บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียและปลาดุกรัสเซียเพศผู้ ขนาดน้ำหนักปลาตัวละ 100 -200 กรัม นำมาเลี้ยงไว้ในบ่อปูนซีเมนต์ก่อนทำการทดลอง

2.2 เครื่องมือ

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

2.2.2 Tissue homogenizer (Thomus type NSI-12)

2.2.3 Refrigerated centrifuge (Hitashi 20PR-520D)

2.2.4 Ultracentrifuge (Hitashi 55P-72)

2.2.5 Standard pH meter (EA 920,Orion Research)

2.2.6 เครื่องชั่งละเอียด (A200S,Satorious)

2.3 สารเคมี

2.3.1 potassium dihydrogen phosphate (E - MERCK)

2.3.2 potassium chloride (E - MERCK)

2.3.3 Di-sodium hydrogen phosphate (E - MERCK)

2.3.4 Glycerine (Farmitalia Carlo Erbar)

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

2.3.6 β-reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADPH) (Sigma Chemical Company)

2.3.7 β- reduced nicotinamide adenine dinucleotide (β-NADH) (Sigma Chemical Company)

2.3.8 Ethanol (J.J. Baker)

2.3.9 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Inc. catalog no. 500-0006)

2.3.10 Bovine serum albumin (Bio- Rad Inc.)

2.3.11 Tris (Hydroxymethyl) - aminometane hydrochloride (TRIZMA) (Sigma Chemical Company)

2.3.12 Sodium dithionite (Fluka Chemical)

2.3.13 Gas carbon monoxide (Thai Industrial Gas)

2.3.14 Sodium nitrite (E - Merck)

2.3.15 Horse heart cytochrome C (Sigma Chemical Company)

2.3.16 Sodium hydroxide (E-Merck)

2.4 การเตรียมสารเคมี

2.4.1 1.15% โปตัสเซียม คลอไรด์

เตรียมโดยการชั่งโปตัสเซียมคลอไรด์ 11.5 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บสารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 0.1 M TRIS, pH5

เตรียมโดยการชั่ง Tris[hydroxymethyl] - aminomethane hydrochloride 1.576 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรปรับ pH ให้ได้ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M และเก็บสารละลายในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.3 β-NADH solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เตรียมโดยการชั่ง β- NADH 5 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายในสารละลาย 0.1M TRIS จำนวน1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.4 bovine serum albumin (1.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

นำขวดที่บรรจุ bovine serum albumin (Bio-Rad-Inc.) มาเติมน้ำกลั่นจำนวน 20 มิลลิลิตร จะได้ protein standard solution ที่ความเข้มข้น 1.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 6 เดือน

2.4.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ A pH 7.1

เตรียมโดยการชั่งโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 2.6810 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 11.3994 กรัม และโปตัสเซียมคลอไรด์จำนวน 11.180 กรัม นำสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4ด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.6 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ B pH 7.4

เตรียมโดยการชั่งโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 2.6810 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 11.3994 กรัม ไดไธโอไตรอิตอลจำนวน 0.1543 กรัม และกลีเซอรีนจำนวน 200 มิลลิลิตร นำสารทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.7 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M

เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2.4.8 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.3 M (pH 7.7)

เตรียมโดยการชั่งสารโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 0.034 กรัม และสารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 0.993 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ให้เท่ากับ 7.7 ด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

2.4.9 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM (pH 7.7)

เตรียมโดยการชั่งสารโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.136 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1M ให้ได้ pH เท่ากับ 7.7

2.4.10 Cytochrome C solution (0.50mM)

เตรียมโดยการชั่ง Horse heart cytochrome C จำนวน 0.012 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM จำนวน 2 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2.4.11 β-NADPH solution (10 mM)

เตรียมโดยการชั่ง β-NADH 8.2 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายในสารละลาย 0.1 M TRIS จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.12 การเตรียมเมททิลพาราไธออน

เตรียม stock เมททิลพาราไธออน 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากเมททิลพาราไธออน 94 % w/w โดยการชั่งเมททิลพาราไธออน จำนวน 10.638 กรัม ละลายในเอธานอลให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5 การเตรียมไมโครโซม

นำปลาดุกมาทำให้สลบโดยการแช่แข็งนาน 30 นาที แยกเอาเฉพาะตับมาชั่งหนักแล้วล้างให้สะอาดด้วยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่แช่เย็น ล้างตับหลายๆ ครั้งจนกระทั่งสารละลายที่ใช้ล้างไม่มีสีเลือดปน ใช้กรรไกรตัดตับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ล้างให้สะอาดด้วยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์อีกครั้ง หลังจากนั้นนำไปบดให้ละเอียดโดย homogenizer ในบัฟเฟอร์ A และนำไป centrifuge ใน refrigerated centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที (12,074 g) นาน10 นาที แยกเอาส่วนของเนื้อเยื่อทิ้งไปเอาเฉพาะส่วน supernatant มา centrifuge อีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เทเอาส่วน supernatant มา centrifuge ต่อใน ultra centrifuge ที่ 40,000 รอบต่อนาที (105,400g)นาน 1 ชั่วโมง จะได้ pelleted microsomal fraction นำ pellet ที่ได้มา suspend ในบัฟเฟอร์ B จำนวน 5 มิลลิลิตรต่อตับปลา 1 กรัม เก็บไมโครโซมที่ได้นี้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการศึกษา

2.6 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนจากไมโครโซมที่เตรียมไว้โดยประยุกต์วิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ชุดน้ำยาของ Bio-Rad มีขั้นตอนดังนี้

2.6.1 เตรียม dry reagent โดยเจือจาง dry reagent concentrate ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1

2.6.2 เตรียม standard protein โดยใช้ bovine serum albumin (1.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง โดยทำให้เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 94.3, 188.7, 377.5 และ 755 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.6.3 ปิเปต standard protein ที่เตรียมไว้จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงใน standard tube

2.6.4 ปิเปตไมโครโซมจำนวน 100 ไมโครลิตรลงใน sample tube

2.6.5 เตรียม blank สำหรับ standard tube โดยปิเปตน้ำกลั่นจำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.6 เตรียม blank สำหรับ sample tube โดยปิเปตบัฟเฟอร์ B จำนวน 100 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.7 เติม dry reagent ในข้อ 1 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดที่เตรียมไว้ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

2.6.8 นำสารละลายใน standard tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

2.6.9 นำสารละลายใน sample tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

2.6.10 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน x)

2.6.11 คำนวนความเข้มข้นของโปรตีนใน sample tube โดยใช้กราฟมาตรฐานในข้อ 2.6.10

2.7 วิธีวัดระดับไซโตโครมบี 5 ไซโตโครมพี450 และ ไซโตโครมพี 420

วัดระดับไซโตโครมบี 5 ไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมพี 420 จากไมโครโซมที่เตรียมไว้โดยประยุกต์วิธีการของ Stegman, Binde และ Orren (1979) ซึ่งมีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.7.1 นำไมโครโซมที่เตรียมไว้จำนวน 2 มิลลิลิตร แบ่งใส่ cuvette 2 อัน ปิดฝาแบ่งเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.7.2 นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.7.3 เติมสารละลาย β-NADH (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตรลงใน sample cuvette แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.7.4 คำนวนหาระดับไซโตโครมบี 5 จากสูตร

$$\text{cytochrome b5 (nmol/mg)} = \frac{\Delta \text{ ABS (425-410)} \times 1{,}000}{185 \times \text{protein concentration}}$$

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

ABS (425-410) = ผลต่างของการดูดกลืนแสงที่ 425 และ 410 นาโนเมตร

protein concentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัด โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7.5 ไมโครโซมในข้อ 2.7.4 ใส่หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร ไปเติมก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์นานประมาณ 15-20 วินาที แล้วผสมให้เข้ากัน

2.7.6 แบ่งสารละลายในข้อ 2.7.5 ลงใน cuvette 2 อัน ปิดฝากำหนดเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.7.7 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.7.8 เติมโซเดียมไดไธโอไนท์ จำนวน 2-3 มิลลิกรัม ใน sample cuvette ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 350-500 นาโนเมตร

2.7.9 คำนวนหาระดับไซโตโครมพี 450 ได้จากสูตร

$$\text{cytochrome P-450 (nmol/mg protein)} = \frac{\text{ABS (450-490)} \times 1{,}000}{91 \times \text{protein concentration}}$$

โดยใช้ค่า extinction coefficient ของไซโตโครมพี 450 เท่ากับ 91 $mM^{-1}.cm^{-1}$

Δ ABS (450 - 490) = ผลต่างของการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 490 นาโนเมตร

protein cocentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัดโดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7.10 คำนวนหาระดับไซโตโครมพี 420

การคำนวนหาระดับไซโตโครมพี 420 ได้จากการวัดระดับไซโตโครมพี 450 โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{cytochrome P-420 (nmol/mg protein)} = \frac{(A_{420-490})_{observed} - (A_{420-490})_{theoretical} - (A_{420-490})_{baseline}}{0.110}$$

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

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

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

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

2.8 วิธีการวัดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

วัดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสจากไมโครโซมที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์วิธีการของ Phillips และ Langdon (1962) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.8.1 นำไมโครโซมใส่ใน cuvette 2 อันๆละ 820 ไมโครลิตร แบ่งเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.8.2 เติมสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.3 mM) ลงใน cuvette ทั้ง 2 อัน จำนวน 100 ไมโครลิตร

2.8.3 เติมสารละลาย Horse heart cytochrome C (0.50 mM) ลงใน cuvette ทั้ง 2 อัน จำนวน 80 ไมโครลิตร

2.8.4 ผสมสารละลายใน cuvette ทั้ง 2 อันให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร นาน 3 นาที

2.8.5 เติมสารละลาย β- NADPH (10 mM) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน sample cuvette ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร นาน 3 นาที

2.8.6 คำนวนหาสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสโดยใช้สูตรดังนี้

$$\frac{\Delta A_{550}/\text{min}}{0.021} = \text{nmol cytochrome c reductase /min}$$

ΔA550 = ผลต่างของการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรต่อนาที

ค่า extinction coefficient ของ cytochrome c reductase เท่ากับ 0.21 $mM.^{-1}$ cm^{-1}

2.9 **วิธีการทดลอง**

2.9.1 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450,ไซโตโครมพี 420, ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

2.9.1.1 แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่มโดยใช้ปลาดุกกลุ่มละ 1 ตัว ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง (n=10) โดยมีขั้นตอนดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมให้เอธานอล 1 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

กลุ่มที่ 2 ให้เมททิลพาราไธออน 0.1 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 3 ให้เมททิลพาราไธออน 0.2 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 6 ให้เมททิลพาราไธออน 2.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 7 ให้เมททิลพาราไธออน 4.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

ตักปลาที่เลี้ยงไว้ในบ่อปูนซีเมนต์ไปเลี้ยงในอ่างกระจกขนาด 36×36×60 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร(ใส่น้ำ 20 ลิตร) อ่างละ 1 ตัวนาน 24 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพหลังจากนั้นนำเมททิลพาราไธออนที่เตรียมไว้ใส่ลงในอ่างที่เลี้ยงปลาตามความเข้มข้นของแต่ละกลุ่มโดยที่กลุ่มควบคุมใส่เอธานอลจำนวน 1 มิลลิลิตร เลี้ยงปลาเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงโดยงดให้อาหารตลอดการทดลอง แล้วจึงนำมาเตรียมไมโครโซม

2.9.1.2 นำไมโครโซมที่เตรียมได้มาตรวจหาระดับไซโตโครมพี 450,ไซโตโครมพี 420, ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

2.9.2 การศึกษาผลของไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมพี 450, ไซโตโครมพี 420, ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

2.9.2.1 แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่มใช้ปลาดุกกลุ่มละ 1 ตัว ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง (n=10)โดยมีขั้นตอนดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ให้โซเดียมไนไตรท์

กลุ่มที่ 2 ให้โซเดียมไนไตรท์ 6.25 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 3 ให้โซเดียมไนไตรท์ 12.50 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 4 ให้โซเดียมไนไตรท์ 25.00 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 5 ให้โซเดียมไนไตรท์ 50.00 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 6 ให้โซเดียมไนไตรท์ 100.00 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 7 ให้โซเดียมไนไตรท์ 150.00 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

ตักปลาที่เลี้ยงไว้ในบ่อปูนซีเมนต์ไปเลี้ยงในอ่างกระจกขนาด 36×36×60 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร(ใส่น้ำ 20 ลิตร)อ่างละ 1 ตัวเพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นนำโซเดียมไนไตรท์ใส่ลงในอ่างที่เลี้ยงปลาตามความเข้มข้นของแต่ละกลุ่มโดยที่กลุ่มควบคุมไม่ใส่โซเดียมไนไตรท์ หลังจากนั้นเลี้ยงปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยงดให้อาหารตลอดการทดลอง แล้วจึงนำมาเตรียมไมโครโซม

2.9.2.2 นำไมโครโซมที่เตรียมได้มาตรวจหาระดับไซโตโครมพี 450, ไซโครมพี 420, ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

2.9.3 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมพี 420 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส โดยแแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดดังนี้

2.9.3.1 ชุดที่ 1 แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ใช้ปลาดุกกลุ่มละ 1 ตัวโดยทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง (n=10)มีขั้นตอนดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ให้เมททิลพาราไธออนและโซเดียมไนไตรท์

กลุ่มที่ 2 ให้เมททิลพาราไธออนอย่างเดียว 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 3 ให้โซเดียมไนไตรท์อย่างเดียว 150 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 25 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 5 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 50 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 6 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 100 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 7 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 150 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

ตักปลาในบ่อปูนซีเมนต์ที่เลี้ยงไว้ไปเลี้ยงในอ่างกระจกขนาด 36×36×60 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร(ใส่น้ำ 20 ลิตร)อ่างละ 1 ตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นนำเมททิลพาราไธออนและโซเดียมไนไตรท์ใส่ลงในอ่างที่เลี้ยงปลาตามความเข้มข้นของแต่ละกลุ่ม เลี้ยงปลาต่อไปอีกเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง โดยงดให้อาหารตลอดการทดลอง แล้วจึงนำมาเตรียมไมโครโซม

2.9.3.2 ชุดที่ 2 แบ่งการทดลองออกเป็น 7 กลุ่มใช้ปลาดุกกลุ่มละ 1 ตัว และทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง(n=10) มีขั้นตอนดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ให้เมททิลพาราไธออนและโซเดียมไนไตรท์

กลุ่มที่ 2 ให้เมททิลพาราไธออนอย่างเดียว 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 3 ให้โซเดียมไนไตรท์อย่างเดียว 50 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 4 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 25 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 50 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 6 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 100 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

กลุ่มที่ 7 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตรและโซเดียมไนไตรท์ 150 มิลลิกรัม/น้ำ 1 ลิตร

ตักปลาในบ่อปูนซีเมนต์ที่เลี้ยงไว้ไปเลี้ยงในอ่างกระจกขนาด 36×36×60 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร (ใส่น้ำ 20 ลิตร)อ่างละ 1 ตัว นาน 24 ชั่วโมงเพื่อปรับสภาพ หลังจากนั้นนำเมททิลพาราไธออนและโซเดียมไนไตรท์ใส่ลงในอ่างที่เลี้ยงปลาตามความเข้มข้นของแต่ละกลุ่มเลี้ยงปลาต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยงดให้อาหารตลอดการทดลอง แล้วจึงนำไปเตรียมไมโครโซม

2.9.3.3 นำไมโครโซมที่เตรียมได้มาตรวจหาระดับไซโตโครมพี 450, ไซโตโครมพี 420, ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ใช้ ANOVA ชนิด oneway โดยวิธี Turky และ Independent t- test เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี5 ไซโตโครมพี 420 และสมรรถนะไซโตโครมซีรีดักเตสกับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ทดลองโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression equation) $Y = a+bx$