



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์ทาง
ห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย
สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

นายสรารุช เหลืองสะอาด
นักวิชาการมหาวิทยาลัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

คำนำ

คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์คือเพื่อให้นักศึกษาทันตแพทย์ระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ที่เกี่ยวข้องได้ทราบหลักการเบื้องต้นในการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยและใช้เป็นข้อมูลในการเลือกวิธีการและเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมได้ถูกต้องทั้งนี้ตัวอย่างทางพันธุกรรมที่เหมาะสมรวมถึงประวัติข้อมูลของผู้ป่วยจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์และแปลผลการวิจัยได้อย่างถูกต้อง

ในคู่มือฉบับนี้ประกอบด้วยหลักการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมตามหลักวิชาการขั้นตอนการตัวอย่างทางพันธุกรรม หน่วยวิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมฉบับนี้นอกจากจะเป็นประโยชน์สำหรับนักศึกษาทันตแพทย์ระดับบัณฑิตศึกษาให้ได้ตัวอย่างสำหรับงานวิจัยที่ถูกต้อง และเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องมือจัดการความรู้ (Knowledge Management (KM)) สำหรับคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานครบุรี

สรารุช เหลืองสะอาด
นักวิชาการมหาวิทยาลัย
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานครบุรี
13 มกราคม 2563



สารบัญ

	หน้า
คำนำ	2
วัตถุประสงค์	4
แนวปฏิบัติในการทำวิจัยสำหรับนักศึกษาส่วนที่เกี่ยวข้องกับหน่วยวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร	5
การตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อ (Surgical Pathology)	6
แนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมเพื่อการทำวิจัย	6
ตัวอย่างการเตรียมสารละลายพื้นฐานที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างสำหรับงานวิเคราะห์ทาง ห้องปฏิบัติการ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร	9
- สารละลายบัฟเฟอร์	9
- น้ำยาคงสภาพ (fixative)	11



วัตถุประสงค์

1. เป็นคู่มือสำหรับนักศึกษาทันตแพทย์ระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ที่เกี่ยวข้องได้ทราบหลักการเบื้องต้นในการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรม ใช้ในการเตรียมตัวอย่างให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ
2. เพื่อให้งานบริการหน่วยวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานครบุรีมีประสิทธิภาพและเป็นระบบที่ดีตามมาตรฐานคุณภาพห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อควบคุมและลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการเก็บตัวอย่างประเภทต่างๆและการส่งรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ
4. เพื่อให้การให้บริการขอคำปรึกษาทางงานวิจัยสะดวกและเป็นประโยชน์แก่นักศึกษาในการนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์และปรึกษากับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



แนวปฏิบัติในการทำวิจัยสำหรับนักศึกษา

ส่วนที่เกี่ยวข้องกับหน่วยวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร

1. นักศึกษาเข้าพบอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เพื่อขอคำปรึกษาถึงแนวทางการวิจัย หัวข้อที่จะใช้ในการทำวิจัย กลุ่มตัวอย่าง ระยะเวลาที่ใช้ และงบประมาณ
2. แนะนำให้นักศึกษาขอคำปรึกษากับเจ้าหน้าที่หน่วยวิจัยเพื่อคำนวณงบประมาณเบื้องต้นในการทำวิจัย เพื่อให้การทำวิจัยใช้งบประมาณได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม
3. นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาแต่ละหลักสูตรจะได้รับการจัดสรรงบประมาณใช้ในการวิจัยจากคณะตามที่ได้กำหนดไว้ในแต่ละหลักสูตร
4. นักศึกษาจะสามารถเบิกงบวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับทางหน่วยวิจัยหลังจากที่นักศึกษาได้ทำการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์แล้วเท่านั้นหากต้องการซื้ออุปกรณ์หรือสารเคมีผ่านหน่วยวิจัยเพื่อทำการทดลองกับกลุ่มย่อยเพื่อหาข้อบกพร่อง และเป็นการประเมินงานวิจัยเบื้องต้น (Pilot study) ต้องได้รับอนุญาตจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์แล้วเท่านั้น
5. หากมีการเปลี่ยนหัวข้อวิทยานิพนธ์งบประมาณที่ได้รับจะมาจากงบประมาณที่เหลือจากงานวิจัยเดิมเท่านั้น
6. หากวัสดุหรือสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยเงินงบประมาณที่คณะจัดสรรนักศึกษาหรือผู้ทำวิจัยต้องจ่ายเงินส่วนที่เกินด้วยตัวเอง, ขอทุนวิจัยจากหน่วยงานภายนอก หรือทำวิจัยโดยใช้อุปกรณ์ร่วมกับนักศึกษาคนอื่นโดยจะต้องได้รับอนุญาตจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
7. การขอใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ภายนอกคณะและภายนอกมหาวิทยาลัย นักศึกษาสามารถขอคำแนะนำจากหน่วยวิจัยได้ สำหรับการขออนุญาตให้นักศึกษาขอคำปรึกษากับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในการทำหนังสือขอใช้เครื่องมือและให้คณบดีมีคำสั่งเป็นลายลักษณ์อักษร



การตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อ (Surgical Pathology)

ในทางพยาธิวิทยาหมายถึงการตรวจชิ้นเนื้อขนาดเล็กจนถึงอวัยวะที่นำออกมาจากร่างกายที่ส่งมาขอการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาในการกรณีการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรม ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่ม Surgical Pathology โดยตัวอย่างมักจะถูเก็บโดยวิธีทางศัลยกรรมช่องปากส่งตรวจอยู่ในสภาพสด(อยู่ในสารละลายที่แนะนำ) ซึ่งทางหน่วยวิจัยจะใช้กรรมวิธีทางห้องปฏิบัติการทำให้ชิ้นเนื้อคงสภาพ ด้วยน้ำยามาตรฐาน formalin หรือตามโครงสร้างงานวิจัยที่นักศึกษาได้เขียนขึ้น



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรม(ฟัน) ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่ม Surgical Pathology ตัวอย่างมักจะถูเก็บโดยวิธีทางศัลยกรรมช่องปาก

แนวปฏิบัติการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมเพื่อการทำวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมจากคนไข้ นักศึกษาต้องได้รับความยินยอมจากคนไข้โดยนักศึกษจะต้องอธิบายวัตถุประสงค์ของการเก็บตัวอย่าง กระบวนการนำตัวอย่างที่ได้จากคนไข้ไปใช้ในการทำวิจัย และอธิบายวิธีการเก็บตัวอย่างจากคนไข้โดยละเอียด และหากคนไข้ไม่ยินยอมให้ใช้ตัวอย่างทางพันธุกรรมที่เก็บได้ไปใช้ในการวิจัย นักศึกษาหรือผู้ทำวิจัยไม่มีสิทธิ์ที่จะนำตัวอย่างข้างต้นไปใช้ในการทำวิจัยถึงจะมีการเอาตัวอย่างทางพันธุกรรมออกจากตัวคนไข้เป็นที่เรียบร้อย
2. แนวปฏิบัติให้นักศึกษายึดถือตามแนวทางที่เขียนไว้ในโครงสร้างวิทยานิพนธ์ ในระหว่างการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมหากมีการเปลี่ยนแปลงทางเทคนิคบางประการ เจ้าหน้าที่จะให้คำแนะนำกับนักศึกษาและนำไปปรึกษาอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

3. การเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมหรือสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะใช้อาหารนำส่งตัวอย่าง (transport media) แต่ในงานวิจัยที่สถานที่เก็บตัวอย่างอยู่ไม่ไกลจากห้องปฏิบัติการ แนะนำให้นักศึกษาเก็บตัวอย่างในสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 หรือตามโครงร่างงานวิจัยที่นักศึกษาได้เขียนขึ้น



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรม(ฟัน) ในสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4

4. น้ำยาคงสภาพมาตรฐานที่ใช้โดยทั่วไปในหน่วยวิจัยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร ที่ใช้จะเป็น 10% formalin ที่ผสมเสร็จแล้วพร้อมใช้ บรรจุในขวดแก้วขนาด 250 มล. เก็บรักษาไม่ให้โดนแสง โดยหน่วยวิจัยจะเตรียมรูปของ 10% neutral buffer
5. ชิ้นเนื้อส่งในสภาพสดและชิ้นเนื้อขนาดใหญ่(เส้นผ่านศูนย์กลางหรือด้านยาวสุดของชิ้นเนื้อมากกว่า 5 เซนติเมตร)ควรต้องส่งมาถึงห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาโดยเร็วและไม่เกิน 1 ชั่วโมง
6. ชิ้นเนื้อทุกประเภทที่อยู่ใน formalin ควรต้องส่งมาถึงหน่วยวิจัยภายในเวลาทำการของวันนั้นกรณีนำส่งไม่ทันให้เก็บไว้ในอุณหภูมิต้องและนำส่งวันทำการรุ่งขึ้น
7. หากมีชิ้นเนื้อหลายชิ้นในรายเดียวกันให้เรียงชิ้นเนื้อตามลำดับความสำคัญ



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

8. เหนี่ยายาคงสภาพออกหลังจากแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างทางพันธุกรรมไปวิจัยตามวิธีการที่เหมาะสมหรือตามขั้นตอนที่ได้เขียนไว้ในโครงร่างวิทยานิพนธ์



รูปที่ 3 การเก็บตัวอย่างหลังจากแช่ในน้ำยาคงสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 °C โดยระบุรายละเอียด วันที่เก็บ และรายละเอียดที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

หมายเหตุ การระบุ HN. หรือชื่อคนไข้ให้ผู้วิจัยพิจารณาตามความเหมาะสมและไม่ขัดกับจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์



ตัวอย่างการเตรียมสารละลายพื้นฐานที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างสำหรับงาน วิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร

สารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพ ธนบุรีได้แก่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4) เนื่องจากเป็นสารละลายที่มีความเป็นไอโซโทนิก (isotonic) ใช้บ่อยในงานทางชีววิทยาเช่นการล้างเซลล์, การขนส่งชิ้นเนื้อ และการเจือจางสารละลาย เนื่องจาก PBS มีคุณสมบัติความเป็นกรด-ด่าง, ค่าออสโมลาริตี (osmolarity) และความเข้มข้นของไอออนที่ใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์ อีกทั้งยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงได้มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง

สำหรับห้องปฏิบัติการคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรีมีการเตรียมสารละลาย PBS เป็น 2 รูปแบบคือ

1. เตรียมสารละลายจากเม็ดสำเร็จรูป (PBS tablet) โดยผสมน้ำกลั่นสัดส่วน 1 เม็ดต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร สารละลายที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีนี้จะมีปริมาณสารที่คงที่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ที่ต้องใช้ความละเอียดสูงอย่างไรก็ตามการเตรียมสารจากวิธีนี้ไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้เก็บตัวอย่างทั่วไปเนื่องจากมีราคาต่อหน่วยค่อนข้างสูง
2. การเตรียมสารละลาย PBS จากสารเคมีพื้นฐานโดยมีวิธีเตรียมดังนี้
PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) 1 L
 - เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ลงในกระบอกตวง
 - เติมน้ำ NaCl 8 กรัมลงในสารละลาย
 - เติมน้ำ KCl 200 มก. ลงในสารละลาย
 - เติมน้ำ Na_2HPO_4 1.44 กรัมลงในสารละลาย
 - เติมน้ำ KH_2PO_4 240 มก. ลงในสารละลาย
3. เตรียมสารบนเครื่องปั่นเหวี่ยงผสมสารแบบแม่เหล็ก (Stirrer Hotplate + magnetic stirrer) ปรับค่า pH ของสารละลายให้ได้ค่า = 7.4
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล (1 ลิตร)

ข้อควรระวัง ในการปรับ pH ห้ามเปิดเครื่องผสมสารเด็ดขาดเนื่องจากแท่งแม่เหล็กผสม (magnetic stirrer) มีโอกาสกระทบกับหัววัด (probe sensor) pH meter เสียหายได้



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์
ทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

ตารางเปรียบเทียบการเตรียมสารละลาย PBS ทั้ง 2 แบบเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน

สารละลาย PBS สำเร็จรูป (PBS tablet)	สารละลาย PBS จากสารเคมีพื้นฐาน
<ul style="list-style-type: none"> - จัดเตรียมได้ง่ายไม่ยุ่งยาก - ไม่ต้องใช้เครื่องมือสำหรับชั่งตวงวัด และไม่ต้องปรับ pH นักศึกษาสามารถเตรียมได้ไม่ยาก - ปรับสารละลายค่อนข้างคงที่ที่เหมาะสมกับงานวิเคราะห์ที่ต้องการความละเอียดสูง - ราคาต่อหน่วยสูงมากเมื่อเทียบกับการเตรียมจากสารเคมีพื้นฐาน  <p>*ภาพประกอบจากอินเทอร์เน็ต</p>	<ul style="list-style-type: none"> - มีขั้นตอนการเตรียมเพิ่มขึ้นมาแต่สารที่ใช้เตรียมเป็นสารเคมีพื้นฐานที่หาได้ง่าย - จำเป็นต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์พื้นฐานในการเตรียมสาร - ปริมาณความเข้มข้นสารละลายไม่คงที่แปรผันไปตามปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความละเอียดเครื่องมือที่ใช้ คุณภาพของสารเคมีพื้นฐาน และความผิดพลาดจากผู้เตรียม เป็นต้น - ราคาต่อหน่วยไม่แพงเมื่อเทียบกับแบบสำเร็จรูปการเตรียมจากสารเคมีพื้นฐานจะถูกกว่าหลายเท่าตัว 



คู่มือการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมสำหรับงานวิเคราะห์ ทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานวิจัย

น้ำยาคงสภาพ (fixative)

Fixation เป็นการรักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างไรก็ตามการ fix นานเกินไปรบกวนผลการย้อมได้ ปัจจุบันยังไม่มี fixative ชนิดใดที่เหมาะสมและสมบูรณ์สำหรับการย้อมและแอนติเจนทุกชนิด

น้ำยาคงสภาพมีใช้ในห้องปฏิบัติการคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร ได้แก่ 10% Formalin หรือ 10% neutral buffer formalin เป็น fixative ซึ่งใช้กันแพร่หลาย ระยะเวลาในการ fix เนื้อเยื่อโดยสมบูรณ์จะประมาณ 18-24 ชั่วโมง โดยรูปแบบที่เตรียมในห้องปฏิบัติการคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพมหานคร จะเตรียมในรูปแบบของสารละลายบัฟเฟอร์ (10% neutral buffer formalin) เนื่องจาก การเตรียมจากฟอร์มาดีไฮด์เข้มข้น 37-40 % ซึ่งปกติจะมีสภาพเป็นกรด เมื่อผ่านไปสักระยะจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเปลี่ยนเป็น Formic acid ไม่สามารถรักษาเซลล์ในชิ้นเนื้อได้ การเตรียมในรูปแบบ buffer ทำให้ความเป็นกรดลดลงเหมาะสมในการแช่ชิ้นเนื้อ และระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น

วิธีเตรียมน้ำยาคงสภาพ 10% neutral buffer formalin ปริมาตร 1 ลิตรมีวิธีเตรียมดังนี้

- เทน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ลงในกระบอกตวง
- เติม Formaldehyde เข้มข้น 100 มล. ลงในกระบอกตวง
- เติม Na_2PO_4 4 กรัมลงในสารละลาย
- เติม Na_2HPO_4 6.5 กรัมลงในสารละลาย

ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล (1ลิตร)



ข้อควรระวัง การเตรียมสารละลายในรูปแบบ buffer จะทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นแต่ทางห้องปฏิบัติการจะไม่ใช้สารละลาย 10% neutral buffer formalin ที่เตรียมไว้นานเกิน 1 เดือนดังนั้นนักศึกษาควรแจ้งแผนการเก็บตัวอย่างทางพันธุกรรมไว้ล่วงหน้าเพื่อที่ทางห้องปฏิบัติการจะได้วางแผนการจัดเตรียมสารเคมีได้อย่างเหมาะสม