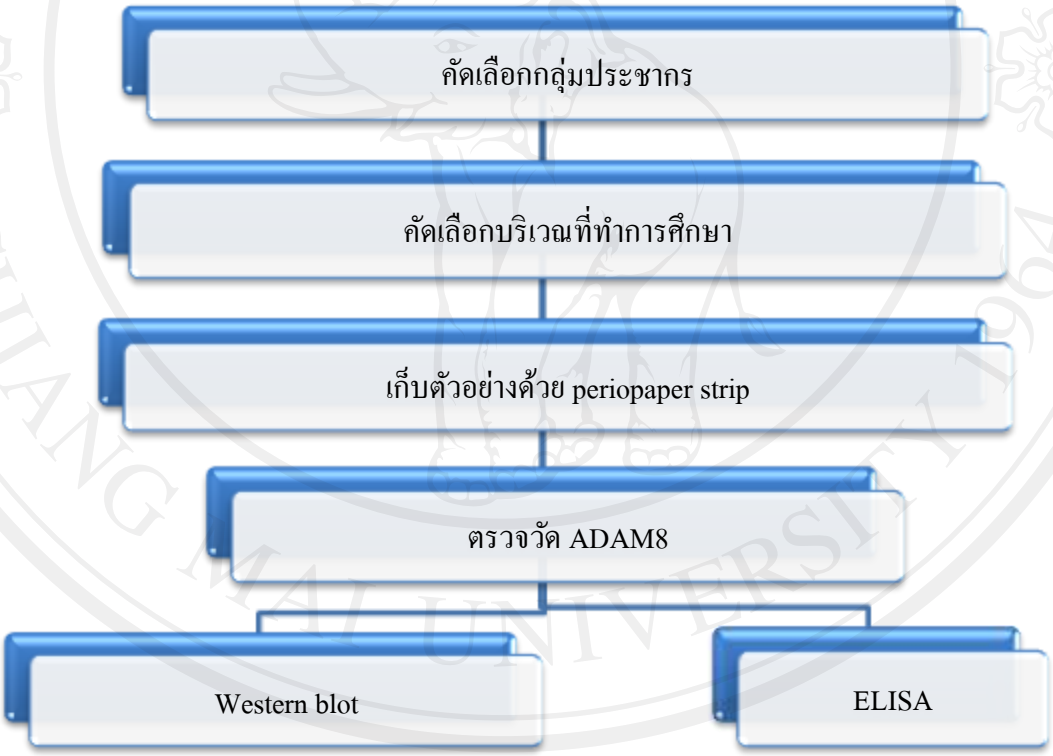
บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้ประกอบด้วยการศึกษาสองส่วน คือ การศึกษาในคลินิกและในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครกลุ่มต่างๆ จากนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำเหลืองเหงือกไปศึกษาการปรากฏของโมเลกุล ADAM 8 และตรวจวัดปริมาณด้วยวิธีการทางชีวเคมีต่อไป ดังภาพ 15



ภาพ 15 ลำดับวิธีการวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1 คัดเลือกกลุ่มประชากร

คัดเลือกกลุ่มประชากรจากผู้ที่มารับการตรวจรักษาโรคปริทันต์ ในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อายุมากกว่า 18 ปีไม่จำกัดเพศ โดยการศึกษานี้ผ่านการอนุมัติให้ทำการศึกษาวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิ์ฯ ของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 1 0 / 2 5 5 4 โดยอาสาสมัครทุกคนให้ความยินยอมโดยการลงลายมือชื่อในเอกสาร แบ่งอาสาสมัครออกเป็น 4 กลุ่ม ตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคของ The American Academy of Periodontology (AAP) 1999 คือ กลุ่มที่มีสุขภาพเหงือกดี กลุ่มที่เป็นโรคเหงือกอักเสบ กลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว และกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง กลุ่มละ 10 คน รวมมีผู้เข้าร่วมในการศึกษาทั้งสิ้น 4 0 คน ซึ่งได้รับการตรวจและวินิจฉัยโรคจากทันตแพทย์ผู้มีประสบการณ์ด้านปริทันต์มาไม่น้อยกว่า 10 ปี จำนวน 2 คน โดยให้การวินิจฉัยโรคที่สอดคล้องกัน โดยมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มประชากรดังนี้

3.1.1 กลุ่มที่มีสุขภาพเหงือกดี มีลักษณะดังนี้

- เป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรง
- ลักษณะทางคลินิก เหงือกมีสีชมพู ขอบเหงือกมีลักษณะบาง เหงือกระหว่างซอกฟันมีลักษณะเป็นยอดแหลม
- ไม่มีเลือดออกภายหลังหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือปริทันต์
- ไม่มีการทำลายระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์

3.1.2 โรคเหงือกอักเสบ มีลักษณะดังนี้

- เป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรง
- ขอบเหงือกมีลักษณะอักเสบบวมน้ำและมีสีแดง กดนิ่ม
- มีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์ (bleeding on probing)
- ไม่มีการทำลายระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 โรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว มีลักษณะดังนี้

- เป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรง
- มักพบในผู้ป่วยอายุน้อย
- มีการอักเสบของเหงือกร่วมกับมีการทำลายระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในฟันกรามแท้ซี่แรก และฟันหน้า
- ระดับของการทำลายอวัยวะปริทันต์หรือความรุนแรงของโรคไม่สัมพันธ์กับปัจจัยเฉพาะที่
- อาจพบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยการซักประวัติอาจพบว่ามีคนในครอบครัวสูญเสียฟันหรือมีประวัติใส่ฟันเทียมเมื่ออายุยังไม่มาก

3.1.4 โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง มีลักษณะดังนี้

- เป็นผู้ที่มีสุขภาพร่างกายที่แข็งแรง
- มักพบในผู้ป่วยที่อยู่ในวัยผู้ใหญ่
- มีการอักเสบของเหงือกร่วมกับมีการทำลายระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์อย่างเรื้อรัง
- มีระดับของการทำลายอวัยวะปริทันต์สัมพันธ์กับปัจจัยเฉพาะที่ เช่น หินน้ำลาย
- มีการดำเนินโรคแบบช้าๆ

3.1.5 ผู้ป่วยที่ไม่นำมาศึกษา ได้แก่

- ผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับการอักเสบและทำลายกระดูก เช่น โรคข้อเสื่อม โรคข้ออักเสบรูห์มาตอยด์ และโรคกระดูกพรุน เป็นต้น
- ผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาปฏิชีวนะหรือต้องหยุดยาที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดก่อนตรวจโดยการใช้เครื่องมือตรวจปริทันต์
- ผู้ป่วยที่ได้การรักษาทางปริทันต์หรือรักษาด้วยยาภายใน 3 เดือนที่ผ่านมา ทั้งยาสเตียรอยด์ ยาปฏิชีวนะ และยากดภูมิคุ้มกัน
- ผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบและมีภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคปริทันต์อักเสบ ได้แก่ โรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการควบคุมและการสูบบุหรี่
- ผู้ป่วยที่เป็นสตรีมีครรภ์
- ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 18 ปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 คัดเลือกบริเวณที่ศึกษา

ทำการคัดเลือกบริเวณที่ศึกษาโดยอาศัยลักษณะทางคลินิกและภาพรังสี ในผู้ป่วย 4 กลุ่ม ดังนี้ (ตารางที่ 2)

3.2.1 กลุ่มผู้มีสุขภาพเหงือกดี บริเวณที่เก็บตัวอย่าง

- มีความลึกของร่องลึกปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร
- ไม่มีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์
- ไม่มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์จากลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสี
- ทำการเก็บตัวอย่างในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง

3.2.2 กลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ บริเวณที่เก็บตัวอย่าง

- เหงือกมีลักษณะอักเสบบวมแดง
- มีความลึกของร่องลึกปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 มิลลิเมตร
- มีเลือดออกภายหลังการหยั่งร่องเหงือกด้วยเครื่องมือตรวจปริทันต์
- ไม่มีการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์จากลักษณะทางคลินิกและภาพถ่ายรังสี
- ทำการเก็บตัวอย่างในผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง

3.2.3 โรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว บริเวณที่เก็บตัวอย่าง คือ

- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์น้อย (shallow pocket) เป็นตำแหน่งที่มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์โดยตรวจทางคลินิกและภาพรังสี โดยมีความลึกของร่องลึกปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร กลุ่มละ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง
- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์มาก (deep pocket) เป็นตำแหน่งที่มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์โดยตรวจทางคลินิกและภาพรังสี โดยมีความลึกของร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร กลุ่มละ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง บริเวณที่เก็บตัวอย่าง คือ

- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์น้อย (shallow pocket) เป็นตำแหน่งที่มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์โดยตรวจทางคลินิกและภาพรังสี โดยมีความลึกของร่องลึกปริทันต์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร กลุ่มละ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง
- ตำแหน่งที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีร่องลึกปริทันต์มาก (deep pocket) เป็นตำแหน่งที่มีการสูญเสียอวัยวะปริทันต์โดยตรวจทางคลินิกและภาพรังสี โดยมีความลึกของร่องลึกปริทันต์มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร กลุ่มละ 10 คน คนละ 5 ตำแหน่ง รวมมีบริเวณที่ศึกษา 50 ตำแหน่ง

ตารางที่ 2 จำนวนตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างน้ำเหลืองเหงือกในประชากรกลุ่มต่างๆ

ตำแหน่งที่คัดเลือก		**จำนวนตำแหน่ง**
สุขภาพเหงือกดี		50
โรคเหงือกอักเสบ		50
โรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว	ร่องลึกปริทันต์น้อย	50
	ร่องลึกปริทันต์มาก	50
โรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง	ร่องลึกปริทันต์น้อย	50
	ร่องลึกปริทันต์มาก	50

3.3 การวัดลักษณะทางคลินิก

ทำการวัดลักษณะทางคลินิกด้วยอุปกรณ์ตรวจปริทันต์ที่มีขีดแบ่งทุก 1 มิลลิเมตร (PCP-UNC15 probe, Hu-Friedy, Chicago, USA) 6 ตำแหน่งรอบตัวฟัน (ด้านใกล้กลางทางด้านแก้ม ด้านกึ่งกลางด้านแก้ม ด้านไกลกลางทางด้านแก้ม ด้านใกล้กลางทางด้านลิ้น ด้านกึ่งกลางด้านลิ้น และด้านไกลกลางทางด้านลิ้น) ลักษณะทางคลินิกดังกล่าว ได้แก่

3.3.1 ระดับเหงือกร่น (recession) วัดจากจุดอ้างอิง คือรอยต่อระหว่างเคลือบฟันกับเคลือบรากฟันถึงขอบเหงือก

3.3.2 ร่องลึกปริทันต์ (probing pocket depth; PPD) วัดจากขอบเหงือกถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 ระดับการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (clinical attachment level; CAL) วัดจากจุดอ้างอิง คือ รอยต่อระหว่างเคลือบฟันกับเคลือบรากฟันถึงจุดลึกสุดของร่องลึกปริทันต์

3.3.4 ดัชนีเหงือกอักเสบ (Gingival index) แบ่งออกเป็น 0-3 ระดับ (Löe และ Silness, 1963) โดย

0 หมายถึง ไม่มีการอักเสบของเหงือก ไม่มีเลือดออกเมื่อใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์หยั่งร่องเหงือก

1 หมายถึง มีการอักเสบของเหงือกเล็กน้อย มีการบวมและเปลี่ยนสีของเหงือกเล็กน้อย ไม่มีเลือดออกเมื่อใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์หยั่งร่องเหงือก

2 หมายถึง มีการอักเสบของเหงือกปานกลาง มีการบวมแดงของเหงือก มีเลือดออกเมื่อใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์หยั่งร่องเหงือก

3 หมายถึง มีการอักเสบของเหงือกมาก มีการบวมแดงของเหงือก มีเลือดออกเมื่อใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์หยั่งร่องเหงือกหรือมีเลือดออกได้เอง

3.3.5 ดัชนีคราบจุลินทรีย์ (Plaque index) แบ่งออกเป็น 0-3 ระดับ (Silness และ Löe, 1964)

0 หมายถึง ไม่มีคราบจุลินทรีย์

1 หมายถึง มีคราบจุลินทรีย์เล็กน้อยบนผิวฟันใกล้ขอบเหงือก อาจเห็นคราบจุลินทรีย์ได้เมื่อย้อมด้วยสีย้อมคราบจุลินทรีย์หรือใช้อุปกรณ์ตรวจปริทันต์ครูด

2 หมายถึง มีคราบจุลินทรีย์สะสมระดับปานกลางในร่องเหงือกหรือผิวฟันใกล้ขอบเหงือก โดยสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3 หมายถึง มีคราบจุลินทรีย์สะสมระดับมากในร่องเหงือกและ/หรือผิวฟันใกล้ขอบเหงือก

3.4 การปรับมาตรฐานการตรวจทางคลินิกของผู้ตรวจ

การตรวจลักษณะทางคลินิกกระทำโดยผู้ตรวจคนเดียว โดยการทดสอบความเที่ยงในตัวของผู้ตรวจ (intra-examiner calibration) จะยอมให้ค่าที่วัดมีความคลาดเคลื่อนภายใน 1 มิลลิเมตรและให้ค่า weight kappa มีค่าตั้งแต่ 0.9 ขึ้นไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 วิธีการเก็บตัวอย่าง

เบื้องต้นตรวจลักษณะทางคลินิกเพื่อวินิจฉัยโรคและคัดเลือกตำแหน่งเพื่อเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้น 7-10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างในน้ำเหลืองเหงือก เริ่มต้นจากการกันน้ำลายรอบบริเวณที่เก็บตัวอย่างด้วยผ้าก๊อซ จากนั้นเป่าลมเบาๆ ให้แห้ง แล้วนำ periopaper strip (Periopaper, ProFlow, Amittyville, USA) (ภาพ 16) ที่ตั้งค่าด้วยเครื่อง Periotron (Periotron 8000™, Oralflow Inc., Plainview, NY, USA) (ภาพ 17) ให้เป็น 0 สอดลงไปในร่องเหงือกที่คัดเลือก ดันลงไปเล็กน้อยและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที (ภาพ 18)

ภาพ 16 Periopaper strip (Periopaper)
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

ภาพ 17 เครื่อง Periotron (Periotron 8000™)
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 18 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเหลืองเหงือกจากร่องลึกปริทันต์
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

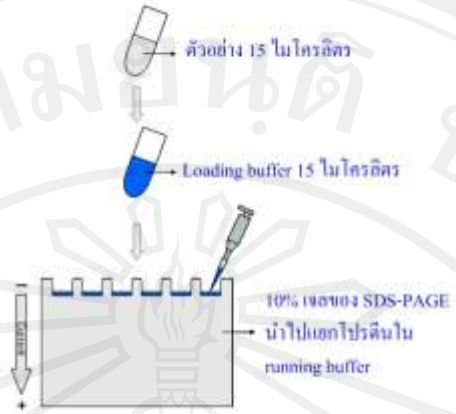
จากนั้นนำ periopaper strip มาวัดค่าที่ได้ด้วยเครื่อง Periotron อีกครั้งหนึ่งเพื่อนำค่านั้นไปคำนวณเพื่อหาปริมาตรของน้ำเหลืองเหงือกที่เก็บได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เคยทำไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ (Khongkhunthian และคณะ, 2008) จากนั้นเก็บกระดาษ periopaper strip ไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างแล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวัด ADAM 8 ด้วยวิธี western blot และ ELISA ต่อไป

3.6 การตรวจวัดค่า ADAM 8 ในน้ำเหลืองเหงือก

ในการตรวจวัด ADAM 8 เบื้องต้นด้วยวิธี western blot ซึ่งเป็นเทคนิคการดูการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis ทำการตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการด้วยแอนติบอดี (antibody) ได้ทำตามวิธีการของ Krisanaprakornkit และคณะ (2008) โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

- เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองและเขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 30 นาที
- เติมบัฟเฟอร์ที่มี 0.2 M Tris-HCl ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 6.8 และมีกลีเซลรอลร้อยละ 25 SDS ร้อยละ 2 และโบรโมฟีนอล บลูร้อยละ 0.04 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มนาน 5 นาที
- นำตัวอย่างไปใส่ใน SDS-PAGE ที่มีเจลร้อยละ 10 (ภาพ 19) เพื่อแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลในรันนิงบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า (1x running buffer) ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพ 20)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 19 การใส่ตัวอย่างใน SDS-PAGE ที่มีเจลร้อยละ 10
(แหล่งที่มา ดัดแปลงจาก ptglab.com)

ภาพ 20 การแยกโปรตีนใน SDS-PAGE ที่มีเจลร้อยละ 10 ด้วยกระแสไฟฟ้า
(แหล่งที่มา ดัดแปลงจาก wigipedia.org)

- จากนั้นย้ายโปรตีนมาใส่ในแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) (ภาพ 21) ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงในบลอทติงบัฟเฟอร์ที่เย็น (cold blotting buffer) โดยใช้เครื่อง Transblot apparatus (Bio-Rad, CA, USA)
- นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ไปแช่ในน้ำนมไร้ไขมันในสารละลายทริส บัฟเฟอร์ (TBS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่มีทวีน-20 (Tween-20) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แล้วใส่แอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ต่อโปรเปปไทด์ โดเมนของ ADAM 8 (Abcam, MA, USA) ทิ้งไว้ข้ามคืนในบลอคกิงบัฟเฟอร์ (blocking buffer)
- จากนั้นนำมาล้างใน Tween-20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในสารละลายทริส บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวที่สองที่จับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับฮอร์ส แรดดิช เปอร์ออกซิเดส (HRP-conjugated secondary antibody) ในทวีน-สารละลายทริส บัฟเฟอร์ (Tween-TBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- ล้างอีกครั้งด้วยทวีน -20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในสารละลายทริส บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาเคมิลูมิเนสเซนต์ (chemiluminescent) โดยใช้ LumiGLO Reserve Chemiluminescence (KPL, Maryland, USA)
- ถ่ายรูปด้วยกล้อง CCD ที่ติดอยู่กับเครื่อง ChemiDoc XRS (Bio-Rad, CA, USA)

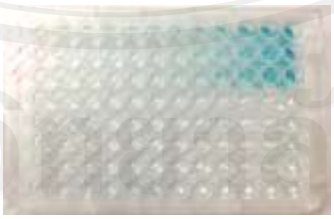
ภาพ 21 การย้ายโปรตีนมาใส่ในแผ่นไนโตรเซลลูโลส
(แหล่งที่มาจาก mit.edu)

สำหรับการทำ ELISA คือการหาสารแอนติเจน (antigen) โดยใช้แอนติบอดี (antibody) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจหาได้จากความเข้มของ substrate ที่เปลี่ยนสี สามารถวัดระดับแอนติเจนได้จากความเข้มของสีที่เกิดขึ้น โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (R&D Systems, MN, USA) โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

- เตรียมสารละลายแคปเจอร์ แอนติบอดี (capture antibody) โดยการละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ได้ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลุมของถาด ELISA หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปิดถาด ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกเหนียว แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ดูดแคปเจอร์ แอนติบอดีทิ้ง แล้วล้างถาด ELISA ด้วยวอชบัฟเฟอร์ (wash buffer) หลุมละ 400 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 รอบ แล้วเช็ดถาด ELISA ให้แห้ง
- เติมบลอกกิง บัฟเฟอร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรเพื่อทำการป้องกันการจับอย่างไม่จำเพาะของโปรตีนและ/หรือ แอนติบอดีเข้ากับถาด ELISA จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ดูดบลอกกิง บัฟเฟอร์ทิ้ง แล้วล้างถาด ELISA ด้วยวอชบัฟเฟอร์ หลุมละ 400 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 รอบ แล้วเช็ดถาด ELISA ให้แห้ง
- ละลายตัวอย่างออกจาก periopaper strip ด้วยตัวละลายรีเอเจนต์ (reagent diluents) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเตรียมสารมาตรฐานของ recombinant human ADAM 8 ที่ความเข้มข้น 0-4,000 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการละลายแบบครั้งละ 2 เท่า (2-fold dilution) ด้วยตัวละลายรีเอเจนต์ จากนั้นเติมสารมาตรฐาน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม 3 แถวแรกของถาด ELISA ส่วนแถวที่เหลือเติมตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นปิดถาด ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกเหนียว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ดูดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานทิ้งแล้วล้างถาด ELISA ด้วยวอชบัฟเฟอร์
- เติมดีเทคชัน แอนติบอดี (detection antibody) ที่ละลายด้วยตัวละลายรีเอเจนต์ ลงในแต่ละหลุมของถาด ELISA หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิดถาด ELISA ด้วยแผ่นพลาสติกเหนียว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ดูดดีเทคชัน แอนติบอดี ทิ้งแล้วล้างถาด ELISA ด้วยวอชบัฟเฟอร์
- เติมสเตรปตาวิดิน-ฮอร์ส แรดดิช เปอร์ออกซิเดส (Streptavidin-HRP) ที่ละลายด้วยตัวละลายรีเอเจนต์อัตราส่วน 1:200 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องแบบไร้แสงเป็นเวลา 20 นาที
- ดูด Streptavidin-HRP ทิ้งแล้วล้างถาด ELISA ด้วยวอชบัฟเฟอร์
- เติมสารละลายซับสเตรท (substrate solution) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิแบบไร้แสงเป็นเวลา 20 นาที (ภาพ 22) จะเห็นของเหลวเปลี่ยนเป็นสีฟ้าในตำแหน่งที่มี ADAM 8



ภาพ 22 การตรวจวัดโปรตีนที่แสดงให้เห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีฟ้า
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมตัวหยุดปฏิกิริยา จะเห็นของเหลวในหลุมจากสีฟ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพ 23)

ภาพ 23 การหยุดปฏิกิริยาทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

- นำไปอ่านผลด้วย ELISA plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (ภาพ 24)

ภาพ 24 การอ่านผลด้วย ELISA plate reader
(แหล่งที่มา จัดทำขึ้นเอง)

3.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตรวจวัดการมี ADAM 8 เบื้องต้นจากการทำ western blot โดยจะปรากฏเห็นเป็นแถบสีดำบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากนั้นวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ ADAM 8 ที่วัดได้จากการทำ ELISA ระหว่างกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพเหงือกดี กลุ่มผู้ป่วยโรคเหงือกอักเสบ กลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดก้าวร้าว และกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบชนิดเรื้อรัง ด้วยสถิติ Non-parametric statistical analyses โดยใช้ Mann-Whitney U test และหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ ADAM 8 กับลักษณะทางคลินิกต่างๆ ด้วย Spearman rank order correlation ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS v.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved