

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก: การตรวจหาเชื้อพยาธิโดย Formalin-ether
concentration technique
วิธีเตรียม 10% buffered formalin
และตารางผลการทดลอง

Formalin-ether concentration technique

สารเคมี

1.อีเธอร์

2 10% formalin

วิธีทำ

- 1.ละลายอุจจาระ 2-3 กรัม ด้วยน้ำเกลือ 10 มล. แล้วกรองด้วยผ้าก๊อช 2 ชั้น
- 2.นำส่วนที่กรองได้ไปปั่นที่เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 1500-2300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1-2 นาที
- 3.เทส่วนที่เป็นน้ำออก เติมน้ำเกลือ 10 มล. ลงไปใหม่เพื่อละลายตะกอนแล้วนำไปปั่นใหม่ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง
- 4.นำตะกอนที่ได้ละลายใน 10% พอร์มาลีน ประมาณ 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
- 5.เติม อีเธอร์ ลงไป 2-3 มล. ปิดจุกแล้วเขย่าอย่างแรงแล้วเติม 10 % พอร์มาลีนลงไปอีกจนเป็น 10 มล.
- 6.นำไปปั่นอีกครั้งจะได้สารละลายเป็นชั้นๆ ชั้นบนสุดคือ อีเธอร์ , ไขมันที่ละลายใน อีเธอร์ ชั้น พอร์มาลีน และตะกอนตกอยู่ที่ก้น
- 7.ใช้ไม้เจาะชั้นไขมันที่ละลายใน อีเธอร์ เจาะไปรอบๆ แก้ว แล้วจึงเทสารละลายออก
- 8.นำตะกอนไปตรวจหาเชื้อพยาธิ

วิธีเตรียม 10% buffered formalin

formalin	2	ลิตร
NA ₂ HPO ₄	130	กรัม
NAH ₂ PO ₄ . H ₂ O	80	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

ตารางที่ ก การกระจายของพยาธิในลาใต้เล็กของแฮมสเตอร์หลังจากได้รับตัวอ่อน
ระยะติดต่อของพยาธิไปแล้วเป็นเวลา 1-16 สัปดาห์จำนวน 200 ตัว/สัตว์
ทดลอง 1 ตัว

เวลา ที่ สำรวจ สัตว์	จำนวนพยาธิที่พบในลาใต้เล็กแต่ละส่วนของสัตว์แต่ละตัว (ตัว)														
	ลาใต้ส่วนต้น					ลาใต้ส่วนกลาง					ลาใต้ส่วนปลาย				
	แฮมสเตอร์ตัวที่					แฮมสเตอร์ตัวที่					แฮมสเตอร์ตัวที่				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	27	13	28	25	18	108	57	108	117	123	13	65	21	15	32
2	19	9	9	19	32	86	31	40	51	71	31	60	78	73	50
3	19	7	88	6	14	37	37	65	25	47	50	84	23	130	70
4	37	9	0	67	2	69	27	30	60	8	43	52	44	22	44
5	4	2	0	1	2	12	6	2	1	13	2	14	25	34	70
6	2	1	3	0	3	5	9	14	11	18	7	15	29	6	21
7	2	0	3	0	0	8	6	13	14	2	20	11	12	20	16
8	8	19	19	-	17	13	31	32	-	35	8	25	12	-	11
9	9	24	0	2	2	14	48	1	11	6	5	22	4	4	11
10	1	20	1	2	0	11	8	3	9	1	7	26	3	0	4
11	11	11	0	0	10	9	12	8	12	5	16	7	5	7	8
12	16	4	13	1	7	11	12	15	2	6	14	5	4	5	5
13	7	9	0	1	2	8	4	3	9	5	11	9	6	7	9
14	9	1	0	0	0	11	10	2	2	6	10	6	3	5	5
15	0	0	0	0	0	6	3	9	6	3	6	4	3	0	1
16	2	0	17	0	0	1	4	12	2	1	1	4	0	1	0

หมายเหตุ สัปดาห์ที่ 8 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 4 ตัว

ตาราง ข ผลของ ELISA โดยใช้พยาธิตัวแก่ของ *H. taichui* เป็นแอนติเจนและใช้ซีรัม
ของแฮมสเตอร์ที่ถูกล้างให้ติดเชื้อแล้ว 1-16 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	OD.1	OD.2	ค่าเฉลี่ย (mean)	ค่า OD.ปรับแล้ว
1	.076	.074	.075	.069
2	.309	.322	.315	.294
3	.244	.254	.249	.232
4	.530	.525	.527	.492
5	.341	.342	.341	.318
6	.496	.502	.499	.465
7	.280	.281	.280	.261
8	.960	.966	.963	.898
9	1.041	1.013	1.027	.958
10	.680	.703	.691	.645
11	.486	.488	.487	.454
12	.656	.661	.658	.614
13	1.117	1.131	1.124	1.048
14	.329	.333	.331	.308
15	.468	.475	.471	.439
16	.797	.780	.788	.735
negative control	.072	.072	.072	.067
positive control	1.027	1.117	1.072	1.00

ค่า OD.เฉลี่ย

ปรับ OD = _____

ค่าเฉลี่ยของ positive control

ตาราง ค ผลของ ELISA โดยใช้ตัวอ่อนระยะติดตัวของ *H. taichui* เป็นแอนติเจน
และใช้ซีรัมของแฮมสเตอร์ ที่ถูกทำให้ติดเชื้อมาแล้ว 1-16 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	OD.1	OD.2	OD.3	ค่าเฉลี่ย (mean)	ค่า OD.ปรับ แล้ว
1	.090	.089	.088	.089	.096
2	.276	.290	.290	.285	.309
3	.146	.148	.146	.147	.159
4	.223	.216	.221	.220	.238
5	.258	.250	.257	.255	.276
6	.285	.329	.317	.310	.336
7	.245	.248	.246	.246	.267
8	.476	.471	.452	.466	.505
9	.564	.570	.589	.574	.622
10	.769	.811	.842	.807	.874
11	.288	.283	.297	.289	.313
12	.348	.346	.323	.339	.367
13	.862	.880	.838	.860	.931
14	.256	.270	-	.263	.285
15	.292	.294	-	.293	.317
16	.450	.361	-	.406	.439
negative control	.115	.108	.101	.108	.116
positive control	.941	.916	.914	.924	1.00

หมายเหตุ สัปดาห์ที่ 14, 15, 16 วัด optical density 2 ค่า (OD1 และ OD2)

ภาคผนวก ข: การเตรียมสารละลายสำหรับ ELISA

1. Coating buffer (Carbonate buffer PH 9.6)		
Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
NaHCO ₃	2.93	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
2. Incubation buffer		
NaCl	8.9	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.28	กรัม
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	0.15	กรัม
Tween 20	0.5	มล.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
3. Washing buffer (10x)		
NaCl	90	กรัม
Tween 20	5	มล.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
4. 0.2 M Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O PH 8.9		
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	35.95	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
5. 0.1 M citric acid PH 2.5		
H ₃ C ₆ O ₇ . H ₂ O	5.25	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	250	มล.
6. Stop reaction solution (4 N.H ₂ SO ₄)		
Conc H ₂ SO ₄	35	มล.
น้ำกลั่น	215	มล.
7. 5 % skim milk ใน carbonate buffer		
skim milk	2	กรัม
Carbonate buffer	40	มล.
8. 2 % skim milk ใน Incubation buffer		
skim milk	2	กรัม
Incubation buffer	100	มล.

9. 1 : 100 H_2O_2

H_2O_2	1	มล.
น้ำกลั่น	99	มล.

10. Substrate Solution (เตรียมก่อนใช้)

สารละลาย	1 plate	2 plate
0.1 M citric acid (มล.)	6.03	10.05
0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (มล.)	6.20	10.34
1 : 100 H_2O_2 (มล.)	0.245	0.408
OPD (เม็ด)	3	5

ภาคผนวก ค: การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE
และ Immunoblot

1. 30 % T Acrylamide		
Acrylamide	30	กรัม
Bis-acrylamide	0.8	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	100	มล.
2. 0.5 M Tris HCl PH 6.8		
Tris	24.22	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	400	มล.
3. 1.5 M Tris HCl PH 8.8		
Tris	72.68	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	400	มล.
4. 10 % SDS		
SDS	1	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	10	มล.
5. 10 % Ammonium persulfate		
Ammonium persulfate	10	ไมโครกรัม
น้ำกลั่น	100	ไมโครลิตร
6. 4 % stacking gel		
30 % T Acrylamide	0.53	มล.
0.5 M Tris HCl PH 6.8	1.00	มล.
น้ำกลั่น	2.43	มล.
10 % SDS	40	ไมโครลิตร
10 % Ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร
Temed	12.5	ไมโครลิตร
รวม	4.037	มล.
7. 11 % Separating gel		
30 % T Acrylamide	3.2	มล.
1.5 M Tris HCl pH 8.8	2	มล.
น้ำกลั่น	2.8	มล.
10 % SDS	80	ไมโครลิตร
10 % Ammonium persulfate	45	ไมโครลิตร

	Temed	10	ไมโครลิตร
	รวม	8.124	มล.
8.	Electrode running buffer PH 8.3 (5x)		
	Tris	9	กรัม
	Glycine	43.2	กรัม
	SDS	3	กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	600	มล.
9.	Sample buffer		
	น้ำกลั่น	14	มล.
	0.5 M Tris PH 6.8	5	มล.
	Glycerol	10	มล.
	10 % SDS	8	มล.
	0.2 % Bromophenol blue	1	มล.
	รวม	38	มล.
10.	0.2 % Bromophenol blue		
	Bromophenol blue	0.02	มก.
	น้ำกลั่น	10	มล.
11.	สีย้อม Coomasie brilliant blue		
	Methanol	80	มล.
	Acetic acid	20	มล.
	น้ำกลั่น	100	มล.
	Coomasie brilliant blue	0.2	กรัม
12.	Destain Coomasie brilliant blue		
	Methanol	200	มล.
	Acetic acid	50	มล.
	น้ำกลั่น	250	มล.
13.	สีย้อม Amido Black		
	Methanol	90	มล.
	Acetic acid	20	มล.
	น้ำกลั่น	90	มล.

	Amido Black	0.2	กรัม
14.	Destain Amido Black		
	Methanol	180	มล.
	Acetic acid	4	มล.
	น้ำกลั่น	16	มล.
15.	Towbin buffer		
	Tris	3.03	กรัม
	Glycine	14.4	กรัม
	Methanol	200	มล.
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
16.	TBS		
	Tris	1.21	กรัม
	เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. ปรับ PH เป็น 8.0 ก่อน		
	NaCl	8.76	กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.
17.	TBST		
	TBS	1,000	มล.
	Tween 20	0.5	มล.
18.	Blocking solution		
	TBST	100	มล.
	Skim milk	5	กรัม
19.	Substrate buffer		
	Tris	12.11	กรัม
	เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. ปรับ PH เป็น 9.5 ก่อน		
	NaCl	5.84	กรัม
	MgCl ₂ . 6H ₂ O	10.16	กรัม
	ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น	1,000	มล.

20. การย้อมเจสด้วย Silver nitrate plus kit (Bio-Rad Catalog Number 161-0449)

20.1 เตรียม Development Accelerator Reagent

ใส่ Deionized water 475 มล. ใน กระบอกตวง ที่มีแท่งแม่เหล็ก เติม Development accelerator Reagent ที่ละน้อยจนหมด พร้อมกับกวนด้วยเครื่องกวนไปด้วย จากนั้นเติม Deionized water ให้ครบ 500 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

วิธีทำ

1. Fixing step ผสมสารดังนี้

Methanol	100	มล.
Acetic acid	20	มล.
Deionized water	70	มล.
Fixative Enhance concentrate	10	มล.
รวม	200	มล.

ใช้แช่เจส 20-30 นาที

2. Rinse step

เท Fixative ทิ้ง แล้วล้างด้วย Deionized water 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

3. Staining และ Developing Step ผสมสารละลายดังนี้

Deionized water	35	มล.
Silver complex solution	5	มล.
Reduction moderator solution	5	มล.
Image Development Reagent	5	มล.

ผสมแล้วกวนให้เข้ากันอย่างแรง (โดยใช้เครื่องกวน) แล้วเติม Development Accelerator Reagent 50 มล. จากนั้นเทสารละลายลงใส่เจส เขย่าไปมาประมาณ 10 นาที หรือจนเห็นแถบสี ขึ้นตามความพอใจ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 5 % acetic acid solution