บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (rat) พันธ์ Wistar เพศผู้หนักประมาณ 180- 200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธีของ Hogeboom (53) ซึ่ง Myers และ Slater (54) เป็นผู้บรรยายไว้ โดยดัดแปลงเล็กน้อย การเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice-cold) การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาวทำด้วย refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C

ขั้นตอนการเตรียมแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

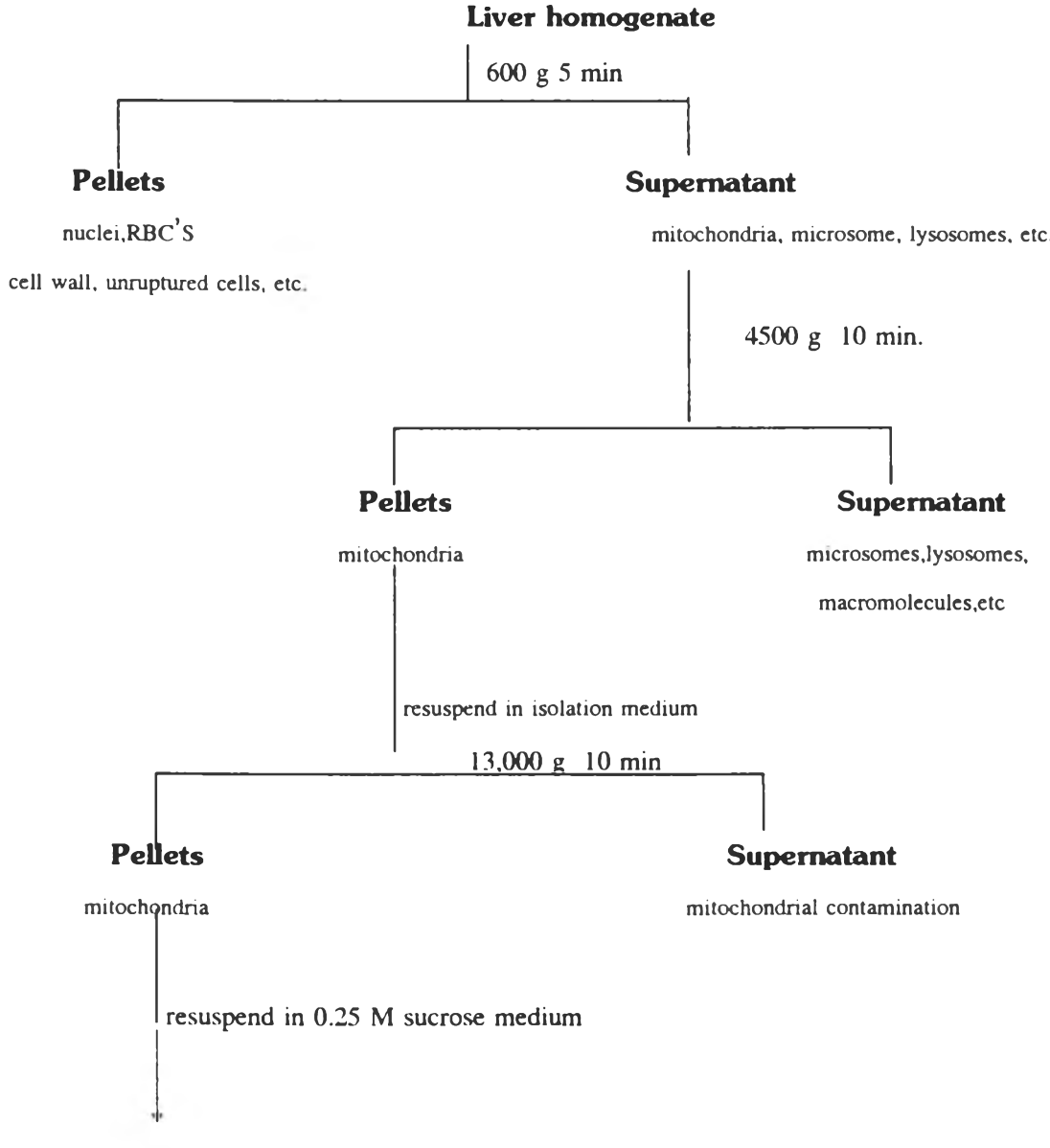
ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

1. ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีหัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation ผ่าตัดหน้าท้องแล้วรีบตัดตับมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัด หลายๆครั้งจนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลายเดิมปริมาตรประมาณ 60-70 ml

2. ตัดตับด้วยกรรไกรออกเป็นชิ้นเล็กประมาณ 0.3-0.5 ซม. ล้างเลือดอีกครั้งด้วยสารละลายเดิม จากนั้นนำไป homogenize ด้วย Heidolph glass homogenizer type 50203 RZR 2 ประมาณ 2-3 นาที (6-7 ครั้ง) จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-80 ml เทใส่หลอด centrifuge

ขั้นตอนที่ 2

นำ liver homogenate ที่ได้ มาปั่นแยก (centrifuge) ให้ได้ไมโตคอนเดรียโดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model CR 20B 3 rotor model RP 18-3 ปั่นทั้งหมด 3 ครั้ง ดังแผนภาพต่อไปนี้



รูปที่ 11 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยใช้ differential centrifugation

Pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจนในหลอด centrifuge ชั้นบนจะเห็นเป็นสีชมพูและเกาะกันอย่างหลวมๆ คือชั้นของ microsomes ส่วนชั้นล่างมีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่น คือ ชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วน supernatant fluid ทิ้งและล้างส่วนของ microsomes ออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose เล็กน้อยเขย่าเบาๆเทของเหลวออก ทำประมาณ 2 ครั้ง จนเหลือเพียงส่วนของไมโตคอนเดรียที่มีสีน้ำตาล นำมา resuspend ด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml homogenize ด้วยมือเบาๆ จะได้ mitochondrial suspension ใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีน 30-60 มก./ มล. และเมื่อใช้ glutamate+malate เป็นสับสเตรทควรมีค่า RCI อยู่ระหว่าง 5-8 (ที่ 37° C)

การเตรียม osmotic-shocked mitochondria

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้จากการปั่นครั้งที่ 3 ดังวิธีข้างต้นมา resuspend ในสารละลาย 0.01 M sucrose ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หมุนกวนช้า ๆ ด้วย magnetic stirrer ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาทดสอบโดยใช้ NADH เป็นสับสเตรทแล้ว incubate นาน 1 นาที ใส่ uncoupler (DNP) เปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนก่อนใส่ uncoupler และหลังใส่ uncoupler อัตราการใช้ออกซิเจนควรใกล้เคียงกับอัตราเดิม จากนั้นให้นำ osmotic-shocked mitochondria เก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (ice-bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม Incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

Incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลอง ได้ดังนี้

1. Incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐาน สำหรับการวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย ประกอบด้วย

HEPES	40 mM	(60 mOsm)
$MgCl_2$	2 mM	(6 mOsm)
KCl	92 mM	(184 mOsm)

(เป็น isotonic buffer ความเข้มข้นรวม 250 milliOsmolar) ปรับ pH ของ incubation medium นี้ให้เป็น 7.2

2. Incubation medium ที่ใช้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลง pH ใน medium จะมีส่วนประกอบเหมือนที่ใช้เป็นมาตรฐาน แต่ปรับ pH ให้เป็น 6.8 , 7.2 และ 7.6

3. Hypotonic incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM , $MgCl_2$ 2 mM , KCl 29.5 mM

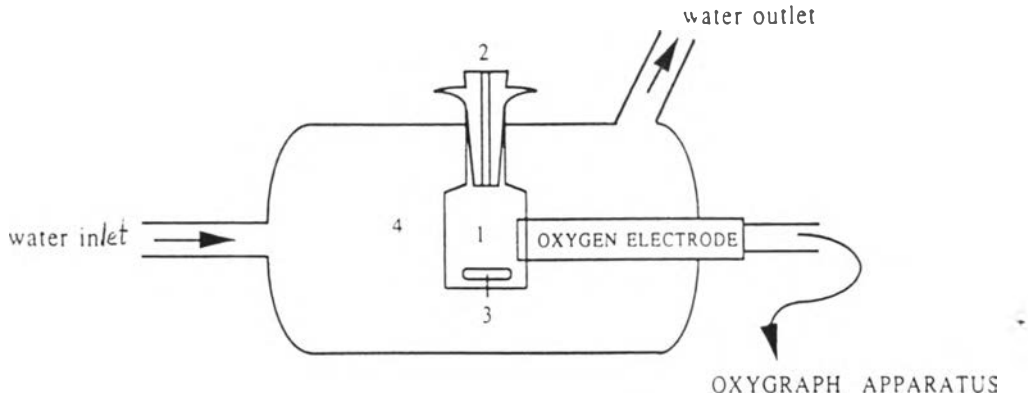
4. Incubation medium สำหรับศึกษาการทำงานของ เอนไซม์โมโนเอมีน ออกซิเดส (monoamine oxidase , MAO) ประกอบด้วย 0.025 M inorganic phosphate (KH_2PO_4) buffer pH 7.2

การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique (55) ซึ่งเป็นการนำไมโตคอนเดรียมา incubate ใน Gilson reaction chamber ที่อุณหภูมิ 37° C โดย chamber มีความจุประมาณ 2 มล. ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น มีฝาจุกปิด (stopper) ซึ่งตรงกลางมีฝามีรูกลวงใช้ในการเติมสับสเตรทและ reagent ต่างๆ เข้าสู่ chamber ขณะที่ทำการทดลองต้องปิดฝาจุกเพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนนอก chamber เข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนภายในซึ่งอาจทำให้ผลวิจัยผิดพลาดได้ เราสามารถวัดอัตราการลดลงของปริมาณออกซิเจนใน chamber ขณะที่ไมโตคอนเดรียมีการหายใจหรือใช้ออกซิเจน โดยใช้ oxygen electrode (Clark type) ที่ต่อกับ oxygen monitor (YSI model 5300) และบันทึกผลโดย recorder ได้เป็น tracing บนกระดาษกราฟแสดงอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย และเรียก tracing นี้ว่า oxygen electrode tracing (หรือ polarographic tracing , oxygraph tracing)

ในขณะที่ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับ reagent ต่างๆ ใน chamber อยู่นั้นจะมี magnetic stirror ขนาดเล็กช่วยหมุนกวนให้สารละลายใน chamber เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและ

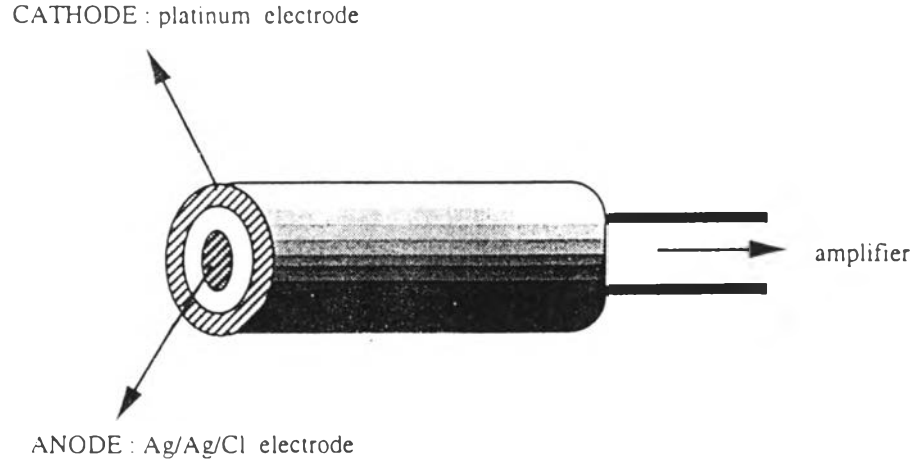
สัมผัสกับ oxygen electrode ได้ทั่วถึง นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมอุณหภูมิในขณะทำการทดลองให้คงที่ ที่ 37° C โดยการทำให้น้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้คงที่ตลอดเวลา ไหลผ่านตามท่อเข้าออกของ chamber (water inlet and outlet) ดังรูปที่ 12



1 = reaction chamber
2 = stopper
3 = magnetic stirrer
4 = water jacket

รูปที่ 12 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านและบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยา ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะคงที่ที่ระดับ 100 % saturation แต่เมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆลดลง และเราวัดอัตราการลดลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย oxygen electrode ซึ่งประกอบด้วย electrode 2 ชนิดรวมกัน คือ Ag/AgCl electrode ซึ่งเป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode (ดังรูปที่ 13) โดยมี half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น



รูปที่ 13 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

ปฏิกิริยาที่เกิดที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ

anode : $4Ag^{+} + Cl^{-} \rightarrow 4AgCl + 4e^{-}$

cathode : $4H^{+} + 4e^{-} + O_2 \rightarrow 2H_2O$

ปกติระหว่างทั้งสองขั้วจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้นจะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้ว เกิดขึ้น และกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้

สำหรับการศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase นั้น อาศัยหลักการในการติดตามการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเช่นเดียวกัน monoamine oxidase เป็นเอนไซม์ที่พบที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของไมโตคอนเดรีย ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์สารพวก amines โดยกระบวนการ oxidative deamination ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

I 17222977

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

เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้นจึงสามารถศึกษาถึง activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้สับสเตรทและ incubation medium ที่เหมาะสม ในการวิจัยนี้จะใช้ benzylamine เป็นสับสเตรท และใช้ phosphate buffer เป็น incubation medium นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงไปใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates โดยไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ไปนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดซ์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบถึง monoamine oxidase actvity ได้

การแบ่งภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโตคอนเดรีย มีหลายประการ เช่น การมี ออกซิเจน, สับสเตรท, ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (56) ได้จัดแบ่งการหายใจของไมโตคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญ ดังนี้

State	**Condition**
1	มีเพียง O_2
2	มี O_2 และ ADP
3 (active state)	มี O_2 , ADP และ substrate
3u	มี uncoupler
4 (resting state)	มี O_2 และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess Ca^{2+}

การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ , อัตราส่วน ADP/O และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

1. **การคำนวณดัชนีควบคุมการหายใจ**

(Respiration Control Index , RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆดังกล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีการคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงการควบคู่(coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชั่นและกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือ เป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีต่อไปนี้

$$RCI = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียใน state 4}}$$

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

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 14 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้ง 2 states ยาวเท่ากันดังนั้น

$$RCI = \frac{Y_1/X}{Y_2/X} = \frac{Y_1}{Y_2}$$

2. **การคำนวณค่า ADP/O**

ADP/O คืออัตราส่วนระหว่าง นนม. ของ ADP ที่ใช้ในการสร้าง ATP ต่อ จำนวน นนอ. ของออกซิเจนที่นำมาใช้สร้าง ATP หรืออาจกล่าวได้ว่า เมื่อไมโตคอนเดรียรับเอาออกซิเจน 1 อะตอม (1/2 O_2) เข้าไปจะเกิดการสร้าง ATP ได้กี่โมเลกุล ค่า ADP/O สามารถคำนวณได้ตามวิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (57) ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

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

จำนวน นนม. ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยานั้น คำนวณจากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา

จำนวน นนอ. ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างในรูปที่ 15 ดังนี้

$$\text{จำนวน นนอ.ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างการเกิด state 3} = \frac{Q}{P} \times S$$

โดยที่ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน นนอ.ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ค่า S นี้ขึ้นอยู่กับปริมาตรของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยาใน reaction chamber และอุณหภูมิของการทดลอง คือ ถ้ามีปริมาตร reaction mixture มาก ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำ ออกซิเจนก็จะละลายอิ่มตัวอยู่ได้มากกว่าเมื่ออุณหภูมิสูง

การคำนวณค่า S จะหาได้จาก การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 มล. (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 มล. (A) ทำได้ดังนี้

$$A = \frac{s \times P}{V} \times \frac{N \times 10^{9}}{100}$$ นนอ. ออกซิเจน/มล.

เมื่อ A = จำนวน นนอ. ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 1 มล.

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ $0^{\circ}C$ และ 760 มม. แล้วถูกดูดซึมในน้ำ 1 หน่วยปริมาตร เมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 มม.) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอม 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรของก๊าซที่ $0^{\circ}C$ ความดันบรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 มล.

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวณค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ มีค่าเท่ากับ 444.9 นนอ. ออกซิเจน/มล.

3. **การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ**

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 16 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

อัตราการหายใจใน state 3 = $\frac{R}{P} \times S$ นนอ. ออกซิเจน/นาที

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน นนอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในปฏิริยา

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหารอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบนจะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน /นาที /มก. โปรตีน

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆออกมาในหน่วยของจำนวน นนอ. ออกซิเจน/ มล./ นาที ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ เช่นกัน

$$\text{อัตราการหายใจใน state 3} = \frac{R \cdot A}{P} \quad \text{นนอ. ออกซิเจน/ มล./ นาที}$$

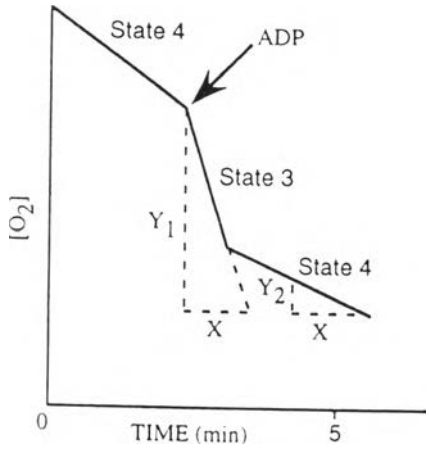
โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

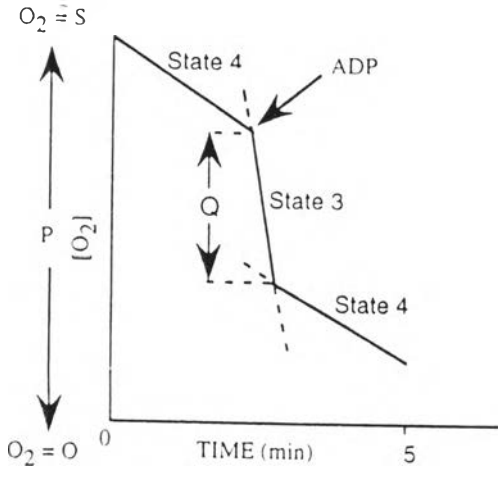
A = จำนวน นนอ. ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ในน้ำ 1 มล. ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในปฏิริยา

ในที่นี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37° C ซึ่งค่า A เท่ากับ 444.9 นนอ. ออกซิเจน/ มล.

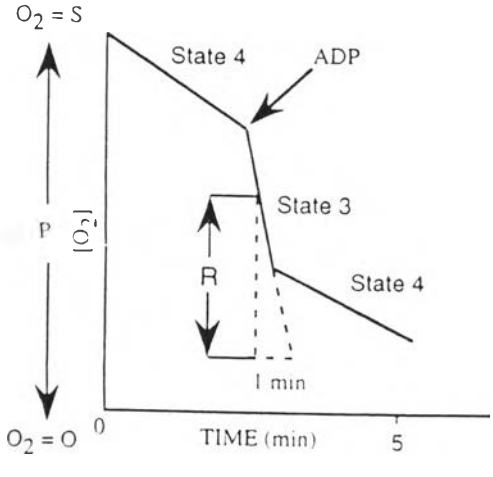
การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะอื่นๆของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในลักษณะเดียวกัน



รูปที่ 14 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 15 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่าอัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 16 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิริยาไฮโดรไลส์ ATP จะเกิดผลิตผลคือ ADP , Pi และ H^+ ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$ATP + H_2O \xleftrightarrow{\text{ATP synthase (} F_1\text{-}F_0\text{ -ATPase)}} ADP + Pi + H^+$$

ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธี คือ
1. โดยวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium โดยใช้ pH meter (58)
2. โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (59)

ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้คือ

1. incubate ไมโตคอนเดรีย ให้ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน. / ปริมาตรของ trichloroacetic acid จำนวน 1 มล. อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากัน และนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

2. วิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (60) ซึ่งเป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชั่นของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 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 จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมค่าของ sample

วิธีการหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 มล. ลงในภาชนะทรงสูงเล็ก ๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ ที่ 37° C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 มคล.

3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะเติม solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน 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. อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที

6. นำไป centrifuge ที่ 4,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน

7. ดูดส่วน supernatant มา 1 มล. (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 มล. ของ KH_2PO_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 Fisk Subbarow reducing agent 0.4 มล. เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample คำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ 3 * 2 = 6) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นตามต้องการ

(หมายเหตุ : ในการเตรียม Fisk Subbarow reducing agent จะมีบางส่วนของ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid ละลายไม่หมดให้กรองออก โดยใช้กระดาษกรองและเก็บสารละลาย Fisk Subbarow reducing agent ในขวดสีชา เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน)

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโตคอนเดรียที่มีอยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับของหนูขาวสำหรับใช้ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง โดยการวัดปริมาณโปรตีนของ mitochondrial suspension เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (61) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (62) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่างจะเกิดเป็น co-ordinate complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultraspec II) โดยใช้น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

วิธีการหาโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

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 จะใช้น้ำ 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) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที
3. เติม Folin-Phenol reagent (dilution 1:10) 3 มล. เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50° C เป็นเวลานาน 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้ คือ 3 * 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย หน่วยเป็น มก. / มล.

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- Alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5 % $CuSO_4$ ที่ละลายใน 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

ในการเตรียมสารเคมี และตัวยาต่างๆ จะใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น 3 ครั้ง ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol หรือ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลายแทน และในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นหลัก

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น ได้แก่

1 M glutamate +1 M malate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 1 M succinate (pH 7.2) ขนาด 10 มคล., 0.8 M ascorbate + 0.2 M TMPD (pH 7.2) ขนาด 5 มคล., 0.2 M NADH ใน 1% $NaHCO_3$ ขนาด 10 มคล., 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ขนาด 2 มคล., 0.05 M DNP ขนาด 10 มคล., 0.1 M ATP (pH 7.2) ขนาด 150 มคล., 0.1 M benzylamine ขนาด 2 มคล., 0.1 M pargyline ขนาด 1 มคล., 10 มก./มล. atractyloside ขนาด 10 มคล., 1 M DTT ขนาด 2 มคล., bovine serum albumin 250 มก./มล. ขนาด 20-120 มคล.,

0.001 และ 0.25 M sucrose , 1 mM EGTA (pH 7.2) , 1 M HEPES buffer, 1 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl , 0.025 M potassium phosphate (KH_2PO_4), 0.2 M H_2SO_4

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ใน absolute ethanol ได้แก่ 5 มก./มล. oligomycin ขนาด 2 มคล.

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆของสารเคมีที่ละลายได้ใน DMSO ได้แก่ 72.5 มก./มล. silymarin ขนาด 1-15 มคล.

แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีจากบริษัท Sigma chemical : ADP , ATP , 1-amino-2-napthol-4-sulfonic acid , ammonium molybdate , ascorbic acid , benzylamine , bovine serum albumin (BSA) , copper sulfate ($CuSO_4$) , DMSO , DNP , DTT , EGTA , Folin & ciocalteu's phenol reagent , L-glutamic acid , atractyloside , malic acid , oligomycin , potassium phosphate , potassium tartrate , rotenone , sodium bisulfite , sodium carbonate , sodium hydroxide , sodium sulfite, succinic acid , sucrose, magnesium chloride, potassium chloride, HEPES buffer , TMPD

สารเคมีจากบริษัท E. Merck . Darmstadt : sodium carbonate , sulfuric acid , hydrochloric acid , potassium hydroxide , absolute ethanol

สารเคมีจากบริษัท Aldrich chemical : Silymarin group.

การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. Oxygraph tracings

เป็น oxygraph tracings ที่ได้จากการทดลอง แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆด้วยตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บ ซึ่งกำกับแต่ละระยะของ oxygraph tracings มีหน่วยเป็น นนอ. ออกซิเจน /มล. /นาที

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยนี้ใช้สถิติชนิด two-tailed unpaired student's t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง โดยในแต่ละหัวข้อการทดลองใช้จำนวนตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง (n=4)