

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลการเก็บตัวอย่าง

ตารางภาคผนวก 1 แสดงผลการเก็บตัวอย่างพยาธิจาก อ.เมือง จ.เชียงใหม่

วันที่	No.	ชนิดพยาธิ		
		<i>P. epiclutum</i>	<i>O. streptocoelium</i>	<i>F. elongatus</i>
25/1/43	1	-	*	-
26/1/43	2	*	-	-
28/1/43	3	*	*	-
29/1/43	4	*	*	3
30/1/43	5	*	-	-
12/2/43	6	41	17	1
15/2/43	7	*	-	40
16/2/43	8	*	-	*
17/2/43	9	*	-	-
19/2/43	10	*	2	43
21/2/43	11	22	33	72
22/2/43	12	10	-	-
23/2/43	13	49	23	81
24/2/43	14	27	7	94
1/3/43	15	-	-	-
2/3/43	16	-	-	-

- ไม่พบพยาธิ

* ไม่สามารถนับจำนวนพยาธิได้

ตารางภาคผนวก 2 แสดงผลการเก็บตัวอย่างพยาธิจาก อ.เมือง จ.ลำพูน

วันที่	No.	ชนิดพยาธิ		
		<i>P. epiclutum</i>	<i>O. streptocoelium</i>	<i>F. elongatus</i>
1/2/43	1	*	*	-
	2	*	1	*
	3	-	-	-
2/2/43	4	*	-	2
	5	*	12	*
	6	-	-	-
	7	-	-	-
4/2/43	8	*	-	-
	9	5	-	-
	10	*	*	-
	11	*	*	20
5/2/43	12	*	-	-
	13	*	-	-
	14	*	30	3
	15	15	3	-
7/2/43	16	-	-	-
8/2/43	17	*	*	1
	18	*	1	-
	19	*	20	*
	20	-	-	-
	21	-	-	-

- ไม่พบพยาธิ

* ไม่สามารถนับจำนวนพยาธิได้

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ เอนไซม์ และสารละลายอื่นๆ

การเตรียมบัฟเฟอร์ เอนไซม์และสารละลายอื่นๆ

1. 5 M NaCl : NaCl 29.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร Sterile ด้วยการ Autoclave

2. 1 M HCl : Concentrated HCl 86.2 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตร

เติม Concentrated HCl ลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ควรทำใน Chemical Hood เพราะไอกรดของ HCl จะเกิดเป็นควันฟุ้งกระจาย

3. 10 M NaOH : NaOH 40 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ถ้าต้องการ Sterile ก็ทำได้ด้วยการ Autoclave การใช้สารละลาย NaOH โดยทั่วๆ ไป เช่น นำไปเจือจางเพื่อใช้ในการเตรียม ดีเอ็นเอ ไม่จำเป็นต้อง Autoclave แต่อาจละลายหรือเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ Sterile ก็พอเพียง

4. 1 M Tris-HCl : Tris base 121.1 กรัม

ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ (pH 7-8) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร Sterile ด้วยการ Autoclave

5. 0.5 M EDTA : Disodium ethylenediamine tetraacetate - $2H_2O$ 136.1 กรัม

ละลายในน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรงๆ ด้วยการใช้ Magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH โดยใช้ NaOH จนได้ pH 8.0 ซึ่งเป็น pH ที่ EDTA ละลายได้หมดพอดี ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไป Autoclave

6. 10% SDS : SDS 10 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นที่ Sterile แล้ว 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อช่วยให้ละลายดีขึ้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

7. chloroform – isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1)

ผสม chloroform 240 มิลลิลิตร และ isoamyl alcohol 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

8. 50x TAE : Tris base 242 กรัม

glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave

9. 10x TBE : Tris.base 108 กรัม

boric acid 57.1 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave

10. 10x TPE : Tris.base 108 กรัม

85% phosphoric acid 15.5 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร นำไป autoclave

11. 6x loading buffer : 0.25% bromophenol blue

0.25% xylene cyanol

30% glycerol

ใน electrophoresis buffer หรือน้ำ

12. Rnase A : Rnase A 100 มิลลิกรัม

ละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 mM

NaCl ผสมอยู่

13. Phenol อิมัตว์ : phenol 100 มิลลิลิตร

8-hydroxy quinoline 400 มิลลิลิตร

1 M Tris-HCl pH 8.0 > 500 มิลลิลิตร

2-mercaptoethanol 100 ไมโครลิตร

นำ phenol มาหลอมละลายที่อุณหภูมิ 65°C แล้วเติม 8-hydroxy quinoline 400 มิลลิลิตรและ 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วย magnetic stirrer นาน 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแยกชั้น แล้วดูดเอา aqueous phase ชั้นบนออก จากนั้นเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้งหรือจนกระทั่ง pH ของ phenol > 7.8 (ทดสอบด้วย pH paper) จึงเติม 2-mercaptoethanol 200 มิลลิลิตร และ 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อปิดผิวสารละลาย จากนั้นเก็บสารละลาย phenol อิมัตว์ที่ได้ไว้ในขวดสีเข้ม ที่อุณหภูมิ 4°C

14. ethidium bromide 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งสารละลายหมด ซึ่งอาจใช้เวลาหลายชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีเข้ม ที่อุณหภูมิ 4°C ในการเตรียมสารนี้จะต้องระมัดระวังมาก ต้องสวมถุงมือและอย่าหายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen

15. Tris ethylenediaminetetra acetic acid buffer (TE buffer) : 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วนำไป autoclave

16. RNase A

ชั่ง RNase A 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) และ 15 mM NaCl ผสมอยู่ จากนั้นต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ระวังให้ระดับสารละลายเอนไซม์อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำเดือด) ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเป็น aliquots (100-500 มิลลิลิตร) เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เอนไซม์นี้จะยังทำงานได้ดี แม้ผ่านการทำ Freeze-thaw หลายๆ ครั้ง

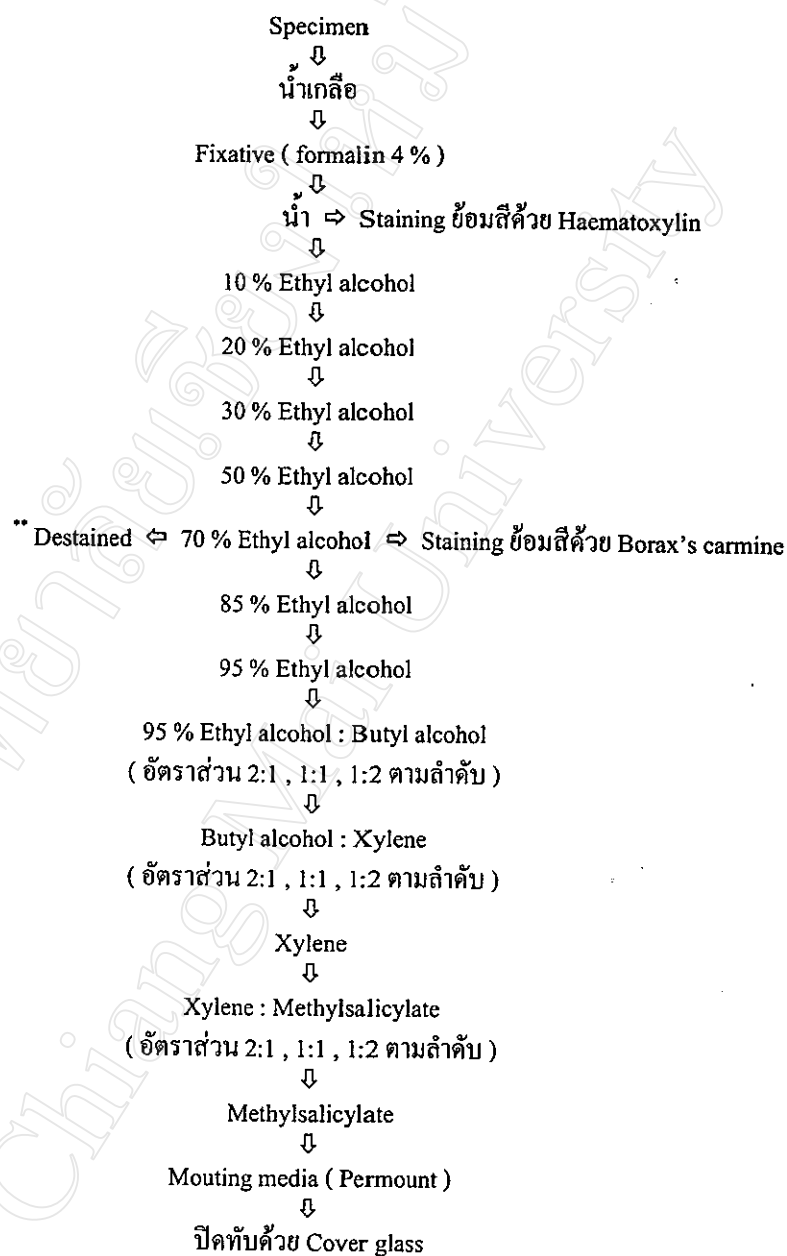
17. Proteinase K

เตรียม stock 20 มิลลิกรัม ในน้ำ เก็บที่ -20°C

Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

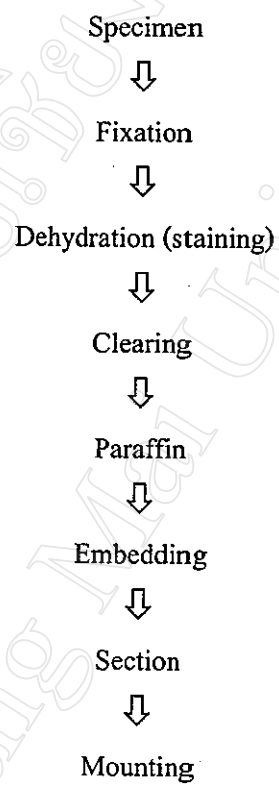
ตารางภาคผนวก 3 แสดง primer และ base sequence ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

primer	code sequence 5'→3'
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OPB-18	CCACAGCAGT
OPC-09	CTCACCGTCC
OPE-13	CCCGATTCCG
OPH-11	CTTCCGCAGT
OPH-17	CACTCTCCTC
OPQ-14	GGACGCTTCA
OPQ-20	TCGCCCAGTC
OPW-14	CTGCTGAGCA
OPW-17	GTCCTGGGTT



****หมายเหตุ** Destained เป็นการทำให้สีย้อม Specimens ในสไลด์จางลงโดยใช้ 1 % HCl ใน 70 % Ethyl alcohol เมื่อได้สีที่ต้องการแล้วใช้ Stop destained solution ซึ่งเป็นสารละลาย 1 % KOH ใน 70 % Ethyl alcohol

รูปภาคผนวก 1 สรุปขั้นตอนการทำสไลด์ถาวร (Permanent slide)



รูปภาคผนวก 2 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตัด section

ภาคผนวก ค

รูปวิธาน (key)

รูปวิธาน (key) ในการจัดจำแนกพยาธิใบไม้จากกระเพาะปล้ำจี้ร่วโค (Sey *et al.*, 1994)

Key to the subfamily of Paramphistomatidae

1. พบ ventral pouch.....Gastrothylacidae
- ไม่พบ ventral pouch.....Paramphistomidae

Key to the genera of Gastrothylacidae

1. Uterus และ vas deferens ไชวักัน ไกลกับกึ่งกลางลำตัว..... *Gastrothylax*
- Uterus และ vas deferens อยู่ทางด้าน dorsal ของ median line..... 2
2. Testes เรียงกันตามขวาง แต่ละด้านของ median line..... *Carmyyerius*
- Testes ไม่ได้เรียงกันตามขวาง อยู่กึ่งกลางลำตัว..... *Fischcoederius*

Key to the genera of Paramphistomidae

1. Excretory duct and Laurer's canal ไชวักัน..... 2
- Excretory duct and Laurer's canal ไม่ไชวักัน..... *Orthocoelium*
2. Pars musculosa เจริญไม่ดี..... 3
- Pars musculosa เจริญดี..... *Calicophoron*
3. Acetabulum แบบ *Explanatum* type..... *Explanatum*
- Acetabulum แบบ *Paramphistomum* or *Pisum* type..... *Paramphistomum*

Key to the species of *Orthocoelium*

1. Pharynx แบบ *Dicranocoelium* type..... 2
- Pharynx แบบ *Calicophoron* type..... *O. streptocoelium*
2. Terminal genitalium แบบ *Gracile* type..... *O. dicranocoelium*
- Terminal genitalium แบบ *Parvipapillatum* type..... *O. parvipapillatum*

Key to the species of *Paramphistomum*

1. Terminal genitalium แบบ *Epiclittum* type..... *P. epiclittum*
- Terminal genitalium แบบ *Ichikawai* type..... *P. ichikawai*

ประวัติการศึกษา

ชื่อ นาย ประลองยุทธ ศรีपालวิทย์
วัน เดือน ปีเกิด 4 สิงหาคม 2519
ประวัติการศึกษา

	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษาที่สำเร็จ
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนอัสสัมชัญ ลำปาง	2533
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนเชียงคำวิทยาคม	2536
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2541

ที่อยู่ปัจจุบัน 40 หมู่ 5 ถ. พิศาล ต. ห้วยวน อ. เชียงคำ จ. พะเยา 56110
เบอร์โทรศัพท์ (054) 429483
E-mail address pralongyut@yahoo.com

ผลงานวิจัย

- Chariyahpongpun P, Sripalwit P, Wongsawad C. 2000. Reinvestigated life history of *Moniliformis dubius* Meyer, 1933 in Chiang Mai, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 31 (Suppl 1) : 65-68.
- Nichapun A, Sripalwit P, Wongsawad C. 2000. Light and Scanning Electron Microscopy of the Trematode *Acanthostomum burmimis* in the Watersnake *Xenochrophis piscator*. JEMST, 14(1) : 17-22.
- Sripalwit P, Wongsawad C. 2000. The tegumental surface of the adult *Moniliformis dubius* Meyer, 1933 by scanning electron microscope. Songklanakarin J Sci Technol, 22(2) : 257-262.