphate	6.8	g
น้ำปราศจากไอออน	850	ml

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ให้ได้ 4.5 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 mL

## 4. ความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

### 4.1 Separating gel buffer (400 mL)

Tris HCl	18.15	g
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	4	mL
น้ำปราศจากไอออน	380	mL

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 400 mL เก็บ Separating gel buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 4.2 Stacking gel buffer (200 mL)

Tris HCl	3	g
10% SDS	2	mL
น้ำปราศจากไอออน	150	mL

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 200 mL เก็บ Stacking gel buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 4.3 10X running buffer (500 mL)

Tris HCl	15	g
10% SDS	10	mL
Glycine	72	g
น้ำปราศจากไอออน	450	mL

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 N NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 500 mL  
เก็บ 10X running buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 4.4 Sample buffer (20 mL)

Stacking gel buffer	12	mL
10% SDS	4	mL
Glycerol	3	mL
Bromophenol blue	50	mg
2-mercaptoethanol	1	mL

เก็บ Sample buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 5. การวิเคราะห์ IgG, sIgA, IL-4 และ IFN- $\gamma$

#### 5.1 0.1 M sodium carbonate pH 9.5 (1 L)

Sodium hydrogen carbonate	7.13	g
Disodium carbonate	1.59	g
น้ำปราศจากไอออน	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วย 10 N NaOH

#### 5.2 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	11.6	g
Potassium dihydrogen phosphate	2	g
Sodium chloride	80	g
Potassium chloride	2	g
น้ำปราศจากไอออน	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 10 NaOH นำ phosphate buffer saline ที่ได้ไป autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 5.3 10% Fetal bovine serum (100 mL)

Inactivated Fetal Bovine serum	10	mL
PBS pH 7.0	90	mL

เก็บ 10% Fetal bovine serum ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 5.4 0.05% Tween 20 (1 L)

Tween 20	0.5	mL
PBS pH 7.0	999.5	mL

เก็บ 0.05% Tween 20 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 6. การเลี้ยงเซลล์ splenocytes

### 6.1 Incompleted RPMI 1640 medium (1 L)

RPMI 1640 medium	1	ซอง
น้ำกลั่น	1	L
Sodium bicarbonate	2	g

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22 µm เก็บ incomplete RPMI 1640 medium ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

### 6.2 Completed RPMI 1640 medium (100 mL)

Inactivated Fetal Bovine serum	10	mL
Incomplete RPMI 1640 medium	89	mL
Penicillin/streptomycin	1	mL

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22 µm เก็บ complete RPMI 1640 medium ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

### 6.3 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (1 L)

Sodium phosphate	1.44	g
Potassium phosphate	0.24	g
Sodium chloride	8	g
Potassium chloride	0.2	g
น้ำกลั่น	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บ PBS pH 7.4 ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

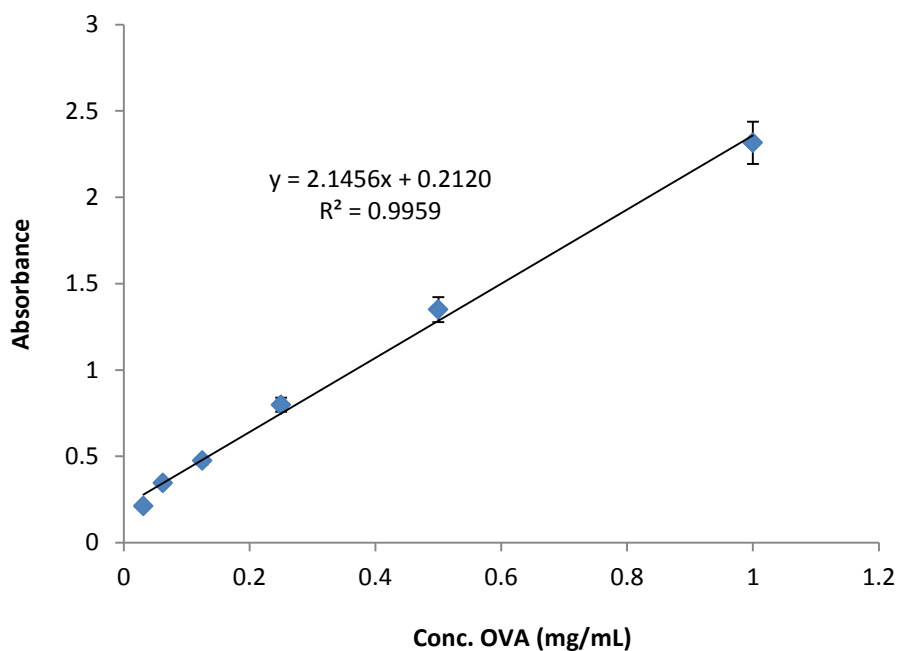
### 6.4 ACK lysing buffer (1 L)

Ammonium chloride	8.3	g
Sodium bicarbonate	1.0	g
Disodium EDTA	0.036	g
น้ำกลั่น	1	L

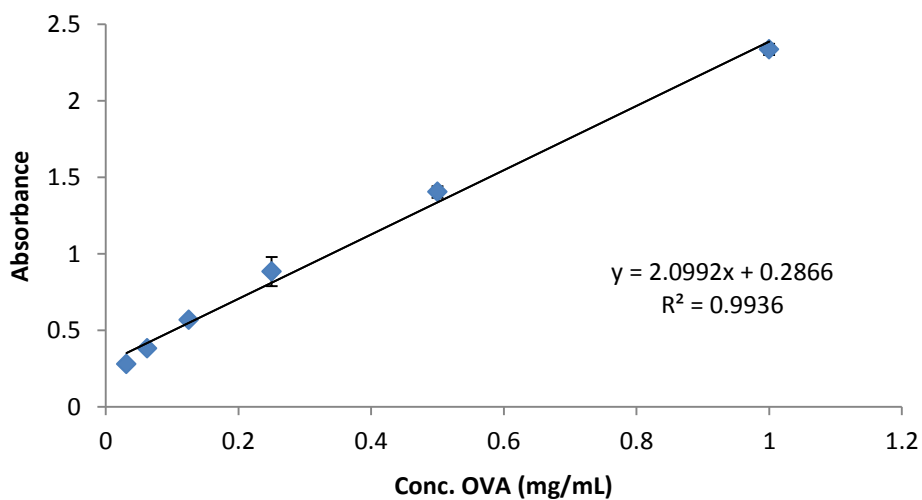
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บ ACK lysing buffer ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

## ข. กราฟมาตรฐาน

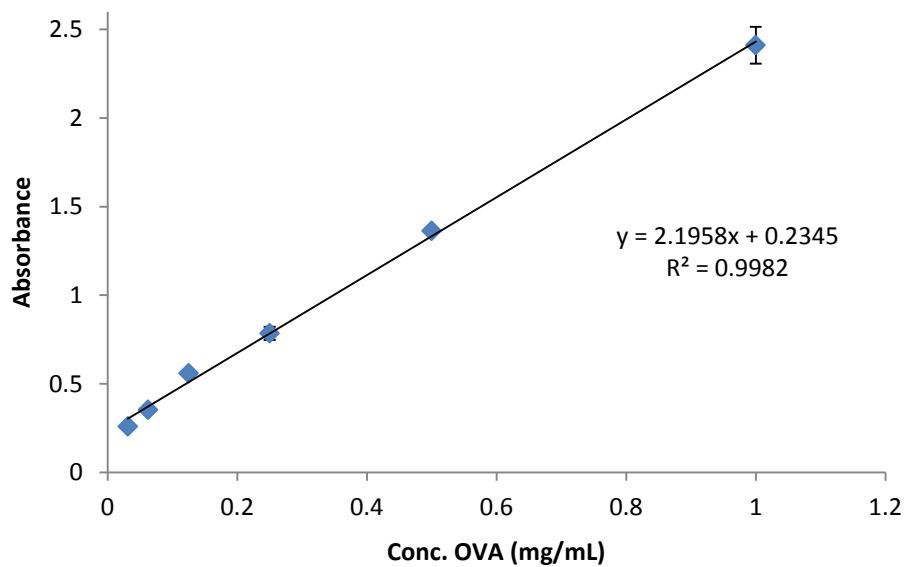
### 1. กราฟมาตรฐานของโอวัลบูมินที่วิเคราะห์ด้วยวิธี BCA assay



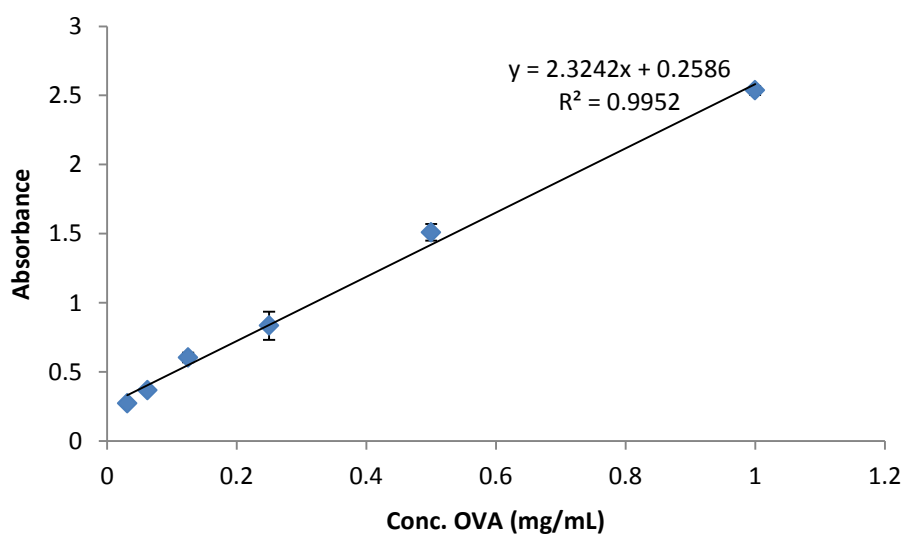
รูปที่ ข.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโอวัลบูมินใน 1% w/v acetic acid



รูปที่ ข.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของโอวัลบูมินใน PBS pH 4.5

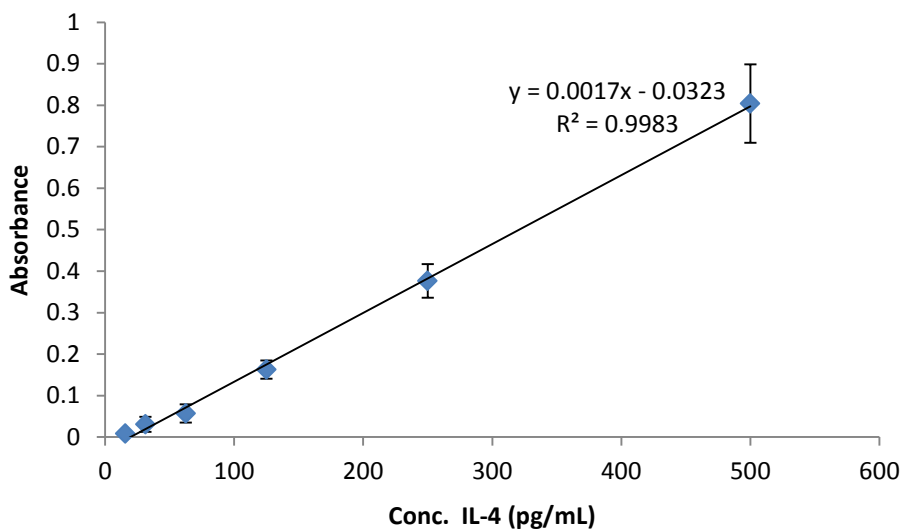


รูปที่ ๓.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอวัลบูมินใน PBS pH 6.8

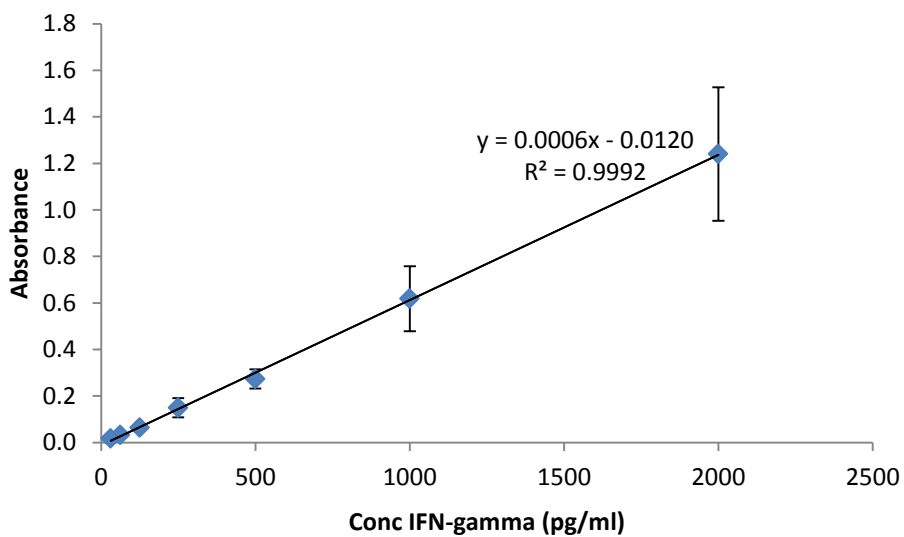


รูปที่ ๓.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอวัลบูมินใน PBS pH 7.4

## 2. กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของไซโตคัยน์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA



รูปที่ ๒.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ IL-4



รูปที่ ๒.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ IFN- $\gamma$