บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP 1 ในเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ใช้ศึกษาได้มาจากฟันกรามถาวรซี่ที่ 3 ในขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่าง ที่มีสภาพปกติสมบูรณ์ ปลายรากเปิด ไม่มีรอยโรคฟันผุและการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ จำนวน 20 ซี่ จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยผู้ป่วยได้ทำการลงนามยินยอมมอบฟันเพื่อใช้ในการศึกษา การศึกษาในครั้งนี้ได้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2547 ตามเอกสารเลขที่ วจ 288/2547

2. วัสดุอุปกรณ์และสารที่ใช้ในการศึกษา

จำแนกเป็น

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยที่แยกจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดี เอ็ม อี เอ็ม (DMEM)

ซีรัม (fetal bovine serum)

ยาปฏิชีวนะ(antibiotic-antimicotic)

แอลกลูตามีน (L-glutamine)

ทริพซิน อี ดี ที เอ (Trypsin–EDTA solution)

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35, 60 และ 100มิลลิเมตร

บรรณานุกรม สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม

2.2 การสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้

แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Analytical grade)

กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 , 0.47 ไมโครเมตร

หลอดสำหรับเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วสูง

Disposable sterile syringe filter, pore size 0.2 ไมโครเมตร

2.3 การวัดจำนวนเซลล์ด้วยสารเอ็ม ที ที

สารเอ็ม ที ที

สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือ ดี เอ็ม เอส โอ (DMSO solution)

คิวเวต (Cuvette)

2.4 การวัดอาร์ เอ็น เอนำรหัสของยีน DMP 1

ไทรซอล (Trizol reagent)

คลอโรฟอร์ม (Chloroform, molecular biology grade)

ไอโซโพรพานอล(Isopropanol, molecular biology grade)

แอลกอฮอล์ (Absolute alcohol, molecular biology grade)

หลอดสำหรับเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ขนาด 200 ไมโครลิตร

ชุด RT- PCR kit

อะกาโรส (Agarose)

DNA marker

เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

น้ำปราศจากเอนไซม์ (RNase DNase Free Water)

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษา

ตอนที่ 1

เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

ทดสอบกับสารโพลีแซคคาไรด์
ที่ความเข้มข้น 0,0.25,0.5,1,2
และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ทดสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสาร เอ็ม ที ที
ได้ความเข้มข้นที่เพิ่มจำนวนและไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ตอนที่ 2

เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

ทดสอบกับสารโพลีแซคคาไรด์
ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สกัดอาร์เอ็นเอ

วิเคราะห์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP 1
ด้วยเทคนิค อาร์ ที-พี ซี อาร์

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 การเตรียมสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้

นำใบว่านหางจระเข้พันธุ์ Aloe barbadensis Mill ที่มีขนาดสมบูรณ์ ความกว้างของใบอย่างน้อย 7 เซนติเมตร มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 30 นาที และน้ำกลั่น 30 นาที ปอกส่วนผิวที่เป็นสีเขียวออกให้หมดจนเหลือแต่วุ้นใส นำมาหั่นให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1x1x1 เซนติเมตร แล้วนำไปทำให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (WHEATON, NJ, USA) จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ได้เคยมีรายงานไว้ (McAnalley, 1998; Lee JK et al., 2001) กล่าวคือ ตกตะกอนด้วยเครื่อง เหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วสูง (ultracentrifuge) (Sigma, USA) ที่ระดับความเร็ว 5 000 9 000 10 000 และ 13 000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีต่อระดับความเร็ว ตามลำดับ นำส่วนของเหลวใสที่ได้ปรับสภาพกรด ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) จากนั้นนำไปผ่านขบวนการตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ95 และตกตะกอนด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 8 000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาผสมกับเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 หลังจากที่แอลกอฮอล์ระเหยออกไปจะเหลือแต่ส่วนตะกอน นำส่วนผงที่ได้ไปผ่านเครื่องทำให้แห้งเยือกแข็ง (Lyophilizer) (Flexi-Dry™ MP, New York, USA) เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรองเบอร์1 และทำให้ปราศจากเชื้อด้วยกระดาษไนโตรเซลลูโลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร นำสารโพลีแซคคาไรด์ของว่านหางจระเข้ที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำสารโพลีแซคคาไรด์มาใช้จะละลายส่วนผงกับน้ำกลั่นและนำไปทำให้ปราศจากเชื้ออีกครั้งก่อนนำไปทดสอบกับเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

3.2 การเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงมาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

เนื้อเยื่อในโพรงฟันที่ใช้ศึกษาได้จากฟันกรามถาวรซี่ที่ 3 ในขากร รไกรบนหรือขากรรไกรล่าง ที่มีสภาพปกติสมบูรณ์ ปลายรากเปิด ไม่มีรอยโรคฟันผุและการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ ผู้ป่วยที่ร่วมในงานวิจัยเป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีการเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงมาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันทำตามวิธีการของ พสุธาและคณะ (พสุธา

ธัญญะกิจไพศาล และคณะ, 2545) โดยเก็บฟันตัวอย่างในภาชนะที่ปลอดเชื้อที่มีฝาเกลียวปิด ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดี เอ็ม อี เอ็ม (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) อาหารเลี้ยงเซลล์นี้ประกอบด้วยยาต้านจุลชีพในอัตราส่วน 1:100 นำฟันตัวอย่างที่ได้มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายด์ (phosphate buffer saline) ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นผ่าส่วนของฟันตามยาวด้วยสิ่วที่สะอาดและปราศจากเชื้อ หยิบส่วนของเนื้อเยื่อในโพรงฟันออกมาด้วยคีมจับสำลี (cotton plier) ที่สะอาด ตัดแบ่งชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1x1x1 มิลลิเมตร วางเรียงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร (Nunc™, Denmark) ห่างกันประมาณ 4-5 มิลลิเมตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด ดี เอ็ม อี เอ็ม ที่ประกอบด้วย ซีรัม (fetal bovine serum) ความเข้มข้นร้อยละ 10 แอลกลูตามีน (L- glutamine) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพนนิซิลลิน จี (penicillin-G) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากบริษัท Gibco (USA) จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์คลานออกจากชิ้นเนื้อ และเจริญเติบโตจนเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว นำเซลล์ที่ได้ออกจากจานเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อ โดยใช้เอนไซม์ทริพซิน อี ดี ที เอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 (0.25% tripsin EDTA) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร (Nunc™, Denmark) และนับเซลล์ที่ทำการเพาะเชื้อต่อช่วง (subculture) เป็นเซลล์รุ่นที่ 1 เซลล์จะถูกเพาะเชื้อต่อช่วงใหม่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่นที่ 3-4 อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนใหม่ทุก 2-3 วัน

3.3 การทดสอบเซลล์ด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้

เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจะถูกแบ่งไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (NUNC™, Denmark) จำนวน 70 000 เซลล์ต่อหลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ดี เอ็ม อี เอ็ม ที่มีความเข้มข้นของซีรัมร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น ดี เอ็มอี เอ็ม ชนิดปราศจากซีรัม 2 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ 3 ชั่วโมง เพื่อล้างซีรัมออก แล้วจึงเปลี่ยนให้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่ผสมกับสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นของสารโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกันจำนวน 6 ความเข้มข้นในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ทดสอบที่ความเข้มข้นละ 4 หลุม ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ ที่ใช้ศึกษาในแต่ละครั้ง มาจากตัวอย่างฟันต่างกันจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสารเอ็ม ที ที

3.3.1 การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์และความเป็นพิษของสารทดสอบด้วยสาร เอ็ม ที ที

วิธีนี้วิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Freshney (Freshney, 2000) เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยสารเอ็มที ที อาศัยหลักการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสที่พบอยู่ในไมโตรคอนเดรีย (mitochondria dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการหายใจ โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt) ในสารเอ็ม ที ที เป็นผลึกฟอร์มาแซน ซึ่งมีสีม่วง เมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายที่เหมาะสม จะสามารถนำไปวัดหาปริมาณเซลล์ได้ โดยหากมีเซลล์จำนวนมาก สารละลายผลึกฟอร์มาแซนจะมีความเข้มของสีม่วงมากขึ้น และทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น วิธีการวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้วัดในแง่การเพิ่มจำนวนเซลล์และการตรวจสอบวัดความเป็นพิษกับสารที่ใช้ทดลอง

การวิเคราะห์ในการทดลองครั้งนี้มีวิธีการทำดังนี้ เซลล์ที่ทำการทดลองในสภาวะที่มีสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เป็นเวลา 24ชั่วโมง ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ถูกล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายด์ (Phosphate buffer saline, PBS) 2 ครั้ง จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิด ดี เอ็ม อี เอ็ม ที่ปราศจากฟีนอล เรด (DMEM without phenol red) ที่มีสารละลายเอ็ม ที ที ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ แล้วนำเข้าตู้บ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที จากนั้นดูดสารละลายเอ็ม ที ที ออกและใส่สารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ เพื่อละลายผลึกสีม่วงของ เอ็ม ที ที ฟอร์มาซาน (MTT formazan) ได้เป็นสารละลายสีม่วง ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่ได้ลงในคิวเวตแล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer model Ultraspec 3000, England)) ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่

$$\text{ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ทดสอบผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้อีกครั้ง โดยทำการการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (NuncTM, Denmark) จนเซลล์มีความหนาแน่นร้อยละ 80 จากนั้น ทำการทดสอบกับสารโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นดังกล่าวได้มาจากผลการทดสอบด้วยสารเอ็ม ที ที ทำการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP1 ด้วยเทคนิค อาร์ ที - พี ซี อาร์ โดยทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง จากตัวอย่างฟันที่ต่างกัน

3.3.2 กระบวนการสกัดอาร์เอ็นเอ และวิเคราะห์ระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP1 ด้วยเทคนิคอาร์ที – พีซีอาร์

3.3.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ที่ผ่านการทดสอบจะถูกสกัดอาร์เอ็นเอด้วย ไทรซอล (TRIzol) (Gibco, USA) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (ultracentrifuge) (Sigma, USA) ที่ระดับความเร็ว 14 000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนอาร์เอ็นเอออกมาจากองค์ประกอบอื่นของเซลล์ โดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะเป็นส่วนของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนสุดประมาณ 4/5 ของส่วนของเหลวใสทั้งหมด จากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยการเติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) และผ่านเครื่องเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ที่ระดับความเร็ว 14 000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอนอยู่รวมกัน เมื่อได้ตะกอนของอาร์เอ็นเอ จะทำการดูดไอโซโพรพานอลออกไปและเติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 80 เพื่อล้างทำให้อาร์เอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ ผ่านเครื่องเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ที่ระดับความเร็ว 13 000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนแอลกอฮอล์ออกให้หมด จนเหลือแต่ตะกอนของอาร์เอ็นเอ นำอาร์เอ็นเอที่แยกได้ผ่านกล่องความร้อน (heat box) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจนกว่าส่วนแอลกอฮอล์ที่ตกค้างอยู่ระเหยหมดไป อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกละลายด้วย RNase Free Water จากนั้นทำการวัด

ความร้อน (heat box) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจนกว่าส่วนแอลกอฮอล์ที่ตกค้างอยู่ระเหยหมดไป อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกละลายด้วย RNase Free Water จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และเข้าสู่กระบวนการ อาร์ ที-พี ซี อาร์ ต่อไป

3.3.2.2 กระบวนการรีเวิร์สทรานสคริปชั่น

อาร์เอ็นเอที่ได้ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะถูกนำไปผ่านกระบวน การ รีเวอร์สทรานสคริปชัน หรือ อาร์ ที ด้วยผลิตภัณฑ์ชุด SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase เพื่อสังเคราะห์คอมพลีเมนทารี ดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที

3.3.2.3 กระบวนการโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น

คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นด้วยขบวนการ โพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น หรือ พี ซี อาร์ โดยใช้เครื่องขยายปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง GeneAmp® PCR System (Foster city, USA) ประกอบด้วยขั้นตอนในแต่ละรอบได้แก่ ขั้นตอนการเริ่มแยกสายคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (initial denature) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขบวนการแยกสายคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (denature) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยขั้นตอนใช้สายไพร์มเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษาบนตำแหน่งของสายดีเอ็นเอ (annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และยืดสายไพร์มเมอร์ (extension) จากตำแหน่ง 3' สู่ตำแหน่ง 5' เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขบวนการทั้งหมดจะทำเป็นจำนวน 30 รอบ โดยการใช้สายไพร์มเมอร์ ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของยีนDMP1 และใช้สายไพร์มเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน GAPDH (Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) ควบคู่กันไป เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายในของการทดลอง สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DMP1 และยีน GAPDH สามารถตรวจสอบได้จาก Genbank ผ่านทางเว็บไซต์ของ National Institute of Health (NIH) โดยลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไพร์มเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แสดงในตารางที่1

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการพี ซี อาร์แล้วสายพันธุกรรมที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น

ของอะกาโรสเจลร้อยละ 1.5 ทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบสายพันธุกรรมโดยใช้ Imaging Densitometer/Gel Doc (BioRAD, USA) program Molecular Analysis ™ Window solfware for BioRAD Image Analysis System Version1.4 โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบยีน DMP1 ในแต่ละความเข้มข้น กับแถบของยีน GAPDH ซึ่งเป็นแถบของยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน

ตารางที่ 1 แสดงลำดับของนิวคลีโอไทด์ไพร์มเมอร์ของยีน GAPDH และ DMP1 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

GAPDH	forward	5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGAT 3'
	reverse	5' TCACACCCATGACGAACATGG 3'
DMP 1	forward	5'GATGACACCATACAAGCCAGT 3'
	reverse	5'CTCACTCACCACCTCTTCCT 3'

GAPDH; Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase

DMP1; Dentin matrix protein 1

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล

การเพิ่มจำนวนเซลล์ ภายหลังการทดสอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้โดยใช้ความเข้มข้นของสารโพลีแซคคาไรด์ 0 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม ทดสอบความเข้มข้นแต่ละระดับครั้งละ 4 หลุม ทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ที่ใช้ศึกษาในแต่ละครั้งมาจากตัวอย่างฟันต่างกัน ดังนั้นตัวอย่างที่ได้ในขั้นตอนนี้มีจำนวนเท่ากับ 12 ตัวอย่าง ทำการตรวจวัดโดยใช้สารละลาย เอ็ม ที ที จากนั้นนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร จากนั้น

จะแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นจำนวนเซลล์ ตามกราฟมาตรฐานและปรับเป็นจำนวนร้อยละของเซลล์

การแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP1 ทำด้วยเทคนิค อาร์ที-พีซีอาร์ แล้วทำการวิเคราะห์โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจล โดยทำการทดสอบเซลล์กับสารโพลีแซคคาไรด์ระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวได้มาจากผลการทดสอบด้วยสารเอ็ม ที ที ทดสอบการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสของยีน DMP1 โดยแต่ละครั้งใช้เซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อในโพรงฟันจากตัวอย่างฟันที่ต่างกัน ดังนั้นตัวอย่างที่ได้ในขั้นตอนนี้มีจำนวน เท่ากับ 6 ตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบแสงโดยใช้ Imaging Densitometer /Gel Doc (BioRAD,USA) program Molecular Analysis ™ Window solfware for BioRAD Image Analysis System Version1.4

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลที่ได้จากการทำเอ็ม ที ที ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 11 หาค่าเฉลี่ย และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้สถิติการทดสอบ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (one-way ANOVA) และแบบทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มแทมเฮน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 การวัดผลกำหนดให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็น 100

ผลจากการทำเอ็ม ที ที ของทุกกลุ่มตัวอย่างถูกนำมาหาค่าเฉลี่ย และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้กับกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติการทดสอบชนิดไม่ใช่พาราเมตริก (non-parametric) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (Kruskal-Wallis One Way Analysis Of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในการวัดผลกำหนดให้ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมเป็น 100

ผลที่ได้จากการทำ อาร์ ที – พี ซี อาร์ ถูกนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS หาค่าเฉลี่ย และความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน DMP1 ใช้สถิติทดสอบค่าเฉลี่ยประชากรเดียวแบบที (One - Sample T test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มทดลองทำการทดสอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยกำหนดให้การแสดงออกของยีนในกลุ่มควบคุมมีค่าการแสดงออกเท่ากับ 1