บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สัตว์ทดลอง

ปลาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียและปลาดุกอาฟริกันเพศผู้ เลี้ยงในอ่างกระจกขนาด 36X36X60 เซนติเมตร^3 บรรจุน้ำ 24 ลิตร น้ำหนักปลาตัวละ 80-100 กรัม

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A,Shimadzu)

2.2.2 Tissue homogenizer (Thomas type NSI-12)

2.2.3 High-speed centrifuge (IBM-22M)

2.2.4 Water bath (EYELA SB-35,Tokyo Rikakikai Co.,Ltd)

2.2.5 Standard pH meter (EA 920,Orion research)

2.2.6 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S,Sartorious)

2.2.7 Vortex mixer (Torika mixer MA-1)

2.3 สารเคมี

2.3.1 Potassium chloride (Riedel-de Haen AG.)

2.3.2 Potassium dihydrogen phosphate (Merck)

2.3.3 Di-sodium hydrogen phosphate (Merck)

2.3.4 Glycerine (Farmitalia Carlo erbar)

2.3.5 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka chemical company)

2.3.6 β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NADH) (Sigma chemical company)

2.3.7 Ethanol (J.J.Baker)

2.3.8 Bio-rad protein assay reagent (Bio-Rad Inc.)

2.3.9 Bovine-serum albumin (Bio-Rad Inc.)

2.3.10 Sodium dithionite (Fluka chemical)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.11 Tris[hydroxymethyl]-aminomethane hydrochloride (TRIZMA) (Sigma chemical (Sigma chemical company)

2.3.12 Methylparathion (J.J.Baker) (Technical grade 92.4%)

2.3.13 Bis(tri-n-butyl)oxide (Fluka chemical)(technical grade 97%)

2.3.14 Gas carbon monoxide (Thai industrial gas)

2.4 การเตรียมสารเคมี

2.4.1 1.15% potassium chloride

เตรียมโดยชั่งโปตัสเซียมคลอไรด์ 11.5 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บสารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 TRIZMA 0.1 M pH5

เตรียมโดยการชั่ง TRIZMA 1.576 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.3 β-NADH solution (5มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เตรียมโดยการชั่ง β-NADH 10 มิลลิกรัม นำมาละลายใน TRIZMA 0.1M จำนวน 2 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.4 bovine serum albumin (1.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

นำขวดซึ่งบรรจุ Bovine serum albumin (Bio-Rad Inc.) มาเติมน้ำกลั่นจำนวน 20 มิลลิลิตร จะได้ protein standard solution ที่มีความเข้มข้น 1.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน

2.4.5 การเตรียม Bio-Rad protein assay reagent

นำ dye reagent (Bio-Rad Inc.) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 2 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.6 สารละลายบัฟเฟอร์ A pH 7.4

เตรียมโดยการชั่งโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2.681 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 11.3994 กรัม และ โปตัสเซียมคลอไรด์ จำนวน 11.18 กรัม นำสารละลายทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.7 สารละลายบัฟเฟอร์ B pH 7.4

เตรียมโดยการชั่งโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2.681 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 11.3994 กรัม ไดไธโอไตรอิตอล จำนวน 0.1543 กรัม และกลีเซอรีน จำนวน 200 มิลลิลิตร นำสารทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.8 การเตรียมเมททิลพาราไธออน

นำเมททิลพาราไธออน(92.4%) 10.82 มิลลิลิตร เติมเอธานอลให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ที่ความเข้มข้น 100,000 ppm แล้วนำมาผสมกับน้ำที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลาจนได้ความเข้มข้น 0.1-5.0 ppm

2.4.9 การเตรียมไตรบิวทิลติน

นำ bis(tri-n-butyltin)oxide (97%) จำนวน 10.3 ไมโครลิตร เติมเอธานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ไตรบิวทิลติน stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 10,000 ppb นำ stock solution ที่ได้ มาผสมกับน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา จนได้ความเข้มข้น 0.1-4.0 ppb

2.4.10 การเตรียมเมททิลพาราไธออน 0.1-1.0 mM

นำเมททิลพาราไธออน(92.4%) จำนวน 525 ไมโครลิตร มาเติมเอธานอลจนได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ stock solution ของเมททิลพาราไธออนที่มีความเข้มข้น 10 mM แล้วจึงนำมาเจือจางด้วยเอธานอลจนได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 mM

2.4.11 การเตรียมไตรบิวทิลติน 0.1-1.0 mM

นำ bis(tri-n-butyltin)oxide (97%) จำนวน 1.31 มิลลิลิตร มาเติมเอธานอลจนได้ปริมาตรรวมเป็น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ stock solution ของไตรบิวทิลตินที่มีความเข้มข้น 10 mM แล้วนำมาเจือจางด้วยเอธานอลได้ความเข้มข้น 0.1-1.0 mM

2.5 การเตรียมไมโครโซม

นำปลาดุกมาทำให้สลบด้วยวิธีแช่แข็งนาน 60 นาที แล้วผ่าท้องทันที เพื่อแยกเอาเฉพาะตับออกมาชั่งน้ำหนักแล้วล้างด้วยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่แช่เย็นจัด หลาย ๆครั้งจนสารละลายที่ใช้ล้างไม่มีสีเลือดปน ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วย homogenizerในบัพเฟอร์A จากนั้นนำไปcentrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเอาส่วนของเนื้อเยื่อทิ้งไปเทเอาเฉพาะส่วน supernatant มา centrifuge ซ้ำอีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วน supernatant มาcentrifuge ที่ 20,000 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง จะได้ส่วนที่เป็น microsomal fraction นำ pellet ที่ได้มา suspend ในบัพเฟอร์B จำนวน 5 มิลลิลิตร น้ำหนักตับ 1กรัม เก็บไมโครโซมไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาศึกษา

2.6 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนจากไมโครโซมที่เตรียมไว้โดยประยุกต์วิธีของ Bradford(1979) ด้วยชุดน้ำยาของ Bio-Rad มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.6.1 เตรียม dye reagent โดยเจือจาง dye reagent concentrate ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

2.6.2 เตรียม standard protein โดยใช้ bovine serum albumin (1.35มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 202.5,405,675 และ 810.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.6.3 ปิเปต standard protein ที่เตรียมไว้จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน standard tube

2.6.4 ปิเปตไมโครโซมจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน sample tube

2.6.5 เตรียม blank สำหรับ standard tube โดยปิเปตน้ำกลั่นจำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.6 เตรียม blank สำหรับ sample tube โดยปิเปตบัฟเฟอร์Bจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.7 เติม dye reagentในข้อหนึ่ง จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนแล้วนำไปปั่นด้วย vortex mixer

2.6.8 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 10 นาที

2.6.9 นำสารละลายใน standard tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

2.6.10 นำสารละลายใน sample tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

2.6.11 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกนX) กับค่าการดูดกลืนแสง(แกนY)

2.6.12 คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนใน sample tube โดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 2.6.10

2.7 วิธีหาระดับไซโตโครมพี 450และไซโตโครมพี 420

วัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมพี 420 จากไมโครโซมที่เตรียมไว้โดยประยุกต์วิธีการของ Stegman , Binder และ Orren(1979) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.7.1 นำไมโครโซมที่เตรียมไว้จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (ไมโครโซมที่นำมาวัดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.25-2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2.7.2 เติมสารละลาย β-NADH (5มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตรจากนั้นผสมให้เข้ากันดี

2.7.3 นำไปเติมก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์นานประมาณ 15-20 วินาที

2.7.4 แบ่งสารละลายใส่ลงใน cuvette 2 อัน ปิดฝากำหนดเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.7.5 วัดการดูดกลืนแสงที่ 350 -500 นาโนเมตร

2.7.6 เติมโซเดียมไดไธโอไนท์ จำนวน 2-3 มิลลิกรัม ในsample cuvette ผสมให้เข้ากันดี แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.7.7 คำนวณปริมาณไซโตโครมพี 450 ได้จากสูตร

$$\text{Total Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)} = \frac{\Delta \text{ ABS (450-490) X 1,000}}{\text{91 X protein concentration}}$$

โดยใช้ค่า extinction coefficient ของ cytochrome P-450 เท่ากับ 91 $mM^{-1}. cm.^{-1}$

Δ ABS (450-490) = ผลต่างการดูดกลืนแสงที่450และ490นาโนเมตร

protein concentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัด โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.7.8 คำนวณหาระดับไซโตโครมพี 420

การคำนวณหาระดับไซโตโครมพี 420 วัดได้จากการวัดระดับไซโตโครมพี 450 โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Cytochrome P-420 (nmol/mg protein)} = \frac{(A_{420-490})_{observed} - (A_{420-490})_{theoretical} - (A_{420-490})_{baseline}}{0.11}$$

เนื่องจากเติมโซเดียมไดไธโอไนท์เข้าไปใน sample cuvette เพื่อให้ได้สเปคตรัมที่แตกต่างกันของ reduced CO กับ oxidised CO ดังนั้น

ค่า extinction coefficient ของ 450-490 = 106 $mM^{-1}cm^{-1}$

$(A_{420-490})_{observed}$ = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่420 และ490นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$(A_{420-490})_{theoretical}$ = (nmol Cytochrome P-450/nmol/mg protein)X(-0.041)

extinction coefficient ของ 420-490 เท่ากับ $-41\ mM^{-1}cm^{-1}$

$(A_{420-490})_{baseline}$ = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 และ 490 นาโนเมตร

2.8 วิธีหาระดับไซโตโครมบี 5

หาระดับไซโตโครมบี 5 จากไมโครโซมที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์วิธีการของ Stegman และคณะ(1979) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.8.1 นำไมโครโซมจำนวน 2 มิลลิลิตร มาแบ่งใส่ cuvette 2อัน แบ่งเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.8.2 นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.8.3 เติมสารละลาย β-NADH (5มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตรลงใน sample cuvette ผสมให้เข้ากันดีวัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.8.4 คำนวณไซโตโครมบี 5 จากสูตร

$$\text{Cytochrome b 5 (nmol/mg protein)} = \frac{\Delta \text{ ABS (425-410) X 1,000}}{\text{185 X protein concentration}}$$

โดยใช้ค่า extinction coefficient ของไซโตโครมบี 5 เท่ากับ $185\ mM.^{-1}cm.^{-1}$

Δ ABS (425-410) = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 และ 410 นาโนเมตร

protein concentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัด มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.9 วิธีการทดลอง

2.9.1 ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 4 ตัว แยกเอาตับมาผ่านการเตรียมไมโครโซมจากนั้น suspend ไมโครโซมในบัพเฟอร์B จำนวน 30 มิลลิลิตร แล้ววัดระดับไซโตโครมพี 450 และระดับไซโตโครมบี 5 ทั้งหมด 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.9.2 ประเมินความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 10 ตัวโดยแบ่งปลาออกเป็นกลุ่มๆ ละ 2 ตัว แยกเอาตับมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซมแล้วsuspend ไมโครโซมที่ได้จากปลา 2 ตัวในบัพเฟอร์B จำนวน 15 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 5 ส่วน แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ตามระยะเวลาที่กำหนดคือวันที่แยกได้ (0) และหลังจากนั้น 1,2,4และ 7 วัน ตามลำดับ

2.9.3 การศึกษาผลภายในร่างกายของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

2.9.3.1 แบ่งจำนวนปลาออกเป็น 11 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กำหนดปลาดุก 3 ตัวต่อ 1 ตัวอย่าง ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง โดยมีขั้นตอนการทำแต่ละครั้งดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมให้ เอธานอล 1.2 มิลลิลิตร/24ลิตร
กลุ่มที่ 2 ให้เมททิลพาราไธออน 0.1 ppm
กลุ่มที่ 3 ให้เมททิลพาราไธออน 0.2 ppm
กลุ่มที่ 4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 ppm
กลุ่มที่ 5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 ppm
กลุ่มที่ 6 ให้เมททิลพาราไธออน 1.5 ppm
กลุ่มที่ 7 ให้เมททิลพาราไธออน 2.0 ppm
กลุ่มที่ 8 ให้เมททิลพาราไธออน 2.5 ppm
กลุ่มที่ 9 ให้เมททิลพาราไธออน 3.0 ppm
กลุ่มที่ 10 ให้เมททิลพาราไธออน 4.0 ppm
กลุ่มที่ 11 ให้เมททิลพาราไธออน 5.0 ppm

ในแต่ละกลุ่มจะเลี้ยงปลาจำนวน 3 ตัวในอ่างกระจกขนาด 36X36X60 เซนติเมตร^3 ปริมาตรน้ำ 24 ลิตร ก่อนทำการศึกษานาน 1 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นนำเมททิลพาราไธออนที่เตรียมไว้ใส่ลงในอ่างที่เลี้ยงปลาตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากนั้นเลี้ยงและให้อาหารตามปกติจนครบ 96 ชั่วโมง นำปลามาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม

2.9.3.2 นำไมโครโซมของตัวอย่างที่ได้มาตรวจหาการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 ไซโตโครมบี 5

2.9.4 การศึกษาผลภายนอกร่างกายของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมปลาดุกพันธุ์ผสม โดยทำการทดลองออกเป็น 10 ครั้ง แต่ละครั้งมีขั้นตอนการทำดังนี้

2.9.4.1 แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุมให้ 2% เอธานอล
กลุ่มที่2 ให้เมททิลพาราไธออน 0.1 mM
กลุ่มที่3 ให้เมททิลพาราไธออน 0.2 mM
กลุ่มที่4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 mM
กลุ่มที่5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 mM

ในแต่ละกลุ่มใช้ไมโครโซมจำนวน 2 มิลลิลิตร ในกลุ่มที่ 1 นำไปเติมเอธานอล ที่เหลืออีก 4 กลุ่มเติมเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.5 , 1.0 mM จำนวน 40µl แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.9.4.2 นำไปวัดระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 ไซโตโครมบี 5

2.9.5 การศึกษาผลภายในร่างกายของไตรบิวทิลตินต่อ ระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

2.9.5.1 แบ่งจำนวนปลาออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กำหนดให้ปลาตุก 3ตัวเท่ากับ 1 ตัวอย่าง ทำการทดลอง 10 ครั้งโดย แต่ละครั้งมีขั้นตอนการทำดังนี้

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุมให้ เอธานอล 1มิลลิลิตร/24ลิตร
กลุ่มที่2 ให้ไตรบิวทิลติน 0.1 ppb
กลุ่มที่3 ให้ไตรบิวทิลติน 0.2 ppb
กลุ่มที่4 ให้ไตรบิวทิลติน 0.5 ppb
กลุ่มที่5 ให้ไตรบิวทิลติน 1.0 ppb
กลุ่มที่6 ให้ไตรบิวทิลติน 2.0 ppb
กลุ่มที่7 ให้ไตรบิวทิลติน 3.0 ppb
กลุ่มที่8 ให้ไตรบิวทิลติน 4.0 ppb

ในแต่ละกลุ่มเลี้ยงปลาไว้จำนวน 3 ตัวในอ่างกระจกขนาด 36X36X60 เซนติเมตร^3 ก่อนทำการศึกษาจะเลี้ยงปลาไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นจะนำไตรบิวทิลตินที่เตรียมไว้ลงในอ่างกระจกตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากนั้นเลี้ยงและให้อาหารตามปกติจนครบ 96 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำปลามาผ่านการเตรียมไมโครโซม

2.9.5.2 นำไมโครโซมที่ได้ไปวัดระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 และไซโตโครมบี 5

2.9.6 การศึกษาผลภายนอกร่างกาย ของไตรบิวทิลตินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5ใน ไมโครโซมปลาดุกพันธุ์ผสม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 10 ครั้ง แต่ละครั้งมีขั้นตอนการทำดังนี้

2.9.6.1 แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่1 กลุ่มควบคุมให้ 2% เอธานอล
กลุ่มที่2 ให้ไตรบิวทิลติน 0.1 mM
กลุ่มที่3 ให้ไตรบิวทิลติน 0.2 mM
กลุ่มที่4 ให้ไตรบิวทิลติน 0.5 mM
กลุ่มที่5 ให้ไตรบิวทิลติน 1.0 mM

ในแต่ละกลุ่มใช้ไมโครโซมจำนวน 2 มิลลิลิตร ในกลุ่มที่1 เติมเอธานอล ในกลุ่มที่ 2,3,4 และกลุ่มที่5 เติมไตรบิวทิลตินตามความเข้มข้นต่าง ๆจำนวน 40µl แล้วนำไป incubate ด้วยไตรบิวทิลตินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.9.6.2 นำไปวัดการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 และไซโตโครมบี 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1 ใช้ ANOVA ชนิด oneway และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (เติมศรี ชำนิจารกิจ,2531)

2 หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 และไซโตโครมบี 5 กับความเข้มข้นของสารเคมีโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression equation) $Y = a+b \log(x)$ และ $Y = a+bx$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย