บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wister เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

2. การเตรียมไมโตคอนเดรียจากตับของหนูขาว

ใช้วิธีของ Hogeboom ซึ่ง Myer และ Slater (48) เป็นผู้บรรยายไว้ โดยมีการดัดแปลงบ้างเล็กน้อย

ตับและไมโตคอนเดรียที่แยกได้ จะเก็บไว้ใน medium ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่แช่น้ำแข็งตลอดเวลา และตั้งอุณหภูมิของ refrigerated centrifuge ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ขณะทำการปั่นตับที่ถูก homogenized แล้ว เพื่อแยกไมโตคอนเดรียออกมา

ขั้นตอนการเตรียมไมโตคอนเดรีย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ ดังนี้คือ

ขั้นที่ 1 ทำให้หนูตายทันทีโดยการตีหัว แล้วทำ cervical dislocation จากนั้นรีบตัดตับออกมาล้างด้วย medium ซึ่งประกอบด้วย 0.25 M sucrose และ 1 mM EGTA (pH 7.2) 3 - 4 ครั้ง เพื่อเอาเลือดออกให้มากที่สุด ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกร แล้วเติม medium ดังกล่าวลงไปประมาณ 70 - 80 มล. แล้วนำไป homogenize ด้วย glass-homogenizer เพื่อให้เซลล์ตับแตก ในขั้นตอนแรกนี้จะได้ rat liver homogenate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

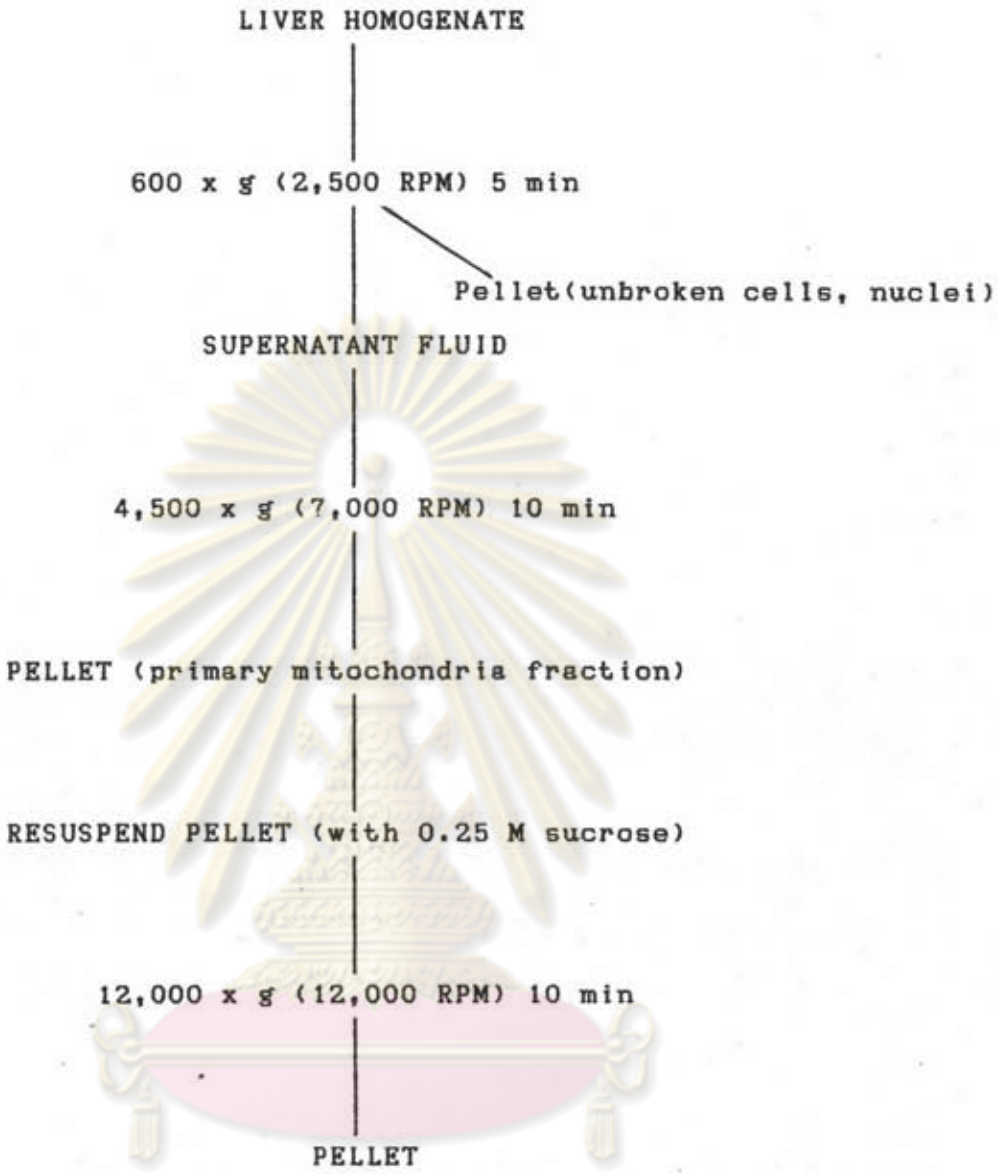
ขั้นที่ 2 ปั่นแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate ที่ได้จากขั้นที่หนึ่ง โดยใช้ Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge, model 20 PR-52 D , rotor model RPR 18-3 ของภาควิชาชีว-เคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ในขั้นตอนนี้มีการปั่นแยกทั้งหมด 3 ครั้ง ดังต่อไปนี้คือ

2.1 นำ liver homogenate มาปั่นที่ 600 x g (2,500 RPM) เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา นำส่วนใสข้างบน (supernatant) มาทำการปั่นในขั้นตอนต่อไป ทิ้งส่วนของตะกอนซึ่งประกอบด้วย nuclei และเซลล์ซึ่งไม่แตก

2.2 นำส่วนใส (supernatant)ที่ได้จากข้อ 2.1มาปั่นต่อที่ 4,500 x g (7,000 RPM) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทิ้งส่วนใสข้างบนและนำส่วนของตะกอนมา resuspend ด้วย 0.25 M-sucrose ทำการ homogenize ด้วยมือ ช่วยทำให้ตะกอนกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายซูโครส

2.3 นำตะกอนที่ resuspend เรียบร้อยแล้วในข้อที่ 2.2 มาปั่นต่อที่ 12,000 x g(12,000 RPM) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อปั่นครบเวลาแล้ว ทิ้งส่วนใสข้างบนไปและล้างตะกอนลิซมพูชั้นบน ซึ่งเป็นส่วนของไมโครโซมออกไปให้หมด จากนั้น resuspend ตะกอนชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนของไมโตคอนเดรียด้วย 0.25 M sucrose ทำการ homogenize ด้วยมือช่วยทำให้ตะกอนของไมโตคอนเดรียกระจายตัว ในขั้นตอนนี้จะได้ mitochondria suspension ประมาณ 3 มล. โดยความเข้มข้นคิดเป็นโปรตีนของไมโตคอนเดรียประมาณ 40 - 80 มก./มล. และเมื่อหาค่าดัชนีการหายใจ (Respiratory Control-Index, RCI) โดยใช้ glutamate + malate เป็น substrate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควรได้ค่ามากกว่า 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการแยกไมโตคอนเดรียจาก liver homogenate โดยวิธี differential centrifugation

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Incubation medium ที่ใช้ในการวิจัย

3.1 Incubation medium สำหรับการวัดอัตราหายใจของไมโตคอนเดรีย (oxidative phosphorylation)

1. HEPES 40 mM (60 m OSM) pH 7.2
2. $MgCl_2$ 2 mM (6 m OSM)
3. KCl 92 mM (184 m OSM)

3.2 Incubation medium สำหรับการวัดอัตราหายใจของไมโตคอนเดรีย เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคลเซี่ยม (calcium stimulated respiration) ประกอบด้วย

1. HEPES 40 mM (pH 7.2)
2. $MgCl_2$ 2 mM
3. KCl 92 mM
4. KH_2PO_4 1 mM

3.3 Incubation medium สำหรับการวัด ATPase activity ประกอบด้วย

1. HEPES 5 mM (pH 7.2)
2. $MgCl_2$ 2 mM
3. KCl 118 mM

3.4 Incubation medium สำหรับการวัด monoamine oxidase-activity ประกอบด้วย

KH_2PO_4 0.025 M (pH 7.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย และแหล่งที่มาของสารเคมี

4.1 สารละลายที่ใช้ในการวิจัย

1 M glulamate + 1 M malate pH 7.2, 1 M succinate pH 7.2, 0.1 M ADP + 0.2 M Pi pH 7.2, 0.1 M ATP pH 7.2, 0.25 M-sucrose, 0.25 M sucrose + 0.1 M EGTA pH 7.2 ,0.5 M HEPES pH 7.2, 40 mM 5HT, 40 mM phenethylamine , 2 mM $MgCl_2$, 92 mM KCl, 0.01 M DNP, 0.625 M KH_2PO_4, 10 mg/ml rotenone , 2 mM $HgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$,2 mM $CdCl_2$, 0.2 M EDTA , 0.4 M DTT

4.2 แหล่งที่มาของตัวยาและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

0.1098 N H_2SO_4 ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการเทียบหาจำนวน H^+ ได้รับจากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

magnesium chloride, oligomycin, potassium phosphate, bovine serum albumin (E. Merck, Dannstadt)

absolute ethanol (Riedel-De Haen AG. Seelae-Hannover)

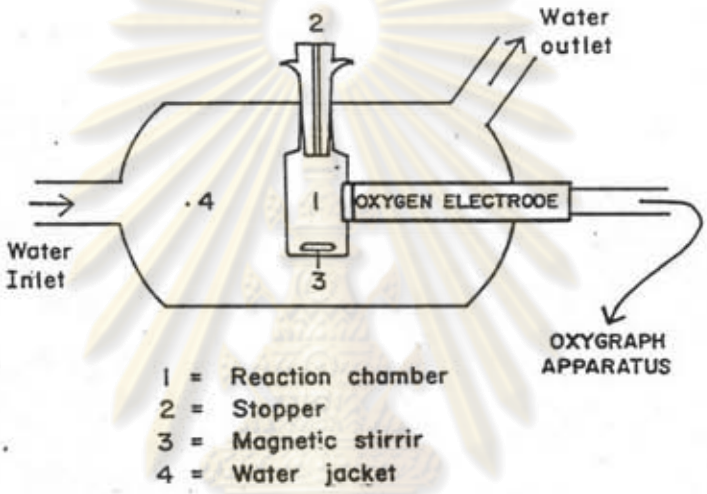
potassium tartate (Analyticals Carlo Erba)

sucrose , HEPES , L-glutamic acid , succinic acid potassium chloride , Folin-Ciocalteu phenol reagent , sodium hydroxide, DNP, ATP, ADP, 5-HT , phenylethylamine ,pargyline (Sigma chemical)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจน ของไมโตคอนเดรียในการวิจัยนี้ ใช้เทคนิคที่เรียกว่า polarographic oxygen electrode technique เครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วย Gilson reaction chamber ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 2 มล. ใช้-



รูปที่ 2 แสดง incubation chamber ซึ่งมี oxygen electrode คอยติดตาม oxygen tension ใน reaction chamber อ่านและบันทึกผลออกมาได้ทันทีทาง oxygraph apparatus (oxygen monitor + recorder)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับ incubate ไมโตคอนเดรียกับสารที่จะทำปฏิกิริยา มีฝาจุก (stopper) (ซึ่งมีรูตรงกลางสำหรับสอด microsyringe เพื่อเติมสารต่าง ๆ ลงไปใน chamber เพื่อทำปฏิกิริยากับไมโตคอนเดรีย) สำหรับปิด chamber เพื่อป้องกันออกซิเจนจากภายนอก ไม่ให้เข้าไปรบกวนปริมาณของออกซิเจนที่มีอยู่ใน reaction chamber เมื่อไมโตคอนเดรียใช้ออกซิเจนไป ปริมาณของออกซิเจนใน reaction chamber จะลดลง สามารถวัดได้โดยต่อ oxygen electrode (Clark type) เข้าไปใน reaction chamber และสัญญาณจาก oxygen electrode จะถูกส่งเข้าเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งจะมีเข็มชี้บอกปริมาณออกซิเจนใน reaction chamber ขณะนั้นว่ามีอยู่ในปริมาณเท่าใด จากเครื่อง monitor จะต่อ output เข้ากับเครื่อง Gilson recorder (model N2) เพื่อบันทึกผลออกมาบนกระดาษกราฟที่กำลังเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่

ในขณะที่ทำการทดลอง จะมีน้ำซึ่งใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาไหลเวียนเข้าออกรอบ reaction chamber อยู่ตลอดเวลา โดยการวิจัยถึงผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น และกระบวนการกระตุ้นการหายใจโดยใช้แคลเซี่ยม จะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส (หรือ 37 องศาเซลเซียสในบางการทดลอง) ส่วนการวิจัยถึงผลต่อ activity ของเอนไซม์ monoamine oxidase จะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ตลอดเวลาที่ทำการทดลอง จะมีแท่งแม่เหล็ก(magnetic stirer) หมุนอยู่ใน chamber เพื่อทำให้สารต่างๆ ที่เติมลงไปในไมโตคอนเดรียเข้ากันดี

5.1 ขั้นตอนการดำเนินการทดลองถึงผลต่อกระบวนการออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชั่น

1. ใส่ medium สำหรับการทดลองนี้ ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.1 จำนวน1.80 มล.
2. เติมไมโตคอนเดรีย ที่เตรียมได้จากข้อ 2 100 มคล.
3. ใส่ glutamate + malate หรือ succinate
4. เติมโลหะหนักชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาแล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
5. เติม ADP+Pi
6. เมื่อลักษณะ tracing เข้าสู่ state 4 แล้วเติม DNP ลงไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 ขั้นตอนการดำเนินการทดลองถึงผลต่อการกระตุ้นการหายใจโดยใช้-แคลเซียม

1. ใส่ incubation medium (ข้อ 3.2) ลงไปใน chamber 1.80 มล.
2. เติมไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้จากข้อ 2 ลงไป 100 มคล.
3. เติมสับสเตรท (glutamate + malate หรือ succinate)
4. เติมโลหะหนักที่ใช้ในการวิจัย และทิ้งไว้ 1 นาที
5. เติม $CaCl_2$

5.3 ขั้นตอนดำเนินการทดลองถึงผลต่อ monoamine oxidase-activity

1. ใส่ incubation medium (ข้อ 3.4) ลงใน chamber 1.80 มล.
2. เติมไมโตคอนเดรียที่เตรียมได้จากข้อ 2 ลงไป 100 มคล.
3. เติม rotenone 10 μg
4. เติมโลหะหนักที่ใช้ในการวิจัย และทิ้งไว้ 1 นาที
5. เติมสับสเตรท(ใช้ 5 HT สำหรับการศึกษาถึง monoamine oxidase type A หรือ phenylethylamine สำหรับการศึกษาถึง monoamine oxidase type B)

หมายเหตุ ในกรณีของการทดลองที่เป็นกลุ่มควบคุม จะข้ามขั้นตอนดำเนินการข้อที่ 4 มาข้อที่ 5

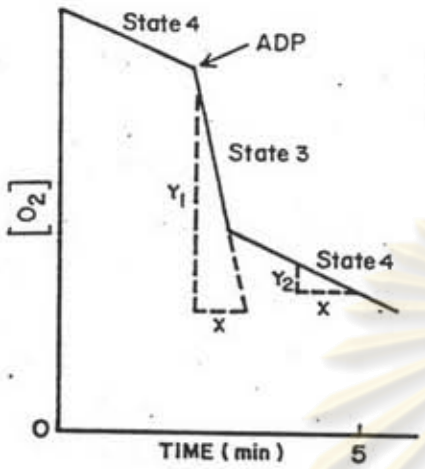
6. การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI) และอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

6.1 วิธีคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (RCI)ตามวิธีของ Chance และ Williams(49)

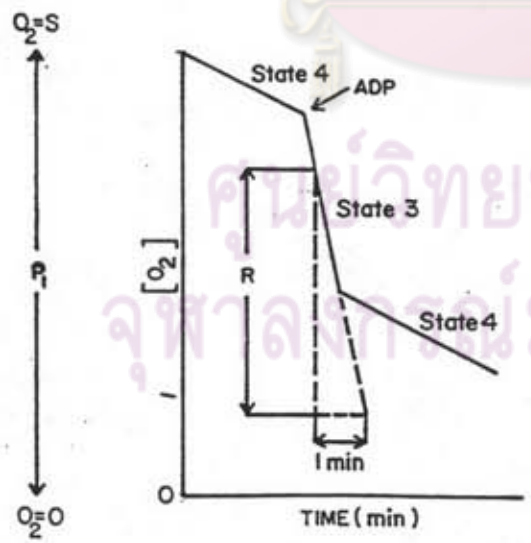
$$RCI = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจน state 4}}$$

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาค่า RCI



รูปที่ 3.2 ตัวอย่าง oxygraph tracing เพื่อแสดงวิธีการหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียในระยะต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 3.1 หาค่า RCI ได้โดยให้ลากแกน x ให้ยาวเท่ากันทั้งใน state 3 และ state 4 จากนั้นลากเส้นตามแนวแกน y ให้ตัดกับเส้นของ tracing แล้วนำค่าที่ได้ตามแนวแกน y มาหารกัน จากตัวอย่างค่า RCI = $\frac{Y_1}{Y_2}$

6.2 การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรีย ในระยะต่าง ๆ ทำได้ดังนี้คือ

จากรูปที่ 3.2 อัตราการใช้ออกซิเจน state 3 = $\frac{R}{P_i}$ x A นนอ. ออกซิเจน/มล./นาที

A = มคอ. ออกซิเจนที่ละลายอิ่มตัวใน incubation medium 1 มล. ก่อนที่จะถูกนำไปใช้โดยไมโตคอนเดรีย (ค่า A ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.489 มคอ.ออกซิเจน/มล. และมีค่าเท่ากับ 0.444 มคอ.ออกซิเจน/มล. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

วิธีการคำนวณหาค่า A มีสูตรดังนี้คือ

$$A = \frac{S}{V} \times \frac{P}{100} \times N \times 10^6 \quad \text{atom O /ml}$$

S = ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดซึมที่อุณหภูมิต่าง ๆ

P = จำนวนอะตอมของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21%

N = จำนวนของอะตอมออกซิเจนใน 1 โมเลกุล

V = ปริมาตรของก๊าซ เทียบเท่า 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 มล.(ที่ 0 องศาเซลเซียส,760 มม.ปรอท)

R = ความสูงของเส้นตามแนวแกน y ในระยะเวลา 1 นาที

P_i = ความสูงของแกน y จากการตั้งเครื่อง recorder เท่ากับ 100% ออกซิเจนที่ละลายใน incubation medium ใน chamber

เมื่อคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนได้แล้ว นำมาหารด้วยค่าปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย จะทำให้ทราบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโตคอนเดรียเป็นจำนวน มคอ./นาที/มก.โปรตีน

7. การวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรีย

เนื่องจากปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ ATP โดย ATPase จะเกิดผลิตผลคือ ADP , Pi และ H^+ ดังสมการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$ATP + H_2O \xrightarrow{F_1\ F_O\text{-ATPase}} ADP + Pi + H^+$$

ดังนั้นในการวิจัยสามารถวัด ATPase activity ของไมโตคอนเดรียได้ 2 วิธีคือ การวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium หรือการวัดจำนวน Pi ที่เกิดจากการสลายของ ATP

การวิจัยครั้งนี้ทำการวัด ATPase activity โดยใช้วิธีการวัดจำนวน H^+ ที่เพิ่มขึ้นใน medium ซึ่งการวัดจะใช้ pH electrode ต่อเข้ากับ pH/ion meter (Pope model 1502) และจากเครื่อง pH meter จะมีสายต่อกับเครื่อง recorder เพื่อบันทึกผลการทดลองลงในกระดาษกราฟ

ขั้นตอนดำเนินการทดลอง

1. ใส่ incubation medium ดังกล่าวไว้ในข้อ 3.3 จำนวน 3 มล. ใน beaker ขนาด 5 มล.
2. เติมไมโตคอนเดรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2 จำนวน 150 มคล.
3. ใส่ DNP (ในกรณีที่ต้องการกระตุ้นด้วย DNP)
4. ใส่โลหะที่ต้องการวิจัยทิ้งไว้ 1 นาที
5. ใส่ ATP

8. การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย

การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย ในการวิจัยนี้ใช้วิธีของ Lowry และคณะ(50) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (51)เป็นวิธีการหาปริมาณโดยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีขึ้น คือ สีน้ำเงิน และนำสีที่เกิดนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm. ด้วยเครื่อง spectrophotometer

วิธีการหาโปรตีนทำดังนี้คือ

1. เจือจางไมโตคอนเดรียในอัตราส่วน 1: 300 ด้วยน้ำกลั่น
2. นำไมโตคอนเดรียที่เจือจางแล้วในข้อ 1 จำนวน 1 มล. และ bovine serum albumin สำหรับเป็น standard ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 มก./มล. จำนวน 1 มล. มาเติม alkaline copper reagent 1 มล. (ถ้าเป็น blank ใช้น้ำกลั่นจำนวน 1 มล.) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที

3. เติม Folin phenol reagent(dilution 1:10)ลงไป 3มล.
4. เมื่อเขย่าให้เข้ากันดีแล้ว นำไปแช่ใน water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.
6. เทียบหาค่าปริมาณโปรตีนจากค่า standard curve

Folin phenol reagent(dilution 1:10) เตรียมจากการเจือจาง concentrated Folin - Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร/ปริมาตร

alkaline copper reagent ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5% $CuSO_4$ ซึ่งผสมอยู่กับ 1% potassium tartate และ 10 ส่วนของ 10% $NaCO_3$ ใน 0.5 M NaOH

9. การแสดงผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

9.1 oxygraph tracing ลอกจาก oxygraph tracing ที่ได้จากการทดลองอัตราการใช้ออกซิเจน มีหน่วยเป็น มคอ. ออกซิเจน/มล./นาที

9.2 tracing ที่แสดงปริมาณ H^+ ลอกจาก tracing ที่ได้จากการทดลองในข้อ 7 อัตราการเพิ่มของ H^+ มีหน่วยเป็น นนม. H^+/มก. โปรตีน/5 นาที

9.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้สถิติ student's pair t-test ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย