บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำวิจัย

การเตรียมไมโตคอนเดรีย

1. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

ก. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม

ข. วิธีการเตรียมไมโตคอนเดรีย

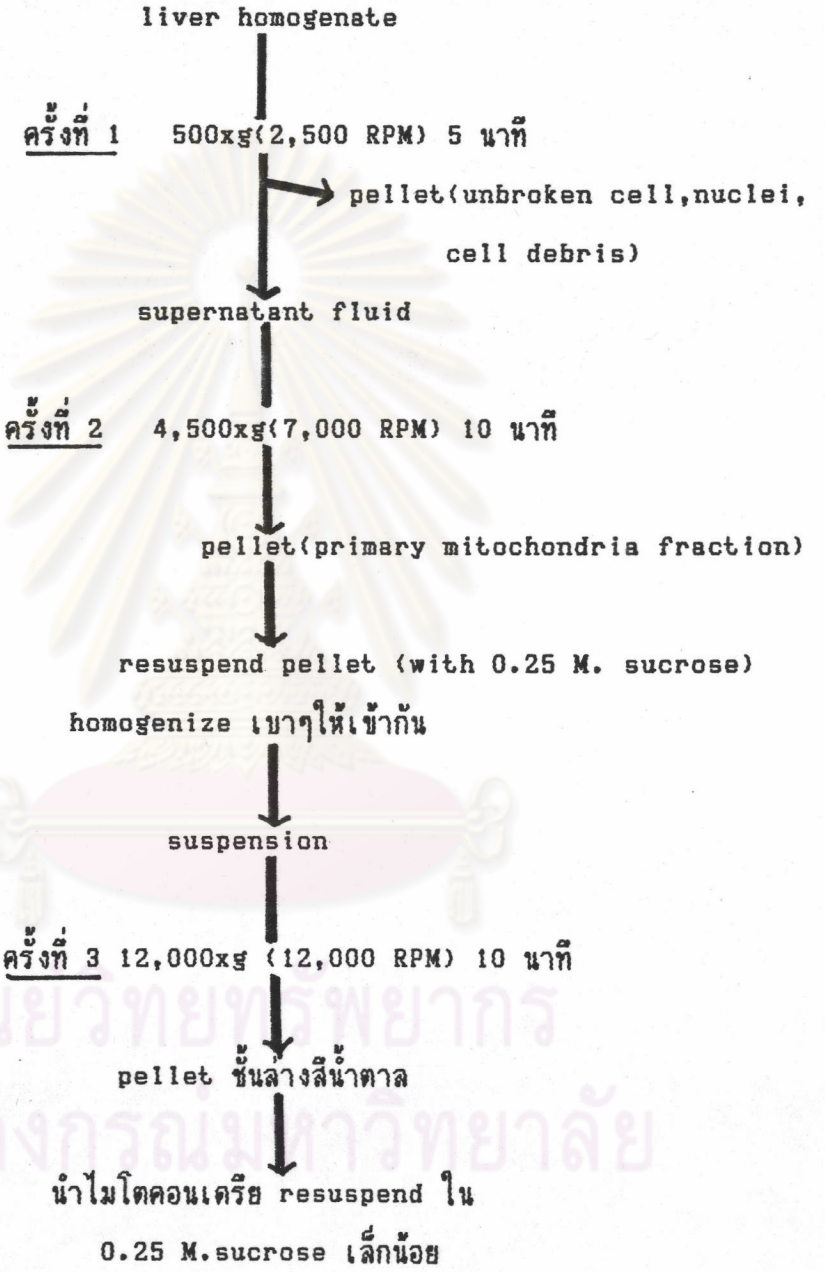
ใช้วิธีของ Hogebloom(47) ซึ่ง Myers and Slater(45)เป็นผู้บรรยายไว้โดยดัดแปลงเล็กน้อย

ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียที่เตรียมจะแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice cold) โดยมีอุณหภูมิประมาณ 4°C รวมทั้งขณะปั่นแยกไมโตคอนเดรียด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge จะทำที่อุณหภูมิเดียวกัน

ขั้นตอนในการเตรียม แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆคือ

ขั้นแรก ทำให้หนูตายอย่างทันทีทันใดด้วยการตีที่หัวแล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดหน้าท้องแล้วรีบนำตับมาล้างหลายๆครั้งจนหมดเลือดด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยsucrose 0.25M. และ 1 mM. EGTA(pH 7.4) และแช่ในสารละลายเดิมปริมาตรประมาณ 50-60 มล. จากนั้นตัดตับออกเป็นชิ้นเล็กๆด้วยกรรไกร และนำไป homogenize ด้วย glass homogenizer เพื่อทำลายให้เซลตับแตก ในขั้นแรกนี้จะได้ liver homogenate ปริมาตรประมาณ 60-80 มล.ต่อหนู 1 ตัว

ขั้นที่สอง การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate ที่อุณหภูมิ 4 ° C โดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac SCR 20 B rotor model RPR 18-3 ตามแผนภาพในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยวิธี differntial centrifugation

จากรูปที่ 12 pellet ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นเป็น 2 ชั้น ชั้นบน

เป็นสีชมพูเกาะกันอย่างหลวมๆ คือชั้นของ microsomes ส่วนชั้นล่างเกาะกันแน่นเป็นสีน้ำตาล คือชั้นของไมโตคอนเดรีย เมื่อริน supernatant ครั้งสุดท้ายออกทิ้งและล้างส่วนที่เป็น microsomes ออกทิ้งโดยการเติม 0.25 M. sucrose ลงไปเล็กน้อย และเขย่าหลอดเบาๆ เทส่วนของเหลวออก ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง จนเหลือเพียงชั้นล่างสีน้ำตาล นำมา resuspend ด้วย 0.25 M. sucrose ประมาณ 2 มล.homogenize ตะกอนและของเหลวให้เข้ากันเบาๆด้วย glass homogenizer ด้วยมือจนได้ mitochondrial suspension ที่เข้ากันดี ปริมาตรสุดท้ายประมาณ 3 มล. และให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 30-40 มก./มล. และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท จะได้ค่า RCI อยู่ระหว่าง 5-8

2. <u>การเตรียมไมโตคอนเดรียจาก *Saccharomyces cerevisiae*.</u>

ก. <u>เชื้อที่ใช้</u> ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5047

ข. <u>วิธีการเตรียมไมโตคอนเดรีย</u>

ใช้วิธีของ Gasser(30) โดยดัดแปลงเล็กน้อย และมีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

<u>สารเคมีและสารละลายที่ใช้</u>

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u> (growth medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 3 กรัม, malt extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม และ glucose 10 กรัม และปรับ pH ของสารละลายสุดท้ายให้ได้ประมาณ 4.5-5.5 โดยใช้ 1 N. HCl acid แล้วนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave

<u>สารละลายที่ใช้ในการแยกไมโตคอนเดรีย</u> สารละลายที่ใช้มี 3 ชนิด คือ

1. Spheroplasting buffer ประกอบด้วย 1.2 M. sorbitol/20 mM. KH_2PO_4 pH 7.4

2. Breaking buffer ประกอบด้วย 0.6 M. mannitol/ 20 mM.HEPES-KOH pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin และ 1 mM. phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)

3. Mitochondrial buffer ประกอบด้วย 0.6 M mannitol/ 20 mM HEPES-KOH pH 7.4

ขั้นตอนในการเตรียม

1. เพาะเลี้ยงเชื้อ Saccharomyces cerevisiae ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้เชื้อที่เจริญเติบโตอยู่ในระยะ log phase ประมาณ 3 กรัม(wet weight) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. แยกเซลออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการนำไป centrifuge ที่ 3,000g 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง นำไปปั่นซ้ำ

3. นำเซลยีสต์ที่ได้มา resuspend ในสารละลาย 0.1 M. TRIS-HCl pH 9.4 ใน 10 mM dithiothreitol ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 กรัมเซล (wet weight) /มล. นำไป incubate ที่ 30°C นาน 10 นาที

4. แยกเซลที่ incubate ครบตามเวลาแล้วโดยการปั่นเช่นเดียวกับข้อ 2 และล้าง 1 ครั้งด้วย 1.2 M. sorbitol

5. นำเซลยีสต์ที่ได้มา resuspend ใน spheroplasting buffer ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.15 กรัมเซล(wet weight)/มล. เติมสารละลายของเอนไซม์Lyticase@ ที่เตรียมในขนาดความแรง 100 ยูนิต/มล. ในอัตราส่วน 1 ส่วน ต่อสารแขวนตะกอนของเซลยีสต์ 3 ส่วนโดยปริมาตร นำไป incubate ที่ 30°C นาน 60 นาที

6. แยกเซลที่ incubate ครบตามเวลาแล้วด้วยการปั่นเช่น

เดียวกับข้อ 2 และล้าง 2 ครั้งด้วย 1.2 M. sorbitol

7. วิธีการเตรียมในขั้นตอนต่อไปนี้ จะต้องทำในสภาวะที่เย็นมีอุณหภูมิไม่เกิน 4°C โดยการนำเซลยีสต์ที่อยู่ในลักษณะ spheroplast มา resuspend ใน breaking buffer ที่เย็นจัด ให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.3 กรัมเซล(wet weight)/มล.

8. นำสารแขวนตะกอนของเซลยีสต์ในข้อ 7 ไป homogenize ใน glass homogenizer ที่แช่ในน้ำแข็งโดย homogenize 10-15 รอบ จากนั้นก็เจือจาง homogenate ด้วย breaking buffer หนึ่งเท่าตัว นำไปปั่นแยกที่ 5,500 RPM (rotor model 20-2) นาน 5 นาที

9. เก็บส่วน supernatant ไว้ นำส่วนตะกอนไป homogenize ซ้ำ โดยทำตามขั้นตอนในข้อ 7-8 และนำ supernatant ที่ได้ทั้ง2 ส่วนมารวมกัน นำไป centrifuge ที่ 13,500 RPM(rotor model 20-2) นาน 10 นาที

10. นำส่วนตะกอนที่ได้ซึ่งเป็นส่วนของไมโตคอนเดรียมา resuspend ใน breaking buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ 5,500 RPM 5 นาที เพื่อแยก cell debris ที่ติดมาออก เก็บส่วน supernatant นำไป centrifuge ที่ 13,500 RPM 10 นาที เพื่อตกตะกอนไมโตคอนเดรีย

11. นำส่วนตะกอนมา resuspend ใน mitochondrial buffer และปั่นซ้ำที่ 13,500 RPM 10 นาที และนำไปปั่นที่ 5,500 RPM และ 13,500 RPM ตามลำดับอีกหนึ่งรอบ

12. ตะกอนที่ได้ครั้งหลังสุด นำมา resuspend ใน mitochondrial buffer โดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนของไมโตคอนเดรียประมาณ 10 มก./มล. ของสารแขวนตะกอนไมโตคอนเดรียที่ได้

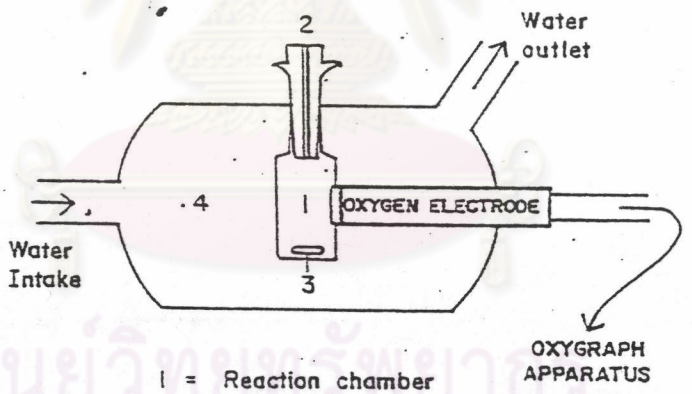
การเตรียม intact yeast suspension ของ *Saccharomyces cerevisiae.*

นำเซลยีสต์ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้มา suspend ในสารละลาย 0.9% sodium chloride ให้มีขนาดความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมเซล(wet weight)/มล. ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.75 มล.

การ incubation ไมโตคอนเดรีย/intact yeast suspension และ incubation medium

1. การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียหรือ intact yeast suspension เพื่อวัดอัตราการหายใจในสภาวะต่างๆนั้น กระทำใน Gilson reaction chamber (รูปที่ 13)



1 = Reaction chamber
2 = Stopper
3 = Magnetic stirrir
4 = Water jacket

รูปที่ 13 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor+recorder)

incubation medium ที่ใช้

- กรณีไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว จะประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM.(pH 7.2),$MgCl_2$ 2 mM.,KCl 92 mM.(เป็นisotonic buffer ความเข้มข้นรวมเป็น 250 milliOsmolar)

- กรณีไมโตคอนเดรียที่เตรียมจาก S. cerevisiae ประกอบด้วย sucrose 0.6 M.,NaH_2PO_4 10 mM., TRIS-HCl 10 mM. pH7.2 ,$MgCl_2$ 5 mM. และ EDTA 1 mM pH 7.2

- กรณีเป็น intact yeast suspension จะใช้ incubation medium เช่นเดียวกับกรณีไมโตคอนเดรียจาก S.cerevisiae แต่เปลี่ยนจาก sucrose เป็น sodium chloride

2. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อวัด ATPase activity จะทำในภาชนะทรงสูงขนาดเล็ก(ความจุประมาณ 5-10 มล.) โดยแช่ส่วนล่างใน waterbath เพื่อควบคุมให้อุณหภูมิของการทดลองคงที่ที่ 30°C

ส่วนประกอบของ incubation medium ที่ใช้ประกอบด้วย HEPES buffer 2 mM.(pH 7.2),$MgCl_2$ 2 mM. และ KCl 121 mM.(เป็น isotonic buffer เช่นเดียวกัน)

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียและ intact yeast ในสภาวะต่างๆ

ในการศึกษาเพื่อทดสอบหน้าที่ในการหายใจของไมโตคอนเดรีย หรือการศึกษาที่เกี่ยวกับออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชั่น ในการวิจัยนี้จะวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียและ intact cell ในสภาวะต่างๆโดยใช้วิธีที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique(46-47) โดยใช้เครื่องมือที่สำคัญคือ Gilson

reaction chamber (รูปที่ 13) ซึ่งจะมีความจุประมาณ 1.8-2 มล. โดยมี oxygen electrode (Clark type) ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับของเหลวใน chamberและ electrode นี้จะต่อเข้ากับเครื่อง Biological oxygen monitor (YSI model 53)ซึ่งทำให้ทราบปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน chamber ตลอดเวลา นอกจากนี้เราสามารถบันทึกระดับของออกซิเจนใน reaction chamber ออกมาทันทีในรูปของกราฟโดยการต่อ out put ของ oxygen monitor เข้ากับ Gilson recorder(model N-2) เป็นตัวบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนใน chamber โดยจะปรากฏลักษณะกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่างๆในลักษณะ ของ tracing

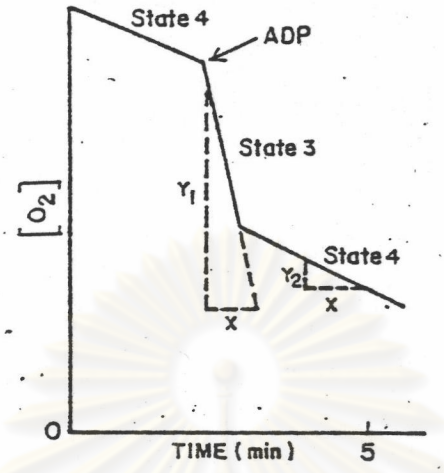
นอกจากนี้ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียและระหว่างที่ไมโตคอนเดรีย ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆใน reaction chamber นั้นจะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆของปฏิกิริยา(reaction mixture) ใน reaction chamber เข้ากันได้ดี และสามารถควบคุมอุณหภูมิของการทดลองต่างๆใน reaction chamber ให้คงที่ที่อุณหภูมิที่ต้องการโดยผ่านน้ำที่มีอุณหภูมิที่ต้องการไหลผ่านเข้าและออกอยู่บริเวณรอบนอก reaction chamber (water jacket)

<u>การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ(RCI),อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียและ intact yeast ในระยะต่างๆ</u>

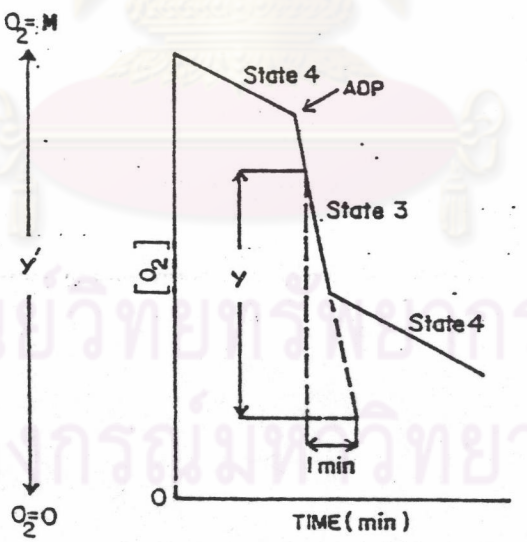
1. <u>การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ(Respiratory Control Index)</u>

การเรียกชื่อระยะต่างๆ(states) ของการหายใจของไมโตคอนเดรียดังได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น ซึ่งเราสามารถคำนวนหาค่าดัชนีควบคุมการหายใจ(RCI) โดยวิธีของ Chance and Willium (48) ดังนี้

$$RCI = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4}} = \frac{\text{ความชันของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชันของ tracing ใน state 4}}$$



รูปที่ 14 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 15 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 10313072

ถ้าพิจารณาจากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 14 ในการหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 นั้น ทำได้โดยการลากเส้นในแกน X ให้ยาวเท่ากัน ทั้งใน state 3 และ state 4 จะทำให้ค่า RCI = Y_1/Y_2

<u>การคำนวณหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย และ intact yeast ในระยะต่างๆ</u>

การคำนวนอัตราการใช้ออกซิเจนจากกรณี tracing ตัวอย่างในรูปที่ 15 สามารถคำนวนได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{Y \times M}{Y'} \quad \text{มคอ.ออกซิเจน/นาที}$$

ในที่นี้ Y = ความสูงของเส้น Y ในรูป

Y´ = ความสูงของเส้น Y´ ในรูป

M = จำนวนมคอ.ออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียหรือ intact yeast ใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า M นี้ขึ้นกับปริมาตรของ reaction mixture ที่ให้ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือถ้ามี reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก รวมทั้งกรณีที่อุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่ออุณหภูมิสูง การคำนวนหาค่า M จะหาได้จาก การคำนวนค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 มล.(A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction chamber จะได้จำนวนของออกซิเจนที่อิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด

$$A = \frac{S \times P \times N \times 10^6}{V \times 100} \quad \text{มคอ.ออกซิเจน/มล.}$$

โดยในที่นี้ A = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม(absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.) โดยที่มีค่า = 0.02831 ที่ 25°C และ 0.02608 ที่ 30°C

P = จำนวนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรของก๊าซ(ที่ 0°C และ 760 มม.) เทียบเท่ากับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 มล.

เมื่อแทนค่าต่างๆลงในสมการดังกล่าวข้างต้น คำนวนหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล.(A) ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ได้เท่ากับ 0.5308 และ 0.4890 มคอ.ออกซิเจน/มล. ตามลำดับ ซึ่งจะประมาณค่าออกซิเจนดังกล่าวมีค่าเท่ากับปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ที่ใช้ 1 มล. เมื่อต้องการทราบปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด ก็นำค่า A ที่คำนวนได้คูณกับปริมาตรสุดท้ายใน reaction chamber ซึ่งจะเท่ากับ M นำไปแทนค่าหาอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 (ดังตัวอย่าง)รวมทั้งในระยะอื่นๆได้ในทำนองเดียวกัน

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในปฏิกิริยา แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวนได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่มีหน่วยเป็น จำนวนมคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

นอกจากการคำนวนหาอัตราการใช้ออกซิเจนดังกล่าวมาแล้ว ยังสามารถคำนวนออกมาในรูปของ จำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที ได้ เช่นในกรณี tracing รูปที่ 15

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $\frac{Y \times A}{Y'}$ มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

ในที่นี้ Y = ความสูงของเส้น Y ในรูป

$Y^{'}$ = ความสูงของเส้น $Y^{'}$ ในรูป

A = จำนวนมคอ.ออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล.

<u>การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย</u>

การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียอาจกระทำได้ 2 วิธีคือ โดยการวัดจำนวน H^{+} ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH Meter(49) และอีกวิธีหนึ่งโดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายของ ATP (50) ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีหลังในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งจะมีขั้นตอนและหลักการสำคัญดังต่อไปนี้คือ

<u>ขั้นที่หนึ่ง</u> incubate ไมโตคอนเดรียกับสารต่างๆที่ต้องการจะดูผลใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วจึงทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเอา reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที

<u>ขั้นที่สอง</u> นำ sample ที่ได้จากขั้นแรกไปวิเคราะห์หา Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (51) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชั่นของ phosphomolybdate complex โดย Fiske Subbarow reducing agent(ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 มล.,20% sodium sulfite 2.5 มล. และ 1-amino-2-naphol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม)เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำสารละลายที่เกิดสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่ปริมาตรเท่า sample เป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆครอบคลุมค่าของ sample

<u>วิธีการหาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น</u> มีขั้นตอนการปฏิบัติได้ดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 1.65 มล. ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath และปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 30 °C พร้อมทั้งมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 มคล. ตามลงไป

3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบตามลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะใช้ solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน หรืออาจจะข้ามไปทำข้อ 4)

4. เติม 0.1 M ATP 100 มคล. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที

5. ดูด reaction mixture ปริมาตร 1 มล. แล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% น.น./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid 1 มล. อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที

6. นำไป centrifuge ประมาณ 10 นาที

7. ดูดส่วน supernatant มา 1 มล.(ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 มล.ของ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.1,0.25,0.50,1,1.50 และ 2 mM. แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M. H_2SO_4 acid 5 มล. อยู่ก่อนหน้าแล้ว เขย่าให้เข้ากัน

8. เติม 2.5% น.น./ปริมาตร ammonium molybdate 0.8 มล.

9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 มล. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample ไปเทียบหาปริมาณ Pi จาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 2 = 6) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นตามต้องการ

(หมายเหตุ ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายได้ไม่หมด ให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่ได้ในขวดชา และเก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน)

<u>การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย</u>

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Lowry และคณะ(52) และดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller(53) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่างจะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper และอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain แล้วเกิดเป็นสีน้ำเงิน เมื่อนำสารละลายสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่า sample เป็น blank และให้ทำปฏิกิริยาต่างๆเช่นเดียวกับ sample เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

ผลจากการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆจะแตกต่างกันไปตามแต่ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโตคอนเดรียที่มีอยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้ในแต่ละครั้ง จึงต้องทำการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียเพื่อนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบผลดังกล่าว

<u>วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย</u> มีขั้นตอนการปฏิบัติได้ดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 มคล. ด้วยน้ำกลั่น 3 มล. จะได้สารละลาย A

2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 มล.แล้วเติม alkaline copper reagent 1 มล. (กรณีที่เป็น blank ให้ใช้น้ำกลั่น 1 มล. และกรณีที่ทำ standard curve ใช้ 1 มล.ของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0.05,0.10,0.15, 0.20,0.25 และ 0.30 มก./มล. แทนสารละลาย A)เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที

3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 มล.

4. นำไป incubate ใน water bath ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50°C เป็นเวลา 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100)จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ใน reaction chamber ต่อครั้งๆละ 100 มคล. มีหน่วยเป็น มก.โปรตีน ซึ่งถ้านำมาหารด้วย ปริมาตรใน incubation mixture จะเป็นค่าโปรตีนที่มีอยู่ใน incubation mixture 1 มล. มีหน่วยเป็น มก.โปรตีน/มล.

<u>การเตรียมสารละลายที่ใช้</u>

- alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วน ของ 0.5% $CuSO_4$ ที่ละลายอยู่ใน 1% (นน./ปริมาตร) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10% Na_2CO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M. NaOH

- Folin-Phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's Phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตร/ปริมาตร) และเตรียมใช้ทันที

การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ปกติตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวยาและสารเคมีต่างๆจะใช้น้ำกลั่น 3 ครั้ง (tri-distrilled water) และในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการ จะใช้สารละลายของ KOH หรือ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นหลัก กรณีตัวยาหรือสารละลายใดที่มีการละลายในน้ำได้น้อยมากจะใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของตัวยาและสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น เช่น 1 M. glutamate + 1 M. malate(pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 1 M. succinate (pH 7.2) ในขนาด 10 มคล.และ 25 มคล.,1 M.glucose 10 มคล., 0.3 M. ADP+ 0.6 M.Pi(pH 7.2) 2 มคล.,DNP 0.05 M. 2-4 มคล., 0.1 M.ATP (pH7.2) 100 มคล.,0.25 M. sucrose ,1 mM. EGTA(pH 7.2), 1 M. HEPES buffer(pH 7.2),0.098 M. $MgCl_2$, 2.3 M. KCl,0.2 M. $CaCl_2$ ในขนาด 2 มคล.,0.2 M. KH_2PO_4 ในขนาด 2 มคล., และ 10 มก./มล. menadione ในขนาด 1-10 มคล.

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของตัวยาและสารเคมีที่ละลายใน DMSO เช่น 0.5 มก./มล. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ขนาด 1-12 มคล. และ 2.5 มก./มล.ในขนาด 4-20 มคล.,10 มก./มล. rotenone ขนาด 1 มคล., 10 มก./มล. lawsone ขนาด 1-10 มคล.และ 0.5 mM. CCCP ขนาด 5 มคล.

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของตัวยาและสารเคมีที่ละลายในเอทานอล เช่น 10 มก./มล. oligomycin ในขนาด 1 มคล. และ 10 มก./มล. antimycin A ขนาด 1 มคล.

2. แหล่งที่มาของตัวยาและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย มีดังนี้

2-methoxy-1,4-naphthoquinone จากภาควิชาเภสัชเวท

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

lawsone จากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชสาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่สั่งซื้อจากบริษัท Sigma chemical ได้แก่ sucrose,HEPES, L-glutamic acid, malic acid,succinic acid, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, sodium sulfite,sodium bisulfite,potassium chloride,cupric su lfate,sodium hydroxide,potassium hydroxide, DNP,ATP,ADP, 2.5% w/v ammonium molybdate, oligomycin,potassium phosphate, bovine serum albumin, Folin-Ciocalteu Phenol reagent, EGTA,rotenone ,antimycin,menadione, calcium chloride,potassium dihydrogen phosphate,dipotassium hydrogen phosphate, Lyticase@ enzyme,phenylmethylsulfonyl fluoride,dithiothreitol, TRIZMA base และ pyruvic acid

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท E.Merck,Darmstadt คือ mannitol, magnesium chloride,sodium carbonate,sulfuric acid,hydrochloric acid และ sorbitol

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Analytical Carlo Erba คือ potassium tartrate

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Riedel-De Haen AG Seelze-Hannover คือ absolute ethanol

<u>การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

1. <u>oxygraph tracing</u> ลอกจาก oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลอง พร้อมทั้งแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ โดยแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ มีหน่วยเป็นจำนวนมคอ.ของออกซิเจน/มล./นาที

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้สถิติชนิด the two-tailed unpaired student t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง

ผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae.*

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ทางด้านจุลชีววิทยา โดยจะศึกษาเพื่อหาระดับของสารนี้ที่มีผลในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *S.cerevisiae* คือหาค่าความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ(MIC = minimum inhibitory concentration) ตลอดจนความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ(MFC = minimum fungicidal concentration)โดยใช้วิธี broth dilution ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. การเตรียมเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* บน malt extract-yeast extract agar slant เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อจะทำการทดลองใช้ malt extract-yeast extract broth ล้างเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และปรับจำนวนเซล/มล. ในsuspension ของเชื้อที่จะใช้ให้ได้ประมาณ 10^5 เซล/มล.

2. วิธีทำการทดลอง

วิธีที่ใช้นี้ดัดแปลงจากวิธีของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคณะ(12)

ละลายสาร 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในตัวทำละลาย DMSO ให้มีความเข้มข้น 160 มคก./มล. และ 80 มคก./มล.และกรองสารละลายดังกล่าวผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อกรองเชื้อแบคทีเรียออก

ใส่ malt extract- yeast extract broth จำนวน 1 มล. ในหลอดทดลองขนาด 12 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ชุดๆละ 12 หลอด สำหรับการทดสอบผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone 2 ชุด อีกชุดหนึ่งสำหรับเป็น solvent control

เริ่มการทดลองในการทดสอบผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในแต่ละชุดนั้น หลอดที่ 1 ใส่สารละลายของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่เตรียมไว้ 1 มล.(160 มคก./มล.)เขย่าให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ 1 มล. แล้วดูดส่วนผสมนี้ 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอยู่ และถ่ายต่อไปตามลำดับ จนถึงหลอดที่ 10 ดูดส่วนผสมที่ได้ออกทิ้ง 1 มล. ส่วนหลอดที่ 11 เติมสารละลายของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ชนิดความเข้มข้น 80 มคก./มล. จำนวน 1 มล.สำหรับเป็น drug control แล้วเติม suspension ของเชื้อ(10^5 เซล/มล.) ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ยกเว้นหลอดที่ 11 ของทั้งสองชุด เขย่าให้เข้ากันดี ในหลอดทดลองจะมีความเข้มข้นของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ลดลงตามลำดับดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบในหลอดทดลองต่างๆที่ใช้ในการทดสอบผลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

	หลอดทดลองที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
media broth(มล.)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
สารละลายของMNQ(มล.)	1	1#	1	1	1	1	1	1	1	1+	1*	0
suspensionของเชื้อ(มล.)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
final concentration (มคก./มล.)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.15	0.08	40	0

* ขนาด 80 มคก./มล.

\# ถ่ายสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วจากหลอดที่ 1 เรื่อยไปตามลำดับจนถึงหลอดที่ 10

\+ หลอดที่ 10 หลังจากผสมเข้ากันดีแล้วให้ดูดสารละลายทิ้งไป 1 มล.

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 3 เติมตัวทำละลายที่ใช้ละลาย 2-methoxy-1,4-naphthoquinone คือ DMSO ลงในหลอดที่ 1 แทนสารละลายของสารดังกล่าว และทำตามขั้นตอนทุกๆอย่างเหมือนกับ 2 ชุดแรก ทุกประการ ชุดที่ 3 นี้เป็น solvent control

นำหลอดทดลองทั้งหมดมา incubate ที่อุณหภูมิ 30°C ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นการเจริญเติบโตในหลอดที่เป็น culture control (หลอดที่ 12 ของทั้ง 3 ชุด)

การหาค่า MIC คือหลอดที่ไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อ และนำหลอดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชุด มาทำการทดสอบหาค่าของ MFC (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อได้) โดยดูดอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลอดนั้นมา 0.1 มล.เพาะเลี้ยงบน malt extract-yeast extract agar plate incubate ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อหรือมีเชื้อเจริญให้เห็นน้อยกว่า 5 colony

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย