บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 150 - 200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

1.2 วิธีการเตรียมไมโตคอนเดรีย

ใช้วิธีของ Hogeboom (33) ซึ่ง Myers and Slater (34) เป็นผู้บรรยายไว้และดัดแปลงเล็กน้อย

ตลอดขั้นตอนการเตรียมและปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียที่เตรียมต้องแช่อยู่ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice cold) โดยมีอุณหภูมิประมาณ 4°C รวมทั้งขณะปั่นแยกไมโตคอนเดรียด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ทำที่อุณหภูมิเดียวกัน

ขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรียแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ก. ขั้นเตรียม homogenates

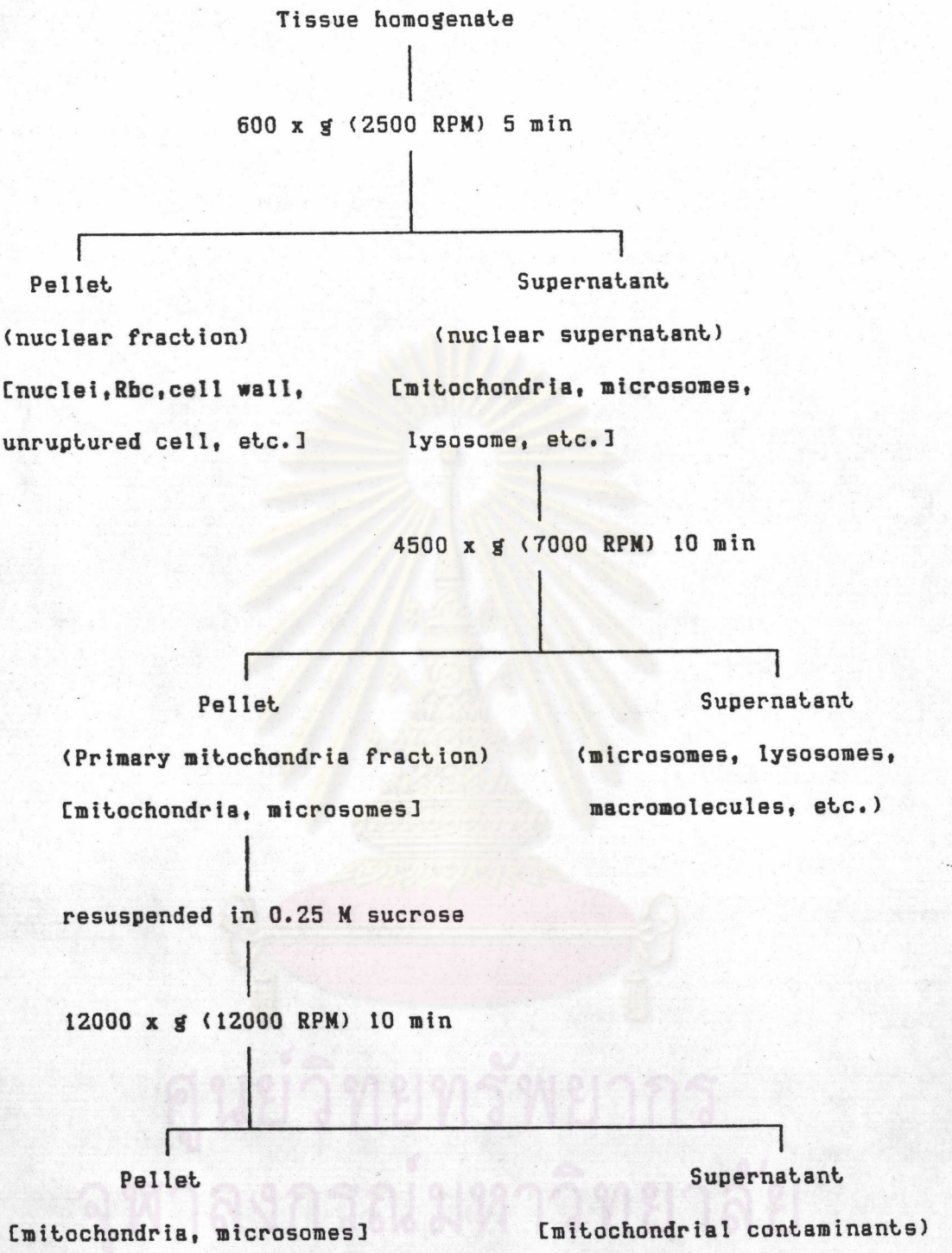
ทำให้หนูตายทันทีทันใดด้วยการตีหัว และทำ cervical dislocation แยกตับออกมาทันที ล้างด้วย homogenizing medium ที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA) (pH 7.2) แล้วแช่ในสารละลายเดิมปริมาตรประมาณ 50 - 60 มล. จากนั้นตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร แล้วนำไป homogenize ด้วย glass homogenizer เพื่อทำให้เซลตับแตก ให้ pestle หมุนด้วย

อัตราเร็ว 600 - 1000 รอบต่อนาที (33) ขั้นตอนนี้จะได้ liver homogenate ปริมาตร 60 - 80 มิลลิลิตรต่อตับหนู 1 ตัว

ข. ขั้นปั่นแยกไมโตคอนเดรีย

ปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate ที่อุณหภูมิ 4°C โดยใช้ automatic high speed refrigerated centrifuge (Himac SCR 20 B /18 B ของ Hitachi)ใช้ rotor model RPR 18-3 ตามแผนภูมิรูปที่ 10 ในขั้นตอนนี้มีการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 แสดงแผนภูมิขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรีย

1. นำ liver homogenate มาปั่นที่ 600 x g (2500 RPM) นาน 5 นาที เมื่อครบเวลา นำส่วนใสข้างบน (supernatant) ซึ่งประกอบด้วยไมโตคอนเดรีย, ไมโครโซม เป็นต้น ไปปั่นในขั้นตอนต่อไป ทิ้งส่วนตะกอนที่ประกอบด้วย nuclei, เม็ดเลือดแดง, ผนังเซล และเซลที่ไม่แตก

2. นำส่วนใส (supernatant)ที่ได้จากข้อ 1 มาปั่นต่อที่ 4500 x g (7000 RPM) นาน 10นาที เมื่อครบเวลาทิ้งส่วนใสข้างบนและนำส่วนตะกอนมา resuspeded ด้วย 0.25 M sucrose แล้ว homogenize ด้วยมือเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนกระจายรวมเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายซูโครส (ส่วนใสประกอบด้วยไมโครโซม, ไลโซโซม, macromolecule ส่วนตะกอนประกอบด้วยไมโตคอนเดรียและไมโครโซม)

3. นำตะกอนที่ resuspeded จากข้อ 2 มาปั่นต่อที่ 12000 x g (12000 RPM) นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาทิ้งส่วนใส นำตะกอนซึ่งแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นบนสีชมพูประกอบด้วยไมโครโซม ที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ ชั้นล่างสีน้ำตาลอ่อนประกอบด้วยไมโตคอนเดรีย ล้างตะกอนชั้นบนออกด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ครั้งจากนั้น resuspeded ตะกอนชั้นล่างด้วย 0.25 M sucrose ให้ได้ปริมาตรประมาณ 2-3 มิลลิลิตร และ homogenize ด้วยมือ ในขั้นนี้จะได้ mitochondiral suspension ซึ่งใช้สำหรับการวิจัย และเมื่อหาดัชนีการควบคุมการหายใจ (Respiratory control index, RCI) ที่ใช้ glutamate และ malate เป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 37°C ควรได้ค่ามากกว่า 4

การทำ osmotic-shocked หรือ hypotonic-treated mitochondria นำไมโตคอนเดรียที่ล้างเอาตะกอนไมโครโซมที่เกาะอย่างหลวม ๆ อยู่ชั้นบนออกด้วย 0.25 M sucrose 2-3 ครั้ง ตามข้อ 3 แล้วนำมา resuspended ตะกอนชั้นล่างด้วย 0.025 M sucrose ซึ่งอุณหภูมิของสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง ให้ได้ปริมาตรประมาณ 2-3 มล. และ homogenize ด้วยมือเบา ๆ นำไมโตคอนเดรียที่ resuspended แล้วใส่บีคเกอร์ขนาดความจุ 5-10 มล. ตั้งบีคเกอร์บน magnetic stirrer ปั่น mitochondrial suspension อย่างช้า ๆ นานประมาณ 1 ชั่วโมง 45 นาทีถึง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียว่ายอมให้สับสเตรทผ่านได้ดีโดยใช้ NADH เป็นสับสเตรท

แล้ว incubate นาน 1 นาที ใส่ uncoupler (DNP) เปรียบเทียบอัตราการหายใจ ก่อนใส่ uncoupler และหลังใส่ uncoupler อัตราการหายใจควรเท่า ๆ กัน

2. การ incubate ไมโตคอนเดรียและ incubation medium

2.1 สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรีย เพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ กระทำใน Gilson reaction chamber ดังรูปที่ 11 ปรับอุณหภูมิขณะทดลองให้คงที่ ที่ 37°C

2.1.1 Incubation medium สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย (oxidative phosphorylation)

ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (60 mOsM) pH 7.2

$MgCl_2$ 2 mM (6 mOsM)

KCl 92 mM (184 mOSM)

2.1.2 Incubation medium สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียม (calcium-stimulated respiration)

ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (pH 7.2)

$MgCl_2$ 2 mM

KCl 92 mM

KH_2PO_4 1 mM

2.1.3 การวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria กระทำใน Gilson reaction chamber เช่นกัน ปรับอุณหภูมิขณะทดลองให้คงที่ที่ 37°C

Incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria

ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (60 mOSM) pH 7.2

$MgCl_2$ 2 mM (6 mOSM)

KCl 30 mM (60 mOSM)

เป็น hypotonic buffer (ความเข้มข้นรวม 126 mOsM)

2.2 <u>การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรียที่เตรียมจากตับของหนูขาว</u>

การ incubateไมโตคอนเดรียเพื่อวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ทำในบีกเกอร์ขนาดเล็ก ความจุประมาณ 5-10 มล. ทดลองที่อุณหภูมิห้อง

Incubation medium สำหรับการวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase

ประกอบด้วย HEPES buffer 5 mM (pH 7.2)

$MgCl_2$ 2 mM

KCl 118 mM

2.3 <u>การวัดการขนส่ง แคลเซียมของไมโตคอนเดรีย</u> (mitochondrial calcium transport)

โดยใช้ calcium-selective electrode กระทำในภาชนะทรงสูงก้นโค้งความจุประมาณ 40 มล. และทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

Incubation medium สำหรับวัดการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย

ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM (pH 7.2)

$MgCl_2$ 2 mM

KCl 92 mM

KH_2PO_4 0.5 mM

3. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

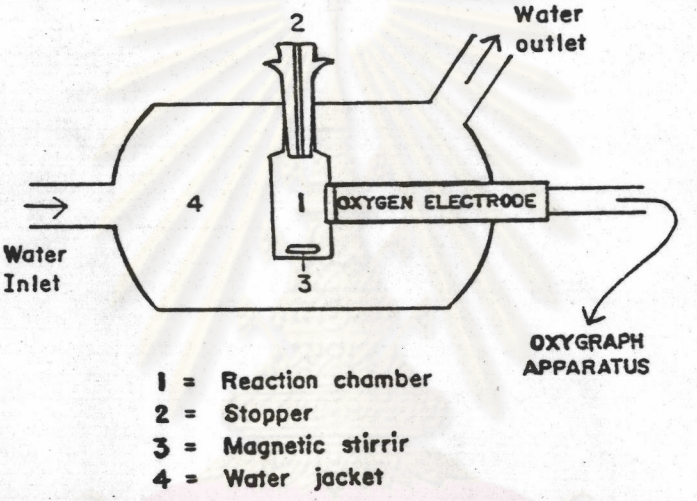
การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic technique โดยเครื่องมือประกอบด้วย Gilson reaction chamber ซึ่งจะมีความจุประมาณ 1.8-2 มล. มี Clark oxygen electrode ต่อเข้า reaction chamber นี้ อีกปลายหนึ่งของ electrode ต่อเข้ากับเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) และ out put จาก oxygen monitor ต่อเข้ากับ Gilson recorder (model N.2) ซึ่งจะบันทึกภาพออกมาเป็น tracing เรียกว่า oxygraph tracing

Gilson reaction chamber ประกอบด้วย ฝาจุก (stopper) ปิด เพื่อป้องกันออกซิเจนภายนอกรบกวนปฏิกิริยา และที่ฝาจุกมีท่อเล็ก ๆ เพื่อให้ใส่สารที่ต้องใช้ทำปฏิกิริยาต่าง ๆ และใช้ magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารต่าง ๆ ให้เข้ากันได้ดี และทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในสารละลายสมดุลกันทั่วทั้ง chamber สามารถปรับอุณหภูมิควบคุมให้คงที่ตลอดการทดลองโดยจะผ่านน้ำที่ปรับอุณหภูมิจาก water bath แล้วให้ไหลผ่านเข้าออกล้อมรอบ reaction chamber

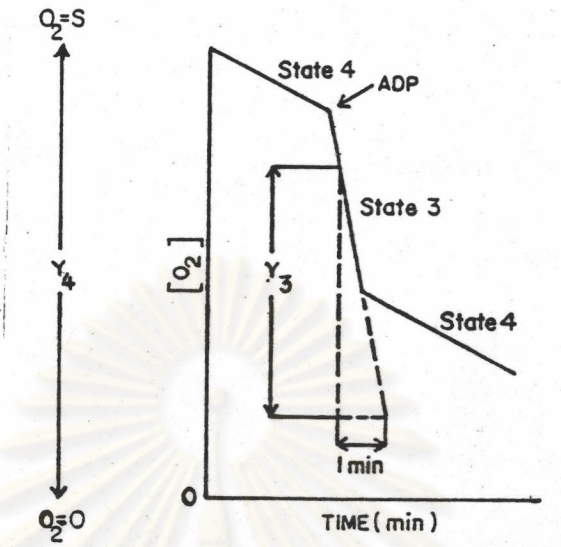
การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

การคำนวณหาค่าดัชนีที่ควบคุมการหายใจ (RCI) ใช้วิธีของ Chance and Willams (36)

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



รูปที่ 11 แสดงส่วนประกอบของ Gilson reaction chamber



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

<u>การคำนวณหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ</u>

ตัวอย่างการคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนแสดงดังรูปที่ 13

จากรูปที่ 13

อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 = $\frac{Y3 \times W}{Y4}$ มคอ.ออกซิเจน/นาที

ในที่นี้ Y3 = ความสูงของเส้น Y3 ในรูป

Y4 = ความสูงของเส้น Y4 ในรูป

W = จำนวนมคอ.ออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกริยา

ค่า W นี้ขึ้นกับปริมาตรของ reaction mixture ใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามี reaction mixture ปริมาตรมากออกซิเจนก็ละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก และที่อุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวได้มากกว่าเมื่ออุณหภูมิสูง

การคำนวณหาค่า W จะหาได้จากการคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture 1 มล.(A) คูณปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture จะได้จำนวนของออกซิเจนที่อิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด

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

ในที่นี้ A = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง [ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตรเมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.] โดยมีค่า 0.02373 ที่ 37°C

P = จำนวนของออกซิเจนในบรรยากาศ (21%)

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน (2)

V = ปริมาตรของก๊าซที่ 0°C และ 760 มม.เทียบเท่ากับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22400 มล.

แทนค่าต่าง ๆ ในสมการดังกล่าวข้างต้น คำนวณหาค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37°C ได้เท่ากับ 0.4449 มคอ.ออกซิเจน/มล.

การหาปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมดหาได้โดยนำค่า A ที่คำนวณได้คูณปริมาตรสุดท้ายของ reaction mixture chamber จะได้ค่า W นำไปแทนค่าหาอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และหาอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่าง ๆ ได้ในทำนองเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17156954

ถ้าต้องการทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียซึ่งมีหน่วยเป็นจำนวน มคอ. ออกซิเจน/มก.โปรตีน/นาที ให้นำปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามาคูณอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้

4. <u>การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย</u>

เอ็นไซม์ F_1F_o - ATPase (หรือ ATPsynthase) เป็นเอ็นไซม์ที่อยู่ใน inner membrane ของไมโตคอนเดรีย มีบทบาทในการ catalyse ปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{F_1F_o - ATPase} ADP + Pi + H^+$$

นั่นคือ การวัดการทำงานของเอ็นไซม์นี้กระทำได้ 2 วิธี คือ วัดปริมาณ H^+ ที่เพิ่มขึ้น โดยใช้ pH meter หรือวัดปริมาณ Pi ที่ได้จากการสลาย ATP ในการวิจัยนี้วัดปริมาณ H^+ ที่เพิ่มขึ้น โดยใช้ pH electrode ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) และต่อ output จาก pH/ion meter เข้ากับ Gilson recorder (moder N2) เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของจำนวน H^+ ใน reaction mixture

การคำนวณจำนวน H^+ ที่เปลี่ยนแปลงไปใน reaction mixture กระทำได้โดยใช้วิธีเปรียบเทียบกับกรดที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้ 0.2063 N H_2SO_4

5. <u>การวัดการขนส่งแคลเซียมโดยไมโตคอนเดรีย</u>

ในการวิจัยเพื่อศึกษาการขนส่งแคลเซียมของไมโตคอนเดรีย ใช้ calcium-selective electrode (Orion Research model 932001) คู่กับ reference

electrode (Orion Research-model 900200) โดยต่อ electrodes ทั้งคู่เข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) และต่อ output จาก pH/ion meter Gilson recorder (Model N2) เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} concentration ใน reaction mixture

6. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (37) ซึ่งดัดแปลงโดย Miller (38) ซึ่งใช้เทคนิควัดปริมาณการเกิดสี ซึ่งปฏิกิริยาเกิดเนื่องจาก copper sulfate ในสารละลายด่างทำปฏิกิริยากับโปรตีน เกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper อิออนกับอะตอมของไนโตรเจน peptide chain ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินแล้วนำสารละลายสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometor (Ultraspec II) ใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample ทำปฏิกิริยากับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับ sample เป็น blank เปรียบเทียบหาค่าปริมาณโปรตีนจาก standard curve ที่ใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นมาตรฐาน

6.1 ขั้นตอนดำเนินการทดลองหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

1. เจือจางไมโตคอนเดรียจำนวน 10 มคล.ด้วยน้ำกลั่น 3 มล. (อัตราส่วน 1 : 300)

2. นำไมโตคอนเดรียที่เจือจางจากข้อ 1 จำนวน 1 มล.เติม alkaline copper reagent 1 มล. [กรณี blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล.และกรณีทำ standard curve ใช้ bovine serum albumin ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มก./มล. จำนวน 1 มล.แทน] เขย่าให้เข้ากันปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที

3. เติม Folin phenol reagent (dilution 1:10) จำนวน 3 มล.ลงไป

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

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับปริมาณโปรตีนจาก standard curve

6.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้

Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วน 0.5% $CuSO_4$ ที่ละลายอยู่ใน 1% น.น./ปริมาตร potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10% $NaCO_3$ ที่ละลายใน 0.5 N NaOH

Folin Phenol reagent (1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated folin ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร/ปริมาตร เตรียมใช้ทันที

7. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัยและแหล่งที่มาของสารเคมี

7.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

การละลายสารเคมีที่นำมาทดลองใช้น้ำกลั่น 3 ครั้งเป็นตัวทำละลาย กรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายจะใช้สารละลาย KOH หรือ HCl ความเข้มข้นต่างๆ

7.2 ความเข้มข้นและขนาดของสารเคมีที่ใช้บ่อย

1M glutamate + 1M malate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 1M succinate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 0.76 mM ascorbate + 0.19 M TMPD

จำนวน 5 มคล.,0.38 M NADH จำนวน 5 มคล.,0.3 M ADP + 0.6 M Pi (pH 7.2) ขนาด 2 มคล., 0.1 mM $CaCl_2$ จำนวน 5 มคล., 0.1 M ATP จำนวน 175 มคล., 0.25 M sucrose, 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA, 92 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1M HEPES (pH 7.2), 50 mM DNP ขนาด 2 มคล., 5 μM $CdCl_2$, 10 μM $CdCl_2$, 10 μM $ZnSO_4$, 10 $\mu g/\mu l$ rotenone, 10 $\mu g/\mu l$ antimycin, 0.38 M DTT จำนวน 5 มคล., 0.38 M EDTA จำนวน 5 มคล.

7.3 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

0.2063 N H_2SO_4 ใช้เป็นมาตรฐานในการเทียบหาปริมาณ H^+ ได้รับจากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

L-glutamic acid, L-malic acid, succinic acid, magnesium chloride, potassium tartrate, potassium phosphate, potassium chloride, TMPD, L-ascorbic acid, EGTA, cadmium chloride, antimycin, ATP, β-NADH, ADP, DTT, bovine serum albumin, folin Ciocalteu phenol reagent, EDTA, sodium hydroxide, potassium hydroxide, cupric sulfate สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Co.

Sucrose, hydrochloric acid, sodium carbonate, Absolute ethanol, zinc sulfate สั่งซื้อจากบริษัท E.Merck, Darmstadt

Cadmium chloride สั่งซื้อจากบริษัท The British drug house Co.Ltd.

8. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้ Student's paired t-test ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยที่ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P value มีค่าน้อยกว่า 0.05 ขึ้นไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย