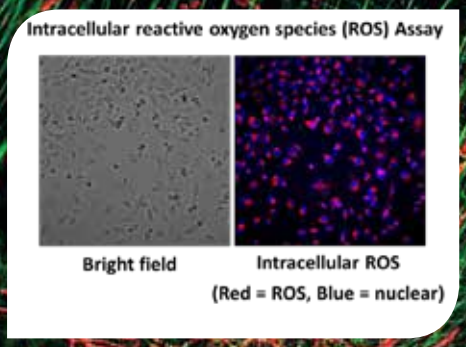
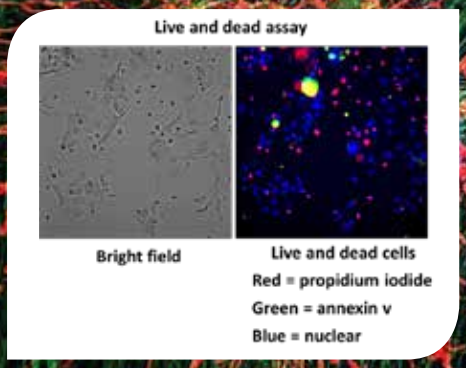
RIC KKU NEWSLETTER

จดหมายข่าวศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ric.kku.ac.th • ปีที่ 2 ฉบับที่ 5 ประจำเดือน มีนาคม 2558 •





แนะนำเครื่องมือวิจัย

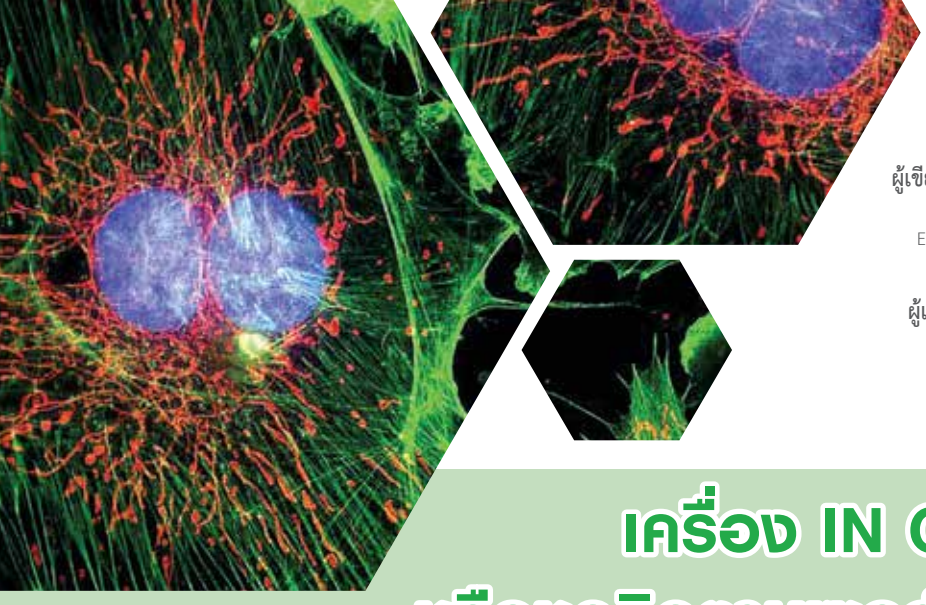
- IN Cell Analyzer
- Flow cytometer
- Fluorescence microplate reader

RIC KKU เข้าร่วมงานประชุมวิชาการวิจัยนานาชาติ 50 ปี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ทีมบรรณาธิการ

ที่ปรึกษา รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี
บรรณาธิการ ผศ.ดร.รินา ภัทรมานนท์
ทีมงาน นายต้นกล้า อินสว่าง
น.ส.ศุภจิรา ศรีจางวาง
น.ส.สุภลักษณ์ ประสาร
พิมพ์ที่ บจก. ศิริภัณฑ์ (2497) www.siriphan.com

Cover from: IN Cell Analyzer experiments
Author: Dr.Wanchana Seubwai



ผู้เขียนบทความ: น.ส.ศุภจิรา ศรีจางวาง
ตำแหน่ง : นักวิทยาศาสตร์
E – mail : suphachiranaja@hotmail.com
suphachira@kku.ac.th

ผู้แก้ไขบทความ: อ.ดร.วันชนะ สืบไวย
ตำแหน่ง : อาจารย์
E – mail : wunchanas@yahoo.com

เครื่อง IN Cell Analyzer 2000 หรือชุดติดตามเซลล์และโมเลกุลระบบปิด

การวิจัยระดับเซลล์ (Cellular research) เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงต่างๆทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคทางชีวเคมี Western blotting Flow cytometry และกล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ซึ่งเทคนิคที่กล่าวมายังมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลที่ได้จากเทคนิคดังกล่าวเป็นแบบ Low-throughput data

เครื่อง IN Cell Analyzer 2000 เป็นระบบถ่ายภาพเซลล์อัตโนมัติแบบ High throughput microscopy ซึ่งสามารถตรวจสอบเซลล์ที่ถูกตรึงไว้และเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (Fixed and live cells) โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้ในระยะเวลาต่าง ๆกัน ทั้งในระดับ วินาที/นาที/ชั่วโมง/วัน (Time lapse microscopy) นอกจากนี้ IN Cell Analyzer 2000 ยังสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ได้ (Fluorescent microscopy) ซึ่งภาพที่ได้จาก IN Cell Analyzer 2000 สามารถนำมาวิเคราะห์ผลทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ด้วยโปรแกรม IN Cell Investigator Software

คุณสมบัติทางเทคนิคของ IN Cell Analyzer 2000

IN Cell Analyzer 2000 หรือชุดติดตามเซลล์และโมเลกุลระบบปิด ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 ส่วนของชุดถ่ายภาพ สามารถถ่ายภาพเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ด้วยกล้องดิจิตอลเป็นแบบ Charge–coupled device หรือที่เรียกว่า CCD camera ซึ่งควบคุมการเคลื่อนที่ของเลนส์และการเปิด – ปิด ไดอะแฟรมต่าง ๆ เป็นแบบอัตโนมัติควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ มีความละเอียดของจุดภาพไม่น้อยกว่า 2048 x 2048 หรือ 7.4 x 7.4 ไมครอน มีระบบทำความเย็นได้ถึง -25 องศาเซลเซียส เพื่อลดสัญญาณรบกวนขณะถ่ายภาพในที่แสงน้อย การปรับความคมชัดของภาพทั้งส่วนของตัวเครื่องและโปรแกรมเป็นแบบอัตโนมัติ (Hardware and software autofocus) โดยส่วนของตัวเครื่องเป็นแบบ Laser Sensor และส่วนของโปรแกรมเป็นแบบ Contrast based algorithm ส่วนหัวขยายในการดูภาพมีขนาดกำลังขยายขนาด 4X, 10X, 20X และ 40X และในส่วนของกำลังขยายตั้งแต่ 10 เท่าขึ้นไปจะเป็นแบบ ASAC (Automated spherical aberration collar) ทำให้สามารถเห็นภาพได้ชัดเจนเสมอกัน มีแผ่นกรองแสงเพื่อตัดแสงฟลูออเรสเซนต์ 2 ชุด สำหรับช่วง Excitation และ Emission โดยแต่ละชุดมีจำนวน 8 อัน ได้แก่ DAPI FITC TexasRed Cy3 Cy5 dsRed CFP และ YFP การควบคุมการหมุนของฟิลเตอร์เป็นแบบอัตโนมัติสั่งงานโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์สำหรับเก็บภาพวัตถุหรือเซลล์โดยไม่จำเป็นต้องย้อมหรือติดสีฟลูออเรสเซนต์ได้ (Transmitted light image) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น LED

ส่วนที่ 2 ส่วนควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมเพื่อให้สามารถศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงในขณะที่มีชีวิตอยู่ ซึ่งจะเชื่อมต่อกับแท่นที่ออกแบบมาเฉพาะสำหรับวางถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 -, 12 -, 24 -, 48 -, 96 -, 384 -, และ 1536 well plate โดยมี Plate heating ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 5 – 42 องศาเซลเซียส โดยมีความคลาดเคลื่อนไม่เกิน ±1 องศาเซลเซียส มีระบบควบคุมการระเหยให้เกิดน้อยที่สุด และสามารถตั้งอุณหภูมิตามที่ต้องการและสั่งงานอัตโนมัติด้วยระบบคอมพิวเตอร์ สามารถติดตาม ตรวจสอบและรายงานอุณหภูมิในส่วนควบคุมซึ่งมีถาดเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลานอกจากนี้ยังสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในส่วนเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในสภาวะที่มีความชื้นปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่พอเหมาะต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยง

ส่วนที่ 3 ส่วนโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ โดยนำข้อมูลจากภาพที่ได้มาแปลงเป็นข้อมูลต่าง ๆซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วน คือ

1). ส่วนวิเคราะห์ที่มีโปรแกรมรูปแบบการวิเคราะห์สำเร็จรูป ซึ่งมีฐานข้อมูลพารามิเตอร์สำเร็จรูปที่ใช้ในการวิเคราะห์

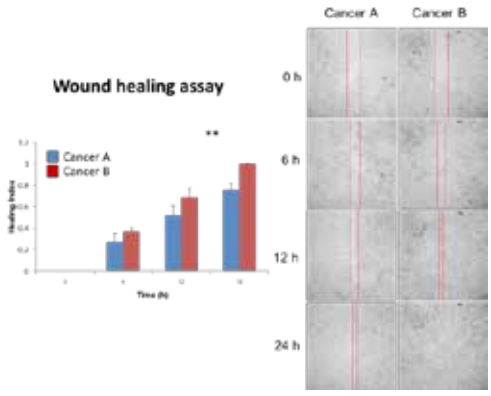
2). ส่วนวิเคราะห์ที่มีโปรแกรมรูปแบบการวิเคราะห์สำเร็จรูปแต่สามารถปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ได้ เพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (Multi – Target Analysis)

3). ส่วนวิเคราะห์ที่ผู้ใช้สามารถสร้างรูปแบบการวิเคราะห์เองได้ (Developer tool kit)

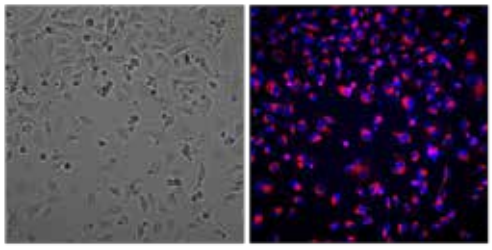
4). ส่วนวิเคราะห์ที่สร้างเป็นภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ในระยะเวลาต่าง ๆ (Spotfire Decision Site)

การประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ

- **Granularity :** การนับจำนวนแกรนูล ขนาดและความเข้มของแสงที่จะบอกได้ถึงความสัมพันธ์กับขนาด
- **Morphology :** การตรวจวัดลักษณะของพื้นผิวและความเข้มของสีฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถบอกความแต่งต่างระหว่างนิวเคลียร์และไซโตพลาสมิก
- **Nuclear trafficking:** การหาอัตราความเข้มของสีฟลูออเรสเซนต์ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างนิวเคลียร์และไซโตพลาสมิก
- **Micronuclei Formation Analysis :** การศึกษาการเกิดไมโครนิวคลีอาย (Micronuclei) ภายนอกนิวเคลียส ซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาการเป็นพิษ (Toxicology) ของการทดลองยาชนิดใหม่ ๆ
- **Cell cycle analysis:** การศึกษาระยะต่าง ๆ ในวัฏจักรเซลล์
- **Cell migration:** การติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา
- **Cytoskeletal analysis:** การติดตามการเปลี่ยนแปลงของโครงร่างเซลล์
- **Object analysis:** การศึกษาเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาหรือจนกว่าจะสิ้นสุดการเปลี่ยนแปลง
- **Neurite Outgrowth :** การศึกษาการเจริญรวมทั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์
- **Simultaneous Quantitation of Subcellular Inclusions:** การศึกษาเปรียบเทียบพร้อมกัน (Dual Area Object Analysis) เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณของส่วนประกอบภายในเซลล์ในเวลาเดียวกัน

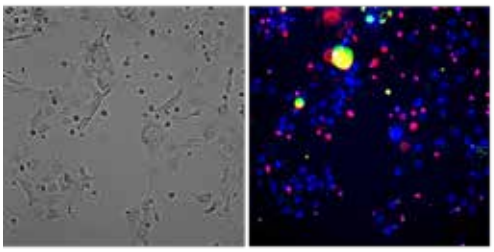


Intracellular reactive oxygen species (ROS) Assay



Bright field | Intracellular ROS (Red = ROS, Blue = nuclear)

Live and dead assay



Bright field | Live and dead cells
Red = propidium iodide
Green = annexin v
Blue = nuclear

งานตีพิมพ์ที่ใช้เครื่อง IN Cell Analyzer

Drug screening

Boyd JD, Lee-Armandt JP, Feiler MS, Zaarur N, Liu M, Kraemer B, et al. **A high – content screen identifies novel compounds that inhibit stress – induced TDP – 43 cellular aggregation and associated cytotoxicity**. Journal of biomolecular screening. 2014; 19(1): 44 – 56. **Apoptosis analysis**

Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Khuntikeo N, Pugkhem A, Hahnvajanawong C, et al. **Aberrant expression of NF – kappaB in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy**. PloS one. 2014; 9(8): e106056.

Sphere formation assay

Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, et al. **PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells**. Biochemical and biophysical research communications. 2014; 444(1): 13 – 8.

Protein expression

Narita Y, Okamoto K, Kawada MI, Takase K, Minoshima Y, Kodama K, et al. **Novel ATP – competitive MEK inhibitor E6201 is effective against vemurafenib – resistant melanoma harboring the MEK1 – C121S mutation in a preclinical model**. Molecular cancer therapeutics. 2014; 13(4): 823 – 32.

เอกสารอ้างอิง

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1326706518989/litdoc28993779_20141208003859.PDF

Wollman R, Stuurman N. High throughput microscopy: from raw images to discoveries. Journal of cell science. 2007;120(Pt 21):3715-22.

Denner P, Schmalowsky J, Prechtl S. High-content analysis in preclinical drug discovery. Combinatorial chemistry & high throughput screening. 2008;11(3):216-30.

อัตราค่าบริการ

รูปแบบการใช้งาน	อัตรา ภายใน มข.	อัตรา ภายนอก มข.
Fluorescent photography	300 บาท/ชั่วโมง	600 บาท/ชั่วโมง
Time – lapsephotography	500 บาท/วัน	1,000 บาท/วัน

นักวิจัย สามารถติดต่อขอใช้บริการเครื่อง IN Cell Analyzer หรือสอบถามเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างได้ที่ คุณศุภจิรา ศรีจางวาง สว่าง ศูนย์เครื่องมือกลางด้านชีวเวชศาสตร์ และหน่วยบริการวิชาการและวิจัย อาคารเวชวิชชาคาร คณะแพทยศาสตร์ โทร. 087-0862774

ผู้เขียนบทความ : นายต้นกล้า อินสว่าง
ตำแหน่ง : นักวิทยาศาสตร์
E-mail : tonkla_ins@hotmail.com
และ tonkin@kku.ac.th

Fluorescence Microplate Reader

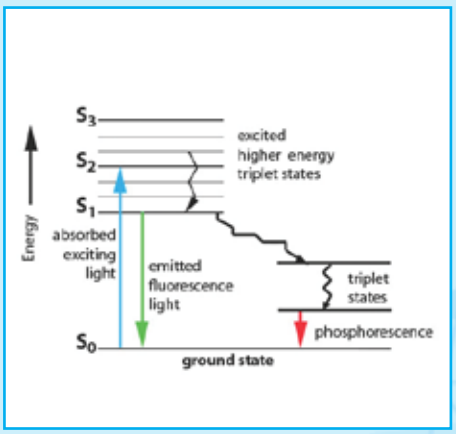
เครื่องวิเคราะห์การเรืองแสงหรือเปล่งแสงของสารละลายในไมโครเพลท

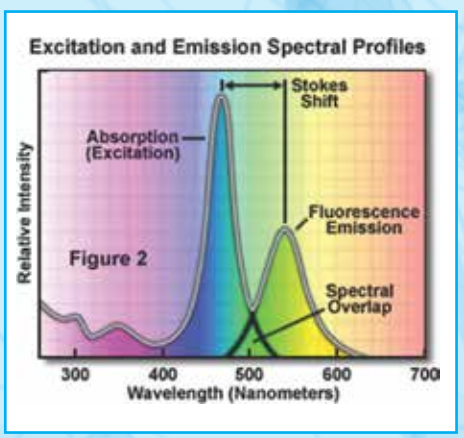
Fluorescence spectroscopy เป็นเทคนิคที่ใช้วัดปริมาณของสารเคมี และชีวโมเลกุล โดยใช้หลักการวัดปริมาณแสง fluorescence ของตัวอย่าง หรือสารเปล่งแสง (fluorophore) ที่ติดกับตัวอย่าง เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากมีความไวในการตรวจวัดสูง (high sensitivit) สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณน้อยมากได้ จึงประยุกต์เพื่อใช้งานได้ในวงกว้างทั้งในด้านการแพทย์ วงการอุตสาหกรรม สิ่งแวดล้อมและเทคโนโลยีชีวภาพ

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาความสามารถของเครื่อง Fluorescence spectrometer ให้ใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยในระดับไมโครลิตร ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถวัดตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า Fluorescence microplate reader

Molecular fluorescence and phosphorescence โมเลกุลเปล่งแสงได้อย่างไร?

เมื่อสารเปล่งแสงดูดกลืนพลังงานแสง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับชั้นอิเล็กตรอน โดยทำให้อิเล็กตรอนเดี่ยวมีพลังงานสูงขึ้น และออกจากชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปยังออร์บิทัลระดับสูง (excited state) ตามระดับพลังงานที่ได้รับ ซึ่งโมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับชั้นพลังงานสูงจะไม่มีความเสถียร จึงต้องมีการปลดปล่อยพลังงานและเข้ามาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า โดยพลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการปล่อยโฟตอน (emission of photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด ถ้ากระบวนปล่อยโฟตอนเกิดขึ้นในเวลาอันสั้น ใช้เวลา 10^{-5} วินาที หรือน้อยกว่า เรียกว่า การวาวแสง (Fluorescence) โดยส่วนมากการเกิด fluorescence ของสารเปล่งแสง จะเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นที่มากกว่าการดูดกลืนแสง ทำให้เกิด excitation และการเลื่อนไปที่ความยาวคลื่นที่มากขึ้นนี้เรียกว่า Strokes shift



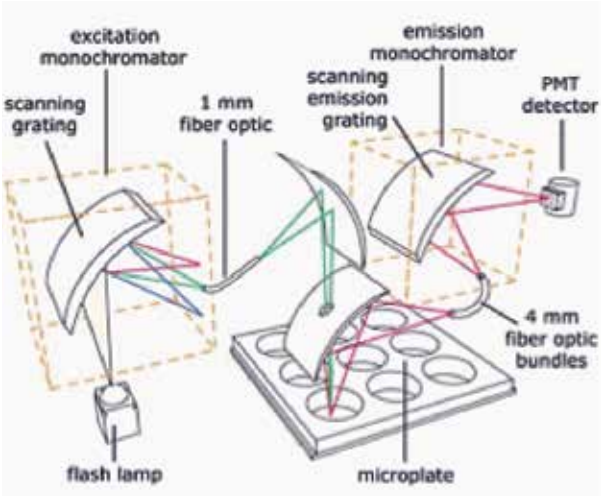


ภาพแสดงระดับพลังงานของการดูดกลืนและการแผ่รังสีของ fluorescence และ phosphorescence
(ที่มา: http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html)

สารเปล่งแสงบางชนิดมีอิเล็กตรอนพลังงานสูง (S1) ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นอิเล็กตรอนที่มีระดับพลังงานสูงใกล้เคียงกัน หรือเรียกว่า triplet states แต่เนื่องจากการเปลี่ยนสถานะจาก triplet state กลับเข้าสู่สถานะพื้นใช้เวลามากกว่า 10^{-5} วินาที ไปจนถึงหลายวินาที ทำให้มีแสงเปล่งออกมาเป็นเวลานาน เรียกกระบวนการนี้ว่า การเรืองแสง (Phosphorescence)

หลักการทำงานของเครื่อง Fluorescence microplate reader

เครื่อง Fluorescence spectrometer มีแหล่งกำเนิดแสง (Flash lamp) ที่ใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ mercury lamp xenon lamp และ laser ซึ่งเมื่อผ่านรังสีไปยังตัวอย่าง เริ่มแรกรังสีจะผ่านตัวแยกแสงตกกระทบ (excitation monochromator) ทำหน้าที่ส่งผ่านรังสีที่จะทำให้เกิด excitation ไปตกกระทบกับตัวอย่างแต่แยก emitted radiation ที่มีความยาวคลื่นเท่ากับฟลูออเรสเซนซ์ออกไป fluorescence radiation จะเปล่งออกจากตัวอย่างทุกทิศทาง จากนั้น emitted radiation จะเข้าไปยัง ตัวแยกแสงปล่อยออก (emission monochromator) ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็นตัวกรองแสง (light filter) และเกรตติง (grating) มีหน้าที่ตัดแสงรบกวนต่างๆ และให้เฉพาะความยาวคลื่นที่ต้องการวัดผ่านไปสู่ตัววัดแสง (photoelectric detector) โดยทั่วไปตัววัดแสงที่ใช้กันมากคือ photomultiplier (PMT) ซึ่งสามารถขยายสัญญาณ fluorescence ได้ดี ในการรายงานผล จะแสดงค่าความเข้มของแสงออกมาในหน่วยต่างๆ เช่น % T (transmittance) RFU (relative fluorescence units) และ RLU (relative luminescence units) หรือวัดออกมาในหน่วยความเข้มข้นได้โดยเครื่องมือที่มีระบบคำนวณผลอัตโนมัติจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์



หลักการทำงานของเครื่อง Fluorescence microplate reader
(ที่มา: Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย

ทางด้านชีวเคมี และชีววิทยาโมเลกุล

• ใช้ในการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของชีวโมเลกุล เช่น DNA RNA และ protein

• ELISAs/enzyme kinetics • Reporter gene assays

• Cell migration assays • Live/Dead viability/cytotoxicity assays

ทางด้านเภสัชวิทยา

• ใช้ในการวิเคราะห์ยา และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น วิตามิน alkaloids, porphyrins, steroids flavanoids และ metabolites

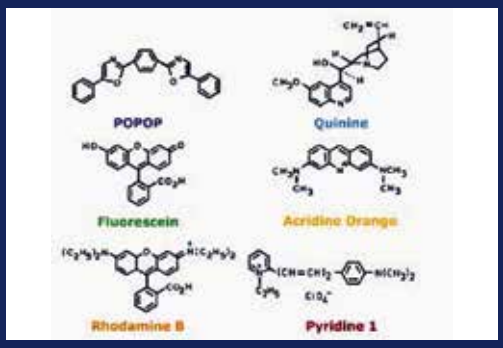
• Drug dissolution profiles

ทางด้านสิ่งแวดล้อม

ใช้ในการหาหาปริมาณสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ จากตัวอย่างที่มาจากสิ่งแวดล้อม

สารประกอบ Fluorescence

สารประกอบที่ให้ Fluorescence ส่วนใหญ่ประกอบด้วย aromatic rings ยกตัวอย่างเช่น quinine fluorescine และ rhodamine B เป็นต้น นอกจากนี้ในธรรมชาติยังพบโมเลกุลที่มีคุณสมบัติของ fluorescence อีกหลายชนิด โดยโมเลกุลที่เป็นที่รู้จักกันมาก คือ โปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescence protein, GFP) ซึ่งค้นพบครั้งแรกจากแมงกะพรุน (Aequorea Victoria) โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น มีการประยุกต์ใช้ GFP กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาการแสดงออกของยีน



การให้บริการเครื่อง Fluorescence Microplate Reader ยี่ห้อ Molecular Devices รุ่น SpectraMax M5

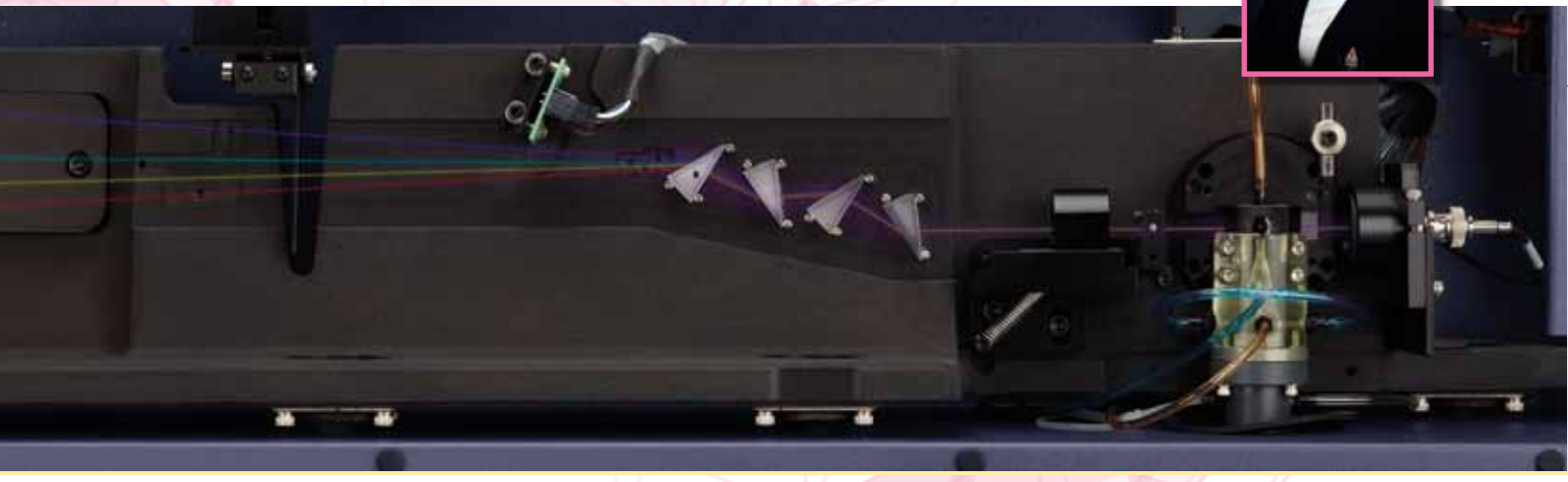
วิเคราะห์ตัวอย่างสารเรืองแสงในรูปของเหลว/สารละลายในปริมาณน้อย โดยอาศัย microplate เป็นภาชนะรองรับสารตัวอย่าง ประกอบด้วยฟังก์ชัน UV-Visible Absorbance (ABS), Fluorescence Intensity (FI), Time-Resolved Fluorescence (TRF), Fluorescence Polarization (FP) และ Glow Luminescence (Lumi)

รายการ	ค่าใช้จ่าย (บาท/ชั่วโมง)	
	อัตรา 1	อัตรา 2
ค่าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader	50	100

อัตรา 1 สำหรับบุคลากรภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น
อัตรา 2 สำหรับบุคลากรภายนอกมหาวิทยาลัยขอนแก่น

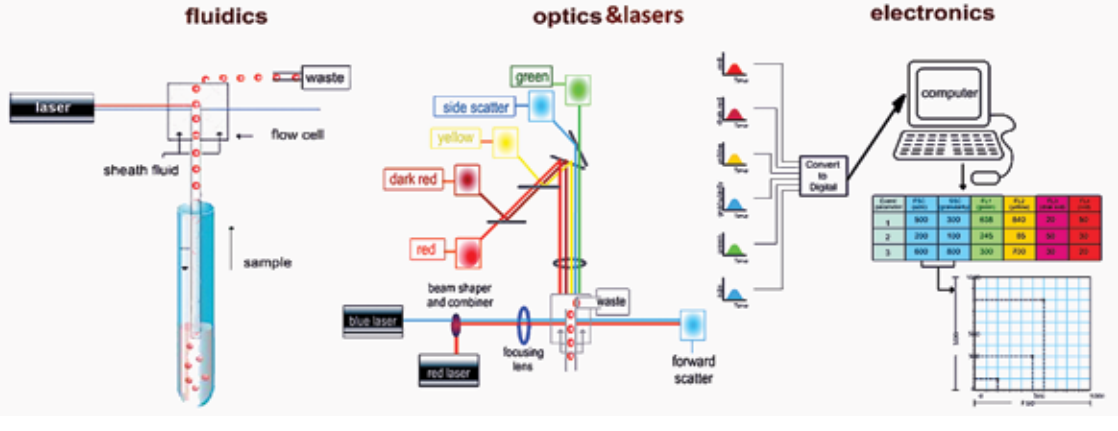
นักวิจัย สามารถติดต่อขอใช้บริการเครื่อง Fluorescence Microplate Reader หรือสอบถามเกี่ยวกับการเตรียมตัวอย่างได้ที่ คุณมงคล กลิ่นศรีสุข คณะวิทยาศาสตร์ โทร. 088-338-7511 Email: mongkl@kku.ac.th

ผู้เขียนบทความ : ดร.พัชราภรณ์ ทิพยวัฒน์[1], ดร.อมรรัตน์ จำเนียรทรง[1], นายวิสิฐ์ศักดิ์ โภคสวัสดิ์[2], และนางสาวศุภจิรา ศรีจางวาง[3]
ตำแหน่ง : [1]อาจารย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]นักเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3]นักวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
e-mail : patchatip@kku.ac.th, jumnainsong@yahoo.com, wisitsakphok@gmail.com, suphachiranaja@hotmail.com



FLOW CYTOMETER

Flow cytometer เป็นเครื่องมือเพื่อการวิเคราะห์ลักษณะเซลล์ ในระดับแต่ละเซลล์หรือแต่ละอนุภาค (particle) ด้วยหลักการ flow cytometry ซึ่งเทคนิคถูกพัฒนาขึ้นตั้งแต่ทศวรรษ 1970 และกลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจวิเคราะห์เซลล์อนุภาค จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ทั้งด้านชีววิทยา งานวิจัยเกี่ยวกับพืชและสัตว์ งานวิจัยทางการแพทย์ และคลินิก เป็นต้น ปัจจุบันมีบทความตีพิมพ์กว่า 200,000 บทความ ที่มีการอ้างถึงการใช้เครื่องมือนี้ ด้วยหลักการของเครื่องมือเป็นการวิเคราะห์เซลล์หรืออนุภาค การกระตุ้นเซลล์ด้วยแสงเลเซอร์ที่ให้พลังงานในช่วงคลื่นที่จำเพาะ (excitation) และตรวจวัดความยาวคลื่นแสงที่ถูกปลดปล่อยออกมา (emission) จากสารชี้บ่ง เช่น สารเรืองแสง (fluorescence) หรือการทำปฏิกิริยา cytochemistry โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างโมเลกุลที่สนใจกับเทคโนโลยี monoclonal และ polyclonal antibody (specific marker) ที่ติดฉลากกับสารเรืองแสงดังที่กล่าว นอกจากนี้การหักเหหรือการกระเจิงของแสงยังสามารถบอกขนาดและปริมาณขององค์ประกอบภายในของเซลล์หรืออนุภาคได้ โดยในการตรวจวัดตัวอย่างจำเป็นจะต้องเตรียมเซลล์หรืออนุภาคในลักษณะแขวนลอยในสารละลาย (suspension) ในกระบวนการตรวจวัด เซลล์หรืออนุภาคจะถูกผลักให้ไหลผ่านท่อกรวยขนาดเล็กในลักษณะการเรียงตัวเดี่ยวๆ ด้วย sheath fluid หรือ sheath stream ที่อัตราความเร็ว 5,000-30,000 เซลล์/วินาที ผ่านลำแสงเลเซอร์ในบริเวณ sensing zone ซึ่งในแต่ละเซลล์เมื่อกระทบลำแสงจะทำให้เกิดการหักเหและกระจายของแสง (scatter) โดยแสงที่มีการหักเหเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 5 องศา) เรียกว่า forward scatter (FSC) สามารถบ่งบอกขนาดของเซลล์ได้ ส่วนแสงที่หักเหมากออกด้านข้างที่ 90 องศา เรียกว่า side scatter (SSC) สามารถแสดงคุณสมบัติองค์ประกอบภายในเซลล์ (granularity) และ membrane roughness ที่เรียกรวมว่า cell complexity การหักเหของแสงและพลังงานที่ปลดปล่อยของสารติดฉลากที่มีความยาวคลื่นจำเพาะแตกต่างกันตามสารเรืองแสงที่เลือกใช้ จะผ่านเลนส์และฟิลเตอร์ไปยังตัวรับ photomultiplier tube ซึ่งจะสามารถแยกความยาวคลื่นแสงเปลี่ยนเป็นสัญญาณดิจิตอล ประมวลผล เพื่อแสดงและแปลผล ทำให้สามารถแยกลักษณะความแตกต่างของแต่ละเซลล์ที่สนใจออกจากเซลล์อื่นๆ บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ได้ นอกจากนี้ flow cytometer ในบางเครื่องยังสามารถใช้แยกเซลล์ที่สนใจ เพื่อนำมาศึกษาต่อโดยที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ การแยกเซลล์ลักษณะนี้ทำได้โดยการปรับประจุบวกลบตามการปล่อยพลังงานแสงของเซลล์ ด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า fluorescence – activated cell sorting (FACS) เป็นเครื่องที่มีชื่อเรียกว่า fluorescence – activated cell sorter (FACS)



การเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจวัด

จากหลักการตรวจวัดที่สามารถทำได้หลายสีพร้อมกัน จึงมีโอกาสที่สีเหล่านี้ให้ความยาวคลื่นที่ซ้อนทับกัน (spillover) อาจเกิดการแปลผลผิดพลาด ดังนั้นเพื่อความแม่นยำและถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์ ควรปฏิบัติตามขั้นตอน ดังนี้

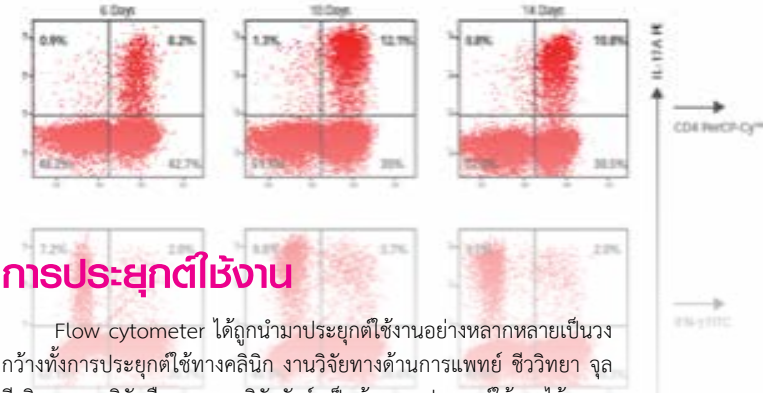
1. การเตรียมเซลล์เพื่อการตรวจวัด เซลล์หรืออนุภาคเดี่ยวจำต้องแขวนลอยอยู่ในสารละลาย เช่น สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. ในการตรวจวิเคราะห์เริ่มต้น ควรประกอบด้วย เซลล์หรืออนุภาคที่ไม่ถูกย้อมด้วย cytochemistry หรือ monoclonal antibody ที่ติดฉลากกับสารเรืองแสง (unstaining) เพื่อนำมาวิเคราะห์จุดตัดของกลุ่มเซลล์ ถือเป็น negative control สำหรับการปรับค่าของเครื่อง หรืออาจทำโดยการใช้หลักการย้อม fluorescence minus one (FMO) ที่จะช่วยแปลผลว่าเซลล์เป้าหมายย้อมติดหรือไม่ และในกรณีย้อมติดสีจะสามารถแปลผลว่าสีที่ติดนั้นจำเพาะต่อ specific marker หรือไม่ หากต้องการย้อมหลากหลายสีที่มีความยาวคลื่นใกล้เคียงกันให้เตรียมเป็นการไม่ย้อมสีหรือ marker ที่สนใจกับ marker อื่นๆ เช่น หากต้องการย้อมเซลล์ด้วยสี 6 สี และตัดสินใจว่าเซลล์ใดให้สี fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) เป็นบวก ทำได้โดยการย้อม FMO คือย้อมสีอื่นๆ ยกเว้นสี FITC เป็นการช่วยให้เลือกกลุ่มเป้าหมายได้ถูกต้องมากขึ้น และลดความผิดพลาดจากการ gating สีอื่นๆ ที่มีความยาวคลื่นคร่อมกันมาต่อช่วงความยาวคลื่นของ FITC ได้ และควรทำ FMO ทีละสีจนครบ ช่วงความยาวคลื่นคร่อมกัน หรือที่เรียกว่า spillover จะถูกแก้ไขด้วยกระบวนการที่เรียกว่า compensation นอกจากนี้ด้วยบางโปรแกรมของเครื่องบางรุ่นสามารถใช้การปรับ compensation แบบอัตโนมัติด้วยการเตรียมเซลล์ที่ย้อมสีแบบสีเดี่ยว single staining ของแต่ละสีกับเซลล์และวิเคราะห์ร่วมกับเซลล์ที่เป็น unstaining

3. ในบางการศึกษา ควรใช้ isotype control ในการเลือก gating ได้ โดย isotype control เป็น monoclonal หรือ polyclonal antibody ที่ไม่จำเพาะกับ marker แต่เป็นแอนติบอดีใน isotype เดียวกันกับแอนติบอดีที่เราใช้ย้อมและติดฉลากด้วยสี fluorochrome ชนิดเดียวกัน ซึ่ง isotype control จะช่วยบอก background ของสีชนิดนั้น ซึ่งเซลล์ที่อยู่ในช่วงเดียวกันกับ isotype control คือเซลล์ที่ให้ผลลบ ส่วนเซลล์ช่วงอื่นจะเป็นเซลล์ที่ให้ผลบวก

4. การเลือกสีให้เหมาะกับปริมาณ marker ที่สนใจควรมีหลักการในการพิจารณาเบื้องต้น คือเลือกชนิดสี fluorochrome ที่มีความเข้มสูงในการจับกับ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ marker ที่พบน้อย และเลือกชนิดสี fluorochrome ที่มีความเข้มน้อยในการจับกับ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ marker ที่พบมากกว่าโดยการพิจารณา fluorochrome staining index

5. ในการตรวจวัด marker ที่มีปริมาณน้อยหรือเป็นกลุ่มเซลล์ที่พบยาก ควรเตรียมตัวอย่างเซลล์มาในปริมาณมาก เพื่อให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์กลุ่มประชากร ซึ่งการตรวจวัดจำนวนประชากรของตัวอย่างในปริมาณมากอาจมากถึง 100,000 - 1,000,000 ประชากร (event number) ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแปรปรวน (coefficient of variation; CV) มีค่าต่ำ และการตรวจวัดถูกต้องแม่นยำขึ้น



การประยุกต์ใช้งาน

Flow cytometer ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้งานอย่างหลากหลายเป็นวงกว้างทั้งการประยุกต์ใช้ทางคลินิก งานวิจัยทางด้านการแพทย์ ชีววิทยา จุลชีววิทยา การวิจัยพืช และการวิจัยสัตว์ เป็นต้น การประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายนั้น เนื่องจากหลักการของเทคนิคเป็นการใช้เทคโนโลยีของการผลิต specific antibody ที่ติดฉลากกับสี fluorochrome หรือการเกิดปฏิกิริยาของ cytochemistry ตัวอย่างการประยุกต์ใช้งาน ได้แก่

- การหาประชากรกลุ่มย่อยของเม็ดเลือดทั้งเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงด้วยการย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ (surface marker) ด้วย monoclonal antibody ที่ติดฉลากกับสี fluorochrome
- การศึกษาวงจรชีวิตของเซลล์โดยการศึกษาวงจร DNA (cell cycle)
- การวัดการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation)
- การศึกษาการมีชีวิตและการตายของเซลล์ (cell dead)
- การศึกษาองค์ประกอบภายในเซลล์ (intracellular target staining) เช่น ไซโตไคน์
- การศึกษาการทำงานของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ (physiologic response and kinetic assays) เช่น การศึกษาการเกิด oxidative burst และ phagocytosis ของกลุ่มเซลล์ฟาโกไซต์
- การวัดไซโตไคน์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ด้วย multiplex bead assay
- การศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยการย้อมสีผนังเซลล์หรือการย้อมดู DNA
- การวิจัยทาง molecular biology เช่น การตรวจหา single nucleotide polymorphism (SNP) เพื่อหาความหลากหลายของ allele หมู่เลือดต่างๆ ของเม็ดเลือดแดง ด้วย microarray bead ที่ติดฉลากกับสี fluorochrome

อัตราค่าบริการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ยี่ห้อ BD รุ่น BD FACSCantoTM II

รายการ	ค่าใช้จ่าย (บาท/ชั่วโมง)		
	อัตรา 1	อัตรา 2	อัตรา 3
ค่าตรวจวิเคราะห์	400	400	500

อัตรา 1 สำหรับบุคลากรภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น
อัตรา 2 สำหรับบุคลากรภายนอกมหาวิทยาลัยขอนแก่น
อัตรา 3 สำหรับภาคเอกชน

นักวิจัยสามารถติดต่อขอรับคำปรึกษาหรือสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมได้ที่ นายวิสิฐศักดิ์ โภคสวัสดิ์, ดร.พัชราภรณ์ ทิพยวัฒน์ และดร. อมรรัตน์ จำเนียรทรง คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โทร 083-418-8410, 085-011-3758 และ 089-710-8930, นางสาวศุภจิรา ศรีจางวาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โทร 087-086-2774

ข่าวกิจกรรม

RIC KKU
เข้าร่วมงานประชุมวิชาการวิจัยนานาชาติ 50 ปี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มหาวิทยาลัยขอนแก่น จัดงานประชุมวิชาการวิจัยนานาชาติ International Conference on "Research for Social Devotion" in Commemoration of the 50th Anniversary of Khon Kaen University เนื่องในโอกาสครบรอบ 50 ปี การก่อตั้งมหาวิทยาลัย เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางด้านการวิจัยและนวัตกรรมของนักวิจัยทุกระดับ โดยการประมวลจัดกลุ่มผลงานวิจัยตามสาขาหลัก ได้แก่ วิทยาศาสตร์สุขภาพ วิทยาศาสตร์กายภาพ มนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ ศิลปกรรมศาสตร์ และตามประเด็นการวิจัย ทั้งการวิจัยพื้นฐาน การวิจัยประยุกต์ การวิจัยชุมชน นวัตกรรม การถ่ายทอดเทคโนโลยี สิทธิบัตรและลิขสิทธิ์ พร้อมกับการสร้างเครือข่ายความร่วมมือทางด้านวิชาการและการวิจัย ในภาคีของภาครัฐ ในชุมชนและเอกชน เปิดโอกาสให้นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยทั้งในและต่างประเทศ รวมทั้งศิษย์เก่าได้มานำเสนอผลงานวิจัยที่ทำขึ้น และมีการแลกเปลี่ยนความรู้ซึ่งกันและกัน เพื่อประโยชน์ทั้งในระดับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระดับประเทศ และนานาชาติ ในระหว่างวันที่ 22-23 มกราคม 2558 ณ อาคารพจน์ สารสิน อาคาร 25 ปี และอาคารวิทยาลัยปกครองท้องถิ่น พิธีเปิดงานจัดขึ้นเมื่อวันที่ 22 มกราคม 2558 เวลา 8.30 น. ณ อาคารพจน์ สารสิน โดยได้รับเกียรติจาก ดร.พิเชฐ ดุรงคเวโรจน์ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เป็นประธานกล่าวเปิดงานและบรรยายพิเศษ พร้อมด้วย นายกำธร ถาวรสถิตย์ ผู้ว่าราชการจังหวัดขอนแก่น รศ.ดร.กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย อธิการบดี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นผู้กล่าวรายงาน โดยมี ผู้ทรงคุณวุฒิ คณะผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัยทั้งคนไทยและต่างประเทศ บุคลากร นักศึกษา และผู้ที่สนใจเข้าร่วมงานเป็นจำนวนมาก

นอกจากนี้ ในภายงานยังมีการออกบูธนิทรรศการของศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รวบรวมเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูง ประกอบด้วยเครื่องมือวิจัยที่อยู่ภายใต้การดูแลของคณะวิชา 8 หน่วยงาน เป็นผู้รับผิดชอบให้บริการ ทั้งนี้เพื่อส่งเสริมงานวิจัยของคณาจารย์ และนักศึกษา เอื้อให้เกิดงานวิจัยที่มีคุณภาพ สามารถผลิตผลงานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ ตลอดจนนำความรู้สู่การพัฒนาประเทศ

ที่มา: ข่าว มข. (www.kku.ac.th)