บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (rat) พันธุ์ Wistar เพศผู้หนักประมาณ 180-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับหนูขาว

เตรียมโดยใช้วิธีของ Hogeboom (1955) ซึ่ง Myers และ Slater (1957) เป็นผู้บรรยายไว้โดยดัดแปลงเล็กน้อย การเตรียมและการปฏิบัติการ ตับและไมโตคอนเดรียจะแช่อยู่ใน medium ที่เย็นจัด ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง (ice-cold) การปั่นแยกไมโตคอนเดรีย จากตับหนูขาวทำโดยใช้ refrigerated centrifuge ซึ่งควบคุมอุณหภูมิตลอดการเตรียมไว้ที่ 4 °C

ขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ
ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate
ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียม liver homogenate

ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีที่หัวบริเวณท้ายทอยแล้วทำ cervical dislocation เปิดหน้าท้องแล้วรีบแยกตับมาล้างด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) ที่เย็นจัดหลายๆ ครั้งจนหมดเลือด แล้วแช่ตับในสารละลายเดิมปริมาตรประมาณ 60-70 ml

จากนั้น ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกร ล้างด้วยสารละลายเดิมจนหมดเลือด จากนั้นนำไป homogenize ด้วย Heidolph homogenizer type 50203 RZR 2 ประมาณ 2-3 นาที ในขั้นตอนนี้จะได้ liver homogenate ประมาณ 60-80 ml ต่อหนู 1 ตัว

ขั้นตอนที่ 2 การปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate

นำ liver homogenate ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาปั่นแยก (centrifuge) ให้ได้ไมโตคอนเดรีย โดยใช้ Hitachi High Speed Refrigerated Centrifuge Himac model CR 20B 3 โดยใช้ rotor model RP 18-3 โดยปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ตามแผนภาพ ในรูปที่ 16

รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนการปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก rat liver homogenate โดยวิธี differential centrifugation (Hogeboom, 1955 ; Myer and slater, 1957)

Pellets ที่ได้จากการปั่นครั้งที่ 3 จะเห็นแยกเป็น 2 ชั้นชัดเจนในหลอด centrifuge ชั้นบนจะเห็นเป็นสีชมพูและเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆ คือชั้นของไมโครโซม (microsomes) ส่วนชั้นล่างที่มีสีน้ำตาลและเกาะกันแน่น คือ ชั้นของไมโตคอนเดรีย รินส่วนของ Supernatant fluid ทิ้งและล้างส่วนที่เป็นไมโครโซมออกให้หมดด้วย 0.25 M sucrose เล็กน้อย จนเหลือเพียงส่วนของไมโตคอนเดรียที่มีสีน้ำตาล นำมา resuspendด้วย 0.25 M sucrose ประมาณ 2-3 ml homogenize ด้วยมืออย่างเบาๆ ให้ตะกอนและของเหลวเข้ากันดี จะได้ mitochondrial suspension สำหรับใช้ในการทดลอง ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียคิดเป็นปริมาณโปรตีน มีค่าประมาณ 30-60 mg/ml และเมื่อใช้ glutamate + malate เป็นสับสเตรท จะได้ค่า RCI ประมาณ 5-8

การเตรียม osmotic-shocked mitochondria

นำ mitochondrial pellets ที่เตรียมได้จากการปั่นครั้งที่ 3 ดังวิธีข้างต้นมา resuspend ในสารละลาย 0.01 M sucrose ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หมุนกวนช้าๆ ด้วย magnetic stirrer ให้ suspension เข้ากันตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดเวลา นำ osmotic-shocked mitochondria ที่ได้เก็บในภาชนะแช่น้ำแข็ง (ice-bath) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียม Incubation medium ที่ใช้ในการทดลอง

Incubation medium ที่ใช้ในการวิจัยแบ่งตามสภาวะการทดลอง ได้ดังนี้

3.1 Incubation medium ที่ใช้เป็นมาตรฐาน สำหรับ การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียประกอบด้วย

HEPES buffer	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

3.2 Incubation medium ที่ใช้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลง pH ใน medium จะมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับใน Incubation medium ในข้อ 3.1 แต่ปรับ pH ให้เป็น 6.8, 7.2 และ 7.6

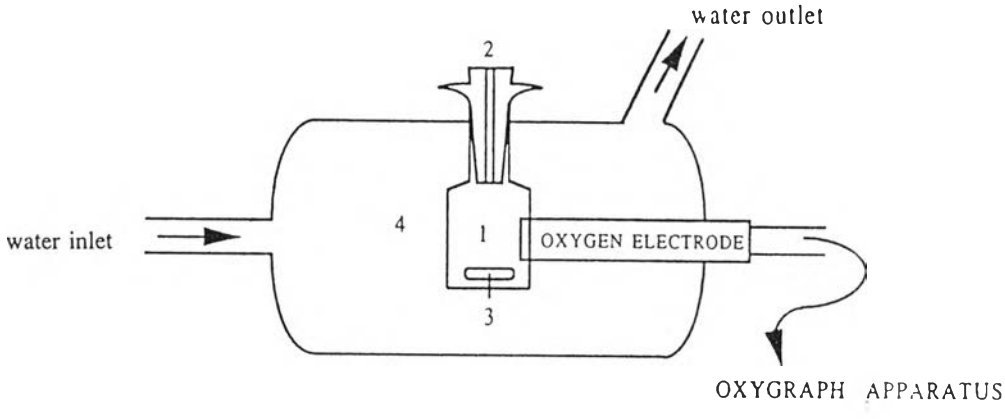
3.3 Hypotonic incubation medium สำหรับวัดอัตราการหายใจของ osmotic-shocked mitochondria ประกอบด้วย HEPES buffer 40 mM, $MgCl_2$ 2 mM, KCl 29.5 mM

3.4 Incubation medium สำหรับศึกษาการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) ประกอบด้วย 0.025 M inorganic phosphate (KH_2PO_4) buffer pH 7.2

4. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polarographic oxygen electrode technique (Sordahl et al., 1971) เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ Gilson reaction chamber รูปที่ 17 ซึ่งมีความจุประมาณ 1.8-2.0 ml ประกอบด้วยผนังแก้ว 2 ชั้น และมีฝาจุก (stopper) เปิดและปิดได้ ตรงกลางฝาจุกมีรูเล็กๆ สำหรับเติมสารต่างๆ ลงไปทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรีย ใน reaction chamber ทำให้ออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปรบกวนปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ขณะทำการทดลอง เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไปในการทำปฏิกิริยาปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง ซึ่งสามารถติดตามดูอัตราการลดลงของออกซิเจนนี้ได้ โดยใช้ Clark oxygen electrode ต่อเชื่อมกับ reaction chamber โดยส่วนของ electrode จะสัมผัสอยู่กับของเหลวใน chamber และปริมาณการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนที่วัดได้โดย oxygen electrode นี้ จะถูกส่งไปยังเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีหน้าปัดบอกปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber ในขณะนั้นๆ ทำให้ทราบปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ตลอดเวลา สามารถบันทึกอัตราการลดลงของออกซิเจนใน reaction chamber ด้วย Gilson recorder (Model N2) ซึ่งจะมีปากกา (recorder pen) บันทึกผลที่ได้ออกมาในลักษณะของกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนในสภาวะต่างๆ tracing ที่ปรากฏบนกระดาษบันทึกโดยวิธีนี้เรียกว่า oxygen-electrode tracing (polarographic tracing, oxygraph tracing)

นอกจากนี้ในระหว่างการ incubate ไมโตคอนเดรียทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ใน reaction chamber นั้น จะมี magnetic stirrer ขนาดเล็กหมุนกวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาใน reaction chamber เข้ากันดีตลอดเวลา โดยใช้น้ำที่ถูกปรับอุณหภูมิจากอ่างควบคุมอุณหภูมิไหลผ่านเข้าออกส่วนของ chanber ชั้นนอก (water jacket) ซึ่งหอหุ้ม reaction chamber ไว้อีกทีหนึ่ง น้ำที่มีอุณหภูมิตามที่ต้องการ จะวนเวียนหล่อเลี้ยงอยู่รอบนอก reaction chamber ทำให้อุณหภูมิของการทดลองใน reaction chamber คงที่ตามที่ต้องการ ในที่นี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 °C



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

รูปที่ 17 แสดง incubation chamber ที่ใช้ในการทดลองเพื่อวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรียในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber แล้วอ่านบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

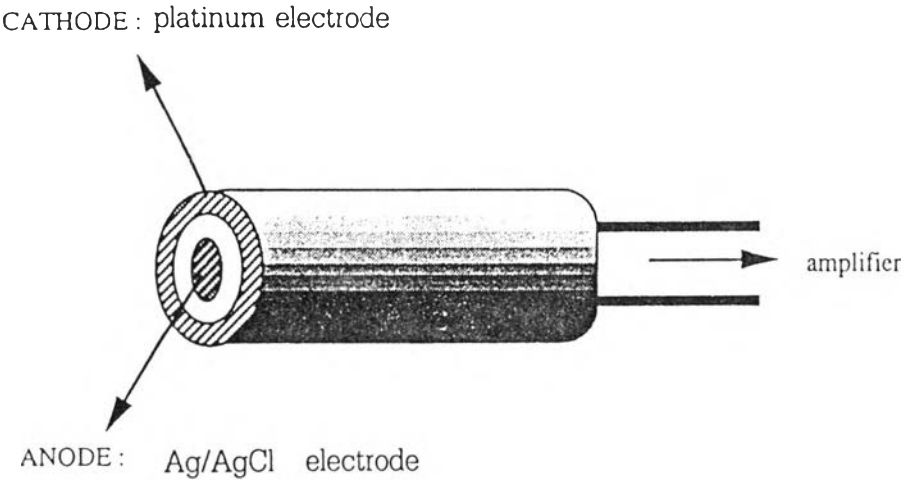
I17191057

เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาปริมาณออกซิเจนใน chamber จะคงที่ที่ระดับ 100% saturation และเมื่อไมโตคอนเดรียมีการหายใจ ปริมาณออกซิเจนใน chamber จะค่อยๆ ลดลง วัดอัตราการลดลงของออกซิเจนใน chamber ได้ด้วย Clark oxygen electrode ซึ่งประกอบด้วย electrode 2 ชนิดรวมกัน คือ Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode ล้อมรอบด้วย platinum electrode ซึ่งทำหน้าที่เป็นขั้ว cathode (ดังรูปที่ 18) โดยมี half saturated KCl solution ฉาบผิวขั้ว electrode ทั้งสอง ทำหน้าที่เป็น salt bridge และมี YSI membrane (standard type) หุ้มปิดที่ขั้วของ electrode โดย membrane ชนิดนี้ยอมให้เฉพาะออกซิเจนผ่านเท่านั้น

ปฏิกิริยาที่เกิดที่ขั้วทั้งสองขณะทำการทดลอง คือ

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

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



รูปที่ 18 แสดงลักษณะของ Clark oxygen electrode ซึ่งมี Ag/AgCl electrode เป็นขั้ว anode และมี platinum electrode เป็นขั้ว cathode

ปกติระหว่างขั้วทั้งสองจะมี polarizing voltage 0.8 V เมื่อทำปฏิกิริยาดังสมการข้างต้นจะมีการไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่าง 2 ขั้ว เกิดขึ้นและกระแสที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยัง amplifier ซึ่งทำหน้าที่ขยายกระแสเข้าสู่ recorder บันทึกเป็น tracing ต่อไป ปริมาณกระแสไฟฟ้าจะแปรผันตามปริมาณออกซิเจนใน chamber ทำให้สามารถวัดอัตราการใช้ ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียได้

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

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

เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จำเป็นจะต้องใช้ออกซิเจน ดังนั้น จึงสามารถศึกษาการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase ได้โดยการติดตามปริมาณออกซิเจนที่ลดลงใน reaction chamber เมื่อใช้สับสเตรท และ incubation medium ที่เหมาะสม ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ tyramine เป็นสับสเตรท และ ใช้ phosphate buffer เป็น incubation medium นอกจากนี้จะเติม respiratory chain inhibitor คือ rotenone ลงใน reaction chamber ด้วย เพื่อยับยั้งการออกซิไดซ์ endogenous substrates โดยไมโตคอนเดรีย ทำให้ออกซิเจนที่ถูกใช้ในนั้นเกิดจากการที่ monoamine oxidase ออกซิไดซ์ amine substrate ที่เติมลงไปเพียงอย่างเดียว จากหลักการที่กล่าวมานี้ ทำให้ทราบถึง monoamine oxidase activity ได้

การแบ่งสภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial respiratory states)

เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโตคอนเดรีย มีหลายประการ เช่น การมีออกซิเจน สับสเตรท ADP+Pi หรือการมี uncoupler หรือไม่ เป็นต้น Chance and William (1956) ได้จัดแบ่งสภาวะการหายใจของไมโตคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญ เป็นดังนี้

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+}

5. การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ , อัตราส่วน ADP/O และ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

5.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ
(Respiratory Control Index , RCI)

นอกจาก Chance and William จะแบ่งสภาวะ (states) การหายใจของไมโตคอนเดรียเป็นภาวะต่างๆ ดังกล่าวมาแล้ว ยังแสดงวิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แสดงการควบคู่ (coupling) กันของกระบวนการออกซิเดชันและกระบวนการฟอสฟอริลเลชัน ค่า RCI นี้บอกถึงคุณภาพของไมโตคอนเดรียที่เตรียมขึ้นว่ามีคุณภาพดี คือเป็น intact mitochondria หรือไม่ การคำนวณค่า RCI ทำตามวิธีดังต่อไปนี้

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

$$= \frac{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 3}}{\text{ความชัน (slope) ของ tracing ใน state 4}}$$

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 19 การหาความชันของ tracing ใน state 3 และ state 4 ทำได้โดยกำหนดให้เส้นที่ลากขนานแกน X ของทั้ง 2 states ยาวเท่ากัน ดังนั้น

$$RCI = \frac{Y1/X}{Y2/X} = \frac{Y1}{Y2}$$

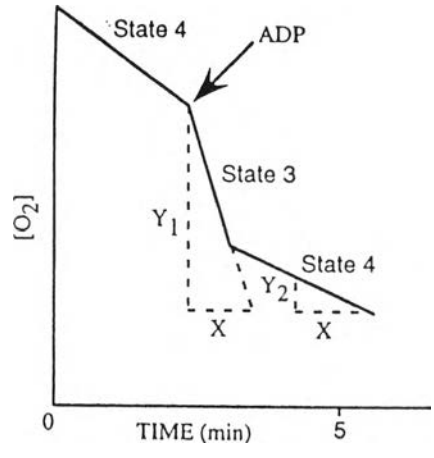
5.2 การคำนวณค่า ADP/O

ADP/O คือ อัตราส่วนระหว่าง nmoles ของ ADP ที่ใช้ในการสร้าง ATP ต่อจำนวน n atoms ของออกซิเจนที่นำมาใช้สร้าง ATP หรืออาจกล่าวว่า เมื่อไมโตคอนเดรียรับเอาออกซิเจน 1 อะตอม (1/2 O_2) เข้าไปจะเกิดการสร้าง ATP ได้กี่โมเลกุล ค่า ADP/O สามารถคำนวณได้ตามวิธีที่บรรยายไว้โดย Estabrook (1967) ซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

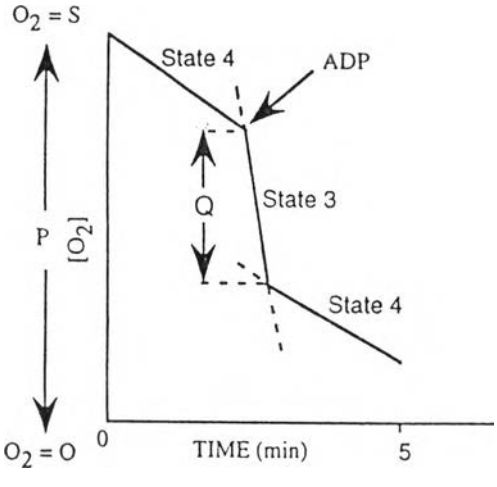
$$ADP/O = \frac{\text{จำนวน nmoles ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา}}{\text{จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ระหว่างการเกิด state 3}}$$

จำนวน nmoles ของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยานั้น คำนวณจากความเข้มข้นและปริมาตรของ ADP ที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา

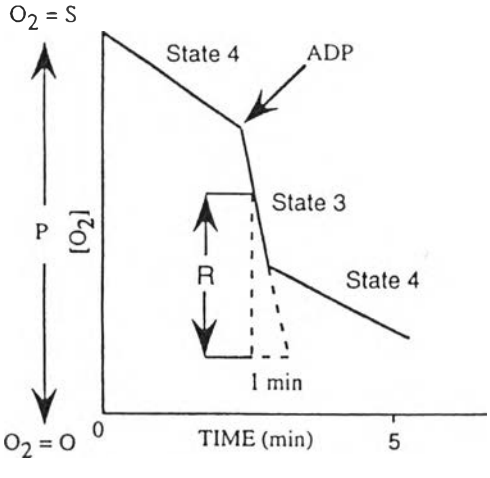
จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างการเกิด state 3 คำนวณได้จาก oxygraph tracing ดังตัวอย่างในรูปที่ 20 ดังนี้



รูปที่ 19 ตัวอย่าง oxygraph tracing
เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 20 ตัวอย่าง oxygraph tracing
เพื่อแสดงวิธีการหาค่า
อัตราส่วน ADP/O



รูปที่ 21 ตัวอย่าง oxygraph tracing
เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการ
ใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย
ในระยะต่างๆ

จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ใช้ระหว่างการเกิด state 3 = $\frac{Q}{P} \times S$

โดยที่ P = ความสูงของเส้น P ในรูป

Q = ความสูงของเส้น Q ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

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

การคำนวณหาค่า S จะหาได้จาก การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 ml (A) คูณด้วยปริมาตรทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา จะได้จำนวนของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน reaction mixture ทั้งหมด การคำนวณค่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation mixture 1 ml ทำได้ ดังนี้

$$A = \frac{S \times P \times N \times 10^{9}}{V \ 100} \text{ n atoms O/ml}$$

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจน ที่ละลายในน้ำ 1 ml

S = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนไปอยู่ที่ $0^{\circ}C$ และ 760 mm แล้วถูกดูดซึมโดยน้ำหนึ่งหน่วยปริมาตร เมื่อความดันของก๊าซเท่ากับ 760 mm) โดยมีค่า เท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$

P = สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน = 2

V = ปริมาตรก๊าซที่ $0^{\circ}C$ ความดัน 1 บรรยากาศเทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml

เมื่อแทนค่าเหล่านี้ลงในสมการดังกล่าว คำนวนหาค่าปริมาตรของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวในน้ำ 1 ml (A) ที่อุณหภูมิ 37°C มีค่าเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

5.3 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ

จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 21 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ได้ดังนี้

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times S}{P} \text{ n atoms O/min}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโตคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา

ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียแล้วนำมาหาอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างบน จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย มีหน่วยเป็น n atoms O/min/mg protein

นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่างๆ ออกมาในหน่วยของ จำนวน n atoms O/ml/min ได้ ดังตัวอย่างจาก oxygraph tracing ในรูปที่ 21 เช่นกัน

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times S}{P} \text{ n atoms O/min}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

S = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัว อยู่ในน้ำ 1 ml

ค่า A นี้ หาได้ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อ 5.2 ในการวิจัยนี้ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C ซึ่งค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะอื่นๆ ของ oxygraph tracing ก็สามารถคำนวณได้ในทำนองเดียวกัน

6. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ ATP จะเกิดผลิตผลคือ ADP, Pi และ H^+ ดังปฏิกิริยา ต่อไปนี้

$$ATP + H_2O \xleftarrow{\text{ATP synthase } (F_0F_1 \text{ ATPase})} ADP + Pi + H^+$$

ดังนั้นในการศึกษา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

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

6.2 โดยการวัดปริมาณของ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP (Weinbach, 1956)

ในการวิจัยนี้จะเลือกใช้วิธีวัดปริมาณ Pi ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ในการวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย โดยมีขั้นตอนและหลักการที่สำคัญดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการ incubate ไมโตคอนเดรีย ให้ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่ต้องการศึกษาใน reaction mixture ที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ทำการหยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการดูด reaction mixture ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid จำนวน 1 ml อยู่ก่อนแล้วเขย่าให้เข้ากัน และนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้น จากที่ได้ในขั้นตอนที่ 1 ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Fiske and Subbarow (1925) เป็นวิธีวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อนจากปฏิกิริยารีดักชันของ phosphomolybdate complex กับ Fiske Subbarow reducing agent (ประกอบด้วย 15% sodium bisulfite 97.5 ml 20% sodium sulfite 2.5 ml และ 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.25 กรัม) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำสารละลายซึ่งเกิดเป็นสีน้ำเงินไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณ Pi จากกราฟมาตรฐานของ Pi ซึ่งมีช่วงความเข้มข้นต่างๆ คลอบคลุมค่าของ sample

วิธีการหา ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. เติม incubation medium ปริมาตร 2.63 ml ลงในภาชนะทรงสูงเล็กๆ ที่ส่วนล่างแช่อยู่ใน water bath ซึ่งจะปรับอุณหภูมิของการทดลองให้คงที่ที่ 37 ^{o}C ส่วนล่างของภาชนะทรงสูงจะมี magnetic stirrer คอยหมุนกวนส่วนประกอบของปฏิกิริยาให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา

2. เติม mitochondrial suspension 200 µl

3. เติมตัวยาที่ต้องการทดสอบลงไป ทิ้งไว้ 1 min (ถ้าเป็นการทดลองที่ใช้เป็น control อาจจะเติม solvent ที่ใช้ละลายตัวยาในปริมาตรที่เท่ากัน หรืออาจจะข้ามไปทำข้อ 4 เลย)

4. เติม 0.1 M ATP 150 µl ปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 10 min

5. ดูด reaction mixture มาเป็น sample ปริมาตร 1 ml แล้วใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี 20% นน./ปริมาตร ของ trichloroacetic acid 1 ml อยู่ก่อน แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งทันที

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

7. ดูดส่วน supernatant มา 1 ml (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml แทน ถ้าจะทำ standard curve ของ Pi ใช้ 1 ml 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 ml อยู่ก่อนแล้ว เขย่าให้เข้ากัน

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

9. เติม Fiske Subbarow reducing agent 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันดี แล้วตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 10 min

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก sample คำนวณหาปริมาณ Pi จาก standard curve ของ Pi แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 X 2 = 6) จะได้เป็นค่าปริมาณ Pi ที่เกิดขึ้นตามที่ต้องการ

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

7. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

ความเข้มข้นหรือปริมาณไมโตคอนเดรียที่อยู่ใน mitochondrial suspension ที่เตรียมได้จากตับของหนูขาวสำหรับใช้ในการทดลองในแต่ละครั้งจะมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะต่างๆ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง โดยการวัดปริมาณโปรตีนของ mitochondrial suspension เพื่อนำมาเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบผลที่ได้

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) เป็นการหาปริมาณโปรตีนโดยการเกิดสี เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่างจะเกิดเป็น co-ordinated complex ของ copper กับอะตอมของไนโตรเจนใน peptide chain เกิดเป็นสีน้ำเงิน นำสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec II) โดยใช้ น้ำกลั่นที่มีปริมาตรเท่ากับ sample เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve ซึ่งใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมค่าของ sample เป็นตัวมาตรฐาน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย มีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้

1. เจือจาง mitochondrial suspension 10 µl ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้สารละลาย A

2. ดูดสารละลาย A ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reagent 1 ml (ในกรณีเป็น blank จะใช้น้ำ 1 ml ส่วนกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A) เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 min

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

4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50 ^{o}C เป็นเวลานาน 10 min

5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 X 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย หน่วยเป็น mg /ml

การเตรียมสารละลายที่ใช้

- 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 ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตร/ปริมาตร) และเตรียมใช้ทันที

8. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลองและแหล่งที่มาของสารเคมี

ในการเตรียมสารเคมี และตัวยาต่างๆ จะใช้ตัวทำละลายเป็น น้ำกลั่น 3 ครั้ง ส่วนสารเคมีที่ละลายได้น้อยหรือไม่ละลายในน้ำ จะใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายแทน และในกรณีที่ต้องปรับ pH ของสารละลายให้ได้ตามต้องการจะใช้สารละลายของ KOH และ HCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นหลัก

8.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆ ของสารเคมีที่ละลายได้ในน้ำกลั่น ได้แก่

1 M glutamate + 1 M malate (pH7.2) ขนาด 10 µl , 1 M succinate (pH7.2) ขนาด 10 µl , 0.2 M NADH ใน 1% $NaHCO_3$ ขนาด 10 µl , 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ขนาด 2 µl , 0.05 M DNP ขนาด 2-6 µl , 0.1 M ATP (pH7.2) ขนาด 150 µl , 0.1 M tyramine ขนาด 2 µl , 0.1 M pargyline ขนาด 1 µl , 1 M DTT ขนาด 2-3 µl , bovine serum albumin 250 mg/ml ขนาด 20-80 µl , 0.001 และ 0.25 M sucrose, 1 mM EGTA (pH7.2) , 1 M HEPES buffer, 1 M $MgCl_2$, 2.3 M KCl , 0.025 M และ 0.05 M potassium phosphate (KH_2PO_4) , 0.2 M H_2SO_4 ขนาด 5 ml, 0.4 M $CaCl_2$ 10 µl, CU-763-10-01 10 mg/ml ขนาด 0.5-10 µl

ความเข้มข้นและขนาดที่ใช้บ่อยๆ ของสารเคมีที่ละลายใน absolute ethanol ได้แก่

5 mg/ml oligomycin ขนาด 2 µl

8.2 แหล่งที่มาของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สาร CU-763-10-01 ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีจากบริษัท sigma chemical คือ

L-glutamic acid , malic acid , succinic acid , ADP , ATP , DNP , magnesium chloride , potassium chloride , HEPES buffer , EGTA , oligomycin , potassium dihydrogen phosphate , dipotassium hydrogen phosphate , tyramine , pargyline , DTT , bovine serum albumin , sodium sulfite , sodium bisulfite , ammonium molybdate , 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid , cupric sulfate , sodium hydroxide , Folin & Ciocalteu's Phenol reagent , sodium carbonate , potassium tartrate, sucrose , rotenone

สารเคมีจากบริษัท E.Merck.Darmastadt คือ sulfuric acid , hydrochloric acid , absolute ethanol

9. การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

9.1 Oxygraph tracings

เป็น oxygraph tracings ที่ได้จากการทดลอง แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนในระยะต่างๆ ด้วยตัวเลขที่อยู่ในวงเล็บ ซึ่งกำกับแต่ละระยะของ oxygraph tracing มีหน่วยเป็น n atoms O/ ml/min

9.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้ใช้สถิติชนิด two-tailed paired student's t test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เป็นกลุ่มทดลอง