บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 170-200 กรัมจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธีของ Hogeboom,1955 ซึ่ง Myers and Slater, 1957 เป็นผู้บรรยายไว้โดยดัดแปลงเล็กน้อย ตลอดการเตรียมและการปฏิบัติการตับและไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice cold) และการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวด้วย refrigerated centrifuge จะกระทำที่อุณหภูมิ 4°C

ขั้นตอนในการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

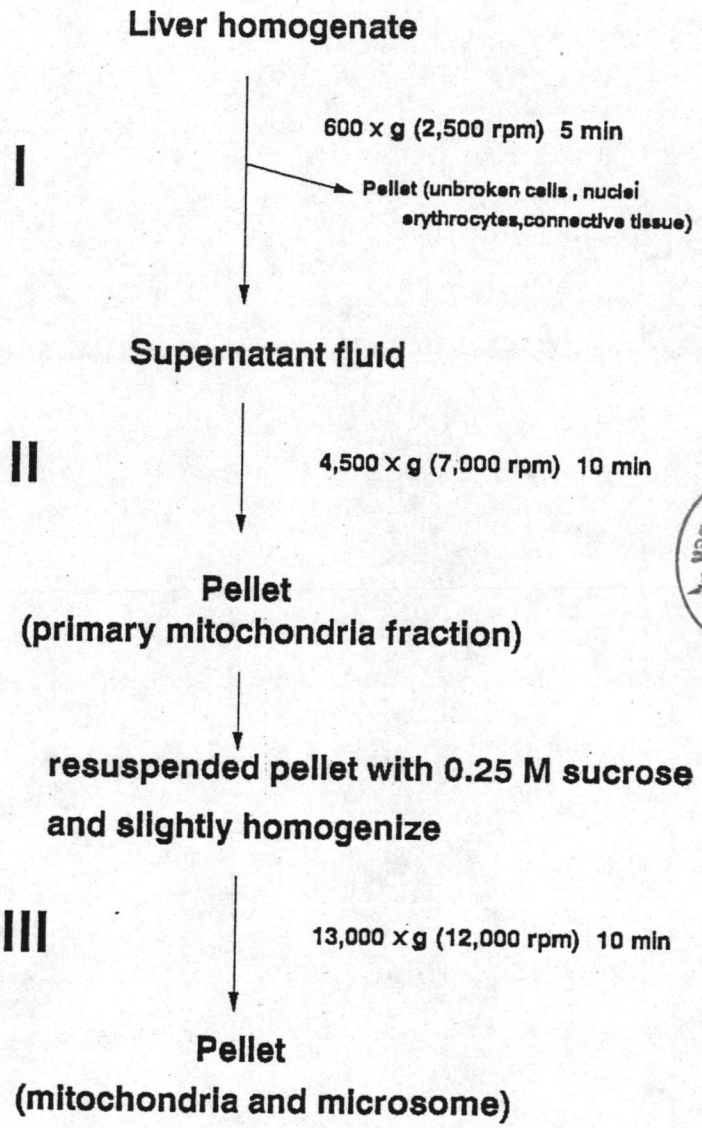
ขั้นตอนที่ 1 เป็นการเตรียม liver homogenate

ทำให้หนูตายอย่างทันทีทันใดด้วยการตีที่หัวบริเวณท้ายทอย แล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดหน้าท้องแล้วรีบตัดตับมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) หลาย ๆ ครั้ง

จนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลายเดิมปริมาตรประมาณ 60-70 มล. จากนั้นตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.5 ซม.ด้วยกรรไกร นำไป homogenize ด้วย Heidolph glass homogenizer Type 50203 RZR 2 ประมาณ 2-3 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-80 มล. ต่อหนู 1 ตัว

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

ในขั้นตอนนี้ การปั่นแยกไมโตคอนเดรีย กระทำโดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac SCR 20 B rotor model RP 18-3 โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภาพในรูปที่ 3



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

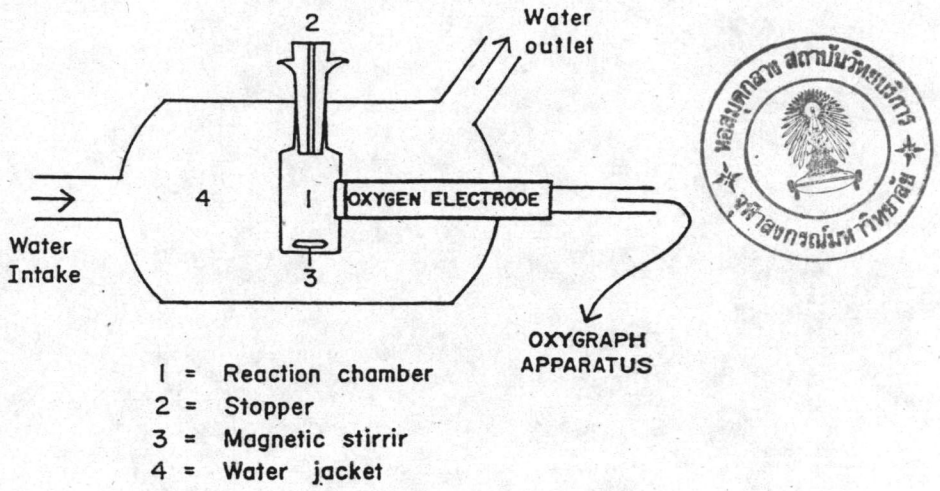
รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยวิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955; Myers and Slater, 1957)

จากรูปที่ 9 pellet ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นเป็นสองชั้น ชั้นบนจะเห็นเป็นสีชมพูและเกาะกันอยู่อย่างหลวม ๆ คือชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างมีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่นคือชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วนของ supernatant fluid ทิ้ง และล้างส่วนที่เป็นไมโครโซมออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose เล็กน้อย และเขย่าหลอดเบา ๆ เทส่วนของเหลวออกทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง จนเหลือเพียงส่วนของไมโตคอนเดรียที่มีสีน้ำตาล นำมา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 มล. homogenize ด้วยมืออย่างเบา ๆ ให้ตะกอนและของเหลวเข้ากันดี จะได้ mitochondrial suspension สำหรับใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีนมีค่าประมาณ 25-40 มก./มล. และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรทจะได้ค่า RCI อยู่ระหว่าง 5-8

3. การ incubate ไมโตคอนเดรีย และ incubation medium

3.1 การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ นั้นกระทำใน Gilson reaction chamber (รูปที่ 10) โดยปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 30°C



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber

<u>incubation medium ที่ใช้</u>

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

- incubation medium ที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลง pH ของ medium จะมีส่วนประกอบเหมือนกับที่ใช้เป็นมาตรฐาน เพียงแต่ปรับ pH ของ HEPES buffer ไว้ที่ 6.8, 7.2 และ 7.6 เท่านั้น

- incubation medium ที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับผลการไม่มี Mg^{2+} ใน medium จะมีส่วนประกอบคล้ายกับที่ใช้เป็นมาตรฐานแต่ไม่ใส่ $MgCl_2$ ลงไปเลย แล้วปรับความเข้มข้นของ KCl เพิ่มขึ้นเป็น 89.06 mM เพื่อให้ได้ isotonic buffer ที่มีความเข้มข้นรวม 250 milliOsmolar เท่าเดิม

3.2 การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

การ incubate ไมโตคอนเดรียเพื่อวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย กระทำในภาชนะทรงสูงขนาดเล็ก ซึ่งมีความจุประมาณ 5-10 มล. โดยส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath เพื่อควบคุมให้อุณหภูมิของการทดลองคงที่ที่ 30°C

incubation medium ที่ใช้

- incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการวิจัยครั้งนี้รวมทั้งที่มีการเปลี่ยนแปลง pH และไม่มี Mg^{2+} ใน medium จะคล้ายกับที่ใช้ในการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ สามารถวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของไมโตคอนเดรียได้ ทั้งในแง่ของการทดสอบหน้าที่ในการหายใจของไมโตคอนเดรีย หรือในแง่ของการทดสอบที่เกี่ยวกับออกซิเดทีฟฟอสฟอริลเลชันเนื่องจากไมโตคอนเดรียจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สับสเตรทเพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP (Sordahl et al., 1971)

ในการวิจัยนี้จะวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique (Sordahl et al.,1971) เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ Gilson reaction chamber (รูปที่ 10) ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 มล. และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูเล็ก ๆ สำหรับเติมสารต่าง ๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรียใน reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลองได้ เมื่อ

ไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยา ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลงซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับของเหลวใน chamber และข้อมูลจาก oxygen electrode นี้จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีหน้าปัดบอกปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamberในขณะนั้น ๆ ทำให้ทราบปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังสามารถบันทึก อัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ออกมาทันทีบนกระดาษบันทึก โดยต่อ output ของเครื่อง oxygen monitor เข้ากับ Gilson recorder (model N2) ซึ่งจะมีปากกา (recorder pen)บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่าง ๆ รอยเส้น (tracing) ที่ปรากฏบนกระดาษบันทึกโดยวิธีนี้เรียก oxygen-electrode tracing (polarographic tracing, oxygraph tracing)

นอกจากนี้ระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรีย และระหว่างที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ใน reaction chamber นั้นจะต้องมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของปฏิกิริยา (reaction mixture) ใน reaction chamber ให้เข้ากันดีตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิของการทดลองต่าง ๆ ใน reaction chamber ให้คงที่ที่อุณหภูมิที่ต้องการตลอดเวลา โดยใช้น้ำที่ถูกปรับอุณหภูมิจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ ไหลผ่านเข้าและออกส่วนของ chamber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งห่อหุ้ม reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง น้ำที่มีอุณหภูมิตามที่ต้องการ จะวนเวียนหล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก reaction chamber ทำให้อุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber คงที่ตามที่ต้องการ

5. การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI), อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

5.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (respiratory control index , RCI)

การเรียกชื่อระยะต่าง ๆ (state) ของการหายใจของไมโตคอนเดรีย รวมทั้งวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) กระทำตามวิธีของ Chance and Williams, 1956 ดังนี้

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

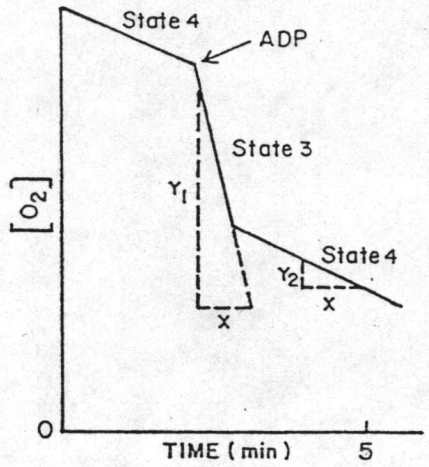
จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 11 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยการลากเส้นในแกน x ให้ยาวเท่ากัน ทั้งใน state 3 และ state 4 จะได้ค่า RCI = Y1/Y2

5.2 การคำนวณอัตราส่วน ADP/O

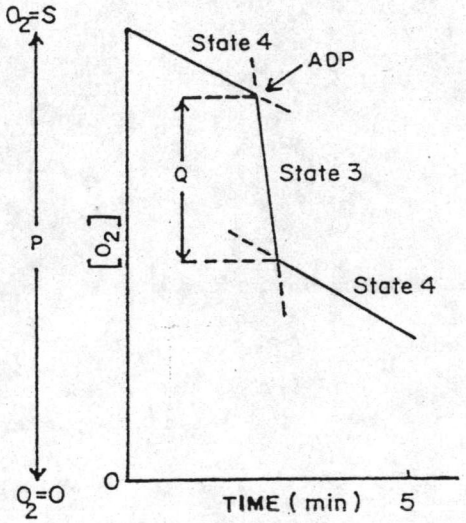
ใช้วิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook, 1967 ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

$$ADP/O = \frac{\text{จำนวน มคม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา}}{\text{จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$

จำนวน มคม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา คำนวณได้จากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา

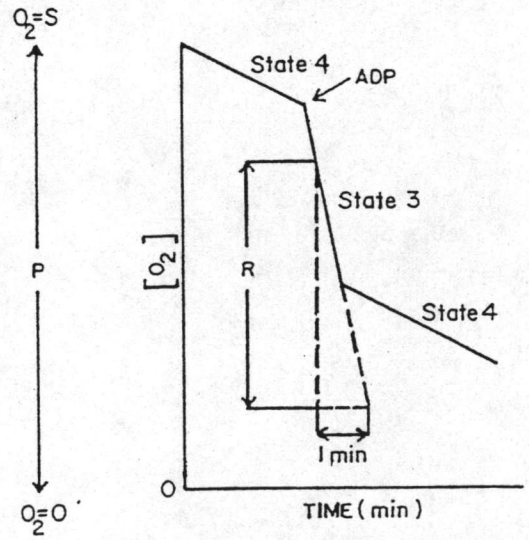


รูปที่ 11 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 13 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างในรูปที่ 12 ดังนี้

จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3

$$= \frac{Q}{P} \times S$$

โดยที่ 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 ถ้ามีปริมาตร reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากและถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่ออุณหภูมิสูง

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

การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 มล. ทำได้ดังนี้

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

โดยที่ A = จำนวน มคอ. ของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึม (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจน เมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ 0°C และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตร เมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02068 ที่ 30°C

P = จำนวนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21 %

N = จำนวนอะตอมใน 1โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรของก๊าซที่ 0°C และ 760 มม. เทียบเท่ากับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 มล.

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 30°C มีค่าเท่ากับ 0.489 มคอ. ออกซิเจน/มล. ซึ่งจะประมาณค่าออกซิเจนดังกล่าวมีค่าเท่ากับปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ที่ใช้ 1 มล.

5.3 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 13 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R}{P} \times S \text{ มคอ. ออกซิเจน/นาที}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

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

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย แล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น มคอ.ออกซิเจน/นาที/มก.โปรตีน

นอกจากนี้ ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ออกมาในหน่วยของจำนวน มคอ.ออกซิเจน/มล./นาทีได้

ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 13 เช่นกัน

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

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน มคอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ในน้ำ 1 มล. ค่า A นี้หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 30°C ค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 0.489 มคอ.ออกซิเจน/มล.

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะอื่น ๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

6. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

ในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรียสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

6.1 โดยการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (Bertina and Slater, 1975)

6.2 โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP เนื่องจากในการวิจัยนี้มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ของ medium หลายสภาวะเช่น การเปลี่ยนแปลง pH ของ medium, การไม่มี Mg^{2+} ใน medium ดังนั้น การวัด ATPase activity โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น จะมีความเหมาะสมมากกว่าการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้น

การวัด ATPase activity โดยการวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP มีขั้นตอนที่สำคัญ คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโตคอนเดรียให้ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ทำการหยุดปฏิกิริยาทันที โดยการดูด reaction mixtureใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากัน และนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นจากที่ได้ในขั้นตอนที่ 1 ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow, 1925 ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อน จากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ 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 นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่า sample เป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐาน ของ Pi

วิธีการหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 มล.ลงในภาชนะทรงสูงเล็ก ๆ ที่มีส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 30°C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrir คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 มคล.

3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะเติม solvent ที่ใช้ละลายตัวยาปริมาตรที่เท่ากัน หรืออาจจะข้ามไปทำข้อ 4 เลย)

4. เติม 0.1 M ATP 150 มคล. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที

5. ดูด reaction mixture มาเป็น sample ปริมาตร 1 มล. แล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตรของ trichloroacetic acid 1 มล. อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที

6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm เพื่อตกตะกอนโปรตีน 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, 1.0, 1.5, 2.0, 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. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

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

(หมายเหตุ: ในการเตรียม Fiske Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมด ให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง และเก็บสารละลาย Fiske Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ไม่เกิน 1 เดือน)

7. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ความเข้มข้น หรือปริมาณไมโตคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับของหนูขาว สำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรีย ที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง โดยการวัดปริมาณโปรตีนของ mitochondrial suspension เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Lowry et al.,1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller,1959 เป็นการหาปริมาณโปรตีน โดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่าง จะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับ

อะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโมเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 มคล. ด้วยน้ำกลั่น 3 มล. (1:300) จะได้สารละลาย A

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

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

4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50°C เป็นเวลา 10 นาที

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโมเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีน จาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ 3 x 100) จะได้ค่าปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียที่ใช้ใน reaction chamber ต่อครั้ง ๆ ละ 100 มคล. มีหน่วยเป็น มก. ซึ่งถ้านำมาหารด้วยปริมาตรของ incubation mixture จะได้เป็นค่าของโปรตีนที่มีอยู่ใน incubation mixture 1 มล. มีหน่วยเป็น มก.โปรตีน/มล.

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของสารละลาย 0.5% $CuSo_4$ ที่ละลายอยู่ในสารละลาย 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

8. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียมสารเคมี และตัวยาต่าง ๆ จะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำบริสุทธิ์สูงจากเครื่อง reverse osmosis และผ่าน nuclear grade resins และในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการ จะใช้สารละลายของ KOH และ HCI ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นหลัก ส่วนกรณีสารเคมีใด ๆ ละลายน้ำได้น้อยมาก จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน

8.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำบริสุทธิ์สูง ได้แก่

1 M glutamate + 1M malate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 1M succinate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 0.3 M ADP + 0.6 M Pi (pH 7.2) ขนาด 1-2 มคล., 0.05 M DNP ขนาด 2-4 มคล., 0.1 M ATP (pH 7.2) ขนาด 100 มคล., 10 มก./มล. atractyloside ขนาด 10 มคล., 0.1 M DTNB ขนาด 2-3 มคล., 1 M DTT ขนาด 2-3 มคล., bovine serum albumin 250 มก./มล. ขนาด 20-120 มคล., 0.25 M

sucrose, 1 mM EGTA (pH 7.2), 1 M MEPES buffer (pH 6.8, 7.2 และ 7.6) 1 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ใน DMSO ได้แก่

0.5 มก./มล. สารสำคัญจากฝอยลม ขนาด 2-10 มคล. และ 5 มก./มล. สารสำคัญจากฝอยลม ขนาด 1-2 มคล.

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อย ๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ใน absolute ethanol ได้แก่

10 มก./มล. oligomycin ขนาด 1 มคล.

8.2 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารสกัดบริสุทธิ์จากฝอยลมได้รับความเอื้อเฟื้อจาก คุณนริสา คำแก่น และ รศ. นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical คือ

L-glutamic acid, malic acid, succinic acid, sucrose, HEPES, ADP, ATP, DNP, magnesium chloride, potassium chloride, EGTA, oligomycin, atractyloside, potassium dihydrogen phosphate, dithiothreitol, DTNB, bovine serum albumin, DMSO, sodium sulfite, sodium bisulfite, ammonium molybdate, 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, cupric sulfate, sodium hydroxide, potassium hydroxide, Folin-Ciocalteu Phenol reagent

สารเคมีจากบริษัท E. Merck, Darmastadt คือ
sodium carbonate, sulfuric acid, hydrochloric acid

สารเคมีจากบริษัท Analytical Carlo Erba คือ
potassium tartrate

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

9. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

9.1 oxygraph tracing

ลอกจาก oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลองโดยแสดงเป็นอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ ตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บ ซึ่งกำกับแต่ละระยะของ oxygraph tracing มีหน่วยเป็น มคอ.ออกซิเจน/มล./นาที

9.2 rate of extra oxygen consumption

คือ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียที่เพิ่มมากขึ้นจากปกติ หาได้โดยนำเอาอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 respiration ไปหักออกจากอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะที่ถูกกระตุ้นด้วย uncouplers

9.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้สถิติชนิด two-tailed paired student's t- test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง