บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 180 - 200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

ทำโดยใช้วิธีของ Hogeboom (45) ซึ่ง Myers and Slater (46) เป็นผู้บรรยายไว้โดยดัดแปลงเล็กน้อย ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็งอยู่ตลอดเวลา (ice cold) ส่วนอุณหภูมิของ refrigerated centrifuge ที่ใช้ในการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวจะตั้งไว้ที่ 4° องศาเซลเซียส

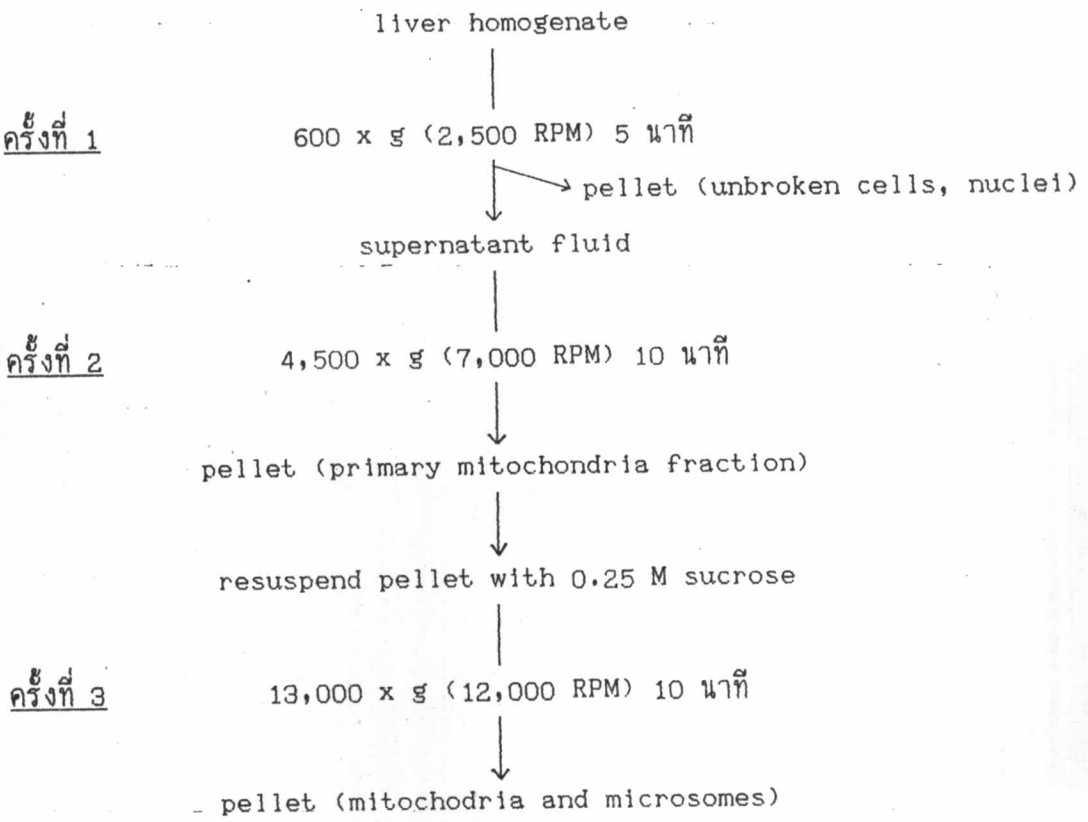
ขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่หนึ่ง

ทำให้หนูตายอย่างทันทีทันใดด้วยการตีหัวแล้วทำ cervical dislocation รีบตัดตับมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) หลาย ๆ ครั้งจนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลายเดิมประมาณ 60 - 70 มล. ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร หลังจากนั้นนำไป homoginize ด้วย glass homoginizer เพื่อให้เซลล์ตับแตก ในขั้นนี้จะได้ liver homogenate ประมาณ 70 มล. ต่อหนู 1 ตัว

ขั้นตอนที่สอง

ปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดยใช้ Hitachi high speed refrigerated centrifuge Himac SCR 20B, rotor model RPR 18-3 ซึ่งจะปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภาพในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifugation

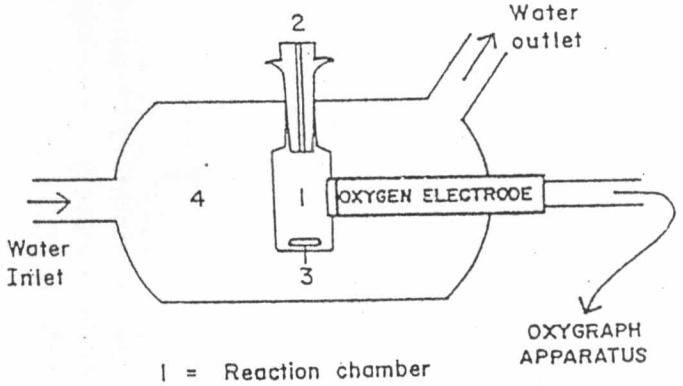
จากรูปที่ 9 pellet ที่ได้จากการปั่นครั้งสุดท้ายจะเห็นเป็นสองชั้น โดยชั้นบนจะมีสีชมพูและเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ คือชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างจะมีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่นกว่าคือชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วนของ supernatant fluid ทิ้งแล้วล้างส่วนของไมโครโซมออกให้หมดโดยใช้ 0.25 M sucrose หลังจากนั้น resuspend ไมโตคอนเดรียที่ได้ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2 - 3 มล. และ homoginize เบา ๆ ด้วยมือให้เข้ากันดี สุดท้ายจะได้ mitochondrial suspersion สำหรับใช้ในการทดลองความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีนมีค่าประมาณ 25 - 40 มก./มล. และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทจะได้ค่า RCI อยู่ระหว่าง 4 - 6 (ที่ 37°C)

การ incubate ไมโตคอนเดรีย และ incubation medium

การ incubate ไมโตคอนเดรีย จะแบ่งเป็น 2 กรณีคือ สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย และสำหรับการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

1. การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อวัดอัตราการหายใจในสภาวะต่าง ๆ กระทำใน Gilson reaction chamber (รูปที่ 10) โดยปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37°C



รูปที่ 10 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

Incubation medium ที่ใช้

- incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการวิจัยนี้ ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (pH 7.2) $MgCl_2$ 2 mM และ KCl 92 mM (เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 milliOsmolar)

- การทดลองเกี่ยวกับผลการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium จะใช้ incubation medium ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน เพียงแต่ปรับ pH ของ HEPES buffer ไว้ที่ pH 7.0, 7.2 และ 7.4 เท่านั้น

- การทดลองเกี่ยวกับผลของ Mg^{2+} ใน medium ส่วนประกอบของ incubation medium คล้ายกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน แต่จะเปลี่ยนความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 0, 2, 5, 10 mM และปรับความเข้มข้นของ KCl ตาม (เพิ่มขึ้นหรือลดลง) เพื่อให้ได้ isotonic buffer ที่มีความเข้มข้นรวม 250 milliOsmolar เท่าเดิม

- incubation medium สำหรับศึกษากระบวนการขนส่งแคลเซียม (calcium transport) ของไมโตคอนเดรีย จะมีส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน เพียงแต่เพิ่ม inorganic phosphate (KH_2PO_4) ลงไป 0.5 mM

- incubation medium สำหรับศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase จะใช้ phosphate buffer 0.024 M pH 7.2

2. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อวัด ATPase activity กระทำในภาชนะทรงสูงซึ่งมีความจุประมาณ 5 - 10 มล. โดยส่วนล่างแช่ใน water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C

สำหรับ incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง จะมีส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้เป็นมาตรฐานดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 1

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

การศึกษาเพื่อทดสอบถึงกระบวนการหายใจของไมโตคอนเดรีย หรือการศึกษาที่เกี่ยวกับออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชัน ในการวิจัยนี้จะวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique (47-48)

เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่าง ๆ ดังนี้คือ Gilson reaction chamber (รูปที่ 10) ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8 - 2.0 มล. และมีฝาเปิดปิดได้ เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้ โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมเข้ากับ reaction chamber ข้อมูลจาก oxygen electrode จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีหน้าปัดบอกถึงปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ใน chamber ขณะนั้น ทำให้สามารถทราบถึงปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังสามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ออกมาทันทีโดยต่อ output ของเครื่อง oxygen monitor เข้ากับเครื่อง Gilson recorder (model N2) ซึ่งจะบันทึกออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่าง ๆ tracing ที่ปรากฏบนกระดาษกราฟโดยวิธีนี้เรียก oxygen-electrode tracing (polarographic tracing, oxygraph tracing)

ระหว่างที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ใน reaction chamber นั้นจะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยา (reaction mixture) ใน reaction chamber เข้ากันดีตลอดเวลา และสามารถควบคุมอุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber ให้คงที่ตามต้องการ โดยใช้น้ำที่ถูกปรับอุณหภูมิแล้วไหลผ่านเข้าและออกอยู่ใน chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งล้อมรอบ reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง

สำหรับการเติมสารต่าง ๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรีย จะใช้ microsyringe สอดลงในฝาจุก (stopper) ของ reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลองได้

สำหรับการศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase นั้นอาศัยหลักการในการติดตามการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเช่นเดียวกัน monoamine oxidase เป็นเอนไซม์ที่พบบริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของไมโตคอนเดรีย มีหน้าที่ออกซิไดซ์สารพวก amines โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังนี้

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \longrightarrow R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ จำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษา activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้สับสเตรท และ incubation medium ที่เหมาะสม ในการวิจัยนี้จะใช้ tyramine เป็นสับสเตรท ส่วน incubation medium จะใช้ phosphate buffer ดังที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น นอกจากนี้ จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates โดยไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดซ์ amine substrates ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบถึง monoamine oxidase activity ได้

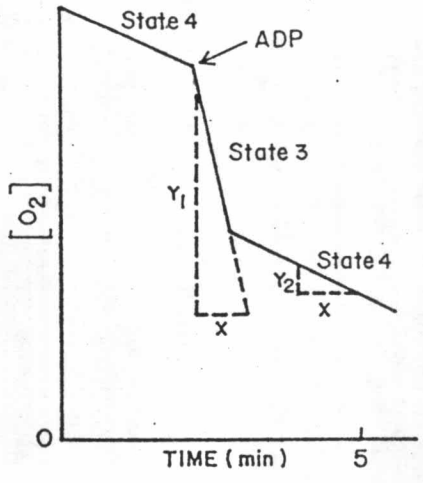
<u>การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ</u>

1. <u>การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ</u>
   (respiratory control index, RCI)

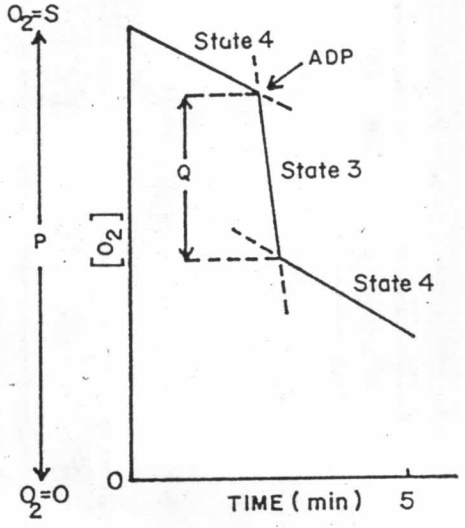
การเรียกชื่อระยะต่าง ๆ ของการหายใจ (metabolic or respiratory states) ของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ กระทำตามวิธีของ Chance and Williams (49) ดังนี้

RCI = อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 / อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4
= ความชันของ tracing ใน state 3 / ความชันของ tracing ใน state 4

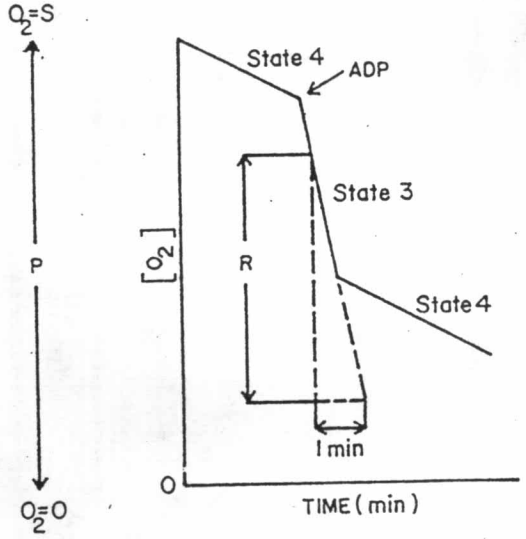
จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 11 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 นั้น ทำได้โดยการลากเส้นในแกน X ให้ยาวเท่ากันทั้งใน state 3 และ state 4 จะได้ค่า RCI = Y_1/Y_2



รูปที่ 11 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 12 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 13 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

2. <u>การคำนวณอัตราส่วน ADP/O</u>

ใช้วิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (50) ซึ่งสรุปได้ดังนี้

ADP/O = จำนวน มคม.ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา / จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3

จำนวน มคม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา สามารถคำนวณได้จากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา ส่วนจำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ไประหว่างเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างในรูปที่ 12 ดังนี้

จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3 = (Q/P) x S

ในที่นี้ P = ความสูงของเส้น P ในรูป
Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป
S = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามี reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากเช่นเดียวกัน

การคำนวณหาค่า S หาได้จากการคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 มล. (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด

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

ในที่นี้ A = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตร เมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02608 ที่ 30°C และ 0.02373 ที่ 37°C

P = จำนวนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

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

แทนค่าเหล่านี้ลงในสมการข้างต้น คำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37°C มีค่าเท่ากับ 0.4449 มคอ.ออกซิเจน/มล. ซึ่งจะประมาณค่าออกซิเจนดังกล่าวมีค่าเท่ากับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ที่ใช้ 1 มล.

3. <u>การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ</u>

จากตัวอย่าง tracing ในรูปที่ 13 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $(R/P) \times S$ มคอ.ออกซิเจน/นาที

ในที่นี้ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา ค่า S นี้หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.2

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา แล้วนำมาหาอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น จำนวน มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

นอกจากนี้ ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ออกมาในหน่วยของ จำนวน มคอ.ของออกซิเจน/มล./นาทีได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 13 ดังนี้

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = (R/P) x A มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

ในที่นี้ R = ความสูงของเส้น R ในรูป
P = ความสูงของเส้น P ในรูป
A = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ในน้ำ 1 มล.
ค่า A นี้หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 6.2
ในการวิจัยนี้ ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 0.4449 มคอ.ออกซิเจน/มล.

<u>การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย</u>

การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธีคือ โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (51) หรือโดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ ATP (52) ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีหลังในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้คือ

<u>ขั้นที่หนึ่ง</u> incubate ไมโตคอนเดรียกับสารต่าง ๆ ที่ต้องการจะดูผลใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ trichloroacetic acid อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

<u>ขั้นที่สอง</u> นำ sample ที่ได้จากขั้นแรกไปวิเคราะห์หา Pi ที่เกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (53) ซึ่งจะวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชั่นของ phosphomolybdate complex โดย Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 มล., 20% sodium sulfite 2.5 มล.

และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำสารละลายซึ่งเกิดสีน้ำเงินขึ้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่ปริมาตรเท่า sample เป็น blank แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ครอบคลุมค่าของ sample

<u>วิธีการหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย</u> มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 1.65 มล. ลงในภาชนะทรงสูงเล็ก ๆ ที่มีส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath และปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37°C พร้อมทั้งมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 มคล. ตามลงไป

3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบตามลงไป ทิ้งไว้ 2 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะใช้ solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน หรืออาจจะข้ามไปทำข้อ 4)

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

5. ดูด reaction mixture ในปริมาตร 1 มล. แล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ 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, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 mM แทน) แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2 M H_2SO_4 5 มล. อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน

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

9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 มล. เขย่าให้เข้ากันดีแล้วตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample ไปเทียบหาปริมาณ Pi จาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 2 x 2 = 4) จะได้ค่าความเข้มข้น และปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นตามต้องการ

(หมายเหตุ : ในการเตรียม Fiske Subarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน)

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียใน mitochondrial suspension จะมีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ และความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้จากตับหนูขาวในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ฉะนั้น จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรีย โดยการวัดปริมาณโปรตีนของ mitochondrial suspension เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (54) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (55) จะเป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสีเมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่าง จะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper และอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank และให้ทำปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่นเดียวกับ sample นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

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

2. ดูดสารละลาย A ในปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม alkaline copper reagent 1 มล. (กรณีเป็น blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มล. และกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 มล. ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มก./มล. แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากันปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที

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

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

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้น และปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ใน reaction chamber ต่อครั้ง ๆ ละ 100 มคล. มีหน่วยเป็น มก.โปรตีน ซึ่งถ้านำมาหารด้วยปริมาตรของ incubation mixture จะได้เป็นค่าของโปรตีนที่มีอยู่ใน incubation mixture 1 มล. มีหน่วยเป็น มก.โปรตีน/มล.

<u>การเตรียมสารละลายที่ใช้</u>

- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 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 ด้วนน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตร/ปริมาตร) และเตรียมใช้ทันที

<u>การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี</u>

1. <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง</u>

ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารเคมีต่าง ๆ โดยปกติจะใช้น้ำกลั่น 3 ครั้ง (tridistilled water) และในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการ จะใช้สารละลายของ KOH หรือ HCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กรณีสารเคมีที่ละลายได้น้อยในน้ำจะใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายแทน

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น เช่น 1 M glutamate + 1 M malate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 1 M succinate (pH 7.2) ในขนาด 10 มคล., 0.4 M ascorbate + 0.1 M TMPD ขนาด 10 มคล., 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ขนาด 2 มคล., 0.05 M DNP 2-4 มคล., 0.1 M ATP (pH 7.2) 100 มคล., 0.1 M $CaCl_2$ 8 มคล., 0.1 M tyramine 2 มคล., 0.1 M DTNB 2 มคล., 1 M DTT 2 มคล., bovine serum albumine 250 มก./มล. ในขนาด 20 - 120 มคล., 1 M α-ketoglutarate 10 มคล., 1 M β-hydroxybutyrate 10 มคล., 1 M pyruvate 10 มคล., 0.25 M sucrose, 1

11719 4685

mM EGTA (pH 7.2), 1 M HEPES buffer (pH 7.2), 0.05 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl, 0.025 M KH_2PO_4, 0.024 M KH_2PO_4 (pH 7.2)

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของสารเคมีที่ละลายในเอธานอล เช่น 5 มก./มล. oligomycin ในขนาด 2 มคล., 20 mM amiodarone ในขนาด 1-10 มคล.

ตัวอย่างความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของสารเคมีที่ละลายใน DMSO คือ rotenone 5 มก./มล. ในขนาด 2 มคล.

2. <u>แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย</u> มีดังนี้

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Sigma chemical Co. ได้แก่ L-glutamic acid, malic acid, succinic acid, ascorbic acid, TMPD, ADP, potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, DNP, ATP, $CaCl_2$, tyramine, pargyline, DTT, DTNB, bovine serum albumin, α-ketoglutaric acid, DL- β -hydroxybutyric acid, pyruvic acid, sucrose, EGTA, HEPES, $MgCl_2$, KCl, oligomycin, amiodarone, rotenone, DMSO, Folin-Ciocalteu Phenol reagent, sodium sulfite, sodium bisulfite, ammonium molybdate, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, cupric sulfate, sodium hydroxide

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท E. Merck, Darmstadt คือ sodium carbonate, sulfuric acid, hydrochloric acid, potassium hydroxide

สารเคมีที่ซื้อจากบริษัท Analytical Carlo Erba คือ Potassium tartrate

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

การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. Oxygraph tracings

ลอกจาก oxygraph tracings ที่ได้จากการทดลอง พร้อมทั้งแสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่าง ๆ โดยแสดงเป็นตัวเลขในวงเล็บ มีหน่วยเป็น จำนวน มคอ. ของออกซิเจน/มล./นาที

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้ two-tailed paired Student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่าง