บรรณานุกรม

ปรีชา สุริยาพันธุ์ (2541) ปัญหาของเด็กซแตรนในขบวนการผลิตน้ำตาล. วารสารอ้อยและน้ำตาลไทย ปีที่ 5 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนสิงหาคม 2541. หน้า 11-14.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2549. รายงานผลการสำรวจพื้นที่ปลูกอ้อยด้วยข้อมูลดาวเทียมปีการผลิต 2548/49 (110 หน้า)

Bose, S. and Singh, L. (1981). Problems associated with dextran, the major microbiological cause of sucrose loss and their remedies. *Indian Sugar, December*: 603-608

Brown, C. F. and P. A. Inkerman. 1992. Specific method for quantitative measurement of the total dextran content of raw sugar. J. Agric. Food Chem. 40:227–233.

Chen, J. C. P. and Rauh, J. S. (1990). Technical and Economic Justification for the Use of Sugar Process Chemicals. 49th Annual Conference of the Hawaiian Sugar Technologists, pp. F48-57.

Cuddihy, J. A., and Rauh, J. S. Dextranase in Sugar Production: Factory Experience. Midland Research Laboratories, Inc.
(website 1: http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/dexexper.pdf)

Cuddihy, J. A., Porro, M. E., and Rauh, J. S. The Presence of Total Polysaccharides in Sugar Production and Methods for Reducing their Negative Effects. Midland Research Laboratories, Inc.
(website 2: http://www.midlandresearchlabsinc.com/doclib/polysach.pdf)

Dipak K. Das, Sadhan K. Dutta. 1996. Purification, Biochemical Characterisation and Mode of Action of an Extracellular Endo-dextranase from the Culture Filtrate of *Penicillium lilacinum*. Int. J. Biol. 28 (1): 107-113.

Egglestona, G. and A. Monge. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Process Biochem. 40: 1881–1894.

Elvira Khalikova, Petri Susi, Nikolai Usanov and Timo Korpela. 2003. Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp.. Journal of Chromatography B. 796: 315-326.

Fukumoto, J., N. Hirsoka, T. Hirose and D.Tsuru. (1971). "Studies 2 Dextranase Production by a Strain of *A. cerneus*." *,Agric*. Biol. Chem. 35 (11), 1727-1732, 1971.

Imrie, F.K.E., and Tilbury R.H. (1972) Polysaccharides in sugar cane and its products, Sugar Technology Reviews,1:291-361.

Khalikova, E., P. Susi, and T. Korpela1. 2005. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. Microbiol. Molec. Biol. Reviews.69: 306–325.

Laemmli, U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. Nature, 277:680-685.

Lloyd G. Simonson, Anthony E. Liberta and Arlan Richadson. 1975. Characterization of an Extracellular Dextranase from *Fusarium moniliforme*. Applied Microbiology. 30 (5): 855-861.

Milintawisamai N., S. niamsanit, C. Ngasan, V. Pliansinchai and P. Weerathawon. (2009) Dextran producing Microorganisms from Miltr Phu veiang sugar factang Thailand. Sugar Tech, 11:196-199.

Wilfred N. Arnold, Tan Binh P. Nguyen and Larry C. Mann. 1998. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii*. Arch Microbiol. 170: 91-98.

Wynter, C. 1997. Partial purification of a thermostable dextranase using Sephacryl S-300 adsorption. Letter in Applied Microbiology. 25: 321-324.

Wynter, C. V. A., M. Chang, J. De Jersey, B. Patel, P. A. Inkerman and S. Hamilton. 1997. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. Enzyme and Microbial Technology. 20: 242-247.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato	250 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร pH = 6.0

สำหรับการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยผสมส่วนประกอบดังกล่าวข้างต้น แล้วทำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Fukumoto

Dextran T 2000 (2%)	20 กรัม
0.3% $NaNO_3$	2 กรัม
KH_2PO_4	2 กรัม
Yeast extract (0.1%)	1 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
KCl	0.5 กรัม
$FeSO_4$	0.01 กรัม
Agar	20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร pH = 6.5

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวข้างต้น แล้วทำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

1.3 Medium A (อาหารแข็ง A)

Dextran T 2000	10 กรัม
$NaNO_3$	2 กรัม
KH_2PO_4	2 กรัม
Yeast extract	2 กรัม
Agar	20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร pH = 5.5

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวข้างต้น แล้วทำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 Alkaline Copper Reagent

$Na_2HPO_4.12H_2O$	71 กรัม
Rochelle salt (potassium sodium tartrate. 4 H_2O)	40 กรัม / น้ำ 700 มิลลิลิตร
NaOH 1 N	100 มิลลิลิตร
$CuSO_4.5H_2O$	80 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนนำไปใช้

2.2 Nelson Reagent

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	53.2 กรัม / น้ำ 900 มิลลิลิตร
H_2SO_4	21 มิลลิลิตร
$Na_2HAsO_4.7H_2O$ 12 %	50 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนนำไปใช้

2.3 การเตรียมสารตั้งต้นเดกซ์แทรน T 2000 ความเข้มข้น 0.625 %

ชั่งเดกซ์แทรน T2000 ปริมาณ 0.625 กรัม ละลายใน 0.05M acetate buffer pH 5.5 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดเตรียมสาร (volumetric flask)

2.4 การหากิจกรรมของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

นำตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาใส่ไว้ใน epppendope tube จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการเจือจางให้ได้ 10, 20, 40, และ 80 เท่า จากนั้นนำเอาตัวอย่างที่ได้มาใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมด จำนวน 1 ml ซึ่งประกอบด้วย 0.5 ml ของสับสเตรท dextran T 2000 ความเข้มข้น 0.625 % , 0.4 ml ของ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.5 และ 0.1 ml ของส่วนน้ำหมักที่ทำการเจือจางไว้ที่ความเข้มข้น

ต่างๆ และ อีกส่วนคือ 0.9 ml ของ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.5 และ 0.1 ml ของเอนไซม์ในส่วนที่เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ acetate buffer โดยจะทำการวิเคราะห์ดังนี้

1) ทำการอุ่น 0.5 ml ของสับสเตรท dextran T 2000 ที่ถูกเติมรวมกับ 0.4 ml acetate buffer พร้อมกับบ่ม 0.9 ml ของ acetate buffer ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2) เติมเอนไซม์ลงไป 0.1 ml ตามความเจือจางที่เตรียมคือ 10, 20, 40, และ 80 เท่า ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มให้เอนไซม์ทำงานในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3) ทำการหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โดยการต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น เมื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์เสร็จแล้วก็นำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในขั้นตอนต่อไป

2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (โดยวิธี Somogyi - Nelson)

1) นำตัวอย่างที่ได้จากหัวข้อที่ 2.4 มาเติมด้วย 1 ml ของสารละลาย Alkaline copper reagent ลงไปในปริมาตรของตัวอย่าง 1 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำเย็นอย่างรวดเร็ว

2) เติมสารละลาย Nelson reagent ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

3) นำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 – 200 µg/ml

2.6 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

1) อบกลูโคสที่เครื่อง hot air oven อุณหภูมิ 90°C เวลา 3 ชั่วโมง

2) เตรียมสารละลายกลูโคส 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคส(stock)ที่มีความเข้มข้น 200 µg/ml ดังตาราง

3) เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ120 µg/ml

4) เติม Alkaline Copper Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็น

5) เติม Nelson Reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมน้ำขจัดไอออน 5 ml

6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ตารางที่ 1 แสดงการเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 – 200 µg/ml

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (µg/ml)	ปริมาตรที่นำมาจาก stork (ml)	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม (ml)
1	0	0	1.0
2	20	0.1	0.9
3	40	0.2	0.8
4	60	0.3	0.7
5	80	0.4	0.6
6	100	0.5	0.5
7	120	0.6	0.4

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรของสารละลายกลูโคส

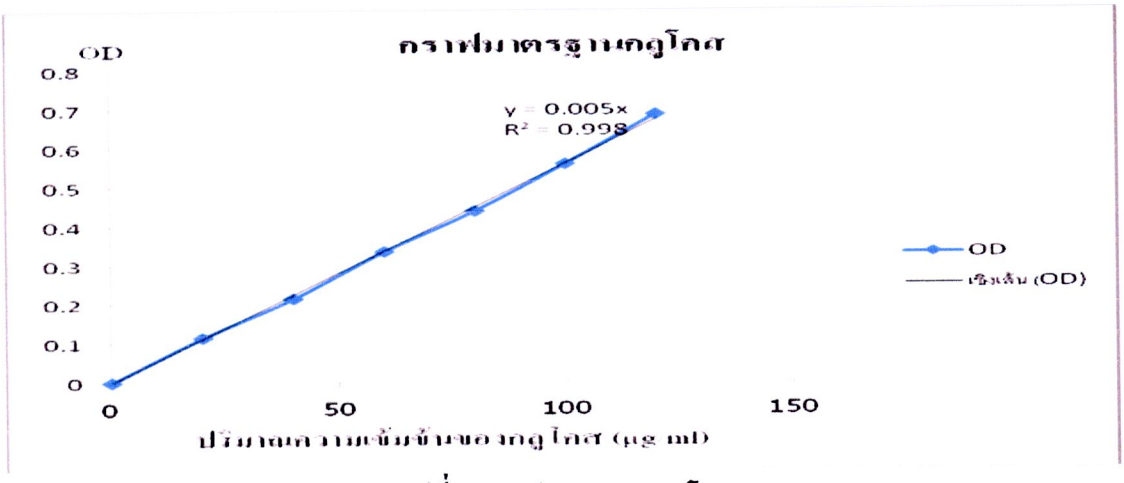
ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (µg/ml)	OD520
0	0
20	0.114
40	0.214
60	0.334
80	0.438
100	0.559
120	0.686

2.7 การคำนาณหาน้ำตาลรีดิวซ์

จากนิยามของกิจกรรมเอนไซม์ dextranase คือ 1 Unit = ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 µmol of reducing sugar/ min ที่ 40°C

สูตรการคำนวณ

Enzyme activity = OD (ที่แท้จริง) / Slope Slope (จากกราฟมาตรฐานกลูโคส) x Dilution factor x 1 µmol of Glucose / ml / min



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

การคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริง

ค่า OD จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริง = ค่า OD ของ Assay Enzyme – ค่า OD ของเอนไซม์ (Dextranase) – ค่า OD ของสับสเตรท (Deetran)

ตัวอย่างการคำนวณ

1. ค่า OD ของการ Assay Enzyme = 0.811
2. ค่า OD ของเอนไซม์ (Dextranase) = 0.055
3. ค่า OD ของสับสเตรท (Dextran) = 0.041

ค่า OD จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริง = ค่า OD ของ Assay Enzyme – ค่า OD ของเอนไซม์ (Dextranase) – ค่า OD ของสับสเตรท (Deztran)

ดังนั้นได้ค่า OD จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แท้จริง = 0.811 – 0.055 – 0.041 = 0.715

จากสูตร

Enzyme activity = OD / Slope x Dilution factor x 1 µmol of Glucose / ml / min

แทนค่า

0.175 / 0.0042 x 40 x 1 / 180 x 1 / 0.1 x 1 / 15 = 25.22 หน่วย/มิลลิลิตร

หมายเหตุ : slope คือ ค่าของ Y/X ในกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

Specific activity(U/mg) = Enzyme activity (U/ml) / Protein (mg/ml)

Recovery (%) = Total unit from purification faction / Total unit from crude enzyme

Purification fold (fold) = Specific activity from purification faction / Specific activity from crude enzyme

2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (โดยวิธี Bradford reagent)

1) เตรียม Bradford dye

2) เตรียมสารละลาย BSA (Bovin serum albumin) ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 µg/µl จำนวน 500 µl

3) ปิเปตสารละลาย BSA (Bovin serum albumin) ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 µg/µl ให้ได้ปริมาตร 2, 4, 6, 8 และ 10 µl ตามลำดับ

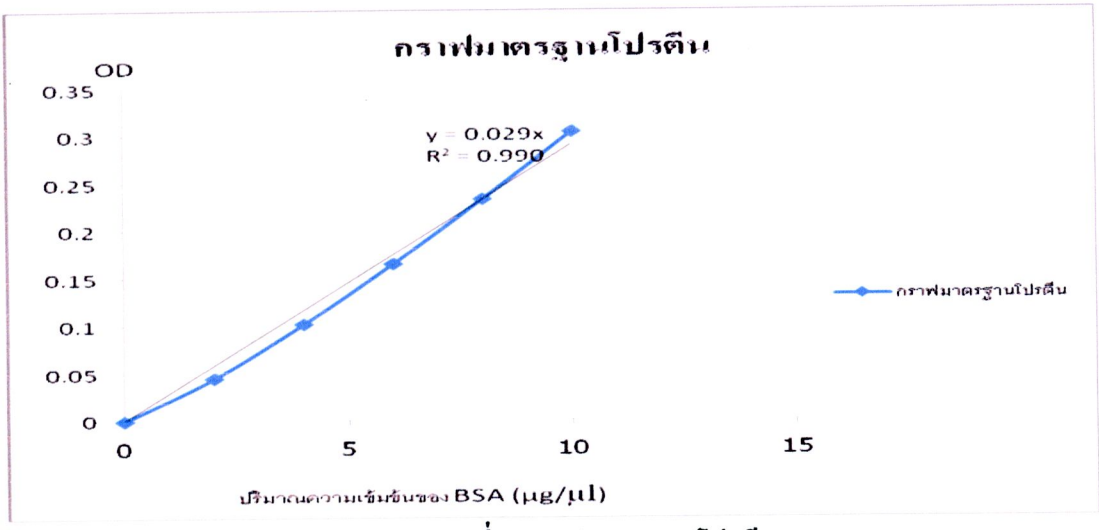
4) เติม 1 ml ของสารละลาย Bradford reagent ลงไปในปริมาตรของสารที่ 2 µl ก่อนแล้วทำการเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วจึงทำในปริมาตรต่อไปตามลำดับ

5) สร้างกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนขึ้นมา

6) การหาปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างได้โดย นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปิเปตมา 1 µl จากนั้นเติม Bradford reagent ลงไป 1 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วจึงทำตัวอย่างต่อไปตามลำดับ โดยค่าที่ได้จะนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรของสารละลาย BSA

ปริมาตรของสาร BSA	OD595
0	0
2	0.045
4	0.102
6	0.165
8	0.233
10	0.304



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานโปรตีน

2.9 การเตรียมถุง Dialysis membrane

- ใส่ถุงมือตัดถุง Dialysis membrane ให้ได้ความยาวตามที่ต้องการและล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเลา 15 นาที
- ต้มถุง Dialysis membrane เป็นเวาล 15 นาที stirring ที่ 80°C ใน 10mM Sodium bicarbonate
- ย้าย Dialysis membrane มาใส่ในสารละลาย 10mM Na_2EDTA และล้างเป็นเวลา 30 นาที
- เอาสารละลายออกแทนที่ด้วยน้ำกลั่นและ stirring 30 นาที ที่ 80°C
- ทิ้งไว้ให้ถุง Dialysis membrane เย็นลงและเก็บใน 20% ethanol
- ก่อนใช้ล้างถุงด้วยน้ำกลั่นทั้งข้างในและข้างนอกด้วยน้ำกลั่น และแช่ใน dialysis buffer
- มัดปลายด้านหนึ่งของถุงให้แน่นใส่น้ำกลั่นหรือ buffer ลงไปในถุงเพื่อดูว่าถุงไม่รั่ว
- เทสารละลายในถุงออกแล้วเติม sample ลงไป
- ย้ายถุงมาใส่ใน บิ๊กเกอร์ที่มีขนาดใหญ่ (โดยทั่วไปประมาณ 100-1000 เท่าของ sample) และ dialyze เป็นเวลาหลายชั่วโมง ที่อุณหภูมิตามต้องการพร้อมกับ stir เบาๆ
- เปลี่ยน dialysis buffer ตามจำเป็น โดยเปลี่ยนประมาณ 2ครั้ง
- ย้ายถุง dialysis จาก buffer เอาที่มัดปลายถุงออกและเอา sample ออกด้วย pipet

2.10 การเตรียมสารที่ใช้ในการแยกโปรตีนด้วย PAGE

1) สารละลาย acrylamide/bis (30%T,2.6% C)

Acrylamide	87.6 กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	2.4 กรัม
Double distilled water	300 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4°C ในขวดสีชา

2) สารละลาย 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris (hydroxyl metyl) aminomethane 18.17 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย hydrochloric acid และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บที่ 4^0

3) สารละลาย 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris (hydroxyl metty) aminomethane 6.07 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย hydrochloric acid และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บที่ 4^0

4) สารละลาย 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Sodium dodecyl sulphate (SDS) 10 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5) สารละลาย 10% ammonium persulphate (APS)

Ammonium persulphate (SDS) 0.1 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็ณ 1 ลิตร

6) สารละลาย running buffer pH 8.3 ความเข้มข้น 5 เท่า (5x)

Tris (hydroxyl methy) aminomethane 15 กรัม

Glycine 72 กรัม

Sodium dodecyl sulphate (SDS) 5 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็ณ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่ 4^0C ก่อนใช้เจือจางให้เป็น 1X

7) สารละลาย 0.1%comassie brilliant blue R-250

comassie brilliant blue R-250 0.1 กรัม

methanol 40 กรัม

ละลายให้เข้ากันจากนั้นเติม glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8) สารละลาย Destain solution

Methanol 400 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

9) Solubilizing solution ความเข้มข้น 2 เท่า (2X)

Double distilled water 525 ไมโครลิตร

0.5 M Tris-HCl pH 6.8 125 ไมโครลิตร

Glycerol 100 ไมโครกรัม

10% SDS	200 ไมโครกรัม
1% bromophenol blue	50 ไมโครกรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันและเก็บที่ 4°C

10) การเตรียมสารละลาย standard protein marker

Standard protein marker	1 vial
bromophenol blue solution	80 ไมโครลิตร
Double distilled water	9 ไมโครลิตร
10% SDS	10 ไมโครลิตร
β-mercaptoethanol	5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เก็บที่ 4°C

ตารางที่ 4 protein marker

Protein	Mr (kDa)
Myosin	**220**
α_2 –Macroglcbulin	**170**
β-Galactosidase	**116**
Transferrin	**76**
Glutamic dehydrogenase	**53**

11) การเตรียม sample buffer

ตารางที่ 5 การเตรียม sample buffer

Sample buffer for	ส่วนประกอบ
1. SDS-PAGE	Sample + β-mercaptoethanol + 10% SDS + bromophenol blue solution + Double distilled water
2. Native SDS-PAGE	Sample + bromophenol blue solution + Double distilled water
3. Activity gel	Sample + β-mercaptoethanol + 10% SDS + bromophenol blue solution + Double distilled water

12) การเตรียมเจล

ตารางที่ 6 การเตรียมเจลสำหรับ SDS-PAGE

component	Final gel concentration	
	10% Separating gel (µl)	4% Stacking gel (µl)
30%Acrylamide/Bis	1,334	268
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,000	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	500
DDW	1,607	1,215
10% SDS	40	20
10% APS	40	12.5
TEMED	4	6.25

ตารางที่ 7 การเตรียมเจลสำหรับ Native-PAGE

component	Final gel concentration	
	10% Separating gel (µl)	4% Stacking gel (µl)
30%Acrylamide/Bis	1,334	268
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,000	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	500
DDW	1,647	1,215
10% SDS	-	20
10% APS	40	12.5

TEMED	4	6.25

ตารางที่ 8 การเตรียมเจลสำหรับ Activity gel staining

component	Final gel concentration	
	10% Separating gel (µl)	4% Stacking gel (µl)
30%Acrylamide/Bis	1,334	268
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1,000	-
5% Bluedextran	805	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	500
DDW	802	1,215
10% SDS	40	20
10% APS	40	12.5
TEMED	4	6.25