

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อและสารเคมี

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด K-199

1. M-199	50	มิลลิลิตร
(M-199 1 ซอง + NaHCO_3 2.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร)		
2. สารละลายเกลือแร่ (salt mixture)	10	มิลลิลิตร
3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	มิลลิลิตร
(ละลาย NaCl 11 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร)		
4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10	มิลลิลิตร
(ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร)		
2. สารละลายแอลกลูตามีน (L-glutamine)	1	มิลลิลิตร
(L-glutamin 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด $0.22 \mu\text{m}$)		
3. HEPES	0.238	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้อยู่ในช่วง 7.3-7.6

หมายเหตุ สารละลายเกลือแร่ (salt mixture) ประกอบด้วย

โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	3.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3.0	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร		

สารเคมีในการวิเคราะห์ Prophenoloxidase Activity

1. สารละลาย cacodylate buffer pH 7.4

ผสมสารละลาย 0.2 M Sodium cacodylate ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลาย 0.2 M HCl ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 47.3 มิลลิลิตร

2. L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

L-dihydroxyphenylalanine 4 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3. สารละลายทริปซิน

เตรียมจาก 0.1% ทริปซินใน cacodylate buffer

สารเคมีในการวิเคราะห์ Phagocytic Activity

1. สารละลาย Shrimp saline

- NaCl	28.4 กรัม
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	10.0 กรัม
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 กรัม
- $CaCl_2 \cdot H_2O$	2.25 กรัม
- KCl	0.7 กรัม
- Glucose	1.0 กรัม
- Hepes	2.38 กรัม

ผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 μm ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. Heat – Killed yeast

2.1 นำ Baker's yeast 0.5 กรัม มาละลายใน 0.9% NaCl 250 มิลลิลิตร แล้วต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 หลังจากนั้นทำการล้างด้วย Shrimp saline ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที 5 ครั้ง

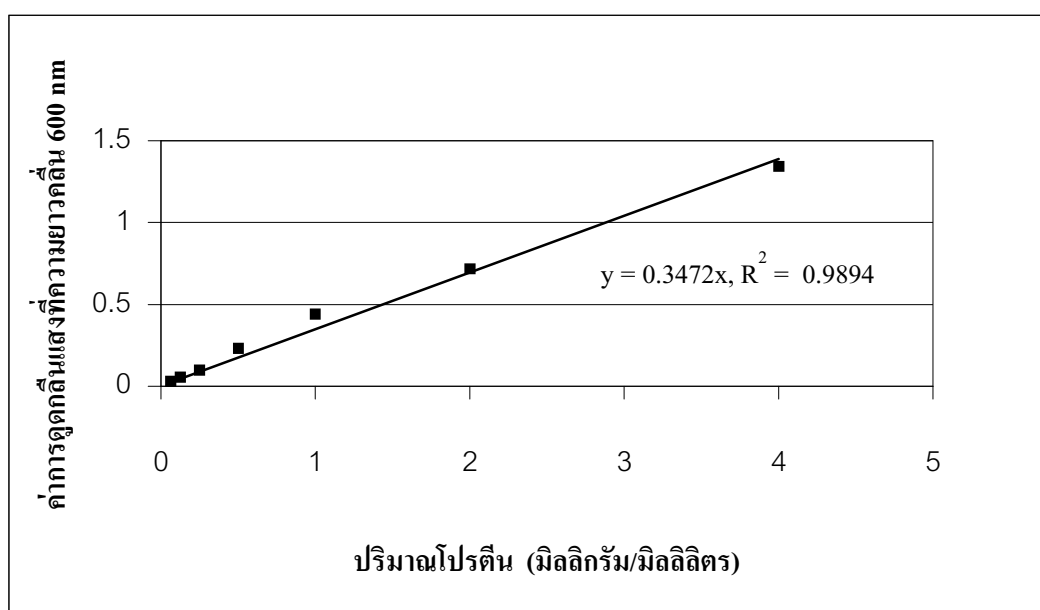
2.3 นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ละลายด้วย Shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ความเข้มข้นของโปรตีน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
4	1.345
2	0.719
1	0.44
0.5	0.23
0.25	0.098
0.125	0.054
0.0625	0.028



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

