บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอ

นำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอจากศูนย์เนื้อเยื่อชีวภาพกรุงเทพฯ จำนวน 48 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นแบบผงและแบบก้อนอย่างละ24 ตัวอย่างมาศึกษา โดยนำกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ชนิดทริปเปิลเอแบบก้อนมาบดให้มีขนาดเล็กลงก่อน จากนั้นนำตัวอย่างกระดูกทั้ง 2 รูปแบบมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AL104 Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) แล้วนำตัวอย่างกระดูกทั้งหมดมาสกัดด้วยกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ /อีดีทีเอ (Guanidine-HCl/EDTA) ตามวิธีการของ Wildemann และคณะ (2007) โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ

3.1.1 ใส่ตัวอย่างกระดูกลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดซึ่งประกอบด้วย 4 โมล กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (4M Guanidine-HCl) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี 50 มิลลิโมล อีดีทีเอ, ทริส ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.4, 5 มิลลิโมล เบนซามิดีนไฮโดรคลอไรด์, 1 มิลลิโมล ฟีนิลเมธิลซัลโฟนิล และ 0.1 มิลลิโมล กรดอะมิโนคาโปรอิก (50 mM EDTA, Tris pH 7.4, 5 mM benzamidine-HCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl, 0.1 mM aminocaproic acid) ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร

3.1.2 นำสารที่ได้จากการสกัดไปผ่านขบวนการไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือและสารอื่นๆ ที่ไม่ต้องการออก โดยมีการเปลี่ยนน้ำกลั่นทั้งหมด 4 ครั้ง

3.1.3 นำของเหลวที่ได้จากถุงไดอะไลซิส (dialysis bags) มาทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ซึ่งจะได้เป็นผงของสารที่สกัดได้จากกระดูก (bone extract powder) ทำการละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร

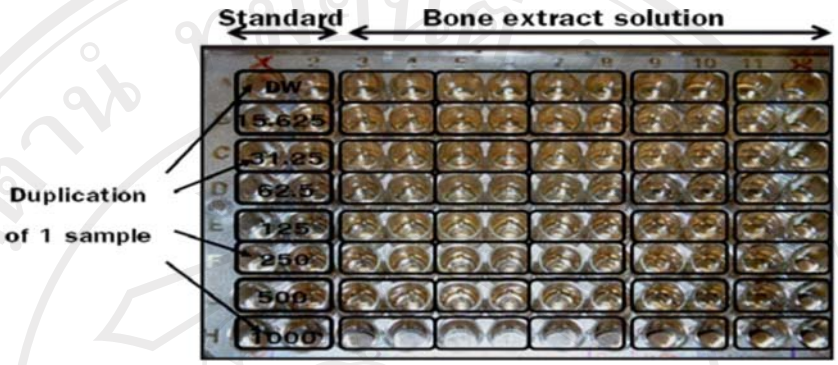
3.1.4 นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ด้วยวิธี Bradford assay (BioRad, USA) รวมทั้งวัดระดับบีเอ็มพี 2 ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปอีไลซา (ELISA kit) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, sensitivity = 11 pg/ml; range 62.5-4000 pg/ml)

3.2 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

3.2.1 เติมโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นสารมาตรฐาน (standard) โดยมีน้ำกลั่น

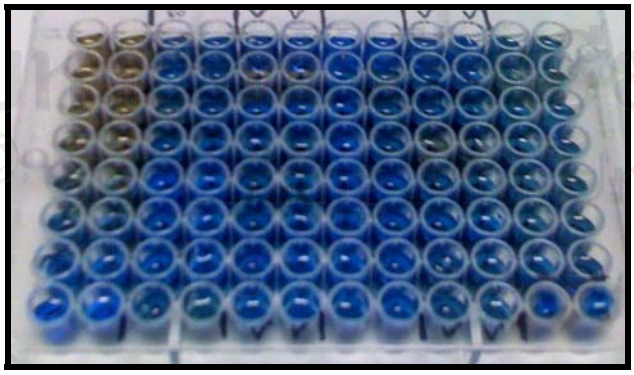
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(distilled water; DW) เป็นตัวควบคุมผลลบรวมทั้งใส่ตัวอย่างที่สกัดได้ลงในเพลทที่มี 96 หลุม (96-well plate) อย่างละ 10 ไมโครลิตร ทำซ้ำสองครั้ง (duplication) โดยมีการแบ่งหลุมทดสอบดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การแบ่งหลุมทดสอบออกเป็นสารมาตรฐานและตัวควบคุมผลลบใน 2 แถวแรก และสารทดสอบในหลุมที่เหลือ

3.2.2 เติมสารละลายโปรตีนเอสเสดายน์รีเอเจนท์คอนเซนเตรท (Bio-Rad Protein Assay dye reagent concentrate) ที่ผ่านการเจือจางในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมเพื่อทำให้เกิดการจับกับโปรตีนที่มีในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเป็นสีฟ้าดังแสดงในภาพที่ 9 จากนั้นจึงนำมาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานใน 2 แถวแรกโดยอ่านผลด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader; Titertek Multiscan MCC/340, CA, USA) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร



ภาพที่ 9 การตรวจวัดโปรตีนที่แสดงให้เห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวิเคราะห์ระดับของบีเอ็มพี 2 ด้วยวิธีอีไลซา (ELISA)

3.3.1 เตรียมบีเอ็มพี 2 สแตนดาร์ด รีเอเจนท์ (BMP-2 standard reagent), วอช บัฟเฟอร์ (wash buffer) และซับสเตรทโซลูชัน (substrate solution) โดยมีคาลิเบรเตอร์ ไดลูเอ็นท์ อาร์ดีไฟว์พี (calibrator diluents RD5P) เป็นสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ 0 (zero standard; 0 pg/ml) ตามวิธีการที่บริษัทกำหนด

3.3.2 เติมเอสเส ไดลูเอ็นท์ อาร์ดี 1-19 (assay diluent RD1-19) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของชุดตรวจสำเร็จรูปอีไลซาที่เคลือบไว้ด้วยแอนติบีเอ็มพี 2 โมโนโคลนอล แอนติบอดี (anti-BMP-2 monoclonal antibody) ซึ่งเป็นแอนติบอดีตัวที่ 1

3.3.3 เติมสารมาตรฐาน ตัวควบคุมผลหรือตัวอย่างที่สกัดได้หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วปิดด้วยแผ่นกาวพลาสติกใส (adhesive strip) จากนั้นนำถาดไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางถาดบนเครื่องเขย่าแนวนอนที่ระดับความเร็ว 500±50 รอบต่อนาที

3.3.4 ทิ้งสารละลายในถาดออกแล้วล้างด้วยวอช บัฟเฟอร์หลุมละ 400 ไมโครลิตร โดยทำการล้างถาดทั้งหมดจำนวน 4 ครั้ง เพื่อแยกส่วนที่ไม่จับกับแอนติบอดีที่เคลือบไว้ในหลุมออก

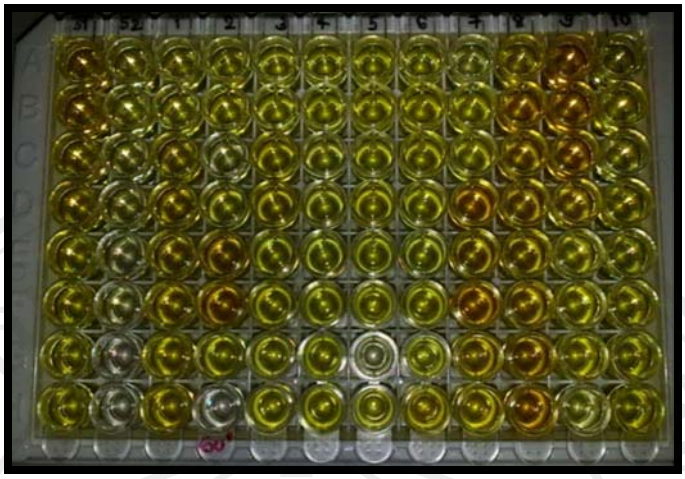
3.3.5 เติมบีเอ็มพี 2 คอนจูเกต (BMP-2 conjugate) ซึ่งเป็นแอนติบอดีตัวที่ 2 หลุมละ 200 ไมโครลิตร จนครบทุกหลุม ปิดด้วยแผ่นกาวพลาสติกใสอันใหม่และนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.6 ล้างถาดอีกครั้งโดยทำเหมือนข้อ 3.3.4

3.3.7 เติมซับสเตรทโซลูชันหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและเก็บให้พ้นแสงเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งจะพบสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีฟ้า

3.3.8 หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 นอร์มัลของกรดซัลฟูริก (2 N sulfuric acid) ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยา (stop solution) หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นจะพบสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 10 สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลืองภายหลังถูกหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมตัวหยุดปฏิกิริยา

3.3.9 วัดความเข้มของสีที่ปรากฏด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยทำการวัดภายใน 30 นาที หลังจากเติมตัวหยุดปฏิกิริยา ซึ่งค่าที่วัดได้ในแต่ละตัวอย่างนั้นจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ได้มาจากการทำค่ามาตรฐานใน 2 แถวแรกของชุดตรวจสำเร็จรูปอีไลซาเพื่อให้ทราบปริมาณของบีเอ็มพี 2 ในแต่ละตัวอย่าง

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าบีเอ็มพี 2 ที่วัดได้จากการทำตัวอย่างละ 2 หลุมมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยและนำมาทำเป็นสัดส่วนต่อค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้ ซึ่งค่าที่ได้จะเป็นระดับของบีเอ็มพี 2 ต่อโปรตีนทั้งหมด (BMP-2/total protein) โดยมีหน่วยเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิกรัมของโปรตีนทั้งหมด (pg/mg protein) รวมทั้งคำนวณเป็นระดับของบีเอ็มพี 2 ต่อกระดูกน้ำหนัก 1 กรัม ซึ่งจะมีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อ 1 กรัมของกระดูก (ng/g of bone) จากนั้นนำระดับบีเอ็มพี 2 ของกระดูกชนิดก้อนและชนิดผงมาวิเคราะห์ความแตกต่างแบบ non-parametric test ด้วยสถิติ Mann-Whitney U test ที่ $p = 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved