บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

ศึกษาผลของฟลูออไรด์,เบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟที่มีต่อเซลล์โพรงฟันของมนุษย์ในปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อต้องการพิสูจน์สมมติฐานว่าฟลูออไรด์,เบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์มีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ โดยศึกษาผลกระทบต่ออัตราการเจริญของเซลล์และการสร้างไฟโบรเนกติน

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (Population and Samples)

ใช้ฟันกรามซี่ที่ 3 (third molar) จากขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างที่ถอนฟันด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟันหรือด้วยเหตุผลอื่นๆ ฟันที่ได้จะต้องมีสภาพสมบูรณ์ปกติ ไม่มีโรคฟันผุ ไม่มีโรคของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน และไม่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ จากผู้ป่วยช่วงอายุ 18-25 ปีที่มารับการรักษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแจ้งให้ผู้ป่วยทราบและขออนุญาตนำฟันมาใช้ในการศึกษา โดยใช้จำนวนฟันอย่างน้อย 1 ซี่ต่อผู้ป่วย 1 คน และใช้ฟันจากผู้ป่วยอย่างน้อย 3 คนต่อหนึ่งการทดลอง เนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วยในแต่ละรายจะนำมาเลี้ยงแยกจากกันโดยไม่มีการปะปนกันระหว่างผู้ป่วยแต่ละคน

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Fetal calf serum (FCS), L-glutamine, Penicillin, Streptomycin sulphate, Amphotericin B, Trypsin-EDTA, primary antibody ต่อ fibronectin, Tris base, Tris-Hydrochloride, Acrylamide, N,N'-Methylenebisacrylamide จากบริษัท Gibco BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Sodium fluoride, Basic fibroblast growth factor, Platelet derived growth factor, Glycine, Lauryl sulfate (SDS), Ammonium persulfate, 2-β-Mercaptoethanol, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), Methylene blue, Bromophenol blue, แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) จากบริษัท Sigma chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Hydrochloric acid, Ethyl alcohol จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- Formaldehyde จากองค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย
- Glycerol จากบริษัท May & Baker LTD ประเทศอังกฤษ
- BCA protein assay reagent, CL-XPosure Film จากบริษัท Pierce ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Molecular protein marker จากบริษัท Biolabs ประเทศอังกฤษ
- Biotin-Rabbit Anti-Mouse IgG1, Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate จากบริษัท Zymed ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Skim milk จากบริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Tween จากบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
- ถุงไฮบริดไดเซชั่น (hybridization bag) จากบริษัท Boehringer Mannheim ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Western blot chemiluminescence reagent จากบริษัท NEN ประเทศสหรัฐอเมริกา

อุปกรณ์การทดลองที่ใช้ในการวิจัย

1.อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ

- ปากคีบขนาดเล็ก และ มีดผ่าตัดพร้อมด้ามมีด
- เครื่องกรอฟัน (micromotor)

2.อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

- ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (horizontal laminar flow) จากบริษัท CLYDE-APAC ประเทศออสเตรเลีย
- ตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) จากบริษัท Forma Scientific
- เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) จากบริษัท Hettich
- กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (Phase-contrast microscope) จากบริษัท Olympus
- เตาออโตเครฟ (autoclave) จากบริษัท Hirayama ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องมือนับเซลล์ (Cell counter : haematocytometer) จากบริษัท Gelman
- ปิเปต (pipette) จากบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- ปิเปตทิป (pipette tip) จากบริษัท AxyGen ประเทศสหรัฐอเมริกา
- พลาสเจอร์ปิเปต (plasteur pipette) จากบริษัท Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา
- จานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 และ 60 มิลลิเมตร (dish : diameter 35 and 60 mm.), จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24-well plate) จากบริษัท Nunc ประเทศเดนมาร์ค

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจหาโปรตีน

- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น ultrospec จากบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องแยกและเคลื่อนย้ายโปรตีนด้วยไฟฟ้า, เดนซิโตมิเตอร์และคอมพิวเตอร์ จากบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า จากบริษัท E-C ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. อุปกรณ์อื่นๆ

- เครื่องชั่งสาร จากบริษัท Mettler Toledo
- เตาทำความร้อน จากบริษัท Corning ประเทศสหรัฐอเมริกา
- pH meter จากบริษัท EUTECH
- Vortex Mixer จากบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม

วิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยการทดลอง 4 ส่วน ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์โพรงฟัน

2. การทดสอบผลของฟลูออไรด์ต่อเซลล์โพรงฟันที่ความเข้มข้นต่างๆกัน เพื่อหาความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่ไม่มีพิษต่อเซลล์โพรงฟัน แล้วหาจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ภายหลังการทดสอบด้วยฟลูออไรด์โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (Methylene Blue assay)

3. การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์, เบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ แล้วศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู และวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยเทคนิกเวสเทอร์น-บลอท (Western blot analysis)

4. การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ แล้วศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู และวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยเทคนิกเวสเทอร์น-บลอท เช่นเดียวกับในข้อ 3

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์โพรงฟัน

เซลล์สร้างเส้นใยจะถูกเพาะเลี้ยงขึ้นจากเนื้อเยื่อโพรงฟันของผู้ป่วยที่มาถอนฟันที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันที่ถูกถอนจะต้องไม่มีรอยโรคของฟันและเนื้อเยื่อปริทันต์ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศร้อยละ 5 ตามวิธีการเก็บฟันตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงฟัน ดัดแปลงจากวิธีปฏิบัติของ Nakashima (1991), Young และคณะ (1995) และ Moule (1995) ดังนี้

1. ฟันที่ถูกถอนออกมาจะรีบนำไปใส่ไว้ในภาชนะที่ผ่านขบวนการทำให้ปลอดเชื้อและมีฝาเกลียวปิดสนิทบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่ปราศจากซีรั่มแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทันที นำฟันมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลายด์ (Phosphate-buffered saline: PBS) ที่ปราศจากเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นจึงแบ่งฟันออกเป็น 2 ส่วนตามแนวยาวด้วยสิ่วและค้อน จากนั้นจึงใช้ปากคีบขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อดึงเนื้อเยื่อโพรงฟันออกมาใส่ในภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้มีดสะอาดตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1-2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปวางเรียงในจานเลี้ยงเซลล์ (tissue culture dish; Nunc) ขนาด 35 มิลลิเมตร ให้มีปริมาณชิ้นเนื้อประมาณ 5-9 ชิ้นต่อหนึ่งจานและวางอยู่ห่างกัน 4-5 มิลลิเมตร อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อโพรงฟันคือ ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่เติมซีรัม (fetal bovine serum; FBS) ร้อยละ 10, 2 มิลลิโมลาร์กลูตามีน (2 mM L-glutamine), ยาปฏิชีวนะ (antibiotics: 10,000 units/ml penicillin และ 10,000 µg/ml streptomycin sulphate) และยาต่อต้านเชื้อรา (antimycotic: 25 µg/ml amphotericin B) องค์ประกอบดังกล่าวนี้ เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ตามวิธีปฏิบัติพื้นฐาน และการศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว นอกจากจะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

2. อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนวันเว้นวันจนเซลล์สร้างเส้นใยคลานออกจากชิ้นเนื้อ เมื่อเซลล์ที่คลานออกจากชิ้นเนื้อเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์จะถูกถ่าย (subculture) โดยใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง หยดเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอที่ความเข้มข้น 0.25% ให้พอท่วมชั้นของเซลล์ ปิดฝาแล้วเอียงจานเพาะเลี้ยง 2-3 ครั้ง เพื่อให้เอนไซม์สัมผัสเซลล์ที่เรียงตัวแผ่เต็มพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงทั่วทุกบริเวณ จากนั้นนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1 นาที 30 วินาที ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อติดตามผลของเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ จะพบว่าเซลล์มีรูปร่างหดสั้นลง ทำให้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์กับผิวจานเพาะเลี้ยงลดลง เซลล์จะเป็นอิสระจากเซลล์ข้างเคียงและสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ เมื่อเซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีรูปร่างกลม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน

จากนั้นใช้พลาสเจอร์ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชะล้างเซลล์ที่ยังเกาะติดที่ผิวจานเพาะเลี้ยงให้หลุดออก จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร และเริ่มนับเป็นเซลล์รุ่นที่ 1 หลังจากนั้นเมื่อเซลล์แบ่งตัวมีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง เซลล์จะถูกหว่านใหม่ในอัตราส่วน 1:3 (หว่านเซลล์ 1 ใน 3 ของเซลล์ทั้งหมดต่อจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ 1 จาน) จนกระทั่งได้เซลล์มากพอโดยในการทดลองจะใช้เซลล์รุ่นที่ 3-7

2. การทดสอบความเป็นพิษของฟลูออไรด์ที่มีต่อเซลล์โพรงฟัน

วิธีการศึกษาจะเริ่มด้วยการหว่านเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมร้อยละ 10 จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีฟลูออไรด์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 10, 25, 50 และ 100 พีพีเอ็มและทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง โดยทำซ้ำกันทั้งหมด 3 ชุดด้วยกัน สำหรับความเป็นพิษของฟลูออไรด์จะตรวจสอบโดยปริมาณของเซลล์ที่เหลืออยู่ร่วมกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เห็นทางกล้องจุลทรรศน์ โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทดสอบหาปริมาณของเซลล์ที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู

<u>การศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยเทคนิคการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู</u>

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดจะดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในทุกหลุมทิ้งแล้วย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู ประยุกต์จากวิธีการของ Oliver และคณะ (1989) ดังนี้ คือเซลล์จะนำไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffer saline:PBS) แล้วนำไปตรึง (fixed) เพื่อคงสภาพเซลล์ด้วยฟอร์มัลดิไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 (4% Formaldehyde) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 2 ครั้งแล้วล้างอีก 1 ครั้งด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (0.01 M Borate buffer) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 เป็นเวลานาน 3 นาที จากนั้นจึงย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์อย่างน้อย 4 ครั้งหรือจนกระทั่งสีส่วนเกินออกหมด แล้วสีที่ย้อมติดเซลล์จะถูกทำละลายด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์ (0.5 M Hydrochloric acid) และเอธิลอัลกอฮอลล์ (ethyl alcohol) ในสัดส่วน 1:1 เขย่าให้สีของเมทิลีนบลูเข้ากันกับสารละลายจะได้สารละลายที่มีสีฟ้า สารละลายสีนี้จะถูกนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่

ความยาวคลื่นแสง 667.5 นาโนเมตร (nm) แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นโดยใช้เซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอน เพื่อคำนวณหาจำนวนของเซลล์

สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยการหว่านเซลล์ที่ทราบปริมาณแล้วลงในจานเลี้ยงเซลล์ นำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 8 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดปริมาณเซลล์ตามวิธีของเทคนิกการย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูที่กล่าวแล้วข้างต้น เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับจำนวนเซลล์ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กันแบบกราฟเส้นตรงที่มีค่าของสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เข้าใกล้ค่า 1

3. การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์, เบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ

วิธีการศึกษาจะเริ่มด้วยการหว่านเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมร้อยละ 10 จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีสารที่เราต้องการจะทดสอบใส่ลงไปและทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง โดย

- ฟลูออไรด์ที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1, 1 และ 10 พีพีเอ็ม
- เบสิค-เอฟจีเอฟและพีดีจีเอฟที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ในการทดลองจะให้แต่ละกลุ่มมีจำนวนชุดที่เหมือนกัน 4 ชุด โดยที่การทดลองใน 3 ชุดแรกจะนำไปศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ ส่วนการทดลองอีก 1 ชุดจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน และทำการทดลองในลักษณะนี้ทั้งหมด 3 ครั้ง

<u>การวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยเทคนิกเวสเทอร์น-บลอท</u>

เซลล์ที่เลี้ยงตามวิธีการในหัวข้อที่ 3 อีกชุดหนึ่ง เมื่อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์แล้ว จะถูกทำละลาย (extract) ด้วยสารละลายเลมลี่บัฟเฟอร์ (Laemmli buffer) (Laemmli,1970) แล้วนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนรวมโดยใช้ชุดวัดโปรตีนบีซีเอ ทำการวัดปริมาณโปรตีนตามที่บริษัทแนะนำโดยปิเปตโปรตีนสกัดมา 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 40 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายบีซีเอที่ผสมขึ้นจากสารละลายเอและสารละลายบีในอัตราส่วน 50:1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย

ให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกันค่าโปรตีนที่ทราบค่าของโปรตีนอัลบูมิน

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินดังนี้ คือ ใช้ปิเปตดูดโปรตีนสกัดมา 60 ไมโครลิตรใส่ในไมโครทิวบ์ เติมสีโบรโมฟีนอลบลูที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (5 mg/ml bromophenol blue) ลงไป 3 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารรีดิวซ์คือสารละลายเมอร์แคปโตเอธานอล (mercaptoethanol) ลงไปอีก 3.15 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 100°C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้จนเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายโปรตีนสกัดบรรจุในหลุมของแผ่นเจลโดยให้แต่ละแถวมีปริมาณโปรตีนที่เท่าๆกัน การแยกด้วยไฟฟ้าใช้อะคริลามายด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (acrylamide gel electrophoresis) และมีความหนาของแผ่นเจล 0.75 มิลลิเมตร ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสคงที่ 40 แอมป์เหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนที่ของโปรตีน จนกระทั่งสารแสดงสีน้ำเงินเคลื่อนลงมาถึงขอบล่างของแผ่นเจล จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) ด้วยไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 15 โวลท์เป็นเวลา 90 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ในสคิมมิลค์ (Skim milk) ที่มีความเข้มข้น 5% เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันปฏิกิริยาที่อาจรบกวนการย้อมโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสสารละลายที่มีแอนติบอดีปฐมภูมิต่อไฟโบรเนกติน (Mouse Monoclonal Anti-human Fibronectin Clone) ที่ความเข้มข้น 1:2000 นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ย้อมตามด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่มีไบโอตินเกาะอยู่ (Biotin-Rabbit Anti-mouse IgG1) ที่ความเข้มข้น 1:4000 นาน 40 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์อีก 3 ครั้ง และย้อมต่อด้วยสารละลายสเตร็ปตาวิดินฮอสราดิชเปอร์ออกซิเดส (Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate) ที่ความเข้มข้น 1:500 อีก 30 นาที เมื่อย้อมครบแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์อีก 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปฉาบด้วยสารละลายเคมิลูมิเนสเซนส์ (Chemiluminescence reagent) โดยทำการผสมระหว่างสารลูมินัล (luminal) กับสารเอนแฮนซ์เซอร์ (enhancer) ในอัตราส่วน 1:1 ภายในถุงไฮบริดไดเซชั่น (hybridization bag) ที่รีดจนเรียบบางและผนึกขอบทั้ง 4 ด้านจนสนิท ซึ่งเป็นเทคนิกที่เรียกว่าการขยายสัญญาณแบบเคมี (Chemiluminescence detection system) สารดังกล่าวจะไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนไฟโบรเนกตินบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสและมีการปล่อยรังสีออกมา และนำไปวางบนฟิล์ม(CL-XPosure Film) นานประมาณ 1 นาทีเพื่อให้ได้สัญญาณบนแผ่นฟิล์มแล้วนำฟิล์มไปล้าง ก็จะปรากฏแถบสีดำในตำแหน่งที่มีไฟโบรเนกตินบนฟิล์ม ความเข้มของแถบสีดำซึ่งแสดงถึงปริมาณของไฟโบรเนกตินจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องอ่านความเข้มเดนซิโตมิเตอร์

(densitometer) โดยเริ่มจากการสแกนภาพลงไปในเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่ออยู่กับเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ ปรับความเข้มของฉากหลังให้พอเหมาะโดยไม่ให้เข้มมากจนเกินไป แล้วจึงลากกรอบสี่เหลี่ยมครอบคลุมส่วนของแถบสีดำทั้งหมดรวมไปถึงส่วนของพื้นหลังด้วย และสั่งให้โปรแกรมอ่านค่าความเข้มของแถบสีดำที่เลือกไว้ออกมาโดยค่าที่ได้จะถูกหักล้างด้วยค่าความเข้มของพื้นหลังแล้ว ทำซ้ำ 3 ครั้งใน 1 แผ่นเพื่อทดสอบความเที่ยงในการอ่านค่าแต่ละครั้ง (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข)

ในการทดลองนี้ใช้ positive control เป็นโปรตีนไฟโบรเนกตินบริสุทธิ์ สำหรับ negative control ได้มีการทดสอบดูความเป็นไปได้ของการเกิด nonspecific band ของโปรตีนชนิดอื่นด้วย โดยการเริ่มย้อมแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิโดยที่ไม่ใช้แอนติบอดีต่อไฟโบรเนกตินย้อมก่อนเพื่อตรวจสอบหา nonspecific band ที่เกิดขึ้น

4. การกระตุ้นเซลล์ด้วยฟลูออไรด์ร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟ หรือพีดีจีเอฟ

วิธีการศึกษาจะเริ่มด้วยการหว่านเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมที่ความหนาแน่น 50,000 เซลล์ต่อหลุมเป็นเวลา 16 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมซีรัมร้อยละ 10 จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมที่มีสารที่เราต้องการจะทดสอบใส่ลงไปและทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง โดยเลือกใช้ฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็มร่วมกับเบสิค-เอฟจีเอฟหรือพีดีจีเอฟที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1, 1 และ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในการทดลองจะให้แต่ละกลุ่มมีจำนวนชุดที่เหมือนกัน 4 ชุด โดยที่การทดลองใน 3 ชุดแรกจะนำไปศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ ส่วนการทดลองอีก 1 ชุดจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน และทำการทดลองในลักษณะนี้ทั้งหมด 3 ครั้งเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2

การคำนวณผลทางสถิติ

ใช้ค่าเฉลี่ยบวกลบกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean$\pm$SD) แล้วนำค่าที่ได้ไปทดสอบสมมติฐานทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%