8 การเซนตริฟิวจ์

- หลักการเซนตริฟิวจ์
- อุปกรณ์ในการเซนตริฟิวจ์
- ประเภทของเครื่องเซนตริฟิวจ์
- วิธีใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์
- ประเภทของการเซนติริฟิวจ์

หลักการเซนตริฟิวจ์

การเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) หรือเรียกการปั่นแยกส่วน เป็นการใช้เครื่องมือสำหรับปั่นแยกสารโดยการตกตะกอนสารออกจากสารละลาย ภายใต้แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force) ที่เกิดจากการหมุนรอบแกนด้วยความเร็วสูง สิ่งต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเป็นเซลล์ ออร์กาเนล หรือสารชีวโมเลกุล สามารถนำมาแยกด้วยวิธีการเซนตริฟิวจ์

เมื่อนำสารมาเซนตริฟิวจ์จะมีแรงกระทำต่ออนุภาคทุกชนิดในสารละลาย ทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ออกจากศูนย์กลางการหมุน ในขณะเดียวกับที่มีแรงต้านทานแรงเหวี่ยง ได้แก่ แรงเสียดทาน (frictional force) และแรงลอยตัว (buoyant force)

แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง = แรงเสียดทาน + แรงลอยตัว

สารจะตกตะกอนภายใต้การกระทำของแรงดังกล่าว ความหนืดของสารละลายทำให้เกิดแรงเสียดทาน สารละลายที่มีความหนืดมากจะมีการตกตะกอนของสารช้า ส่วนความหนาแน่นของสารละลายจะต้านการเคลื่อนที่ของสาร คือทำให้เกิดแรงลอยตัว สารละลายที่มีความหนาแน่นสูงจะมีแรงลอยตัวมาก ทำให้การตกตะกอนของสารช้า ดังนั้นการที่สารใดจะตกตะกอนเร็วหรือช้าจึงพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient; s)

การตกตะกอนของสารขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล ขนาด รูปร่าง และความหนาแน่นของสาร สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลและความหนาแน่นสูงจะตกตะกอนออกมาก่อน

อนุภาคของสารที่อยู่ภายใต้แรงของการเซนตริฟิวจ์ คำนวณจากสมการดังนี้

$$F = m\omega^2 r$$

เมื่อ F คือแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force)

m คือมวลของอนุภาค

ω คือความเร็วเชิงมุม (angular velocity) มีหน่วยเป็นเรเดียนต่อวินาที (radian/sec)

r คือรัศมีในการหมุน หรือระยะทางของอนุภาคกับแกนของการหมุน มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

แรงเหวี่ยงในการตกตะกอนสารบอกเป็นความเร็วรอบ (revolution per minute; RPM) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแรงโน้มถ่วงของโลก ในรูปของแรงปั่นสัมพัทธ์หรือจำนวนเท่าของแรงดึงดูดของโลก (relative centrifugal force; RCF หรือ x g) คือ

$$RCF = \frac{F_{centrifuge}}{F_{gravity}} = \frac{m\omega^2 r}{g} = \frac{\omega^2 r}{mg}$$

g คือความเร่งเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลก (เท่ากับ 980 cm/sec^2)

เนื่องจากหนึ่งรอบของการหมุนมีค่าระยะเชิงมุม 2π radians ดังนั้น ω คำนวณจากจำนวนรอบต่อนาที

$$\omega = 2\pi \text{ RPM}/60$$

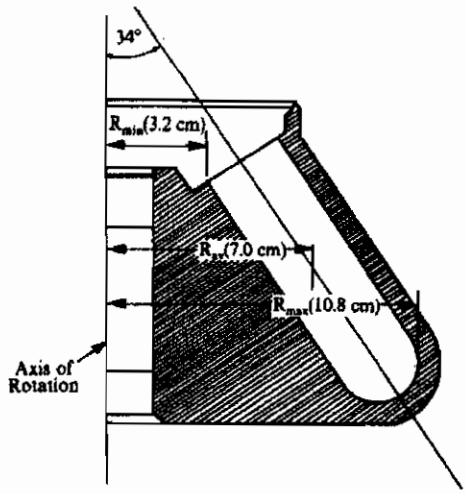
เมื่อ
$$\text{RCF} = \frac{\omega^2 r}{g}$$

$$= \frac{\left(\frac{2\pi \text{ RPM}}{60}\right)^2 r}{980}$$

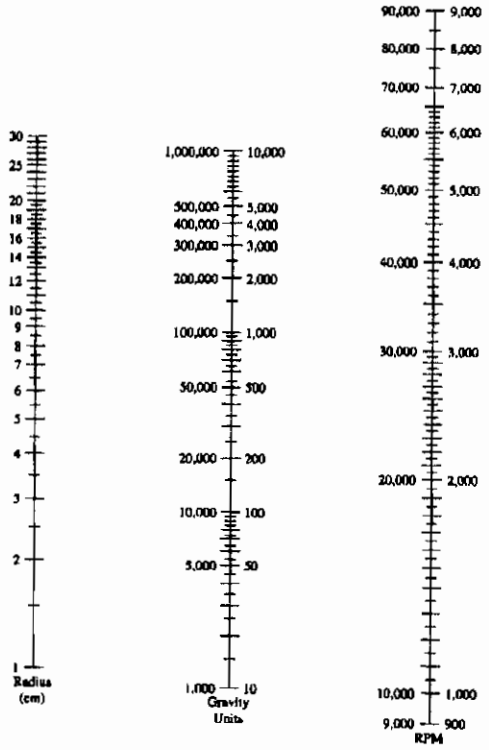
$$= \frac{4\pi^2(\text{RPM})^2 r}{3600 \times 980}$$

ดังนั้น
$$\text{RCF} = (1.119 \times 10^{-5})(\text{RPM})^2 r$$

การทราบรัศมีของการหมุน สามารถเปลี่ยนระหว่าง RCF (x g) และ RPM ได้ ซึ่งค่ารัศมีของการหมุน คือค่ารัศมีเฉลี่ย (r_{av}) ดังรูปที่ 8.1 เมื่อทราบรัศมีของการหมุนจึงนำมาแทนค่าในสมการด้านบน หรือสามารถใช้แผนภาพโนโมแกรม (nomogram) ในการเปรียบเทียบหาค่า RCF ซึ่งเครื่องเซนตริฟิวจ์บางรุ่นจะมีอยู่ประจำเครื่อง ดังรูปที่ 8.2 โนโมแกรมประกอบด้วยเส้นตรง 3 เส้น ที่แสดงค่า RPM, RCF และ r เมื่อต้องการหาค่า RCF จากค่าที่ทราบคือ RPM และรัศมีของการหมุน ให้ลากเส้นจากค่า RPM ผ่านไปยังค่ารัศมีของการหมุน ทำให้ทราบค่า RCF จะตำแหน่งที่เส้นนั้นผ่าน



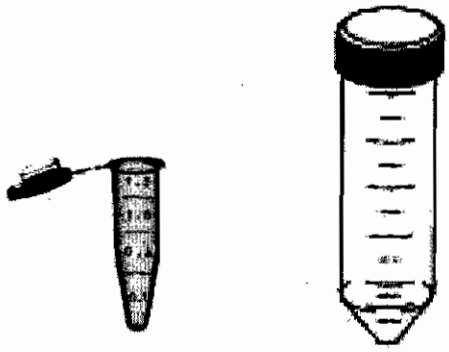
รูปที่ 8.1 การหารัศมีของการหมุนเฉลี่ย (R_{av})



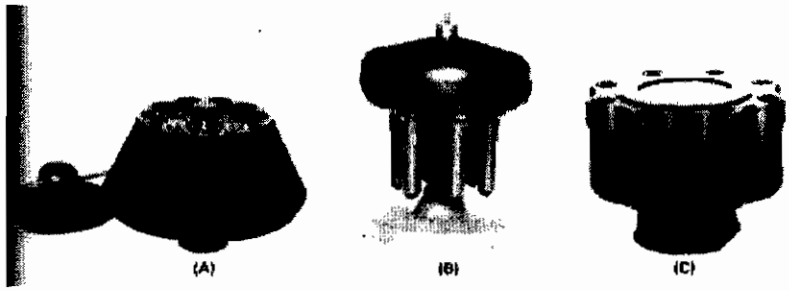
รูปที่ 8.2 nomogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RPM, RCF (Gravity Units) และ r (Radius หน่วยเป็น cm)

อุปกรณ์ในการเซนตริฟิวจ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเซนตริฟิวจ์ประกอบด้วยหลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) และหัวเหวี่ยง (rotor) หลอดเซนตริฟิวจ์มีหลายขนาด มีทั้งที่ทำจากพลาสติก และทำจากแก้ว มีขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ 1.5 มิลลิลิตร ถึง 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 8.3) หัวเหวี่ยงมี 3 แบบ คือ swinging bucket rotor, fixed angle rotor และ vertical rotor ดังรูปที่ 8.4 หัวเหวี่ยงแบบ swinging bucket rotor มีลักษณะเป็นกระบอกโลหะที่แขวนอยู่กับแกนของโรเตอร์ เมื่อโรเตอร์หมุนจะทำให้กระบอกอยู่ในแนวราบ ส่วน fixed angle rotor และ vertical rotor มีช่องใส่หลอดที่ทำมุมคงที่



รูปที่ 8.3 หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 และ 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 8.4 แบบของหัวเหวี่ยง (A) fixed angle rotor (B) swinging bucket rotor (C) vertical rotor

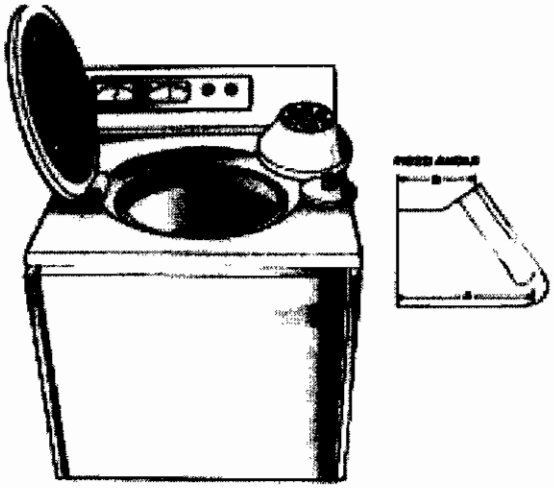
ประเภทของเครื่องเซนตริฟิวจ์

แบ่งประเภทของเครื่องเซนตริฟิวจ์ตามอัตราเร็วของเครื่องดังนี้

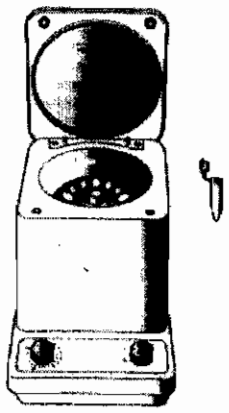
1. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วต่ำ (low speed centrifuge) มีอัตราเร็วของการปั่นแยกสูงสุดประมาณ 4,000 ถึง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางชีวเคมีทั่วไป เนื่องจากเครื่องมีขนาดเล็กที่สามารถตั้งบนโต๊ะปฏิบัติการได้จึงเรียกเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบ bench top centrifuge เครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ใช้อัตราเร็วต่ำโดยทั่วไปจะไม่มีระบบทำความเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิของสารตัวอย่าง หัวเหวี่ยงที่ใช้กับเครื่องมี 2 แบบ ได้แก่ แบบ fixed angle rotor และแบบ swinging bucket rotor การปั่นสามารถตกตะกอนสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง หรือตะกอนโปรตีน

2. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูง (high speed centrifuge) เป็นเครื่องที่มีอัตราเร็วในการปั่นแยกค่อนข้างสูง มีระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อรักษาสภาพของสาร เนื่องจากการใช้อัตราเร็วในการปั่นสูงจะทำให้เกิดความร้อน ซึ่งอาจทำให้สารชีวโมเลกุลบางชนิดเสียสภาพได้ ปกติจะรักษาอุณหภูมิของหัวเหวี่ยงไว้ที่ 4 $^{\circ}$C ชนิดของหัวเหวี่ยงที่ใช้กับเครื่องมี 2 ชนิด ได้แก่ fixed angle rotor และ swinging bucket rotor อัตราเร็วในการปั่นประมาณ 1,000 ถึง 25,000 รอบต่อนาที โดยขึ้นอยู่กับชนิดของหัวเหวี่ยง รูปที่ 8.5 แสดงตัวอย่างเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูง นอกจากนี้มีเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูงขนาดเล็ก (microfuge) ดังรูปที่ 8.6 ใช้กับหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microtube) ที่มีปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งทำจากพลาสติก เป็นที่นิยมใช้ในงานเตรียมสารปริมาณน้อย เช่น งานวิเคราะห์หรืองานวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล หรืองานทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์

3. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบความเร็วสูงมาก (ultracentrifuge) เป็นเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่มีอัตราเร็วในการปั่นสูงมาก คือสูงถึง 80,000 รอบต่อนาที ตัวเครื่องมีระบบทำความเย็นสำหรับควบคุมอุณหภูมิของห้องเหวี่ยง (chamber) มีเครื่องสูบอากาศออกจากห้องเหวี่ยงทำให้เป็นระบบสูญญากาศ (vacuum) เพื่อลดแรงเสียดทานที่ทำให้เกิดความร้อน



รูปที่ 8.5 เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูง และหัวเหวี่ยงแบบ fixed angle rotor



รูปที่ 8.6 เครื่องเซนตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (microfuge)

วิธีใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์

เครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ได้แก่ เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วต่ำ และเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูง ส่วนเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูงมากมีการใช้งานเฉพาะทาง วิธีการใช้งานจะซับซ้อนขึ้น ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการใช้โดยทั่วไปของเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วต่ำ และเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูง

1. เปิดเครื่องเซนตริฟิวจ์ ใส่โรเตอร์เข้ากับแกนของเครื่อง ถ้าใช้ระบบทำความเย็นควรเตรียมห้องเครื่องและโรเตอร์ให้มีอุณหภูมิตามต้องการ

2. บรรจุสารละลายลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ปกติจะบรรจุสารละลายที่ระดับประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด โดยบรรจุสารละลาย 2 หลอดที่จะใส่ตรงข้ามกันให้มีน้ำหนักเท่ากัน เพื่อความสมดุลของแรงเหวี่ยง

3. บรรจุหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลายลงในหัวเหวี่ยง โดยให้หลอดคู่ที่มีน้ำหนักเท่ากันอยู่ฝั่งตรงข้ามในแนวเดียวกันเสมอ

4. ในกรณีที่เครื่องนั้นมีฝาหัวเหวี่ยง ให้ปิดฝาหัวเหวี่ยงให้แน่น

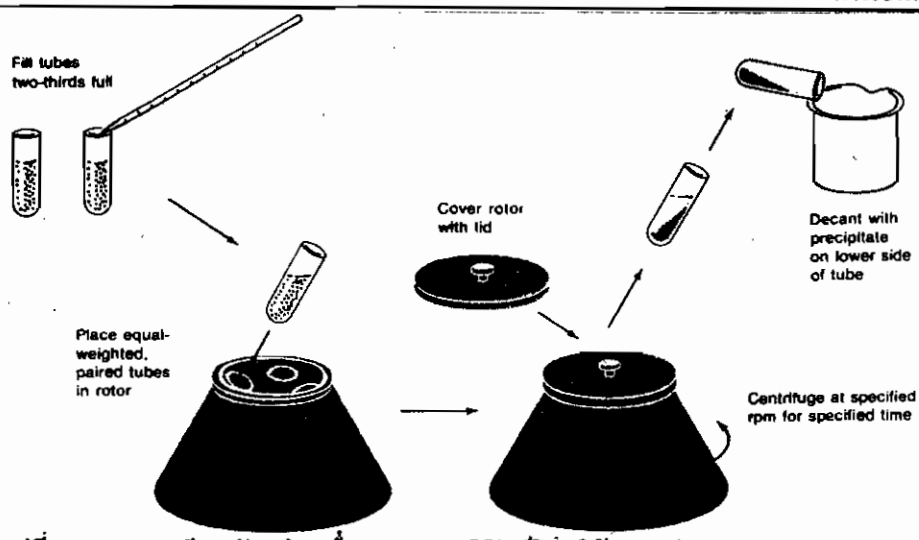
5. ปิดฝาเครื่องเซนตริฟิวจ์

6. เปิดสวิทช์ของเครื่อง ปรับอัตราเร็วและเวลา ถ้าเครื่องมีระบบควบคุมอุณหภูมิให้ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง กดปุ่มเริ่มทำงาน

7. เมื่อเครื่องทำงานจนครบเวลาที่ได้ตั้งไว้เครื่องจะหยุดการทำงาน ให้รอจนกระทั่งหัวเหวี่ยงหยุดหมุน จึงเปิดฝาเครื่องและเปิดฝาหัวเหวี่ยง นำหลอดเซนตริฟิวจ์ออกจากเครื่อง เก็บส่วนที่ต้องการไปทำการทดลองต่อไป

ตัวอย่างการเซนตริฟิวจ์โดยใช้ fixed angle rotor ดังรูปที่ 8.7

หมายเหตุ ควรศึกษาคู่มือที่มีอยู่ประจำเครื่องแต่ละเครื่อง เนื่องจากจะมีข้อแนะนำและรายละเอียดของการใช้เครื่อง รวมทั้งชนิดของโรเตอร์และชนิดของหลอดที่สามารถนำมาใช้งานกับเครื่องได้



รูปที่ 8.7 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการเซนตริฟิวจ์โดยใช้หัวเหวี่ยงแบบ fixed angle rotor

ประเภทของการเซนตริฟิวจ์

1. แบ่งประเภทของการเซนตริฟิวจ์ตามจุดประสงค์

1.1 การเซนตริฟิวจ์เพื่อเตรียมสาร (preparative centrifugation) สำหรับแยกสารที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

1.2 การเซนตริฟิวจ์เพื่อวิเคราะห์สาร (analytical centrifugation) เช่น วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล หรือการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารชีวโมเลกุล โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบอัตราเร็วสูงมาก

2. แบ่งประเภทของการเซนตริฟิวจ์ตามรูปแบบในการแยกสาร

2.1 การใช้แรงเหวี่ยงคงที่ ใช้ในการแยกตะกอนออกจากสารละลาย เช่น การแยกตะกอนโปรตีนออกจากสารละลาย โดยเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

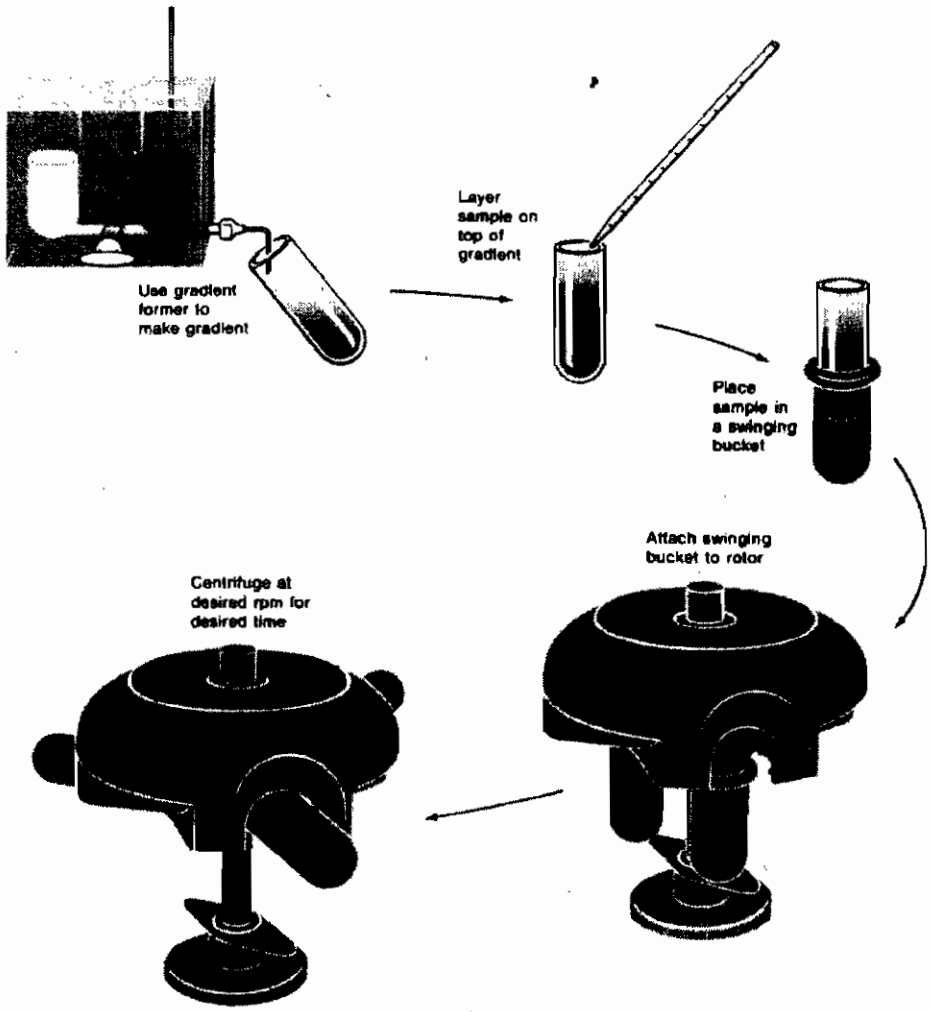
2.2 การเพิ่มแรงเหวี่ยงที่ละขั้น (differential centrifugation) เช่น การเซนตริฟิวจ์เพื่อตกตะกอนสารแต่ละชนิดตามค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอน สำหรับสารหลายชนิดที่ปนกันอยู่ ตารางที่ 8.1 แสดงขั้นตอนการทำ differential centrifugation เพื่อแยกส่วนต่างๆ ของเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยปรับค่า x g เพิ่มขึ้นจาก 1,000 x g เป็น 100,000 x g ตามลำดับ และปรับเวลาเพิ่มขึ้นในแต่ละขั้น สารที่มีค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอนมากจะตกตะกอนออกมาก่อน

ตารางที่ 8.1 การเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกส่วนต่างๆ ของเซลล์

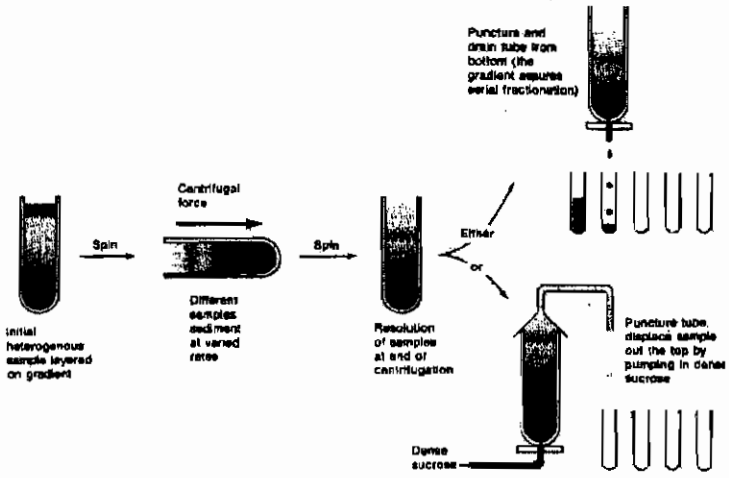
สภาวะของการเซนตริฟิวจ์	ส่วนที่ตกตะกอน (fractions sedimented)
1,000 x g, 5 นาที	most eucaryotic cells
4,000 x g, 10 นาที	chloroplasts, most eucaryotic cell debris, most cell nuclei
15,000 x g, 20 นาที	mitochondria, bacteria
30,000 x g, 30 นาที	lysosomes, most bacterial cell debris
100,000 x g, 3 ชั่วโมง	ribosomes and polysomes

2.3 density gradient centrifugation คือการตกตะกอนสารโดยใช้ความหนาแน่นของสารละลายที่แตกต่างกันแบบต่อเนื่อง เช่น การเตรียมเกรเดียนท์ความหนาแน่นของสารละลายเพื่อตกตะกอนสารดังรูปที่ 8.8 มีการเตรียมสารละลายให้มีความหนาแน่นลดลงแบบต่อเนื่องจากด้านล่างถึงด้านบนของหลอดเซนตริฟิวจ์ เช่น การทำเกรเดียนท์ของซูโครส ทำการใส่สารที่ต้องการแยกที่ด้านบนของหลอดเซนตริฟิวจ์ ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใน bucket และแขวน bucket เข้ากับหัวเหวี่ยง จากนั้นทำการบรรจุหัวเหวี่ยงลงสู่เครื่องเซนตริฟิวจ์ และทำการเซนตริฟิวจ์ สารจะแยกออกจากกันเป็นบริเวณตามค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอน จึงเรียก zonal centrifugation รูปที่ 8.9 แสดงการเซนตริฟิวจ์แบบเกรเดียนท์สามารถแยกสารตามน้ำหนักโมเลกุล และวิธีการเก็บแต่ละส่วนที่แยกได้

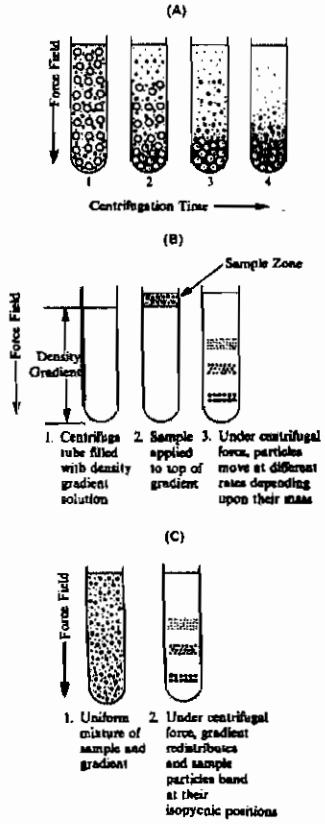
2.4 วิธี isopycnic centrifugation เป็นการแยกสารโดยผสมสารกับสารละลายเข้าด้วยกัน เมื่อทำการเซนตริฟิวจ์ทำให้เกิดเกรเดียนท์ความหนาแน่นของสารละลาย สารสามารถแยกออกจากกันได้ตามเกรเดียนท์ของสารละลาย รูปที่ 8.10 เปรียบเทียบการเซนตริฟิวจ์แบบ differential centrifugation, zonal centrifugation และ isopycnic centrifugation



รูปที่ 8.8 การเซนตริฟิวจ์แบบเกรเดียนท์ความหนาแน่น โดยใช้ swinging bucket



รูปที่ 8.9 การเซนตริฟิวจ์แบบเกรเดียนท์ความหนาแน่นและการเก็บส่วนที่แยกได้



รูปที่ 8.10 การเซนตริฟิวจ์แบบ(A)differential centrifugation (B) zonal centrifugation และ (C) isopycnic centrifugation

การทดลองที่ 8.1

การแยกส่วนประกอบเซลล์โดยวิธี differential centrifugation

ทำการทดลองเพื่อแยกส่วนประกอบของเซลล์ โดยนำเนื้อเยื่อมาบดด้วยเครื่องบดสาร จากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์แบบเพิ่มแรงเหวี่ยงทีละขั้น (differential centrifugation)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

กรรไกรสแตนเลท

หลอดเซนตริฟิวจ์

เครื่องบดสาร (homogenizer)

เครื่องเซนตริฟิวจ์

vacuum desiccator

สารเคมี

เนื้อเยื่อ เช่น ตับ, หัวใจ หรือใบไม้

0.25 M sucrose, 0.005 M $MgCl_2$

75% ethanol

absolute ethanol

biuret reagent

10 mg/ml BSA

orcinol reagent

6% alcoholic orcinol

500 µg/ml standard RNA

วิธีการทดลอง

1. นำเนื้อเยื่อประมาณ 0.1 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง ใส่สารละลาย 0.25 M sucrose, 0.005 M $MgCl_2$ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 15–30 ชิ้น จากนั้นถ่ายใส่ใน homogenizer ที่อยู่ในอ่างน้ำแข็ง ทำการบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด

2. ถ่ายส่วนที่บดได้ ลงผ่านผ้าขาวบางสู่ภาชนะที่เย็น และวัดปริมาตรที่ได้โดยใช้กระบวกตวง จากนั้นแบ่งสารใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ 2 หลอดให้เท่ากัน ทำการเซนตริฟิวจ์ตามตาราง

3. นำแต่ละส่วนที่ได้มาทดสอบหาโปรตีน และอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีไบยูเร็ต และ orcinol test ตามลำดับ

ตารางแสดงการปรับค่า RCF และเวลาในการเซนตริฟิวจ์

การเซนตริฟิวจ์ครั้งที่	RCF (x g)	เวลา
1	1,000 x g	10 นาที
2	10,000 x g	30 นาที
3	100,000 x g	1 ชั่วโมง
4	300,000 x g	3 ชั่วโมง

การทดลองที่ 8.2

การแยกเม็ดพลาสติกโดยวิธี density gradient

เม็ดพลาสติกแต่ละเม็ดที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน สามารถนำมาแยกออกจากกันได้ในสารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นต่างกัน

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ปิเปตต์

เม็ดพลาสติกที่มีความหนาแน่นต่างๆ

สารเคมี

15% ซูโครส

40% ซูโครส

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย 15% ซูโครส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย 40% ซูโครส ที่มีสีผสมอาหาร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. ปิเปตต์ 15% ซูโครส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงที่ด้านล่างของหลอดทดลองซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่แล้ว 20 มิลลิลิตร โดยปล่อย 15% ซูโครสสู่หลอดทดลองช้าๆ

3. ปิเปตต์ 40% ซูโครส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงสู่ชั้น 15% ซูโครส สังเกตชั้นของสารละลาย

4. ใส่เม็ดพลาสติกลงสู่หลอดทดลอง สังเกตว่าเม็ดพลาสติกแต่ละแบบอยู่ที่ส่วนใดของหลอด

การทดลองที่ 8.3

การแยกดีเอ็นเอของโครโมโซม

การทดลองเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอจากใบไม้โดยวิธีการเซนตริฟิวจ์ในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอแยกตามระบบเกรเดียนท์

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ครกกระเบื้อง (morta)

ผ้าขาวบาง

หลอดเซนตริฟิวจ์

เครื่องเซนตริฟิวจ์

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

UV light (long wave)

สารเคมี

ใบไม้ (ใบอ่อน)

บัฟเฟอร์ HB (0.2 M sucrose, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris HCl pH 8.0)

Triton X-100

30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA

10% (w/v) Sarkosyl

5 mg/ml pronase

CsCl

10 mg/ml EtBr

วิธีการทดลอง

1. นำใบไม้ 20 กรัม มาบดในบัฟเฟอร์ HB 50 มิลลิลิตร โดยใช้ครกบด (morta) บดจนใบไม้ละเอียด เติมบัฟเฟอร์ HB ให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. กรองสารผ่านผ้าขาวบาง เก็บส่วนสารละลายที่ได้

3. นำสารละลายมาเซนตริฟิวจ์ที่ 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอนที่แยกได้

4. นำตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์ HB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เซนตริฟิวจ์ที่ 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอน

5. นำตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์ HB ที่มี 2% Triton X-100 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เซนตริฟิวจ์ที่ 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บตะกอน

6. ตะกอนที่ได้นำมาเติม 30 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA ปริมาตร 16 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ว ถ่ายใส่ขวดรูปกรวยขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 10% (w/v) Sarkosyl 2 มิลลิลิตร และเติม 5 mg/ml pronase ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 5 นาที และนำมาบ่มในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 5-10 ชั่วโมง

7. นำสารมาวัดปริมาตรและปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร เติม CsCl 20 กรัม ผสมและตั้งให้ละลายให้หมดที่ 4 $^{\circ}$C โดยใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

8. นำสารมาเติม 10 mg/ml EtBr ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ และนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 35,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ที่ 15 $^{\circ}$C เก็บส่วนที่เป็นดีเอ็นเอโดยส่องแสงอัลตราไวโอเลตแบบ long wave UV light