หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) เพศผู้พันธุ์ Wistar มีน้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัม เป็นสัตว์ทดลองตลอดการทดลองนี้ โดยได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

2. วิธีทำการวิจัย

2.1 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

ไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวเตรียมโดยวิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้ได้อธิบายไว้ ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 M ซึ่งแช่ในน้ำแข็งเป็น medium แช่ homogenizer และ centrifuge tube (ทำด้วย polyallomer ขนาด 7 มล.) ในน้ำแข็งตลอดการเตรียมไมโตคอนเดรีย ปั่นแยกไมโตคอน-เดรียจากเซลของตับหนูด้วยเครื่อง Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge Model 20 PR-52 D ของ Hitachi โดยใช้ Rotor Model RPR 20-3 786 และตั้งอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียส

ในขั้นแรกเตรียม liver homogenate โดยการฆ่าหนูด้วยการตัดคอ หลังจากนั้นตัดตับออกมาใส่ใน beaker ทันทีซึ่งมีสารละลายของซูโครสความเข้มข้น 0.25 M ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งและล้างด้วยสารละลายของซูโครสความเข้มข้น 0.25 M ซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็ง 2-3 ครั้งเพื่อเอาเลือดออกโดยใช้ครั้งละประมาณ 20-30 มล. ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ และ homo-genize อย่างเบา ๆ ด้วย glass homogenizer ขนาด 30 มล. โดยมี pestle ที่เป็นโลหะที่หุ้มปลายด้วย teflon และหมุนได้โดยการทำงานของมอเตอร์ เมื่อ homogenate เข้ากันดีแล้วปิดมอเตอร์ ข้อควรระวังไม่ควร homogenize ตับนานเกินไป เพราะว่าอาจทำให้

012332

เมมเบรนของไมโตคอนเดรียบางส่วนถูกทำลายด้วยแรงที่ใช้ในการ homogenize ได้

ขั้นต่อมาแยก mitochondrial suspension จาก liver homogenate โดยการนำ homogenate ใส่ลงใน centrifuge tube และปั่นที่ 600g (2,500รอบต่อนาที) เป็นเวลา 6 นาที เพื่อแยกเอาเซลที่ยังไม่แตกและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลที่หนักออก รินชั้น supernatant fluid มาใส่ใน centrifuge tube และปั่นครั้งที่ 2 ที่ 4,500 g (7,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที ในการปั่นครั้งนี้จะรินชั้น supernatant ทิ้งไป และนำ pellet ที่เหลือส่วนล่างมา resuspend ด้วยสารละลายของซูโครส 0.25M ซึ่งแช่ในน้ำแข็ง และทำให้เข้ากันโดยใช้ glass homogenizer ขนาดความจุ 10 มล. และทำการปั่นครั้งที่ 3 ซึ่งเป็นครั้งสุดท้ายที่ 13,000 g (12,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนไมโตคอนเดรีย ในการปั่นแยกครั้งนี้จะมีไมโครโซมบางส่วนซึ่งมีสีชมพูตกลงมาอย่างหลวมๆ เหนือชั้นของไมโตคอนเดรียซึ่งอัดกันแน่นที่ก้นหลอดและมีสีน้ำตาลอ่อน รินชั้นของ supernatant fluid ทิ้งไปและล้างไมโครโซมที่ติดอยู่เหนือไมโตคอนเดรียออกด้วยสารละลายของซูโครส 0.25 M ครั้งละประมาณ 0.5 มล. 2 ครั้ง นำตะกอนไมโตคอนเดรียที่เหลืออยู่ก้นหลอดมา resuspend ด้วยสารละลายของซูโครส 0.25 M ประมาณ 1 มล. โดยการ homogenize ด้วยมืออย่างเบา ๆ ปริมาตรสุดท้ายของ mitochondrial suspension ประมาณ 1.5 - 2.5 มล. และแช่ในน้ำแข็งตลอดการทดลอง

2.2 การเตรียม hypotonic-treated mitochondria จากตับของหนูขาว

เตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวจำนวน 1 ตัวซึ่งวิธีการเตรียมไมโตคอนเดรียได้อธิบายไว้แล้วข้างต้น นำ mitochondrial suspension มา 2 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 3 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer ขนาดเล็กตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา $1\frac{1}{2}$ ถึง 2 ชม. หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งตลอดการทดลอง

2.3 การ incubate ไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อศึกษาถึงการหายใจและ ATPase activity กระทำใน chamber ขนาดเล็กซึ่งล้อมรอบด้วยน้ำไหลหมุนเวียนที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่

ที่ 37 องศาเซลเซียส reaction mixtures ถูกกวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ขนาดเล็ก

ในการศึกษา calcium transport incubate ไมโตคอนเดรียที่อุณหภูมิห้องใน beaker ขนาด 30 มล. reaction mixtures ถูกกวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ขนาดเล็ก

ส่วนประกอบของ incubation medium ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะแตกต่างกันแต่ละการทดลอง อย่างไรก็ตามในการทดลองส่วนใหญ่นั้น incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานจะประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM ที่ pH 7.4, $MgCl_2$ 8 mM และ KCl 83 mM ส่วน substrate และ cofactor ต่าง ๆ จะเติมลงไปใน incubation medium นี้ภายหลัง

สำหรับการศึกษา calcium transport ส่วนประกอบของ medium ที่ใช้ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM ที่ pH 7.4, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 92 mM และ KH_2PO_4 0.5 mM

2.4 การวัด oxygen uptake และการหาค่าอัตราส่วนของ ADP/O และค่าของดัชนีการควบคุมการหายใจ (Respiratory Control Index ย่อว่า RCI)

ทำการวัด oxygen uptake โดยไมโตคอนเดรียกระทำใน chamber ของ Gilson โดยใช้ Clark-typed oxygen electrode ต่อเข้ากับ oxygen monitor (YSI model 53) และบันทึกผลลงใน Gilson recorder (model N2) chamber ซึ่งล้อมรอบด้วยน้ำไหลหมุนเวียนที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส คน reaction mixture ต่าง ๆ ใน chamber ให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ขนาดเล็ก

อัตราของ oxygen uptake โดยไมโตคอนเดรียภายใต้สภาวะต่าง ๆ แสดงในหน่วยของไมโครอะตอมของออกซิเจนต่อ มล.ต่อนาที การหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายใน 1 มล. ของ incubation mixture สามารถคำนวณได้ดังสูตรต่อไปนี้

$$A = \frac{S}{V} \times \frac{P}{100} \times N \times 10^6 \text{ ไมโครอะตอมต่อมล.}$$

ในที่นี้

A = ไมโครอะตอมของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม (absorption coefficient)

ที่ 37 องศาเซลเซียส = 0.02373 (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0 องศาเซลเซียส และ 760 มม. ถูกดูดซึมโดยน้ำ 1 ปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.)

P = เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

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

แทนค่าเหล่านี้ลงในสมการข้างต้น คำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายใน reaction mixture 1 มล. ที่ 37 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 0.4449 ไมโครอะตอมออกซิเจนต่อ มล.

สามารถหาค่าอัตราของ oxygen uptake ค่าอัตราส่วนของ ADP/O (ไมโครโมลของ ADP ที่เติมลงไปต่อไมโครอะตอมของออกซิเจนที่ใช้) และค่าดัชนีการควบคุมการหายใจ(respiratory control index ซึ่งเป็นอัตราของ oxygen uptake ใน state 3 ต่ออัตราของ oxygen uptake ใน state 4) ตามวิธีซึ่งได้อธิบายไว้โดย Estabrook (1967)

2.5 การวัดการสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรีย

การสะสมและปลดปล่อยแคลเซี่ยมโดยไมโตคอนเดรียศึกษาได้โดยใช้ calcium-selective electrode (Orion model 93-20) ร่วมกับ reference electrode (Orion model 90-02) ซึ่ง electrodes ทั้ง 2 นี้ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) และบันทึกผลการทดลองลงใน Gilson recorder (model N2)

2.6 การวัด ATPase activity และการหาปริมาณของ inorganic phosphate

ATPase activity ของไมโตคอนเดรียวัดจากปริมาณของ inorganic phosphate (Pi) ที่ถูก hydrolysed จาก ATP ระหว่างช่วงเวลาของการ incubate ไมโตคอนเดรียใน reaction mixtures ที่เหมาะสม หยุดปฏิกิริยาโดยการดูด reaction mixtures 1 มล. ใส่ในหลอดที่มี trichloroacetic acid ความเข้มข้น 20% (นน./ปริมาตร) 1 มล. เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

การหาปริมาณของ inorganic phosphate ใช้วิธีของ Fiske และ Subbarow (1925) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชั่นของ phosphomolybdate complex โดยใช้สารที่เป็น reducing เฉพาะ จะเกิดเป็นสีน้ำเงิน reaction mixture ของแต่ละหลอดที่ใช้วิเคราะห์ประกอบด้วย sample ปริมาตร 1 มล. (ใช้น้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากันเป็น blank), sulfuric acid ความเข้มข้น 0.4 N ปริมาตร 5 มล., ammonium molybdate 2.5% ปริมาตร 0.8 มล. และ Fiske - Subbarow reducing agent 0.4 มล. (สารเคมีนี้ประกอบด้วย sodium bisulfite 15% 97.5 มล., 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม และ sodium sulfite 20% 2.5 มล.) เขย่า reaction mixtures นี้ให้ทั่วและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายซึ่งเกิดสีน้ำเงินที่ 650 nm ด้วยเครื่อง Bausch & Lomb Spectronic Model 20 หาปริมาณของ inorganic phosphate ในแต่ละ sample จาก standard curve ของ phosphate ซึ่งใช้ inorganic phosphate ในช่วงความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งคลุมค่าของ sample

2.7 การหาปริมาณของโปรตีน

การหาปริมาณของโปรตีนใน mitochondrial preparations ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งได้ดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) การหาปริมาณของโปรตีนโดยการเกิดสี วัดการเกิดเป็นสีน้ำเงินเมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ใน alkaline solution เกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper และ nitrogen atoms ใน peptide chains ขั้นตอนการทดลองทำดังนี้ ในแต่ละหลอด

ทดลองจะมี alkaline copper reagent 1 มล. (ซึ่งประกอบด้วย 1 ส่วนของ copper sulfate 0.5% ละลายใน potassium tartrate 1% และ 10 ส่วนของ sodium carbonate 10% ละลายใน sodioum hydroxide 0.5 N) เติมลงใน sample 1 มล. (ใช้น้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากันเป็น blank) ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ต่อมาเติม Folin phenol reagent ที่เจือจาง 3 มล. (เจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันทันทีและนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากตั้ง reaction mixture ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้ว ทำการวัดการดูดกลืนแสงของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Bausch & Lomb Spectronic Model 20 หาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในแต่ละ sample จาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นตัวมาตรฐาน

3. สารเคมีและตัวยา

สารเคมีและตัวยาส่วนใหญ่ละลายในน้ำซึ่งกลั่น 3 ครั้ง และบางกรณีอาจปรับสารละลายให้ได้ pH 7.4 ด้วย potassium hydroxide หรือ hydrochloric acid ยกเว้น reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) นำมาละลายในสารละลายของ 1% sodium bicarbonate แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบต่อไปนี้ละลายเฉพาะใน absolute alcohol เท่านั้นได้แก่ไพเพอรีน, oligomycin และ carbonyl-cyanide m-chloro--phenylhydrazone (CCCP)

ในการทดลองซึ่งใช้ alcohol ละลายตัวยาต่าง ๆ นั้น จะใช้ alcoholic solution ของยาต่าง ๆ เติมลงใน reaction mixture ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และทำ control โดยใช้เฉพาะ pure alcohol ในปริมาณที่เท่ากันเป็นตัวควบคุม

สารเคมีและตัวยาซึ่งใช้ในการทดลองและแหล่งที่มามีดังต่อไปนี้ :

ไพเพอรีน, ซูโครส, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), L-glutamic acid, succinic acid, malic acid,

ascorbic acid, TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine), 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, sodium sulfite, sodium bisulfite, potassium chloride, cupric sulfate, sodium hydroxide, calcium chloride, DNP (2,4-dinitrophenol), ATP (adenosine 5'-triphosphate), ADP (adenosine 5'-diphosphate), β-NADH (β-nicotinamide adenine dinucleotide-reduced form), ammonium molybdate, atractyloside, oligomycin, CCCP (carbonyl-cyanide m-chlorophenylhydrazone), potassium phosphate, bovine serum albumin และ Folin-Ciocalteu Phenol reagent ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical มลรัฐมิสซูรี magnesium chloride, sodium carbonate, sulfuric acid และ hydrochloric acid ซื้อจากบริษัท E. Merck, Darmstadt potassium tartrate ซื้อจากบริษัท Analyticals Carlo Erba และ absolute alcohol ซื้อจากบริษัท Riedel-De Haën AG Seelze-Hannover

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย