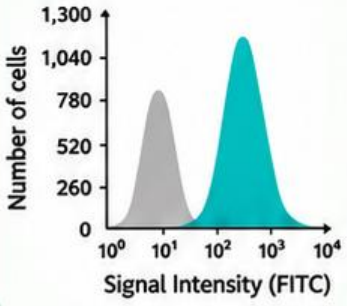
คู่มือปฏิบัติงาน

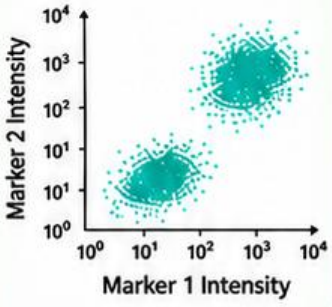
การใช้เทคนิค Flow Cytometry เพื่อศึกษาการจับกันของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) และแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงในงานวิจัยด้านเภสัชวิทยาระดับโมเลกุล



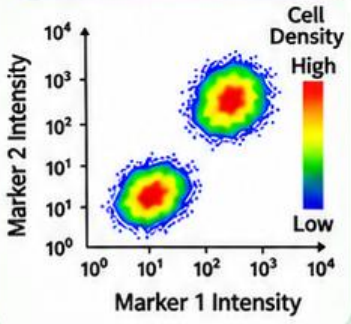
Histogram



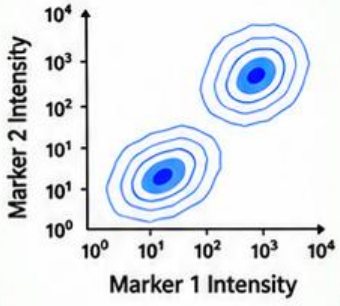
Dot plot



Pseudocolor



Contour



ภาควิชาเภสัชวิทยา | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

ศรุดา ปิยธาดาพัฒน์

คำนำ

Flow Cytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของเซลล์หรืออนุภาค (particles) ในระดับเซลล์เดี่ยว โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณจากเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์อย่างต่อเนื่องทีละเซลล์ สามารถวิเคราะห์เซลล์ได้หลายพันเซลล์ต่อวินาที โดยตรวจวัดสัญญาณการกระเจิงของแสง (light scattering) และสัญญาณเรืองแสง (fluorescence) จากสารเรืองแสงบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ ปัจจุบันเทคโนโลยี Multiparameter และ Spectral Flow Cytometry สามารถตรวจวิเคราะห์สารเรืองแสงหลายชนิดพร้อมกันได้มากกว่า 30 สีในเครื่องมือบางรุ่น สำหรับ CytoFLEX Flow Cytometer ที่ติดตั้งเลเซอร์ 3 ตัว สามารถรองรับการตรวจวิเคราะห์ได้สูงสุด 13 สี ด้วยความสามารถในการวิเคราะห์เซลล์จำนวนมากได้อย่างรวดเร็วและให้ข้อมูลเชิงปริมาณที่มีความละเอียดสูง เทคนิคนี้จึงได้รับการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยด้านชีววิทยาระดับเซลล์ เภสัชวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา และมะเร็งวิทยา โดยเฉพาะการศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์และการจับจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาชีวเภสัชภัณฑ์และการรักษาโรคมะเร็งด้วยภูมิคุ้มกันบำบัด (cancer immunotherapy)

คู่มือการใช้เทคนิค Flow Cytometry เพื่อศึกษาการจับกันของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) และแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงในงานวิจัยด้านเภสัชวิทยาระดับโมเลกุลเล่มนี้ จัดทำขึ้นเพื่ออธิบายหลักการและขั้นตอนการใช้งานเครื่อง Flow Cytometer โดยมุ่งเน้นการตรวจวิเคราะห์การจับระหว่างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (human single-chain variable fragment; HuScFv) กับแอนติเจนเป้าหมายบนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ชนิด anti-E-tag เพื่อตรวจจับ HuScFv ที่มี E-tag และใช้แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ชนิด goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) เพื่อตรวจวัดสัญญาณการจับด้วยเทคนิค Flow Cytometry นอกจากนี้คู่มือยังครอบคลุมขั้นตอนการเตรียมเซลล์ การย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดี การใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer การดูแลและบำรุงรักษาเครื่องมือเบื้องต้น ตลอดจนการวิเคราะห์และแปลผลข้อมูลด้วยโปรแกรม FlowJo อย่างเป็นระบบ

คู่มือฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติงานมาตรฐานในห้องปฏิบัติการหน่วยเภสัชวิทยาระดับโมเลกุล สาขาเภสัชวิทยาชีวการแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ความรู้และเป็นแนวทางในการใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer สำหรับนักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรเภสัชวิทยามหาบัณฑิตและเภสัชวิทยาดุษฎีบัณฑิต ตลอดจนผู้ที่สนใจศึกษาเทคนิค Flow Cytometry เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง เป็นระบบ และมีประสิทธิภาพ

ผู้จัดทำหวังว่าคู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานทุกท่าน และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำยินดีน้อมรับคำแนะนำเพื่อนำไปปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้น

ศรุดา ปิยธาดาพัฒน์

มิถุนายน 2568

สารบัญ

1. บทนำ 1

1.1 ความเป็นมา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตของคู่มือการปฏิบัติงาน 2

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ 3

2. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ 5

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง 5

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ 6

2.2.1 งานวิจัย 6

2.2.2 งานสนับสนุนการเรียน-การสอน 6

2.2.3 งานพัฒนาคุณภาพ 7

2.2.4 งานพัฒนาตนเองและอื่น ๆ 7

2.2.5 งานทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม 7

2.3 โครงสร้างการบริหารจัดการ 8

3. หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข 9

3.1 กฎระเบียบและข้อบังคับ 9

3.2 มาตรฐานและแนวทางการปฏิบัติงาน 10

3.2.1 หลักเกณฑ์การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเซลล์ 10

3.2.2 เตรียมเซลล์ 10

3.2.3 หลักเกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพ HuScFv ก่อนใช้งาน 10

3.2.4 หลักเกณฑ์การทดสอบการจับและการย้อมแอนติบอดี 11

3.2.5 มาตรฐานการใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer 12

3.2.6 หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ผล การบันทึกข้อมูล และการตรวจสอบย้อนกลับ 16

4. เทคนิคในการปฏิบัติงาน 17

4.1 กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน/ขั้นตอนการปฏิบัติงาน 17

4.1.1 การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยง 18

4.1.2 การเพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์ 19

4.1.3 การคำนวณจำนวนเซลล์และผังการเตรียมตัวอย่าง 20

4.1.4 การผลิตและตรวจสอบ HuScFv 22

4.1.5 ขั้นตอนการ Blocking และ Binding 26

4.1.6 ขั้นตอนการ Staining และคำนวณ Master Mix 27

4.1.7 การเริ่มต้นใช้งานเครื่อง CytoFLEX และตรวจสอบ Daily QC 29

4.1.8 การเก็บข้อมูลตัวอย่าง (Acquisition) 33

4.1.9 การทำความสะอาดและบันทึกการใช้เครื่อง 35

4.1.10 การวิเคราะห์ด้วย FlowJo และการรายงานผล 36

สารบัญ(ต่อ)

5. ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน **43**

5.1 กรณีไม่พบแถบโปรตีนหรือแถบโปรตีนมีความเข้มต่ำ 43

5.2 การไม่พบสัญญาณเรืองแสงในการตรวจด้วย Flow Cytometry 43

5.3 การปนเปื้อนในสารสกัดโปรตีน Soluble HuScFv 44

5.4 จำนวนเซลล์ HubCCA1 หรือ MMNK1 ไม่เพียงพอสำหรับการทดลอง 44

6. ข้อเสนอแนะ **45**

บรรณานุกรม **47**

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 หลักการทำงานของเครื่อง Flow Cytometry 1
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบโปรตีน scFv บนแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose 11
ภาพที่ 3 เครื่อง CytoFLEX ของบริษัท Beckman Coulter 12
ภาพที่ 4 ภาชนะบรรจุ sheath fluid และ waste (ซ้าย) และแผ่นกรองแสงของเครื่อง CytoFLEX (ขวา) 13
ภาพที่ 5 ตารางฟิลเตอร์และช่องตรวจวัดสัญญาณของเครื่อง CytoFLEX 13
ภาพที่ 6 รายงานผลการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง (QC) 14
ภาพที่ 7 ลำดับการปฏิบัติงาน 17
ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐาน (Standard Curve) และสมการเส้นตรงสำหรับคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน 25
ภาพที่ 9 เครื่อง Mini Rotator รุ่น Bio RS-24 สำหรับหมุนตัวอย่าง 26
ภาพที่ 10 ผังการจัดวางตัวอย่างบนไมโครเพลต 96 หลุม (Plate map) 27
ภาพที่ 11 สวิตช์ด้านหลังเครื่อง Flow Cytometer 29
ภาพที่ 12 หน้าต่างโปรแกรม CytExpert เมื่อเริ่มใช้งาน 30
ภาพที่ 13 การเลือกโหมดใช้งานสำหรับหลอดทดลองหรือไมโครเพลต 30
ภาพที่ 14 ขั้นตอนการเปลี่ยน probe จาก tube เป็น plate (8) 31
ภาพที่ 15 ขั้นตอนการเริ่มต้นระบบ (Startup) ของเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer 32
ภาพที่ 16 ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง CytoFLEX (Quality Control; QC) 33
ภาพที่ 17 ขั้นตอนการสร้างไฟล์สำหรับเริ่มการทดลอง 34
ภาพที่ 18 การตั้งค่าช่องตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง (Fluorescence Channel) 34
ภาพที่ 19 การเลือกโปรแกรมสำหรับทำความสะอาด 35
ภาพที่ 20 การนำเข้าไฟล์ .fcs เพื่อวิเคราะห์ในโปรแกรม FlowJo 36
ภาพที่ 21 การเพิ่มคอลัมน์ (Column) ในโปรแกรม FlowJo 36
ภาพที่ 22 การกำหนดชื่อคอลัมน์เพื่อจัดเรียงลำดับตัวอย่าง 37
ภาพที่ 23 การแสดง Dot Plot และการคัดเลือกเซลล์เดี่ยว (Single Cells) 37
ภาพที่ 24 การกำหนด Gate เพื่อเลือกกลุ่มเซลล์ที่ต้องการ 38
ภาพที่ 25 การกำหนด Gate เพื่อแยกเซลล์ที่ให้สัญญาณแอนติบอดี 38
ภาพที่ 26 ค่าสถิติ (Statistics) ที่ปรากฏใน Worksheet หลังการ Gating 38
ภาพที่ 27 หน้าต่าง Layout Editor ของโปรแกรม FlowJo 39
ภาพที่ 28 การเลือกหัวข้อย่อยใน Worksheet ก่อนนำไปวางใน Layout 39
ภาพที่ 29 กราฟที่ปรากฏใน Layout 40
ภาพที่ 30 การส่งออกภาพจาก Layout 40
ภาพที่ 31 การเลือก Expand All เพื่อแสดงข้อมูลทั้งหมด 41
ภาพที่ 32 การบันทึกข้อมูล Statistics เป็นไฟล์ Excel 41
ภาพที่ 33 ตัวอย่างไฟล์ Excel ที่ส่งออกจากโปรแกรม FlowJo 42

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยง.....18
ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของกลุ่มควบคุม.....21
ตารางที่ 3 เงื่อนไขการเติมสารและแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม.....21
ตารางที่ 4 สรุปการคำนวณ Master Mix ของแอนติบอดี.....27

1. บทนำ

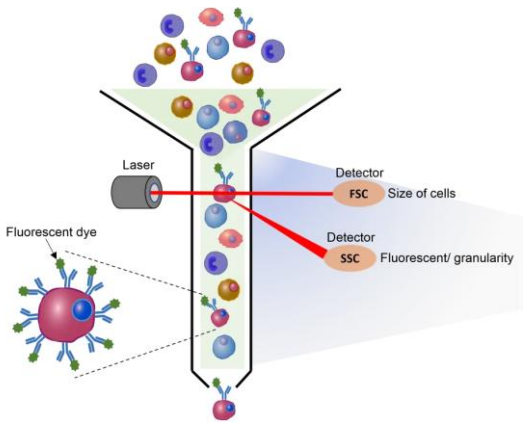
1.1 ความเป็นมา

Flow Cytometry เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจากหลักการตรวจนับและวิเคราะห์เซลล์ โดยมีรากฐานสำคัญจาก Coulter Principle ซึ่งพัฒนาโดย Wallace Coulter ในช่วงทศวรรษ 1950 โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของความต้านทานไฟฟ้าในการตรวจวัดเซลล์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1965 Mack Fulwyler ได้พัฒนาเครื่องคัดแยกเซลล์โดยอาศัยการวัดปริมาตรเซลล์และระบบเบี่ยงเบนหยดของเหลวด้วยไฟฟ้า ก่อนที่ Leonard Herzenberg และคณะจากมหาวิทยาลัยสแตนฟอร์ดจะพัฒนาเทคนิค Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) ซึ่งสามารถคัดแยกเซลล์โดยอาศัยสัญญาณเรืองแสงได้ในเวลาต่อมา ความก้าวหน้าดังกล่าวนำไปสู่การพัฒนาเครื่อง Flow Cytometer ที่สามารถตรวจวัดคุณลักษณะของเซลล์หลายพารามิเตอร์พร้อมกัน และได้รับการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางชีวการแพทย์[1, 2].

หลักการทำงานของ Flow Cytometry อาศัยระบบไหลของของเหลวแบบ Hydrodynamic focusing เพื่อจัดเรียงเซลล์ให้ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ทีละเซลล์(ภาพที่1) โดยตรวจวัดสัญญาณการกระเจิงของแสง (light scattering) ได้แก่ Forward Scatter (FSC) ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์ และ Side Scatter (SSC) ซึ่งสัมพันธ์กับความซับซ้อนหรือองค์ประกอบภายในเซลล์ รวมถึงตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง (fluorescence) จากสารเรืองแสงที่ใช้ติดฉลากโมเลกุลเป้าหมาย ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม เช่น CytExpert และ FlowJo เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเซลล์ในระดับเซลล์เดี่ยว เทคนิคนี้จึงมีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยา การจำแนกประชากรเซลล์ การตรวจวัดโปรตีนบนผิวเซลล์ และการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้านมะเร็งและการพัฒนาชีวเภสัชภัณฑ์[3, 4].

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma; CCA) เป็นมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินน้ำดี ทั้งภายในตับ (intrahepatic) และภายนอกตับ (extrahepatic) ซึ่งเป็นโรคที่มีความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตสูง เนื่องจากผู้ป่วยในระยะแรกมักไม่แสดงอาการหรือมีอาการไม่จำเพาะ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากได้รับการวินิจฉัยเมื่อโรคอยู่ในระยะลุกลามแล้ว[5, 6]

การศึกษาการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งมีความสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาแอนติบอดีเพื่อประยุกต์ใช้ทางชีวการแพทย์ ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค Flow Cytometry เพื่อตรวจวิเคราะห์การจับของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (human single-chain variable fragment; HuScFv) กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี HubCCA1 โดยใช้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี MMNK1 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ คู่มือฉบับนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อกำหนดแนวทางการเตรียมตัวอย่าง การทดสอบการจับของแอนติบอดี การใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer และการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างเป็นระบบ เพื่อเพิ่มความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง



ภาพที่1 หลักการทำงานของเครื่อง flow cytometry [7]

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานมีแนวทางที่ชัดเจนในการศึกษาความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับโปรตีนบนผิวเซลล์ โดยใช้ CytoFLEX Flow Cytometer ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

1.2.2 เพื่อกำหนดมาตรฐานการปฏิบัติงานที่เป็นระบบ ทำให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถ ปฏิบัติงานทดแทนกันได้โดยไม่ส่งผลต่อความถูกต้องของผลการทดลอง

1.2.3 เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถตั้งค่าและใช้งานเครื่อง Flow Cytometer ได้อย่างเหมาะสม ลดข้อผิดพลาดในการตั้งค่าพารามิเตอร์และการวิเคราะห์ข้อมูล

1.2.4 เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถวิเคราะห์และแปลผลข้อมูลจาก Flow Cytometry ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ โดยใช้ซอฟต์แวร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น FlowJo หรือ CytExpert

1.3 ขอบเขตของคู่มือการปฏิบัติงาน

คู่มือปฏิบัติงานเรื่องการประยุกต์ใช้เทคนิค Flow Cytometry เพื่อศึกษาการจับของแอนติบอดีจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) ในงานวิจัยด้านเภสัชวิทยาระดับโมเลกุลฉบับนี้ จัดทำขึ้นสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการหน่วยเภสัชวิทยาระดับโมเลกุล สาขาเภสัชวิทยาชีวการแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โดยมุ่งเน้นการตรวจวิเคราะห์ความสามารถในการจับของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) กับแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี HubCCA1 โดยใช้เซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี MMNK1 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

เนื้อหาครอบคลุมหลักเกณฑ์และขั้นตอนการปฏิบัติงาน ตั้งแต่การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยง การเพาะเลี้ยงและเตรียมเซลล์ การผลิตและตรวจสอบคุณภาพ HuScFv การทดสอบการจับและการย้อมแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect fluorescence staining การใช้งานและการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ตลอดจนการเก็บข้อมูล การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม FlowJo และการดูแลบำรุงรักษาเครื่องมือเบื้องต้น เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถดำเนินการทดลองได้อย่างถูกต้อง เป็นระบบ และได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ

2xYT	=	อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณ Yeast extract และ Tryptone มากเป็นสองเท่าของสูตรปกติ
Accutase	=	สารละลายเอนไซม์สำหรับแยกเซลล์ที่ยึดเกาะกับภาชนะเพาะเลี้ยงให้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยช่วยรักษาความสมบูรณ์ของโปรตีนบนผิวเซลล์
Anti E-Tag	=	แอนติบอดีชนิด Rabbit polyclonal ที่จำเพาะต่อ E-Tag
Binding	=	การจับกันระหว่างโมเลกุลตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปผ่านแรงยึดเหนี่ยวหรือพันธะที่มีความจำเพาะ
Bleach solution	=	สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium hypochlorite) ที่ใช้สำหรับฆ่าเชื้อบนพื้นผิวและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
Blocking buffer	=	สารละลายที่ใช้ลดการจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding) ของแอนติบอดีกับเซลล์หรือโปรตีน เพื่อช่วยลดสัญญาณรบกวนในการตรวจวัด
Bradford Assay	=	วิธีการวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ปฏิกิริยากับสาร Coomassie Brilliant Blue เป็นวิธีที่รวดเร็วและใช้กันอย่างแพร่หลาย
BSA	=	โปรตีนอัลบูมินจากเลือดวัว มักใช้เป็น Standard ในการวัดปริมาณโปรตีน
Cholangiocarcinoma	=	มะเร็งท่อน้ำดี
Cholangiocyte	=	เซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี
Compensation	=	กระบวนการปรับค่าชดเชยของสัญญาณเรืองแสงที่ซ้อนทับกันระหว่าง fluorescence channels
Contrad® 70 Reagent	=	น้ำยาทำความสะอาดชนิดเข้มข้น ใช้สำหรับทำความสะอาดเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ควรเจือจางตามคำแนะนำของผู้ผลิตก่อนใช้งาน
CytExpert	=	ซอฟต์แวร์ที่ใช้ควบคุมเครื่อง Flow Cytometer และวิเคราะห์ข้อมูล
CytoFLEX Daily QC Fluorospheres	=	เม็ดไมโครบีดเรืองแสงที่ใช้ตรวจสอบคุณภาพการทำงานของเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ก่อนการใช้งาน
CytoFLEX Sheath Fluid	=	ของเหลวที่ใช้ในเครื่อง Beckman Coulter CytoFLEX Flow Cytometer ไม่มีประจุ ไม่เรืองแสง และไม่มีสาร azide
Daily Clean	=	กระบวนการทำความสะอาดระบบดูดตัวอย่าง (sample probe) และระบบไหลของเครื่องหลังการใช้งานหรือก่อนเริ่มใช้งาน
Deep Clean	=	กระบวนการทำความสะอาดระบบไหล (fluidics) และ flow cell อย่างละเอียด เพื่อลดการอุดตันและการปนเปื้อน
Default configuration	=	การตั้งค่ามาตรฐานของเครื่อง
DMEM	=	สารอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์
Dot plot	=	กราฟแสดงข้อมูลในรูปแบบจุด โดยแต่ละจุดแทนเซลล์หรืออนุภาค (particle) หนึ่งเหตุการณ์ (event)

Event	=	เซลล์หรือ particle ที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้
FACS Buffer	=	PBS ที่เติม BSA หรือ FBS เพื่อช่วยลดการจับแบบไม่จำเพาะและรักษาสภาพของเซลล์
Flow Clean	=	น้ำยาสำหรับทำความสะอาดระบบไหลของเครื่อง Flow Cytometer หลังการใช้งาน
Flow Cytometer	=	เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของเซลล์ในระดับเดี่ยว โดยอาศัยการไหลผ่านลำแสงเลเซอร์
FlowJo	=	โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลจาก Flow Cytometry
FSC	=	สัญญาณการกระเจิงแสงด้านหน้า (Forward Scatter; FSC) ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของเซลล์
Gain	=	ค่าที่ใช้ปรับการขยายสัญญาณของ detector เพื่อให้เหมาะสมกับการตรวจวัด
Goat anti rabbit-PE	=	Secondary antibody จากแพะ ที่จับกับแอนติบอดีของกระต่าย และติด Phycoerythrin เพื่อใช้ตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง
HB2151	=	เชื้อ Escherichia coli สายพันธุ์ HB2151 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ non-suppressor นิยมใช้ในการแสดงออก (expression) และการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์
HubCCA1	=	เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma cell line) สายพันธุ์ HubCCA1 ที่ใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาชีววิทยาของมะเร็งท่อน้ำดี
HuScFv	=	แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (Human single-chain variable fragment; HuScFv) ซึ่งประกอบด้วยบริเวณแปรผันของสายหนัก (VH) และสายเบา (VL) เชื่อมต่อกันด้วย peptide linker
Layout Editor	=	เครื่องมือสำหรับจัดรูปแบบและจัดวางกราฟ ตาราง และข้อมูลสำหรับการนำเสนอผลการวิเคราะห์
MMNK1	=	เซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดีที่ถูกดัดแปลงให้สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด
Negative events	=	เซลล์หรืออนุภาคที่ไม่แสดงสัญญาณของ marker ที่ต้องการตรวจวัด
Optical filter	=	ส่วนที่ช่วยกรองและแยกความยาวคลื่นแสงเฉพาะ เพื่อให้ตรวจจับสัญญาณเรืองแสงได้แม่นยำ
Plate loader PEEK tubing	=	ท่อที่ใช้ดูดตัวอย่างจาก plate เข้าเครื่อง
Positive events	=	เซลล์หรืออนุภาคที่แสดงสัญญาณของ marker ที่ต้องการตรวจวัด
PPE	=	อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เช่น ถุงมือ เสื้อกาวน์ และหน้ากาก สำหรับป้องกันอันตรายในห้องปฏิบัติการ
Prime	=	กระบวนการไล่อากาศและเติมของเหลวเข้าสู่ระบบไหลของเครื่องก่อนการใช้งาน
Probe	=	หัวดูดตัวอย่างเข้าสู่ระบบ Flow Cytometer ซึ่งมีทั้งแบบรองรับหลอด (tube) และเพลต (plate)
Protein expression	=	กระบวนการที่เซลล์สร้างและผลิตโปรตีน
QC (Quality Control)	=	การตรวจสอบคุณภาพและประสิทธิภาพของเครื่องมือ เพื่อยืนยันความพร้อมก่อนการใช้งาน
Semi-Automatic mode	=	โหมดใช้งานเครื่องโดยใช้ tube สำหรับดูดตัวอย่าง

Soluble antibody	=	แอนติบอดีที่ละลายในสารละลาย ไม่ตกตะกอนหลังจากการปั่นเหวี่ยง
Sonicate	=	กระบวนการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เซลล์แตก เพื่อสกัดโปรตีนหรือสารภายในเซลล์
SSC	=	สัญญาณการกระเจิงแสงด้านข้าง (Side Scatter; SSC) ซึ่งสัมพันธ์กับความซับซ้อนหรือความเป็นเม็ดภายในเซลล์
Start-up	=	ขั้นตอนการ warm-up เครื่อง Flow Cytometer เมื่อเริ่มเปิดใช้งาน
Subculture cells	=	กระบวนการถ่ายเซลล์จากภาชนะเดิมไปยังภาชนะใหม่ เพื่อคงการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยอาจใช้เอนไซมหรือสารละลายช่วยให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิว
Supernatant	=	ส่วนของสารละลายที่อยู่ด้านบน หลังจากการปั่นเหวี่ยง
Template plate format	=	รูปแบบการจัดวางตำแหน่งตัวอย่างบนไมโครเพลต (plate layout template) ที่กำหนดตำแหน่งหลุม ชื่อตัวอย่าง และข้อมูลการทดลอง
Threshold	=	ค่าขั้นต่ำของสัญญาณที่เครื่องสามารถตรวจจับเซลล์หรือ particle ได้
Unstained	=	เซลล์หรือ particle ที่ไม่ได้ผ่านการย้อมสี ใช้เป็น control ในการเปรียบเทียบ
Western Blot	=	เทคนิคตรวจสอบและวิเคราะห์โปรตีน โดยแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วถ่ายโอนไปยังเยื่อเมมเบรน เพื่อตรวจจับด้วยแอนติบอดีจำเพาะ

2. บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

นักวิทยาศาสตร์หน่วยเภสัชวิทยาระดับโมเลกุล สาขาเภสัชวิทยาชีวการแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา มีบทบาทหน้าที่ในการทำงานวิจัยในหัวข้อที่อาจารย์แพทย์สนใจ โดยทำหน้าที่สืบค้น และวิเคราะห์บทความทางวิทยาศาสตร์เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนางานวิจัย วางแผนการทดลอง ออกแบบและดำเนินการทดลองโดยคำนึงถึงความถูกต้อง ความแม่นยำและความน่าเชื่อถือของผลลัพธ์ ปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองตามความเหมาะสมและตามหลักวิทยาศาสตร์ สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองอย่างถูกต้องและมีหลักการ วิเคราะห์ปัญหาพร้อมเสนอแนวทางแก้ไขได้อย่างเป็นระบบ อีกทั้งต้องจัดทำรายงานผลการทดลอง เขียนบทความวิชาการหรือสิ่งพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์เพื่อนำเสนอผลงาน นักวิทยาศาสตร์ต้องวางแผนและดูแลความเรียบร้อยของห้องปฏิบัติการ ดูแลการบำรุงรักษาเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ให้อยู่ในสภาพดีเสมอ รวมถึงการจัดการสารเคมี การทำสารบบสารเคมี และจัดทำคู่มือการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างถูกต้องและปลอดภัย ตลอดจนสามารถให้คำแนะนำแก่ผู้ร่วมงาน นักศึกษา หรือบุคคลที่เกี่ยวข้องในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

2.2.1 งานวิจัย

2.2.1.1 วางแผนงานวิจัยในหัวข้อที่ได้รับมอบหมาย

นักวิทยาศาสตร์ต้องกำหนดวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ระบุขอบเขตของการศึกษา และกำหนดแนวทางในการดำเนินงานให้สอดคล้องกับเป้าหมายที่ตั้งไว้

2.2.1.2 สืบค้นข้อมูล สอบถามกับผู้เชี่ยวชาญ และศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทำการรวบรวมข้อมูลจากแหล่งข้อมูลที่น่าเชื่อถือ เช่น ฐานข้อมูลวิชาการ วารสารวิทยาศาสตร์ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง รวมถึงสอบถามผู้เชี่ยวชาญในสาขานั้น ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและเป็นประโยชน์

2.2.1.3 ประชุมวางแผนปรึกษากับผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ดำเนินการประชุมกับทีมงาน อาจารย์ที่ปรึกษา เพื่อปรับปรุงแผนการดำเนินงาน ตรวจสอบความเป็นไปได้ของแนวทางวิจัย และวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อกำหนดวิธีการศึกษา

2.2.1.4 วางแผนการจัดซื้อวัสดุอุปกรณ์ และน้ำยาสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สำรวจความต้องการของอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง พร้อมวางแผนการจัดซื้อให้เหมาะสมกับงบประมาณและระยะเวลาการดำเนินงาน

2.2.1.5 ปรับวิธีการวิเคราะห์ทดสอบเพื่อหา Condition ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

เช่น ความเข้มข้น อุณหภูมิ ระยะเวลาที่เหมาะสม ทำการสรุปวิธีวิเคราะห์ออกมาเป็นมาตรฐานวิธีการปฏิบัติงาน

2.2.1.6 ทำการวิเคราะห์ และประมวลผล

วิเคราะห์ผลการทดลอง เปรียบเทียบกับสมมติฐาน และสรุปผลที่ได้เพื่อนำไปจัดทำรายงานนำเสนอให้ผู้บังคับบัญชาได้รับทราบความก้าวหน้าของงานเป็นประจำ พร้อมเสนอแนวทางปรับปรุงและพัฒนาในการทดลองครั้งถัดไป ตลอดจนจัดทำบทความทางวิชาการ

2.2.2 งานสนับสนุนการเรียน-การสอน

การมีส่วนร่วมในการดูแลและให้คำแนะนำนักศึกษาในระหว่างการเรียนการสอน ในหลักสูตร แพทย์แผนไทยประยุกต์ และมีบทบาทสำคัญในการให้คำแนะนำและดูแลนักศึกษาในระหว่างการทดลองระดับบัณฑิตศึกษาสาขาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งต้องใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ในการศึกษาและปฏิบัติการทดลอง

2.2.3 งานพัฒนาคุณภาพ

มีหน้าที่ตรวจสอบและบำรุงรักษาเครื่องมือวิทยาศาสตร์เป็นประจำ เพื่อให้มั่นใจว่าอุปกรณ์อยู่ในสภาพพร้อมสำหรับการใช้งาน รวมถึงทำความสะอาดและบำรุงรักษาเบื้องต้นตามคู่มือการใช้งานเพื่อลดการเสื่อมสภาพ หากพบความผิดปกติ เช่น ความคลาดเคลื่อนของค่าการวัด หรือความเสียหายทางกายภาพ ต้องดำเนินการแก้ไขหรือประสานงานกับผู้เชี่ยวชาญ นอกจากนี้ ยังต้องจัดทำคู่มือการใช้งานที่ครอบคลุมทุกขั้นตอนในรูปแบบเอกสาร พร้อมแนวทางป้องกันข้อผิดพลาดและวิธีแก้ไขกรณีฉุกเฉิน

2.2.4 งานพัฒนาตนเองและอื่นๆ

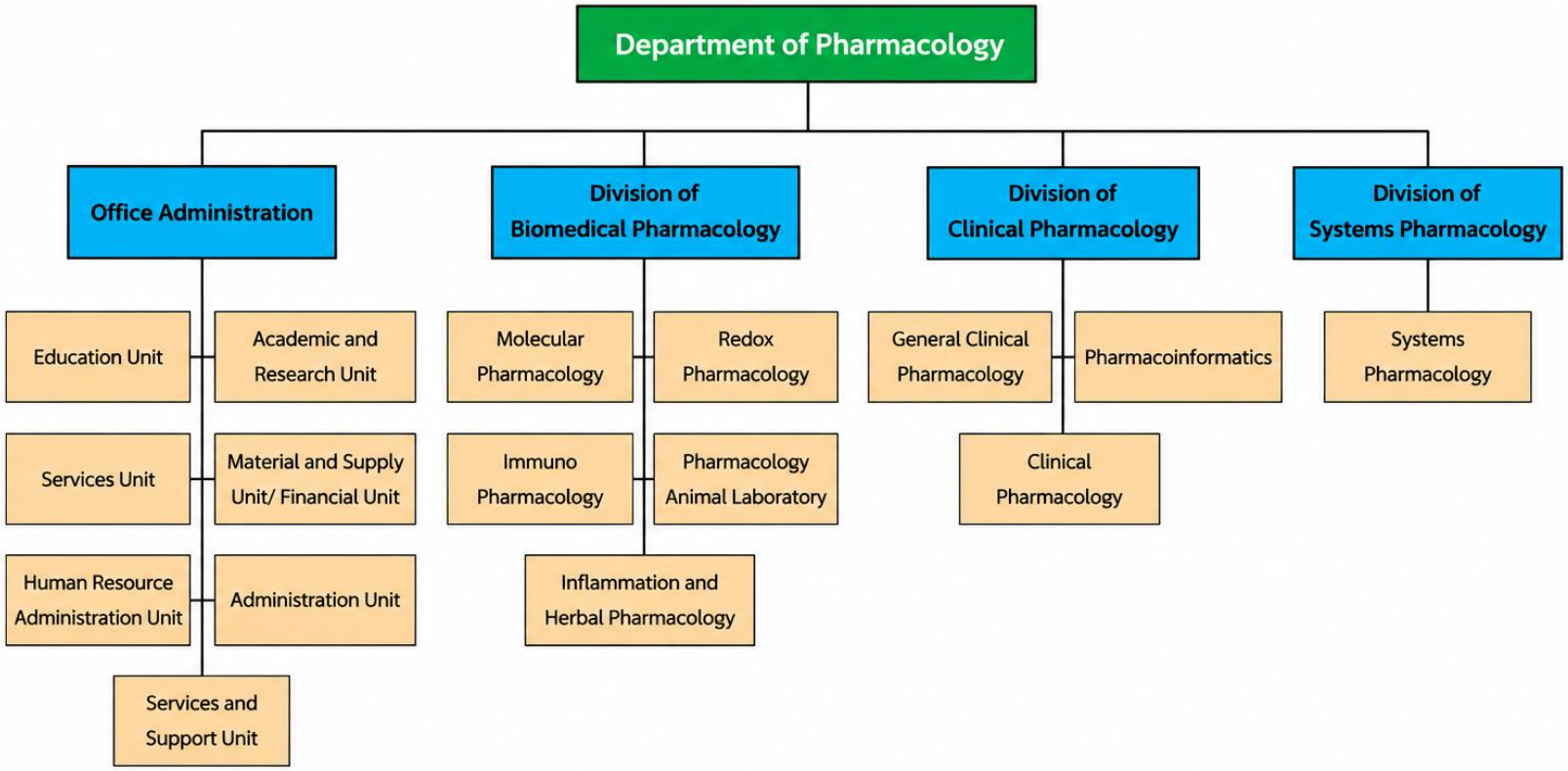
มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางวิชาการของภาควิชา เช่น สัมมนา การนำเสนอผลงาน และแลกเปลี่ยนองค์ความรู้กับอาจารย์ นักวิจัย และบุคลากร เพื่อส่งเสริมความร่วมมือทางวิชาการ เข้าร่วมประชุมภาควิชาเพื่อติดตามความคืบหน้าการดำเนินงาน รวมถึงการอบรม สัมมนา และหลักสูตรพิเศษที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย การทดลอง และการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อเพิ่มพูนทักษะ นอกจากนี้ยังเข้าร่วม work shop เกี่ยวกับความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ และการจัดการสารเคมี พร้อมทั้งพัฒนาทักษะด้าน Soft Skills เช่น การสื่อสาร การทำงานเป็นทีม และการบริหารจัดการโครงการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน

2.2.5 งานทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

เข้าร่วมกิจกรรมทางศาสนาและวัฒนธรรมเพื่อส่งเสริมสิริมงคลและความสัมพันธ์ที่ดีในองค์กร เช่น งานขึ้นปีใหม่ พิธีรดน้ำดำหัวผู้ใหญ่ และกิจกรรมวันสงกรานต์ นอกจากนี้ ยังเข้าร่วมทำบุญตักบาตรในวันสำคัญทางศาสนา ฟังเทศน์มหาชาติ เพื่อสืบทอดศีลธรรมและจิตสำนึกทางศาสนา รวมถึงสนับสนุนประเพณีไทยและท้องถิ่น เช่น ลอยกระทง หรือกิจกรรมเฉพาะของมหาวิทยาลัย เพื่ออนุรักษ์วัฒนธรรมไทย

โครงสร้างภาควิชาเภสัชวิทยา

แผนภูมิ ก.



โครงสร้างภาควิชาเภสัชวิทยา ก.ย. 2563 *บุคลากรดังกล่าวปฏิบัติงานมากกว่าหนึ่งหน่วยงาน/สาขา **บุคลากรดังกล่าวดำรงตำแหน่งบริหารภายในคณะ ***บุคลากรดังกล่าวดำรงตำแหน่งบริหารภายในมหาวิทยาลัยมหิดล

3. หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

การปฏิบัติงานตามคู่มือนี้ต้องคำนึงถึงหลักเกณฑ์และเงื่อนไขที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่าง การควบคุมคุณภาพของแอนติบอดี การเลือกใช้ชุดควบคุมที่เหมาะสม การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ตลอดจนการวิเคราะห์และบันทึกข้อมูลอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ผลการทดลองมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ โดยรายละเอียดขั้นตอนและเทคนิคการปฏิบัติงานแสดงไว้ในบทที่ 4

3.1 กฎระเบียบและข้อบังคับ

3.1.1 ผู้ใช้งานจะต้องได้รับการอบรมเกี่ยวกับการใช้เครื่อง CytoFlex Flow Cytometry และผ่านการทดสอบความเข้าใจเบื้องต้นก่อนใช้งานจริง

3.1.2 สวมอุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (PPE) ให้เหมาะสมกับความเสี่ยงของงาน ได้แก่ เสื้อกาวน์ ถุงมือ และอุปกรณ์ป้องกันดวงตาเมื่อจำเป็น

3.1.3 ห้ามใช้งานเครื่องในกรณีที่ไม่ได้รับอนุญาต หรือไม่มีเจ้าหน้าที่ควบคุม

3.1.4 การเตรียมตัวอย่างเซลล์ต้องดำเนินการในพื้นที่ที่กำหนด และต้องปฏิบัติตามหลักความปลอดภัยทางชีวภาพ

3.1.5 ก่อนใช้งานต้องมีการจองเครื่องมือโดยจองผ่าน Google calendar ของห้องปฏิบัติการและหลังใช้งานต้องทำความสะอาดเครื่องและบันทึกข้อมูลการใช้งานลงในสมุดบันทึก

3.1.6 หากเครื่องทำงานผิดปกติ ให้หยุดการใช้งานและแจ้งผู้รับผิดชอบ ไม่ดำเนินการซ่อมแซมหรือปรับแก้ระบบภายในโดยพลการ

3.1.7 ปฏิบัติตามข้อกำหนดด้านการกำจัดของเสียและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ตามระเบียบปฏิบัติของห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด

3.2 มาตรฐานและแนวทางการปฏิบัติงาน

การศึกษาการจับระหว่างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (human single-chain variable fragment; HuScFv) กับแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Flow Cytometry ประกอบด้วยการเตรียมสารละลาย การเตรียมเซลล์ การผลิตและตรวจสอบโปรตีน HuScFv การทดสอบการจับและย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดี การตรวจวัดด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม FlowJo การดำเนินงานต้องควบคุมคุณภาพตัวอย่างและเงื่อนไขของการทดสอบเพื่อให้ผลมีความน่าเชื่อถือและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองได้

3.2.1 หลักเกณฑ์การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเซลล์

การเลือกใช้สารละลายมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ความคงตัวของโปรตีน และระดับสัญญาณพื้นหลังในการตรวจวัด สารละลายและอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่กำหนดสำหรับการทดลอง ได้แก่ complete DMEM, FACS buffer, blocking buffer และ 2×YT ก่อนนำไปใช้ต้องตรวจสอบชื่อสาร ส่วนประกอบ ความเข้มข้น วันเตรียม วันหมดอายุ และสภาพการเก็บรักษาก่อนใช้ และการเตรียมต้องคำนึงถึงความปลอดเชื้อโดยรายละเอียดสูตรเตรียมแสดงในข้อ 4.1.1

3.2.2 เตรียมเซลล์

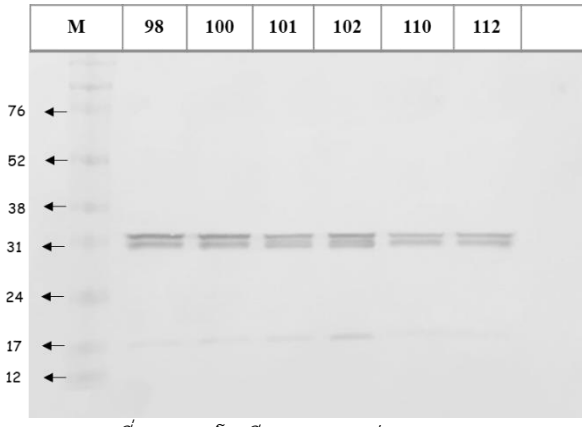
ใช้เซลล์ HubCCA1 เป็นกลุ่มศึกษามะเร็งท่อน้ำดี และ MMNK1 เป็นกลุ่มเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีที่ใช้เปรียบเทียบ โดยตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเซลล์ สภาพและลักษณะการเจริญเติบโต การปนเปื้อน และความมีชีวิตของเซลล์ก่อนดำเนินการทดสอบ การแยกเซลล์ควรให้ได้เซลล์เดี่ยว (single-cell suspension) และลดการจับกลุ่มของเซลล์ (cell aggregates) เพื่อป้องกันการรบกวนผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry รวมทั้งเลือกวิธีการแยกเซลล์ที่ลดผลกระทบต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์ เพื่อควบคุมความแปรปรวนระหว่างตัวอย่าง ให้กำหนดจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันที่ 2×10^{5} เซลล์ต่อหลุม ตามแผนการทดลอง

3.2.3 หลักเกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพ HuScFv ก่อนใช้งาน

ตัวอย่างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) ผลิตจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ HB2151 โดยใช้โปรตีนส่วนที่ละลายได้ (soluble protein fraction) ภายหลังการสกัดโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรีย โดยต้องระบุ วันที่ผลิต และสภาวะเก็บรักษา การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน HuScFv ดำเนินการด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ E-tag เพื่อตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย โดยต้องมีขนาดประมาณ 26–34 kDa (ภาพที่ 2) การปรากฏแถบที่ขนาดคาดหมายช่วยสนับสนุนการมีอยู่ของโปรตีน จากนั้นใช้โปรแกรม Alpha DigiDoc วิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน (Band intensity) และเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker) ที่ทราบปริมาณ เพื่อประมาณปริมาณโปรตีน HuScFv เบื้องต้น ทั้งนี้ การประเมินดังกล่าวใช้เป็นแนวทางในการกำหนดปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการจับกับเซลล์ (Binding assay) โดยไม่ได้มุ่งหมายให้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบสัมบูรณ์

ในการทดสอบการจับของ HuScFv กับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี HubCCA1 และเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี MMNK1 จะใช้ HuScFv clone เดียวกันในปริมาณที่กำหนดเท่ากันสำหรับเซลล์ทั้งสองชนิด เพื่อควบคุมตัวแปรด้านปริมาณแอนติบอดีและให้สามารถเปรียบเทียบผลการจับระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดได้ภายใต้เงื่อนไขการทดลองเดียวกัน

สำหรับสารสกัดโปรตีนจากแบคทีเรีย *E. coli* HB2151 (HB2151 lysate) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ให้ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน และกำหนดปริมาณโปรตีนรวมของ HB2151 lysate ให้เทียบเท่ากับปริมาณโปรตีนรวมของตัวอย่างที่มี HuScFv เพื่อประเมินสัญญาณพื้นหลัง (background signal) ที่เกิดจากองค์ประกอบอื่นในสารสกัดแบคทีเรีย ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการจับจำเพาะระหว่าง HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์



ตัวอย่างผลจาก Western Blot

Lane 1 marker

Lane 2-7 *E. Coli* lysate ที่มีโปรตีน HuScFv

ภาพที่ 2 ผลของโปรตีน scFv บนแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose, scFv มีขนาดประมาณ 26-34 kDa เมื่อเทียบกับ Marker

3.2.4 หลักเกณฑ์การทดสอบการจับและการย้อมแอนติบอดี

การย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีเพื่อตรวจวัดสัญญาณเรืองแสงสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก ได้แก่ Direct fluorescence staining ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจับกับแอนติเจนโดยตรง และ Indirect fluorescence staining ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ไม่ติดสารเรืองแสงจับกับแอนติเจนก่อน จากนั้นจึงตรวจจับด้วยแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสงในขั้นตอนถัดไป

ในการศึกษาความสามารถในการจับของ HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์ เลือกใช้วิธี Indirect fluorescence staining โดยให้ HuScFv จับกับแอนติเจนเป้าหมายบนผิวเซลล์ก่อน จากนั้นใช้ rabbit anti-E-tag antibody ตรวจจับ E-tag ที่อยู่บน HuScFv และใช้ goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) ตรวจจับ rabbit anti-E-tag antibody เพื่อให้สามารถตรวจวัดสัญญาณเรืองแสงด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ได้

การทดสอบต้องควบคุมระยะเวลา อุณหภูมิ วิธีการผสมตัวอย่าง ขั้นตอนการล้าง และปริมาตรสารละลายให้สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มทดลอง รวมถึงป้องกันตัวอย่างจากแสงระหว่างและหลังการย้อมด้วยสารเรืองแสง เพื่อลดความแปรปรวนของสัญญาณที่ตรวจวัดได้ นอกจากนี้ ต้องกำหนดกลุ่มควบคุมที่เหมาะสม ได้แก่ unstained control, Primary antibody control, negative control และ secondary antibody control เพื่อใช้ประเมินสัญญาณพื้นหลัง การจับแบบไม่จำเพาะ และความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ โดยการเติมแอนติบอดีและสารทดสอบต้องเป็นไปตามเงื่อนไขที่กำหนดสำหรับกลุ่มควบคุมแต่ละประเภท

3.2.5 มาตรฐานการใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer[8-11]

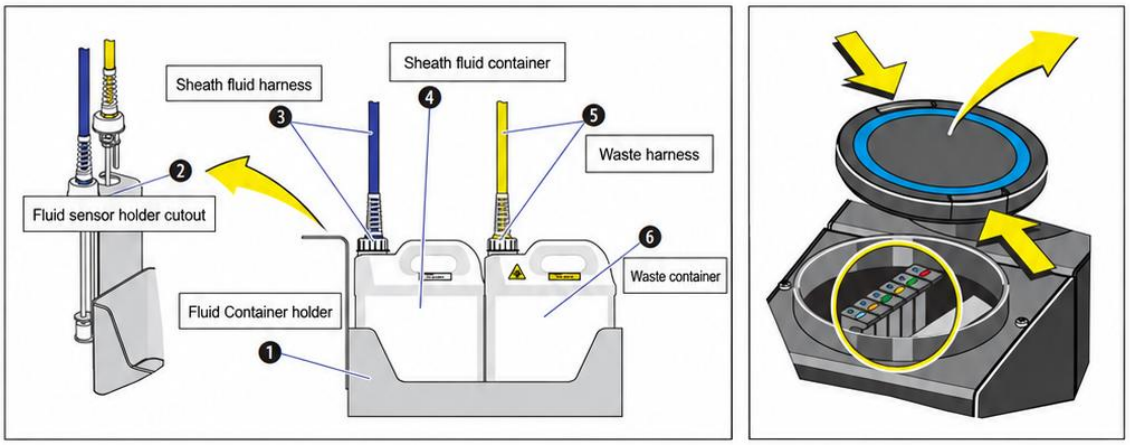
ก่อนตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ต้องตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้แก่ สภาพภายนอก ระดับสารละลาย Sheath Fluid ระดับของเสียในภาชนะรองรับ (Waste Container) หัวดูดตัวอย่าง (Sample Probe) และภาชนะบรรจุตัวอย่าง จากนั้นเริ่มต้นระบบเครื่องตามคำแนะนำของผู้ผลิต พร้อมตรวจสอบการตั้งค่าเลเซอร์ ตัวกรองแสง (Optical Filters) และช่องตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ให้สอดคล้องกับระบบที่ติดตั้ง โดยเฉพาะการเลือกช่องตรวจวัดสารเรืองแสง Phycoerythrin (PE) ให้เหมาะสม ทั้งนี้ ต้องดำเนินการควบคุมคุณภาพเครื่องประจำวัน (Daily QC) ด้วยสารมาตรฐานตามคำแนะนำของผู้ผลิต และยืนยันว่าผลผ่านเกณฑ์ที่กำหนดก่อนใช้งาน เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องมีความพร้อมและสมรรถนะเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์

3.2.5.1 หลักเกณฑ์การเลือกใช้เครื่องและช่องตรวจวัดสัญญาณ

เครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ใช้สำหรับวิเคราะห์คุณลักษณะของเซลล์โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณการกระเจิงของแสง (Light Scattering) และสัญญาณเรืองแสง (Fluorescence) จากเซลล์ที่ไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ การเลือกช่องตรวจวัดต้องพิจารณาความสอดคล้องระหว่างความยาวคลื่นของเลเซอร์ คุณสมบัติการกระตุ้นและการปล่อยแสงของสารเรืองแสง (Excitation and Emission Spectra) และชุดตัวกรองแสง (Optical Filters) ที่ติดตั้งในเครื่อง สำหรับการศึกษานี้ใช้แอนติบอดี Goat Anti-Rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Phycoerythrin (PE) ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นด้วยเลเซอร์สีน้ำเงินความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร โดยเลือกช่องตรวจวัด PE ที่มีชุดตัวกรองแสงเหมาะสมกับช่วงความยาวคลื่นการปล่อยแสงของสารเรืองแสง เพื่อให้การตรวจวัดสัญญาณมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้



ภาพที่ 3 เครื่อง CytoFLEX ของบริษัท Beckman Coulter
ซึ่งเป็นเครื่อง Flow Cytometer ตั้งอยู่ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา อาคารศรีสวรินทิรา



ภาพที่ 4 ซ้าย-Containers สำหรับวางถัง sheath fluid และถัง waste ของเครื่อง CytoFLEX [9]

ขวา-Optical filter glass piece หรือแผ่นกระจกกรองแสงของเครื่อง CytoFLEX [9]

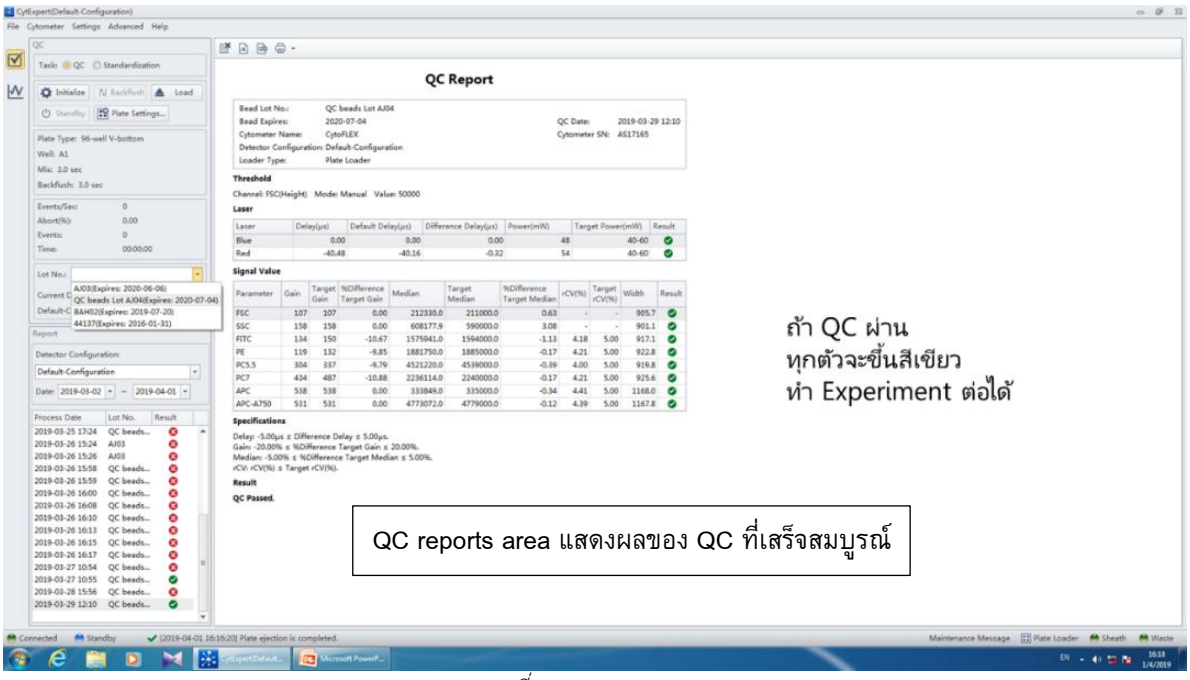
Laser	Fluorescent Channel	CytoFLEX Channel Names	Commonly used Fluorescent Dyes
488-nm	525/40 BP	FITC	FITC, Alexa Fluor™ 488, CFSE, Fluo-3
	585/42 BP	PE	PE, PI
	610/20 BP	ECD	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PI
	690/50 BP	PC5.5	PC5.5, PC5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PI
	780/60 BP	PC7	PC7
638-nm	660/20 BP	APC	APC, Alexa Fluor™ 647, eFluor™ 660
	712/25 BP	APC-A700	APC-A700, Alexa Fluor™ 700
	780/60 BP	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC- eFluor™ 780
405-nm	450/45 BP	PB450	Pacific Blue™ dye, V450, eFluor™ 450, BV421
	525/40 BP	KO525	Krome Orange, AmCyan, V500, BV510
	610/20 BP	Violet610	BV605, Qdot® 605
	660/20 BP	Violet660	BV650, Qdot® 655
	780/60 BP	Violet780	BV785, Qdot® 800

ภาพที่ 5 ตารางฟิลเตอร์แต่ละชนิดและความยาวคลื่น[8]

3.2.5.2 หลักเกณฑ์การตรวจสอบความพร้อมและคุณภาพเครื่องก่อนใช้งาน

ก่อนเริ่มตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ต้องตรวจสอบความพร้อมของระบบแสง (optical system) ระบบไหลของของเหลว (fluidics system) และระบบตรวจจับสัญญาณ (detection system) โดยดำเนินการเริ่มต้นระบบ (system startup) รวมถึงตรวจสอบสถานะการทำงานของเลเซอร์และระบบต่าง ๆ เพื่อให้เครื่องพร้อมสำหรับการใช้งาน

ก่อนเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่าง ต้องดำเนินการตรวจสอบคุณภาพเครื่องประจำวัน (daily quality control; Daily QC) โดยใช้ CytoFLEX Daily QC Fluorospheres และตรวจสอบให้หมายเลขรุ่นการผลิต (lot number) ของเม็ดบีดตรงกับข้อมูลที่กำหนดในซอฟต์แวร์ เนื่องจากเม็ดบีดแต่ละรุ่นการผลิตมีค่าอ้างอิง (target values) แตกต่างกัน โดยผลการตรวจสอบต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ในซอฟต์แวร์ก่อนเริ่มวิเคราะห์ตัวอย่าง หากผลการตรวจสอบไม่ผ่านเกณฑ์ ต้องตรวจสอบสาเหตุ ดำเนินการแก้ไขและตรวจสอบคุณภาพซ้ำจนกว่าจะผ่านเกณฑ์ พร้อมบันทึกผลการตรวจสอบเพื่อใช้ติดตามประสิทธิภาพของเครื่องและสามารถตรวจสอบย้อนหลังได้



ภาพที่ 6 รายงานผลของ QC

3.2.5.3 หลักเกณฑ์การเก็บข้อมูลและควบคุมความถูกต้องของผลการตรวจวัด

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ต้องกำหนดค่าพารามิเตอร์ให้เหมาะสมกับชนิดของเซลล์และสารเรืองแสงที่ใช้ โดยเลือกช่องตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง (fluorescence channel) ให้สอดคล้องกับสารเรืองแสง phycoerythrin (PE) ที่ใช้ในการศึกษา และควบคุมค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ค่า Gain, Threshold และอัตราการไหลของตัวอย่าง (sample flow rate) ให้สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มทดลอง รวมถึงกำหนดจำนวนเหตุการณ์ที่ต้องการเก็บข้อมูล (event count) ให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผล

ก่อนเก็บข้อมูลตัวอย่าง ต้องตรวจสอบสัญญาณพื้นหลังโดยใช้กลุ่มควบคุมที่เหมาะสม ได้แก่ unstained control และ secondary antibody control เพื่อประเมินสัญญาณเรืองแสงที่ไม่ได้เกิดจากการจับจำเพาะของ HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์ และใช้ประกอบการกำหนดเกณฑ์การแยกประชากรเซลล์ที่ให้สัญญาณบวกและลบ (positive and negative populations) โดยใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์เดียวกันในการเปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์ HubCCA1 และ MMNK1

ข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ต้องบันทึกในรูปแบบไฟล์มาตรฐาน Flow Cytometry Standard (.fcs) พร้อมระบุข้อมูลตัวอย่าง เงื่อนไขการทดลอง และการตั้งค่าที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo และตรวจสอบย้อนกลับได้

3.2.5.4 แนวทางการทำความสะอาดและบำรุงรักษาเครื่องมือ

การทำความสะอาดและบำรุงรักษาเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ต้องดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิตเพื่อรักษาประสิทธิภาพการทำงานและลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนหรือการอุดตันของระบบไหล ภายหลังการใช้งานต้องทำความสะอาดระบบดูดตัวอย่างและระบบไหลตามโปรแกรมทำความสะอาดประจำวัน (Daily Clean) โดยใช้น้ำยาทำความสะอาดและสารละลายสำหรับล้างระบบที่เหมาะสม

นอกจากนี้ ต้องทำความสะอาดบริเวณวางตัวอย่าง (sample station) และดำเนินการทำความสะอาดระบบไหลอย่างละเอียด (Deep Clean) ตามรอบการบำรุงรักษาหรือเมื่อพบความผิดปกติ รวมถึงตรวจสอบสภาพของภาชนะบรรจุ sheath fluid และ waste container โดยคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและบันทึกการบำรุงรักษาให้เป็นระบบ

3.2.5.5 ข้อควรระวังในการใช้งานเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer

- ตรวจสอบระดับ sheath fluid ระดับของเสียในถัง waste และการเชื่อมต่อของระบบท่อก่อนใช้งาน เพื่อป้องกันการรั่วไหลและความผิดปกติของระบบไหล
- ห้ามปิดเครื่องหรือถอดสายเชื่อมต่อขณะเครื่องกำลังตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อป้องกันการหยุดทำงานผิดปกติและการสูญหายของข้อมูล
- เลือกใช้ภาชนะบรรจุตัวอย่างและติดตั้งอุปกรณ์ให้ถูกต้องตามรูปแบบการใช้งาน โดยระมัดระวังไม่ให้ sample probe กระแทกกับภาชนะหรืออุปกรณ์อื่น
- ตรวจสอบการตั้งค่าช่องตรวจวัดสัญญาณให้สอดคล้องกับสารเรืองแสงและชุดกรองแสงที่ติดตั้ง เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์
- หลีกเลี่ยงการสัมผัสหรือปรับเปลี่ยนส่วนประกอบภายในระบบแสง เช่น optical filters และ optical fibers โดยไม่ได้รับอนุญาตหรือผ่านการฝึกอบรม
- ใช้น้ำยาและสารละลายสำหรับระบบไหลและการทำความสะอาดตามข้อกำหนดของผู้ผลิต เพื่อป้องกันความเสียหายและการสะสมของสิ่งตกค้าง

3.2.6 หลักเกณฑ์การวิเคราะห์ผล การบันทึกข้อมูล และการตรวจสอบย้อนกลับ[12]

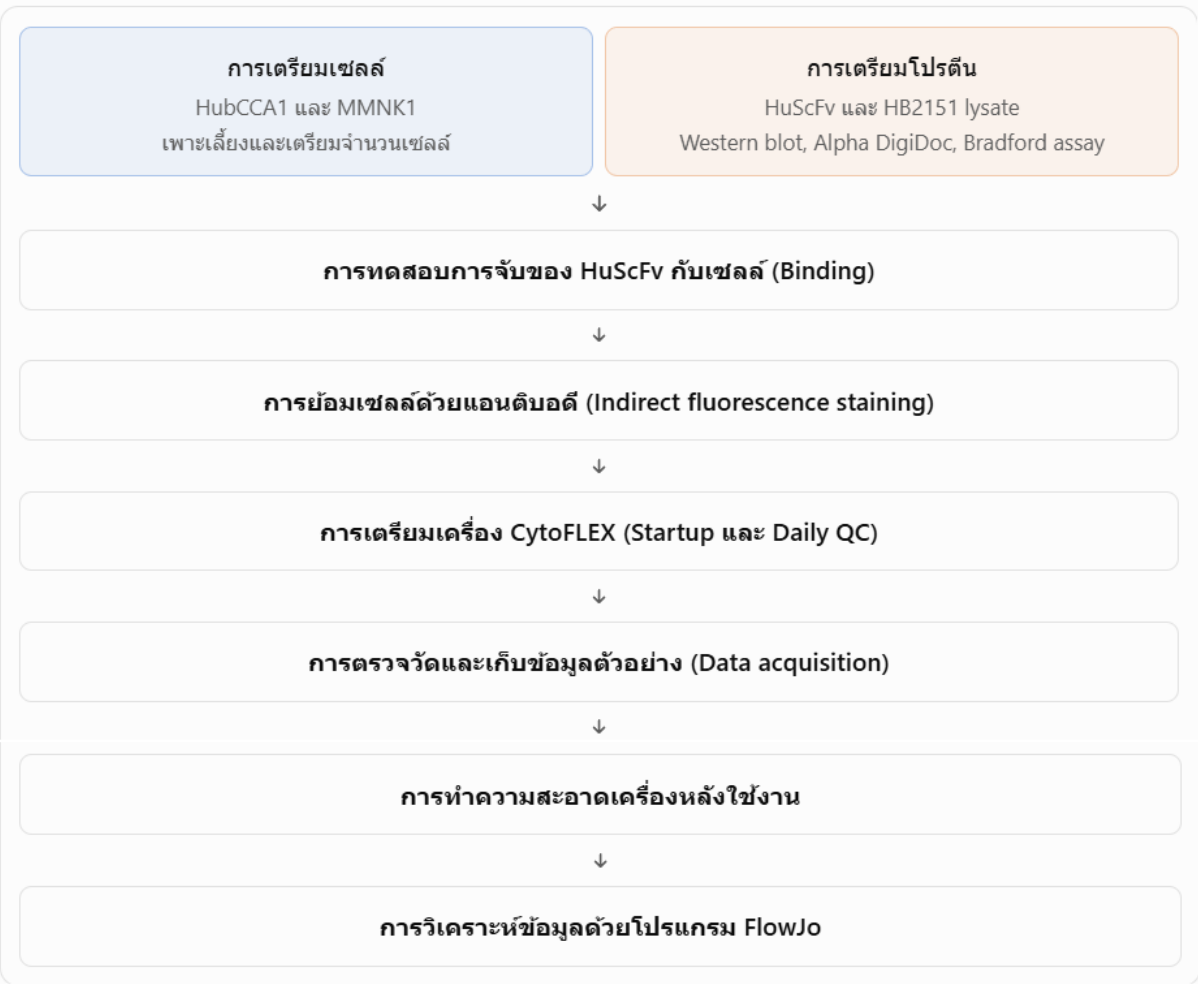
กำหนดลำดับ gating ให้สอดคล้องกัน เช่น เลือก singlets ด้วย FSC-A/FSC-H กำหนดประชากรเซลล์เป้าหมายด้วย FSC/SSC และพิจารณา PE-positive จาก controls ที่เหมาะสม กรณีเปรียบเทียบความเข้มสัญญาณ ควรใช้ค่า Median fluorescence intensity หรือค่าที่กำหนดไว้ล่วงหน้าอย่างสม่ำเสมอ และระบุด้วยว่าเกณฑ์ PE-positive อ้างอิงจากชุดควบคุมใด

จัดเก็บไฟล์ข้อมูลดิบ (.fcs) พร้อมบันทึกรายละเอียดที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ วันที่วิเคราะห์ ชนิดของเซลล์ โคลนของแอนติบอดี หมายเลขรุ่นการผลิตของน้ำยา (Lot number) การตั้งค่าเครื่องมือ และผลการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง (QC) จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo โดยกำหนดขอบเขตประชากรเซลล์ (gating) ตามเกณฑ์ที่เหมาะสม พร้อมบันทึกไฟล์การวิเคราะห์ (workspace) และส่งออกผลการวิเคราะห์ในรูปแบบกราฟหรือตาราง ทั้งนี้ ต้องจัดเก็บไฟล์ข้อมูลดิบต้นฉบับโดยไม่มีการแก้ไขและสำรองข้อมูลไว้อย่างเป็นระบบ เพื่อให้สามารถตรวจสอบย้อนกลับและวิเคราะห์ข้อมูลซ้ำได้

4. เทคนิคในการปฏิบัติงาน

4.1 กิจกรรม/แผนปฏิบัติงาน/ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การศึกษาความสามารถในการจับของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) กับแอนติเจนบนผิวเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิค Flow Cytometry ประกอบด้วยกระบวนการสำคัญ ตั้งแต่การเตรียมเซลล์และโปรตีน HuScFv การทดสอบการจับและการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดี การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer ตลอดจนการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม FlowJo โดยลำดับการปฏิบัติงานแสดงดังภาพที่ 7 และรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนอธิบายไว้ในหัวข้อถัดไป



ภาพที่ 7 ลำดับการปฏิบัติงาน

4.1.1 การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยง

การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมความพร้อมสำหรับการทดลอง โดยเลือกใช้สารเคมีและส่วนประกอบในปริมาณที่เหมาะสมตามสูตรที่กำหนด และคำนึงถึงการป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมและการใช้งาน สารละลายและอาหารเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย DMEM high glucose สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ HubCCA1 และ MMNK1, FACS buffer สำหรับเตรียมและล้างเซลล์, Blocking buffer สำหรับลดการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดี และอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 2×YT สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ผลิตโปรตีน HuScFv โดยมีองค์ประกอบดังตารางที่1

สารละลายและอาหารเลี้ยง	องค์ประกอบและปริมาณ
Basal DMEM 1 L	DMEM powder 1 pack, Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 3.7 g, Distilled water ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L
FACS buffer 100 mL	Phosphate-buffered saline (PBS) 95 mL และ FBS 5 mL
Blocking buffer 2 mL	FACS buffer 1,800 µL และ Human AB serum 200 µL
2×YT medium 1 L	Tryptone 17 g, Yeast extract 10 g, Sodium chloride (NaCl) 5 g และ Distilled water ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L

ตารางที่1 องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Complete DMEM (1 ลิตร)

นำ Basal DMEM ที่ผ่านการกรองปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 890 มิลลิลิตร มาเติม Fetal Bovine Serum (FBS) และ Penicillin/Streptomycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10% และ 1% ตามลำดับ โดยมีปริมาตรรวม 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Complete DMEM สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี HubCCA1 และเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี MMNK1

การเตรียม FACS buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียม Phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และเติม Fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ FACS buffer ที่มี FBS ความเข้มข้น 5% (v/v) สำหรับใช้ในการเตรียมและล้างเซลล์ระหว่างการทดสอบการจับของแอนติบอดีและการย้อมเซลล์

การเตรียม Blocking buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เตรียม FACS buffer ปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร และเติม Human AB serum ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ Blocking buffer ที่มี Human AB serum ความเข้มข้น 10% (v/v) สำหรับใช้ลดการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีกับเซลล์ในระหว่างการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 2xYT ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tryptone 17 กรัม Yeast extract 10 กรัม และ Sodium chloride (NaCl) 5 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นและคนให้ส่วนประกอบทั้งหมดละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสม ให้เติม Ampicillin ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL สำหรับใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดซึ่งมียีนต้านทาน Ampicillin

4.1.2 การเพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์

ขั้นตอน Subculture cells มีดังนี้

นำ cryovial ออกจากถังเก็บเซลล์ และละลายใน water bath ที่ 37°C ประมาณ 1–2 นาที
จากนั้นย้ายลง complete medium เพื่อลด DMSO

↓

เพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในจานขนาด 10 cm โดยใช้ complete DMEM (DMEM + 10% FBS + 1% penicillin/streptomycin บ่มในตู้ incubator อุณหภูมิ 37°C, CO_2 5%

↓

เปลี่ยนอาหารเป็นประจำ (ทุก 2-3 วัน) เพื่อป้องกันการสะสมของของเสีย เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี

↓

เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80% สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อ (Cell Subculture) ได้

↓

ล้างจานเลี้ยงเซลล์ด้วย 1X ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS) 2 ครั้งๆละ 5-10 ml

↓

เติม 1X enzyme Accutase 1-2 ml ใน dish ขนาด 10cm

↓

บ่ม 5-10 นาทีในตู้ incubator 37°C สามารถเคาะภาชนะเบา ๆ หรือ pipette ช่วยให้เซลล์หลุด

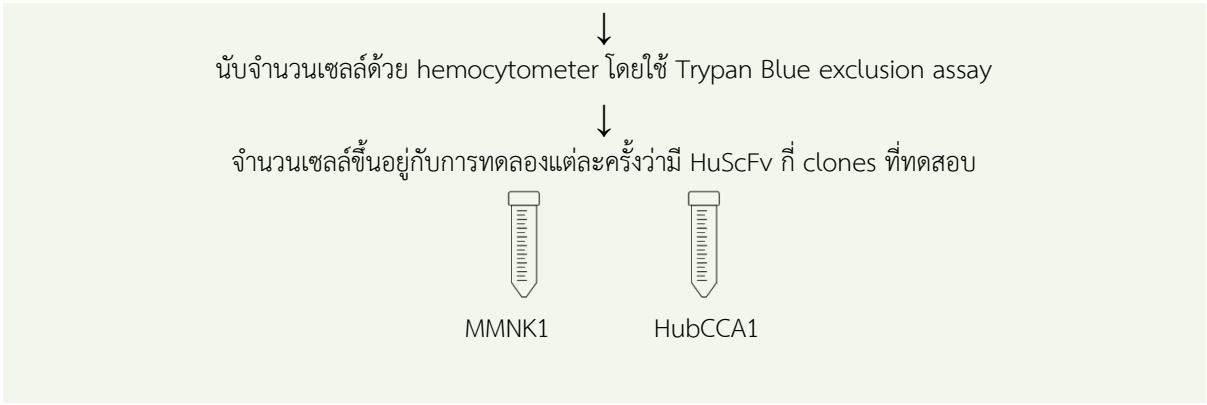
↓

เติม 10% DMEM 5ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ enzyme Accutase

↓

ปั่นล้างโดย resuspend ใน 10ml PBS ใน 50 centrifuge tube

Centrifuge ที่ 300g/20°C/2นาที



4.1.3 การคำนวณจำนวนเซลล์และผังการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบความสามารถในการจับของแอนติบอดี HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์ ใช้เซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี HubCCA1 (cholangiocarcinoma cells) และเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี MMNK1 (immortalized cholangiocyte cells) โดยกำหนดจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้เท่ากันที่ 2×10^5 เซลล์ต่อหลุม เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลการจับของแอนติบอดีภายใต้เงื่อนไขการทดลองที่สอดคล้องกัน

ในการทดลองนี้ใช้ HuScFv จำนวน 6 clones ได้แก่ หมายเลข 84, 87, 98, 100, 110 และ 112 ร่วมกับกลุ่มควบคุม 4 กลุ่ม ได้แก่ unstained control, primary antibody control, secondary antibody control และ negative control (HB2151 lysate) รวมเป็น 10 ตัวอย่างต่อชนิดเซลล์ โดยเตรียมเซลล์เผื่อสำหรับ 12 หลุมต่อชนิดเซลล์ เพื่อรองรับการสูญเสียเซลล์ระหว่างการเตรียมและดำเนินการทดลอง ดังตารางที่2

รายการ	จำนวนตัวอย่าง	หมายเหตุ
Soluble HuScFv clones หมายเลข 84, 87, 98, 100, 110 และ 112	6	กลุ่มทดสอบการจับของ HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์
Unstained control (ไม่เติมแอนติบอดี)	1	ประเมินการเรืองแสงตามธรรมชาติของเซลล์ (autofluorescence)
Primary antibody control (rabbit anti-E-tag + goat anti-rabbit IgG-PE)	1	ประเมินสัญญาณพื้นหลังจากระบบแอนติบอดีตรวจจับเมื่อไม่มี HuScFv
Secondary antibody control (goat anti-rabbit IgG-PE)	1	ประเมินการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีทุติยภูมิ
Negative control (HB2151 lysate)	1	ประเมินสัญญาณพื้นหลังจากสารสกัดแบคทีเรียที่ไม่มี HuScFv เป้าหมาย
รวมตัวอย่างทดลอง	10	จำนวนตัวอย่างต่อ cell line
ตัวอย่างสำรองสำหรับการเตรียมเซลล์	2	สำรองเผื่อการสูญเสียระหว่างเตรียมตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่างที่ใช้คำนวณ	12	จำนวนตัวอย่างต่อ cell line รวมส่วนสำรอง

ตารางที่2 จำนวนตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของกลุ่มควบคุม

ดังนั้น จำนวนเซลล์ที่ต้องเตรียมสำหรับเซลล์แต่ละชนิด คือ $12 \times (2 \times 10^{5}) = 2.4 \times 10^{6}$ เซลล์ เมื่อได้ cell suspension อย่างละประมาณ 2.4×10^{6} เซลล์ ให้แบ่ง 30 µL ต่อหลุมตาม plate map โดยระบุชื่อ cell line, clone และ control ให้ครบ หลีกเลี่ยงการสลับตำแหน่ง และเก็บ plate map ของแต่ละรอบการทดลองเป็นเอกสารประกอบ การเติมสารทดสอบและแอนติบอดีให้เป็นไปตามเงื่อนไขที่กำหนดสำหรับแต่ละกลุ่มตามตารางที่3

กลุ่มทดลอง	HuScFv	HB2151 lysate	Rabbit anti-E-tag	Goat anti-rabbit IgG-PE
HuScFv clones 84, 87, 98, 100, 110, 112	✓	–	✓	✓
Negative control (HB2151 lysate)	–	✓	✓	✓
Primary antibody control	–	–	✓	✓
Secondary antibody control	–	–	–	✓
Unstained control	–	–	–	–

✓ = เติมสาร และ **–** = ไม่เติมสาร โดยใช้เซลล์ HubCCA1 หรือ MMNK1 ในทุกกลุ่ม

ตารางที่3 เงื่อนไขการเติมสารและแอนติบอดีในแต่ละกลุ่ม

4.1.4 การผลิตและตรวจสอบ HuScFv

ขั้นตอนการทำ Protein Expression

- การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* HB2151 ที่มียีน HuScFv

เลือก Single colony เพาะเลี้ยงใน 2×YT-AG ปริมาตร 1 mL
มี Ampicillin 100 µg/mL และ Glucose 2% (2×YT-AG)

↓

การเพาะเลี้ยงข้ามคืน (Overnight culture) ที่ 37°C, 250 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

↓

นำ Overnight culture 100 µL เติมลงใน 2×YT-AG 10 mL

↓

เพาะเลี้ยงที่ 37°C, 250 rpm จน OD600 อยู่ในช่วง 0.3–0.5

↓

- การเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีน HuScFv

ปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 × g เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเดิมออก
และแขวนตะกอนเซลล์ใน 2×YT-A 10 mL (ไม่มี Glucose)

↓

เติม isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mM
เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

↓

เพาะเลี้ยงที่ 37°C, 250 rpm เป็นเวลา 3–5 ชั่วโมง

↓

- การเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรีย

ปั่นเหวี่ยงที่ 4,500×g, 4°C เป็นเวลา 15-30 นาที

↓

เก็บ Cell pellet และแขวนตะกอนใน PBS 1 mL

↓

- การทำให้เซลล์แตกเพื่อสกัดโปรตีน (Cell Lysis)

ใช้ ultrasonic processor (VCX130, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT) ที่มีหัวขนาด 6 มิลลิเมตร

↓

ตั้งค่าความเข้ม 30% amplitude ใช้โปรแกรม เปิด 2 วินาที / ปิด 2 วินาที
เป็นเวลา 2 นาที ตัวอย่างอยู่บนน้ำแข็ง

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000×g, 4°C เป็นเวลา 15-30 นาที

↓

เก็บส่วนสารละลายใสส่วนบน (supernatant) แล้วนำไปวิเคราะห์โปรตีน HuScFv

ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blotting

ข้อแนะนำ: หากยังไม่วิเคราะห์ทันที ควรแบ่ง supernatant เป็น aliquots แล้วเก็บที่ −80°C เพื่อช่วยรักษาสภาพโปรตีน และหลีกเลี่ยงการแช่แข็ง–ละลายซ้ำ

ขั้นตอนการตรวจสอบโปรตีน HuScFv

- การเตรียมตัวอย่าง

นำสารละลายส่วนใส (supernatant) มาผสมกับ 6× sample buffer ในอัตราส่วน 5:1 (v/v)

↓

ให้ความร้อนที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพ

↓

- การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

นำตัวอย่างโหลดลงบนเจล SDS-PAGE 12%

↓

แยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ประมาณ 20 mA ต่อเจล

↓

- การตรวจสอบโปรตีนโดย Western Blot

โปรตีนที่แยกได้จาก SDS-PAGE ถูกถ่ายโอนไปยังแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส

↓

บล็อกแผ่นเยื่อด้วย 5% skim milk ใน blocking buffer เพื่อลดการจับแบบไม่จำเพาะ

↓

- การตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย

แอนติบอดีปฐมภูมิ Rabbit anti-E-tag antibody (Abcam, Cambridge, UK) สำหรับตรวจหา HuScFv ถูกเจือจางใน TBST ที่อัตราส่วน 1:3000 และบ่มกับเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสในปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อ 1 แผ่น

↓

ล้างเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer (Tris-Buffered Saline with Tween 20)

↓

แอนติบอดีทุติยภูมิชนิด goat anti-rabbit ที่เชื่อมกับเอนไซม์ alkaline phosphatase (Abcam, Cambridge, UK) เจือจางในสารละลาย TBST ที่อัตราส่วน 1:20,000 และบ่มกับเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสในปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อ 1 แผ่น

↓

ล้างเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST เพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนที่ไม่จับกับโปรตีนเป้าหมาย

↓

เติมสารตั้งต้น BCIP/NBT substrate (SeraCare, Milford, CT) เพื่อให้เกิดสัญญาณ และตรวจสอบผลบนเมมเบรน

↓

- การวิเคราะห์ผลลัพธ์

ล้างเมมเบรนด้วยน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นปล่อยให้แห้ง

↓

ตรวจสอบแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเมมเบรน หากแถบโปรตีนชัดเจนและตรงตามขนาดที่ต้องการ แสดงว่าการแสดงออกของ HuScFv สำเร็จ

การประเมินปริมาณ HuScFv ด้วย Alpha DigiDoc

เปรียบเทียบตำแหน่งแถบกับ Protein marker

↓

วิเคราะห์ Band intensity เพื่อประมาณปริมาณ HuScFv เบื้องต้นสำหรับ Binding assay

ขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนรวมของ HB2151 lysate ด้วย Bradford assay

เตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนโดยทำ serial dilution จาก BSA stock 10 mg/ml

dilution 1 = 1 mg/ml,

dilution 2 = 0.5 mg/ml,

dilution 3 = 0.4 mg/ml,

dilution 4 = 0.3 mg/ml,

dilution 5 = 0.2 mg/ml,

dilution 6 = 0.1 mg/ml

dilution 0 = 0 (PBS)

↓

เตรียมตัวอย่างโปรตีนโดยเจือจางด้วย PBS อัตราส่วน 1:10 (เช่น ตัวอย่าง 2 µL เติม PBS 18 µL)

↓

เติมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 10 µL ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลต

↓

เจือจาง Bradford Reagent ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (DI water) ในอัตราส่วน 1:4

↓

เติม Bradford Reagent ที่เจือจางแล้ว 200 µL ลงในแต่ละหลุม และผสมให้เข้ากัน

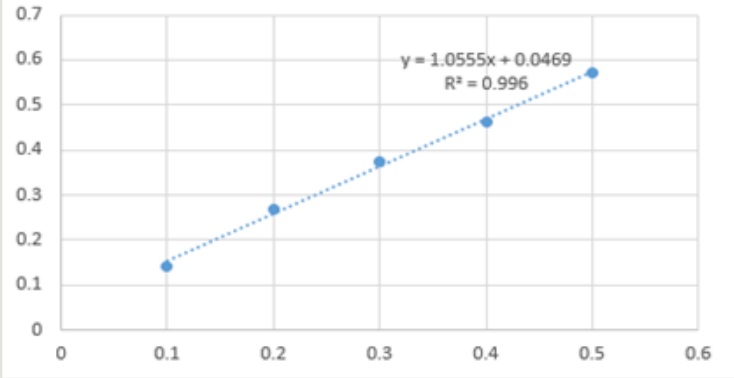
↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD) ที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง Absorbance Microplate Reader

↓

สร้างกราฟมาตรฐาน (Standard Curve) จากสารละลายมาตรฐาน BSA

และนำไปใช้คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง



ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐาน (Standard Curve) และสมการเส้นตรงสำหรับคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน

<u>ตัวอย่างการคำนวณโปรตีน</u>

$$\text{Protein} = \frac{\text{Normalize} - b}{a} \times \text{Dilution Factor}$$

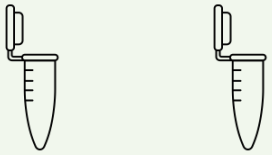
กำหนดให้ OD595 = 0.437, Slope = 1.0555, Intercept = 0.0469 และ Dilution factor = 10

คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน y= ax+b

$$\text{Protein} = \frac{(0.437 - 0.0469)}{1.0555} \times 10 = \frac{0.3901}{1.0555} \times 10 \approx 0.3695 \times 10 = 3.695\ \mu g/\mu l$$

4.1.5 ขั้นตอนการ Blocking และ Binding

นำเซลล์ HubCCA1 และ MMNK1 อย่างละ 2.4 × 10^6 เซลล์ ใส่ในหลอด 1.5 mL microcentrifuge tube



MMNK1 HubCCA1

ปั่นล้างเซลล์ด้วย FACS Buffer จำนวน 2 ครั้ง (ครั้งละ 1 mL) ที่ 1,000 × g, 20°C เป็นเวลา 3 นาที

↓

ดูดทิ้ง supernatant โดยระมัดระวังไม่ให้รบกวน pellet

↓

เติม Blocking Buffer ปริมาตร 1 mL ต่อหลอด

↓

บ่มที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ Mini Rotator



ภาพที่ 9 เครื่อง Mini Rotator รุ่น Bio RS-24 ของยี่ห้อ Biosan ซึ่งใช้สำหรับการหมุนตัวอย่างในหลอดทดลอง ตัวเครื่องตั้งอยู่ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา อาคารศรีสวรินทิรา

ปั่นล้างเซลล์ด้วย FACS Buffer จำนวน 2 ครั้ง (ครั้งละ 1 mL) ที่ 1,000 × g, 4°C เป็นเวลา 3 นาที

↓

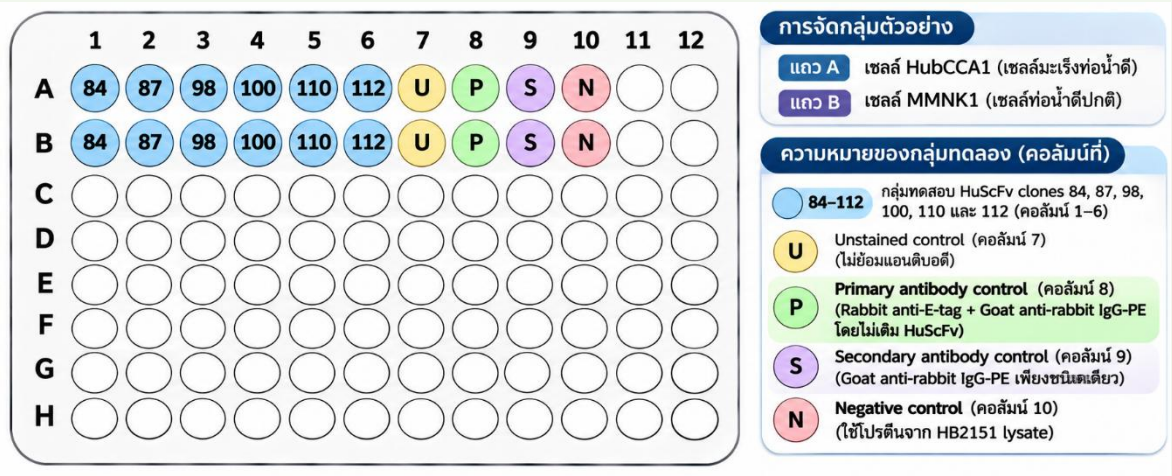
ดูดทิ้ง supernatant และแขวนลอยเซลล์ใน FACS Buffer

↓

เซลล์ปริมาตร 30 µL ต่อหลุม ตามผังการจัดวางตัวอย่าง (Plate map) ในภาพที่ 10

↓

เติม soluble HuScFv ปริมาณ 3 µg/หลุม ตามรหัส clone ที่กำหนดในกลุ่มทดลอง ส่วนหลุมควบคุมให้เติมสารตามเงื่อนไขที่ระบุในตารางที่ 3



ภาพที่ 10 ผังการจัดวางตัวอย่างบนไมโครเพลต 96 หลุม (Plate map)

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง พร้อมเขย่าบน Microplate Shaker ที่ 400 rpm

↓

ปั่นล้างด้วย FACS Buffer จำนวน 2 ครั้ง (ครั้งละ 200 µL) ที่ 1,000 × g, 20°C เป็นเวลา 2 นาที

4.1.6 ขั้นตอนการ Staining และคำนวณ Master Mix

รายการ	Rabbit anti-E-tag	Goat anti-rabbit IgG-PE
ปริมาณแอนติบอดีต่อหลุม	0.2 µg	0.3 µg
ความเข้มข้น Stock	1 µg/µL	0.1 µg/µL
ปริมาตร Stock ต่อหลุม	0.2 µL	3 µL
จำนวนหลุมที่ใช้จริง	16	18
จำนวนหลุมที่ใช้คำนวณ (รวมเผื่อ 1 หลุม)	17	19
ปริมาตร Stock รวม	3.4 µL	57 µL
ปริมาตร FACS buffer	3,396.6 µL	3,743 µL
ปริมาตร Master Mix รวม	3,400 µL	3,800 µL

ตารางที่4 สรุปการคำนวณ Master Mix ของแอนติบอดี

การเตรียม Primary antibody (Rabbit anti-E-tag)

กำหนดปริมาณ Rabbit anti-E-tag ที่ใช้สำหรับย้อมเซลล์เท่ากับ 0.2 µg/หลุม โดยใช้ Stock solution ความเข้มข้น 1 mg/mL (1 µg/µL)

คำนวณปริมาณแอนติบอดีสำหรับ 16 หลุม และเตรียมเผื่อเป็น 17 หลุม ดังนี้

$$\textbf{ปริมาตรต่อหลุม} = \frac{0.2}{1} = 0.2\ \mu L$$
$$\textbf{ปริมาตรสำหรับ 17 หลุม} = 0.2 \times 17$$
$$= \boxed{3.4\ \mu L}$$

เตรียม Master Mix ปริมาตรรวม 3,400 µL

โดยผสม Rabbit anti-E-tag 3.4 µL กับ FACS buffer 3,396.6 µL ให้เข้ากัน

↓

เติม Master Mix ปริมาตร 200 µL/หลุม ลงในหลุมที่กำหนดให้ได้รับ Primary antibody ในภาพที่ 10

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน Microplate shaker ที่ความเร็ว 400 rpm

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 × g อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูด Supernatant ออก

↓

ล้างเซลล์ด้วย FACS buffer จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 200 µL

โดยปั่นเหวี่ยงและดูด Supernatant ออกหลังการล้างแต่ละครั้ง

↓

การเตรียม Secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG-PE)

กำหนดปริมาณ Goat anti-rabbit IgG-PE ที่ใช้เท่ากับ 0.3 µg/หลุม โดยใช้ Stock solution ความเข้มข้น 100 µg/mL (0.1 µg/µL)

คำนวณปริมาณแอนติบอดีสำหรับ 18 หลุม และเตรียมเผื่อเป็น 19 หลุม ดังนี้

$$\textbf{ปริมาตรต่อหลุม} = \frac{0.3}{0.1} = 3\ \mu L$$
$$\textbf{ปริมาตรสำหรับ 19 หลุม} = 3 \times 19$$
$$= \boxed{57\ \mu L}$$

เตรียม Master Mix ปริมาตรรวม 3,800 µL

โดยผสม Goat anti-rabbit IgG-PE 57 µL กับ FACS buffer 3,743 µL ให้เข้ากัน

↓

เติม Master Mix ปริมาตร 200 µL/หลุม ลงในหลุมที่กำหนดให้ได้รับ Secondary antibody ในภาพที่ 10

↓

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บน Microplate shaker ที่ความเร็ว 400 rpm โดยป้องกันตัวอย่างจากแสง

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 × g อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูด Supernatant ออก

↓

ล้างเซลล์ด้วย FACS buffer จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 200 µL
โดยปั่นเหวี่ยงและดูด Supernatant ออกหลังการล้างแต่ละครั้ง

↓

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry

หลังการย้อมและล้างเซลล์ ให้แขวนลอยเซลล์ใน FACS buffer ตามปริมาตรที่กำหนดสำหรับการตรวจวิเคราะห์

↓

ทำให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และลดการจับกลุ่มของเซลล์ (cell aggregation)
ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry

↓

ป้องกันตัวอย่างจากแสงระหว่างรอการตรวจวิเคราะห์ เพื่อรักษาความเสถียรของสารเรืองแสง PE

↓

นำตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer เพื่อเก็บข้อมูลและวิเคราะห์สัญญาณเรืองแสง

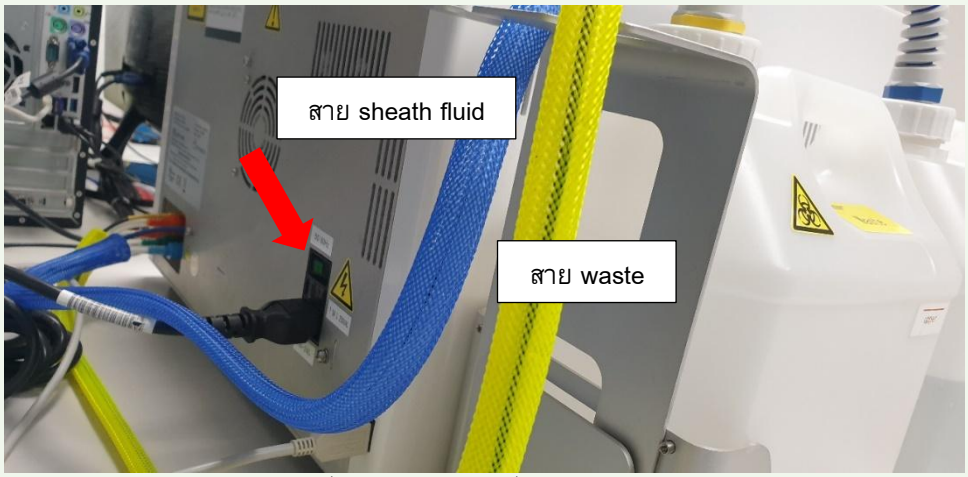
4.1.7 การเริ่มต้นใช้งานเครื่อง CytoFLEX และตรวจสอบ Daily QC

เลือกประเภทภาชนะบรรจุตัวอย่าง

เช็คน้ำยา Sheath Fluid ให้เต็มถังหรือเพียงพอที่จะใช้ เช็คถัง waste ว่าถูกทิ้งเรียบร้อยแล้ว

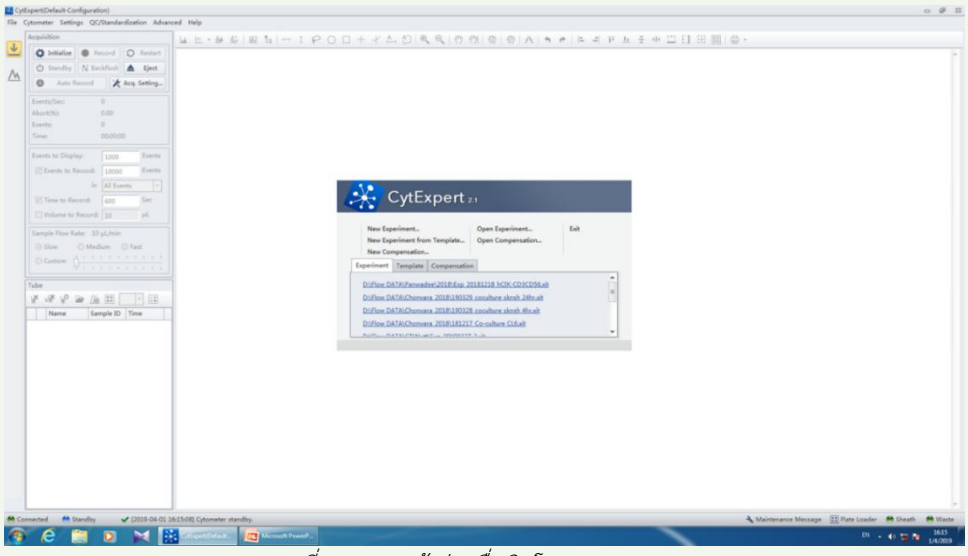
↓

เปิดสวิตช์ที่หลังตัวเครื่อง CytoFLEX



ภาพที่ 11 สวิตช์ด้านหลังเครื่อง Flow Cytometer

เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์และเปิดโปรแกรม CytExpert 



ภาพที่ 12 แสดงหน้าต่างเมื่อเปิดโปรแกรม CytExpert

↓

เลือกประเภทภาชนะบรรจุตัวอย่างให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์

- Semi-Automatic Mode สำหรับการใช้หลอดทดลอง (tube)
- Plate Loader Mode สำหรับการใช้ไมโครเพลต (microplate)

↓

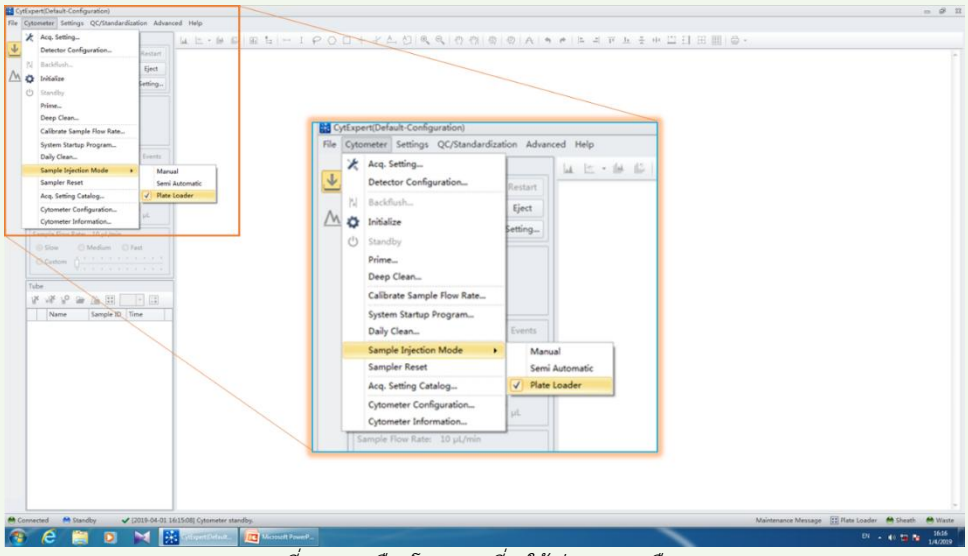
เมื่อกำหนดโหมดการใช้งานแล้ว ให้ปิดโปรแกรม CytExpert และปิดเครื่อง CytoFLEX ตามขั้นตอนที่กำหนด

↓

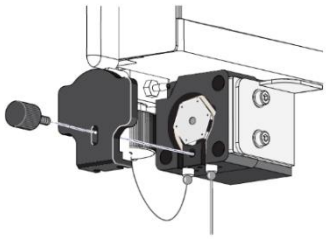
เปลี่ยนหัวดูดตัวอย่าง (sample probe) ให้ตรงกับโหมดการใช้งานที่เลือก โดยปฏิบัติตามภาพที่14

↓

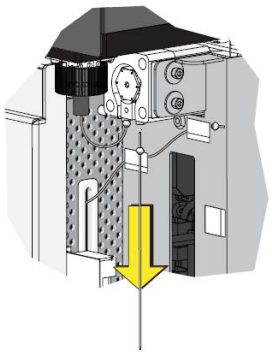
จากนั้นเปิดเครื่อง CytoFLEX และโปรแกรม CytExpert อีกครั้ง เพื่อเริ่มต้นการใช้งานตามขั้นตอนที่กำหนด



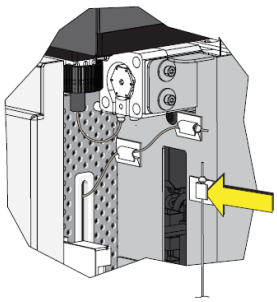
ภาพที่ 13 การเลือกโปรแกรมที่จะใช้เช่น tube หรือ plate



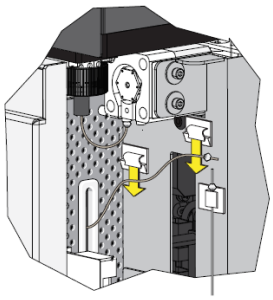
คลายเกลียวของแผ่น cover



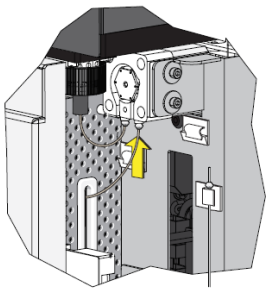
ถอด probe ของ tube ออก



นำ probe เก็บเข้าที่

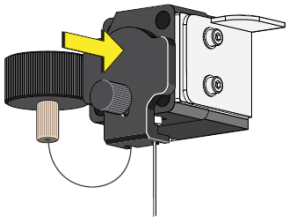


ถอด probe ของ plate ออกจากที่เก็บ



ใส่ probe เข้าไปในช่องจนสุด

ระยะลูกปัด



ปิดแผ่น cover จากนั้นปิดฝาเครื่อง

ภาพที่ 14 ขั้นตอนการเปลี่ยน probe ของ tube เป็น plate [9]

การเริ่มต้นระบบ (Startup Program)

เปิดโปรแกรม CytExpert คลิกเมนู Cytometer → Startup Program เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการเริ่มต้นระบบ

↓

เลือกประเภทไมโครเพลต (microplate) ให้ตรงกับภาชนะที่ใช้ ได้แก่ U-bottom หรือ V-bottom และกำหนดตำแหน่งหลุมสำหรับบรรจุน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water)

↓

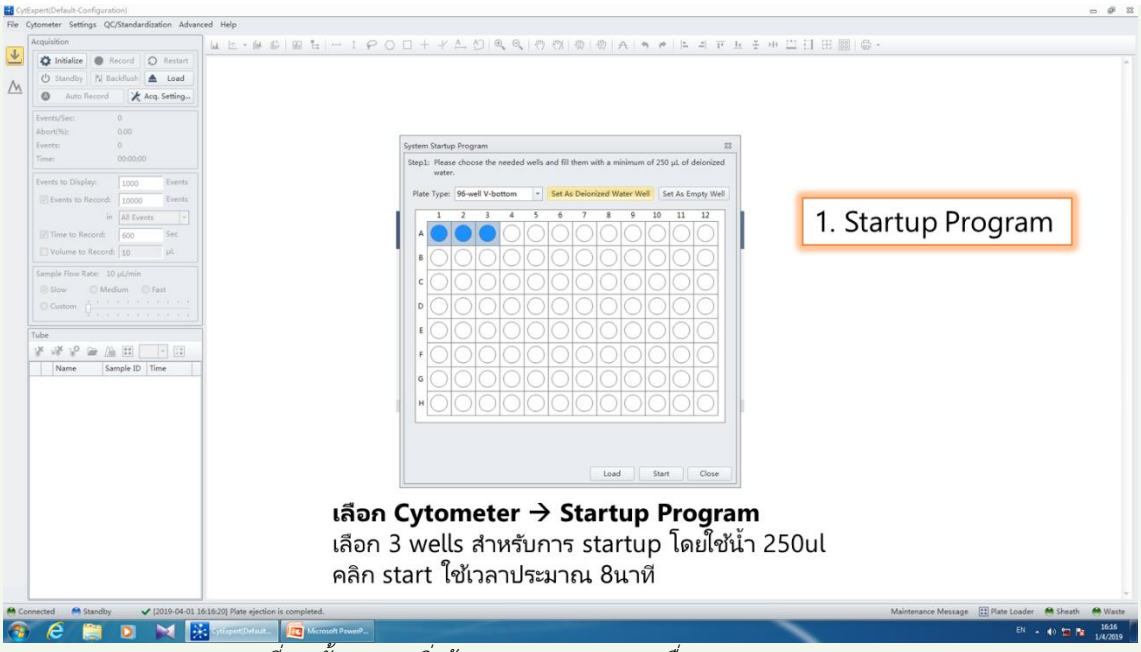
เตรียมไมโครเพลตโดยเติม DI water ปริมาตร 250 µL ต่อหลุม จำนวน 3 หลุม ตามตำแหน่งที่กำหนดในโปรแกรม

↓

วางไมโครเพลตบน Plate Loader ให้ถูกต้อง จากนั้นคลิก Load เพื่อนำไมโครเพลตเข้าสู่ตำแหน่งทำงาน

↓

คลิก Start เพื่อเริ่มโปรแกรม Startup และรอจนกระบวนการเสร็จสมบูรณ์ ก่อนดำเนินการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง (Daily QC) ในขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 15 ขั้นตอนการเริ่มต้นระบบ (Startup) ของเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer

ขั้นตอน QC Sample

เตรียม DI water ปริมาตร 1 mL ในหลอดทดลอง

↓

จากนั้นเขย่าขวด CytoFLEX Daily QC Fluorospheres ให้เข้ากัน และเติม 3 หยด ลงในหลอด

↓

ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer หากใช้ไมโครเพลต ให้เติมสารละลาย QC ที่เตรียมแล้ว 250 µL/well

↓

สารละลาย QC ที่เตรียมแล้วสามารถเก็บที่ 2–8°C ในที่มืดได้นาน 5 วัน

↓

คลิกเมนู QC แล้วเลือก Start QC

↓

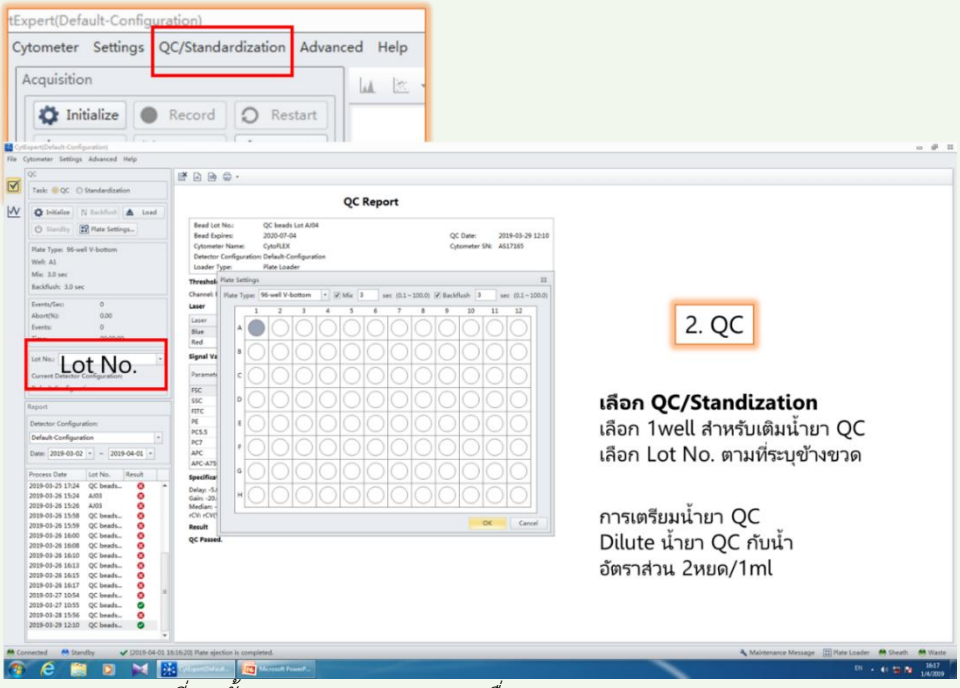
เลือกชนิดของไมโครเพลต (U-bottom หรือ V-bottom) และระบุตำแหน่งหลุมที่บรรจุสารละลาย QC

↓

เลือก Lot Number ของ CytoFLEX Daily QC Fluorospheres ให้ตรงกับน้ำยาที่ใช้งาน หากเป็น Lot ใหม่ ให้ดาวน์โหลด Target File โดยเลือก Settings เลือก Target Library เลือก Download Target File

↓

โหลด plate เข้าเครื่อง และคลิก Start เพื่อเริ่มการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง (Run QC)



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพเครื่อง CytoFLEX (Quality Control; QC)

4.1.8 การเก็บข้อมูลตัวอย่าง (Acquisition)

เปิดโปรแกรม CytExpert คลิกเมนู File และเลือกคำสั่งสร้างการทดลองตามความเหมาะสม ได้แก่

↓

New Experiment สำหรับสร้างการทดลองใหม่โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ด้วยตนเอง

↓

New Experiment From Template สำหรับสร้างการทดลองใหม่โดยใช้รูปแบบและค่าพารามิเตอร์จากไฟล์ต้นแบบที่บันทึกไว้เดิม

↓

โปรแกรมจะแสดงหน้าต่าง Worksheet สำหรับกำหนดรูปแบบและเงื่อนไขการตรวจวิเคราะห์ โดยไฟล์การทดลองของ CytExpert ใช้นามสกุล .xit

↓

คลิก Browse เพื่อเลือกโฟลเดอร์สำหรับจัดเก็บข้อมูล พร้อมระบุชื่อไฟล์และวันที่ทำการทดลอง จากนั้นคลิก OK

↓

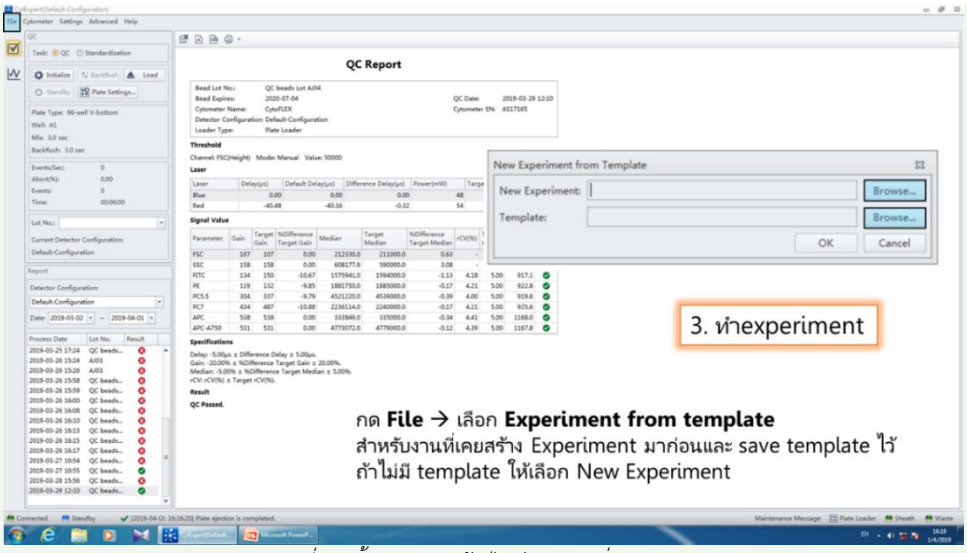
ในส่วน Plate Format กำหนดตำแหน่งหลุม (well) ที่บรรจุตัวอย่างให้ตรงกับการจัดวางตัวอย่างบนไมโครเพลต

↓

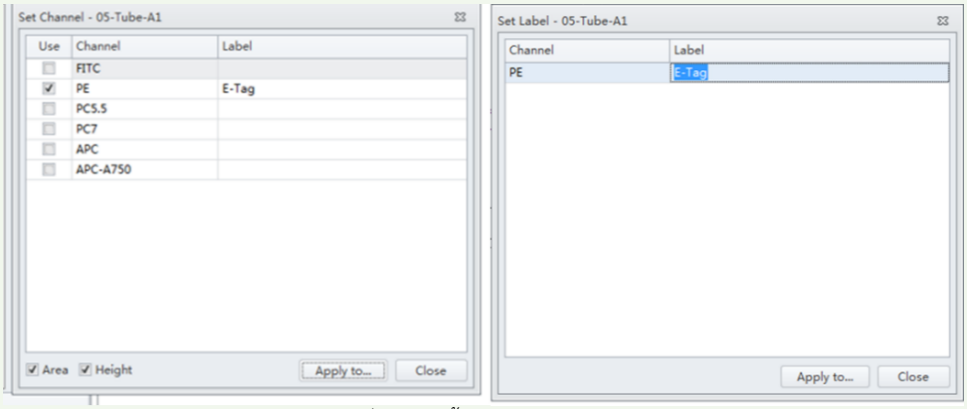
กำหนดช่องตรวจวัดสัญญาณเรืองแสงโดยใช้คำสั่ง Set Channel เลือกช่อง PE และใช้คำสั่ง Set Label เพื่อระบุชื่อ marker ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์

↓

ตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งตัวอย่างและการตั้งค่าพารามิเตอร์ก่อนเริ่มเก็บข้อมูล



ภาพที่ 17 ขั้นตอนการสร้างไฟล์ สำหรับเริ่มการทดลอง



ภาพที่ 18 การตั้งค่า ช่อง fluorescence

การตั้งค่าพารามิเตอร์

ปรับค่า Gain และ Threshold ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง

↓

วางไมโครเพลต (microplate) หรือหลอดตัวอย่าง (tube) ในตำแหน่งที่กำหนดของเครื่อง CytoFLEX Flow Cytometer

↓

สร้างกราฟ Dot Plot เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง FSC-A กับ SSC-A และระหว่าง PE-A กับ SSC-A รวมถึง Histogram สำหรับแสดงการกระจายของสัญญาณเรืองแสง PE-A

↓

รันตัวอย่าง Unstained control เพื่อตรวจสอบลักษณะประชากรเซลล์และระดับสัญญาณพื้นหลัง

↓

ปรับค่า Gain หากจำเป็น และกำหนดขอบเขตประชากรเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ (gating) โดยอาศัยข้อมูลจาก FSC-A และ SSC-A รวมถึงสัญญาณพื้นหลังจาก Unstained control

↓

รันตัวอย่างที่ย้อมด้วยสารเรืองแสง PE โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดไว้ให้สอดคล้องกัน ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

↓

กำหนดจำนวนเหตุการณ์ที่ต้องการบันทึก (event count) ประมาณ 10,000–50,000 events ต่อตัวอย่าง

↓

คลิก Record เพื่อเริ่มบันทึกข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง

↓

ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ Flow Cytometry Standard (.fcs) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FlowJo ในขั้นตอนถัดไป

4.1.9 การทำความสะอาดและบันทึกการใช้เครื่อง

คลิกเมนู Daily Clean

↓

หากใช้ Microplate ให้เลือกชนิดของก้นเพลต (U-bottom หรือ V-bottom) และระบุตำแหน่งหลุมที่บรรจุ Flow Clean (สีเหลือง) จำนวน 3 wells และ DI water (สีฟ้า) จำนวน 5 wells โดยเติมสารละลาย 250 µL/well

↓

หากใช้ Tube ให้เตรียม Flow Clean solution ปริมาตร 2 mL จำนวน 1 หลอด
และ DI water ปริมาตร 2 mL จำนวน 1 หลอด

↓

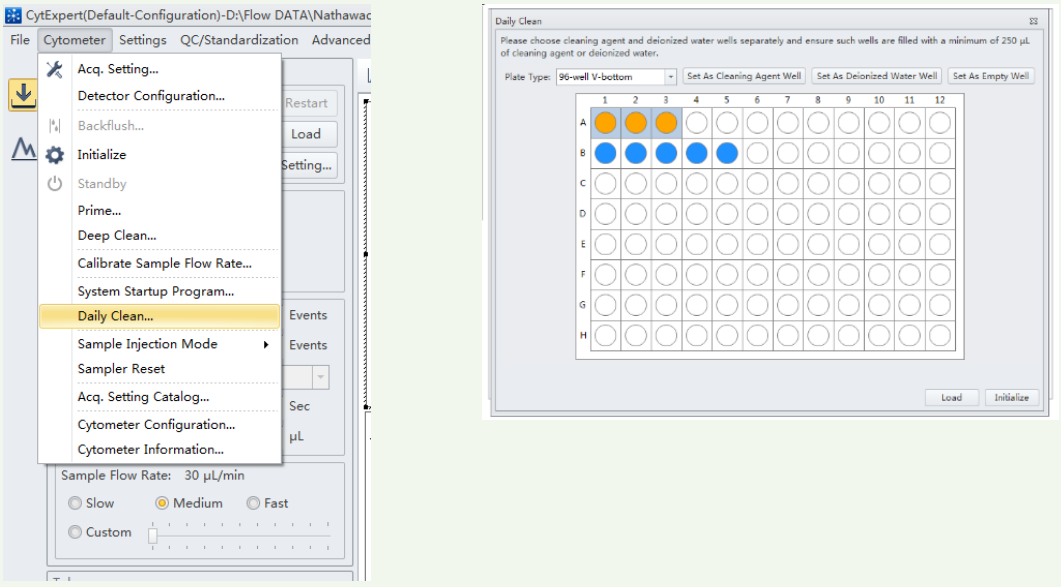
คลิก Load เพื่อนำตัวอย่างเข้าสู่ตำแหน่งทำงาน

↓

คลิก Start เพื่อเริ่มกระบวนการ Daily Clean

↓

เมื่อโปรแกรมทำงานเสร็จสิ้น ให้นำ Microplate หรือ Tube ออกจากเครื่อง และปิดหน้าต่าง Daily Clean



ภาพที่ 19 การเลือกโปรแกรมสำหรับทำความสะอาด

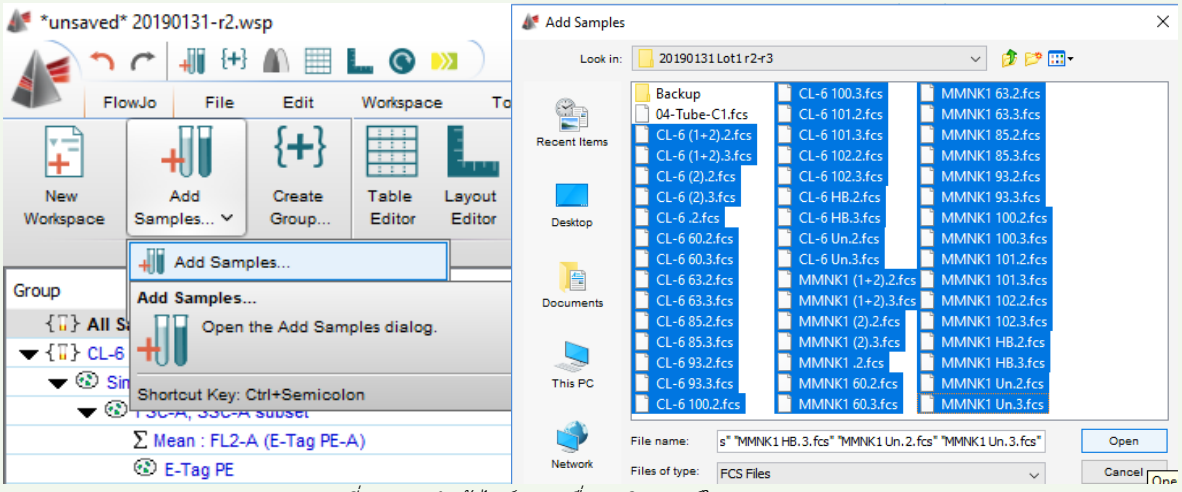
4.1.10 การวิเคราะห์ด้วย FlowJo และการรายงานผล

(ในที่นี่เป็น version 10)

การนำเข้าข้อมูล (Import Data)

เปิดโปรแกรมและนำเข้าตัวอย่าง

คลิก Add Samples แล้วเลือกไฟล์ .fcs



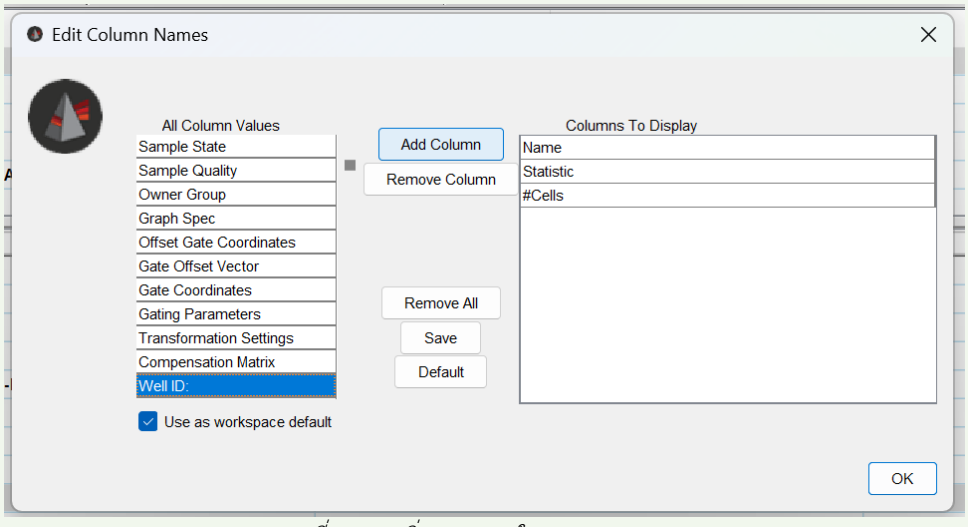
ภาพที่ 20 การนำเข้าไฟล์ .fcs เพื่อการวิเคราะห์ใน Flowjo software

↓

ไฟล์ที่นำเข้าจะปรากฏใน All Samples Group

↓

สามารถเพิ่มหรือลด Columns ได้จาก Edit Columns เช่น Well ID สามารถกำหนดรหัสเพื่อช่วยจัดเรียงตัวอย่าง



ภาพที่ 21 การเพิ่ม column ใน FlowJo software

	Well ID:
16957	a1
16477	a2
16607	a3
16165	a4
16397	a5
16539	a6
16930	a7
16708	a8
16871	a9
18548	a10
18401	a11

ภาพที่ 22 การกำหนดชื่อใน column เพื่อง่ายต่อการเรียงลำดับ sample

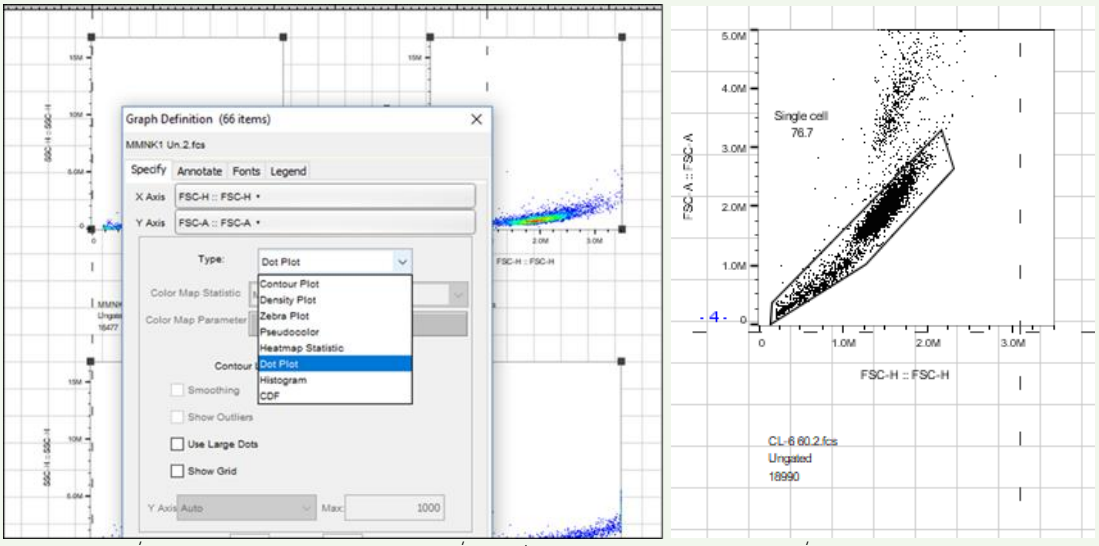
การสร้าง Gate

ดำเนินการสร้าง Gate ตามลำดับ ดังนี้

↓

Gate ครั้งที่ 1 เลือก single cells กราฟ FSC-A vs FSC-H

เลือกเฉพาะเซลล์เดี่ยว (Single Cells) กลุ่มเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นทแยงมุมระหว่างสองแกน

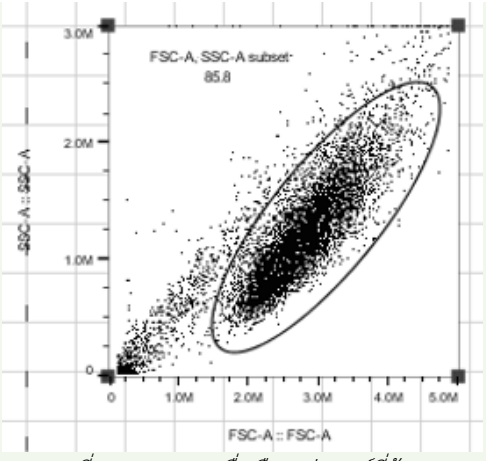


ภาพที่ 23 ซ้ายคือการเลือกลักษณะ event ที่แสดงเป็น dot plot, ขวาคือการ gate เพื่อเลือกเฉพาะ single cell

↓

Gate ครั้งที่ 2 เลือก populations ที่ต้องการ

กราฟ FSC-A vs SSC-A เลือกประชากรเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์

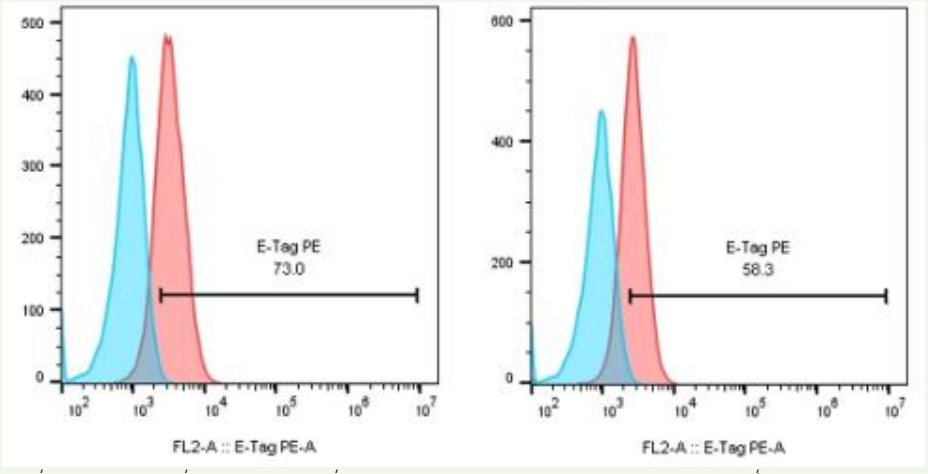


ภาพที่ 24 การ gate เพื่อเลือกกลุ่มเซลล์ที่ต้องการ

↓

Gate ครั้งที่ 3 เลือกเซลล์ที่ติดแอนติบอดี

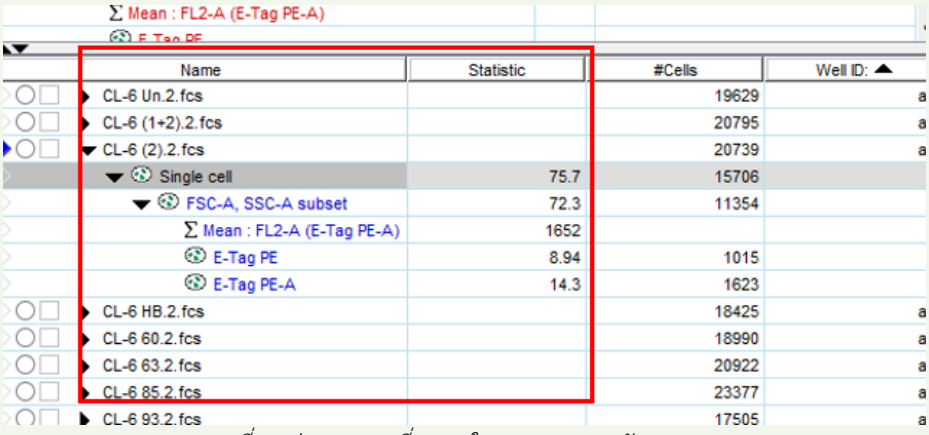
กราฟ PE-A vs SSC-A แยกเซลล์ที่ให้สัญญาณ PE-positive และ PE-negative



ภาพที่ 25 การ gate เพื่อเลือกกลุ่มเซลล์ที่ติดแอนติบอดี (สีแดง) จะอยู่ทางด้านขวาของกลุ่มที่ไม่ติดแอนติบอดี (สีฟ้า)

↓

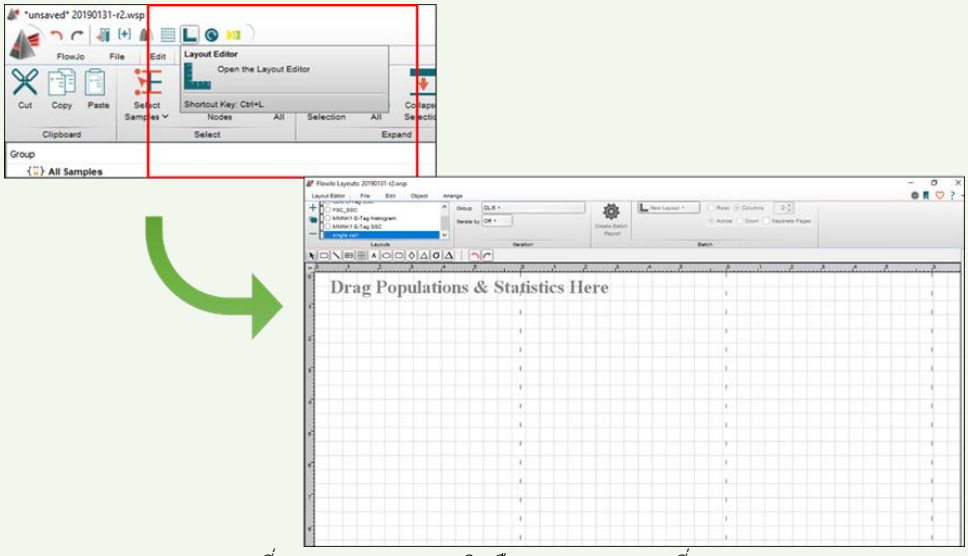
หลังจาก Gating แล้ว ค่าทางสถิติจะปรากฏใน Worksheet



ภาพที่ 26 ค่า statistic ที่ปรากฏใน worksheet หลังจาก gating

การสร้าง Layout

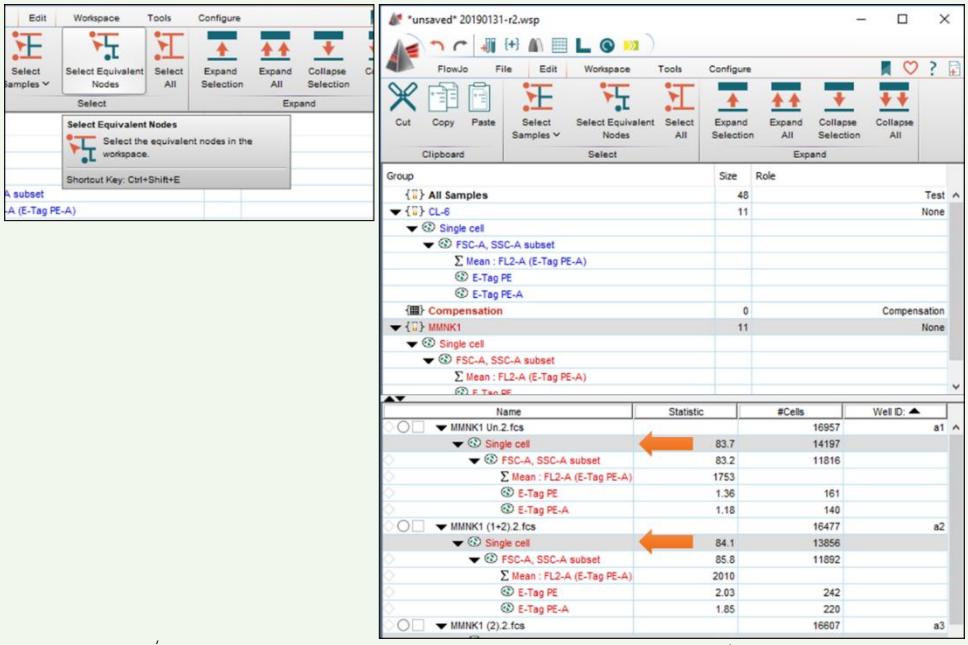
เปิด Layout Editor ที่แถบเมนู



ภาพที่ 27 Layout จากการคลิกเลือก Layout Editor ที่แถบเมนู

↓

เลือก Sample หรือ Subset แล้วลากไปวางใน Layout ได้เลย

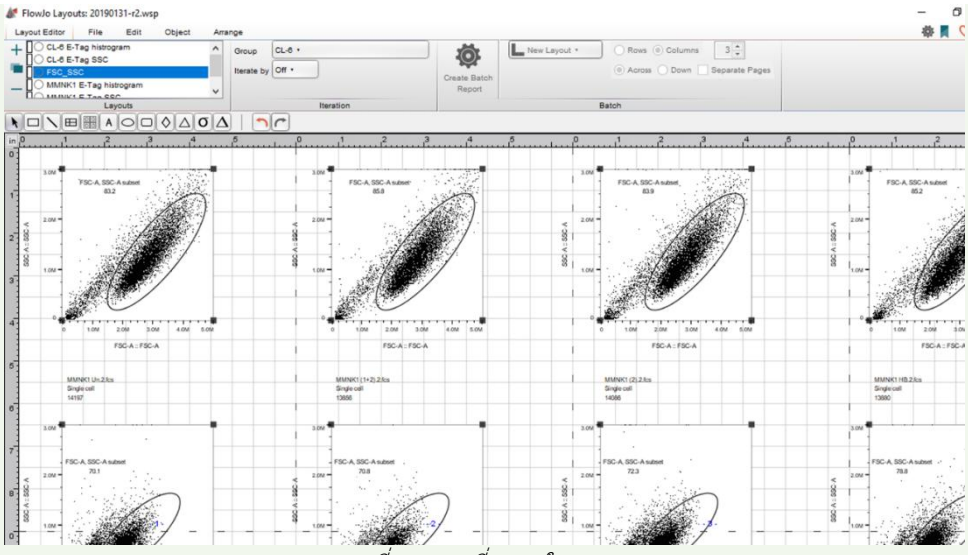


ภาพที่ 28 การเลือกหัวข้อย่อยใน worksheet ของหลาย sample ก่อนลากไปวางใน Layout

↓

รูปกราฟจะปรากฏใน Layout

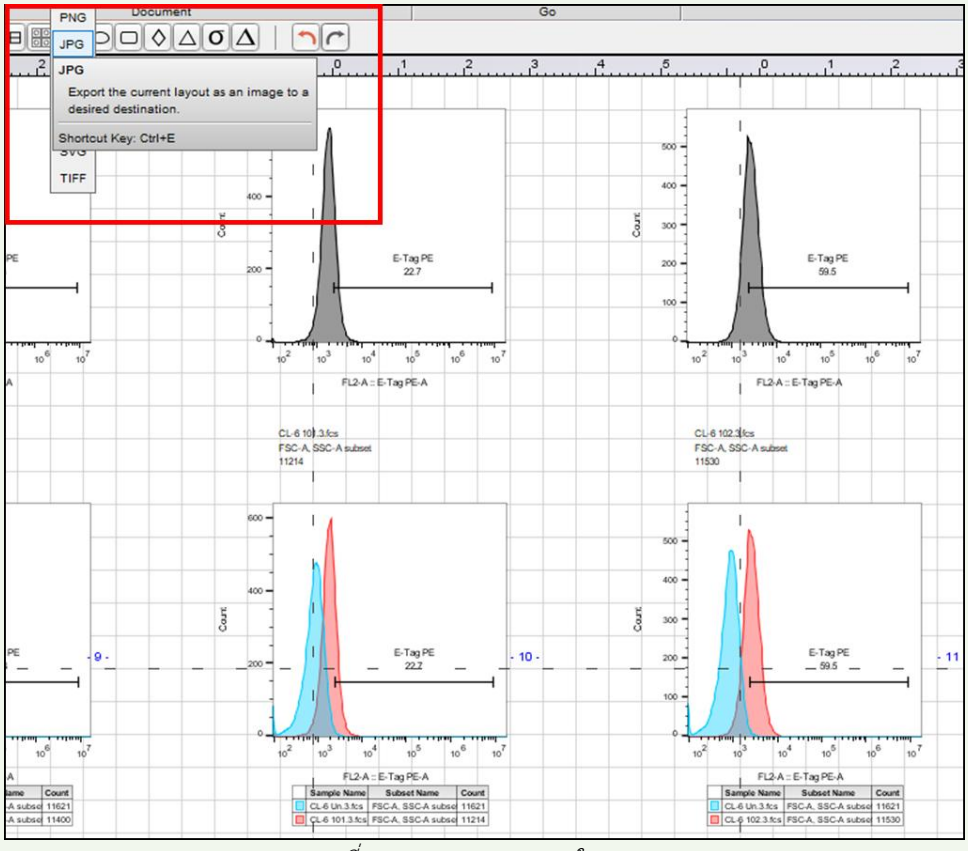
สามารถเปลี่ยนชนิดของกราฟที่แสดงได้โดยการ double click ที่กราฟเลือก dotplot หรือ histogram



ภาพที่ 29 กราฟที่ปรากฏใน Layout

การส่งออกภาพ

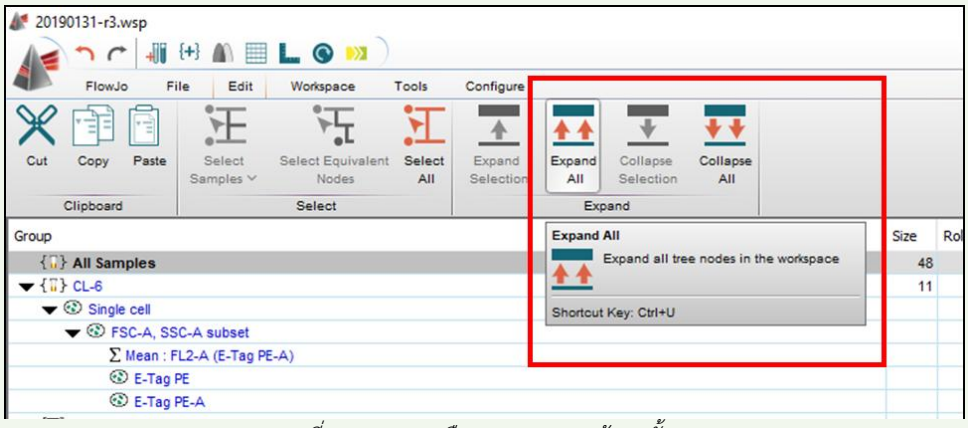
ภาพกราฟใน Layout สามารถ Export โดยเลือก File กด Export เลือก JPG



ภาพที่ 30 การ export ภาพจากใน Layout

การส่งออกข้อมูล

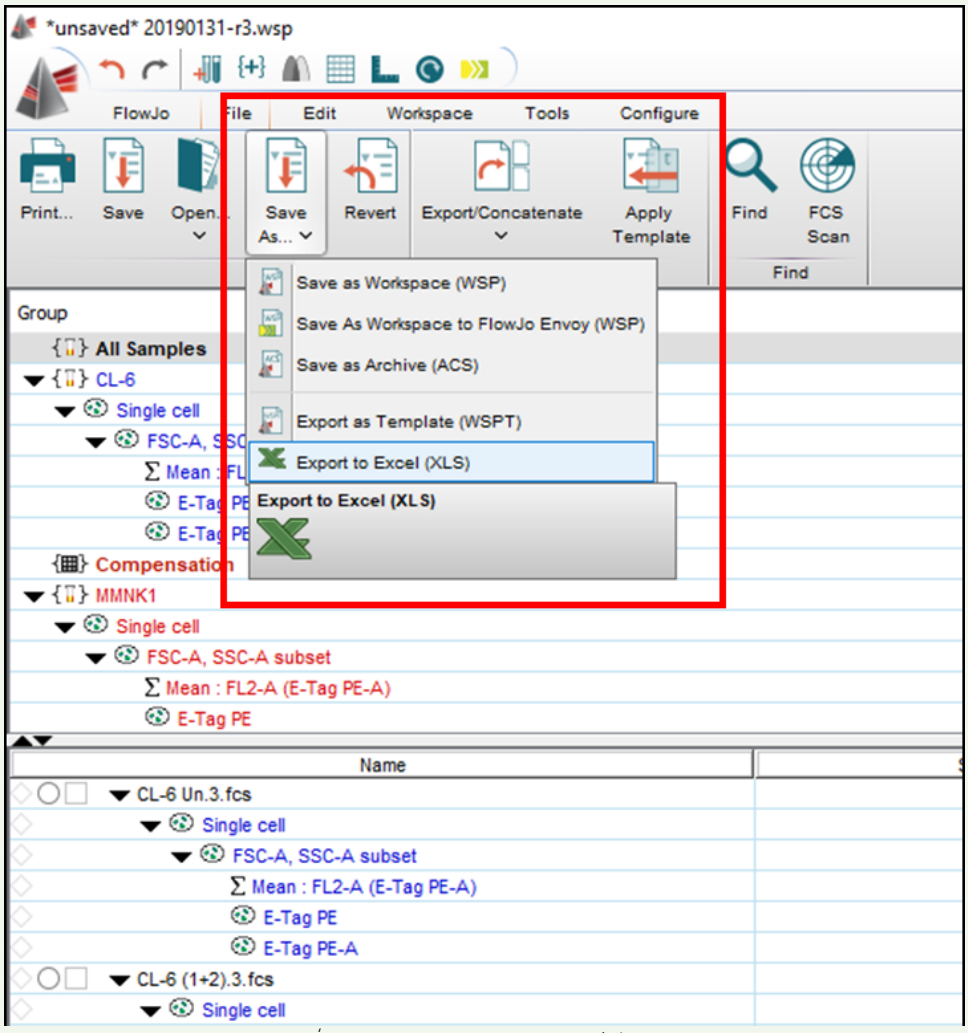
ให้เลือก Expand All เพื่อแสดงข้อมูลทั้งหมด



ภาพที่ 31 แสดงการเลือก Expand all ข้อมูลทั้งหมด

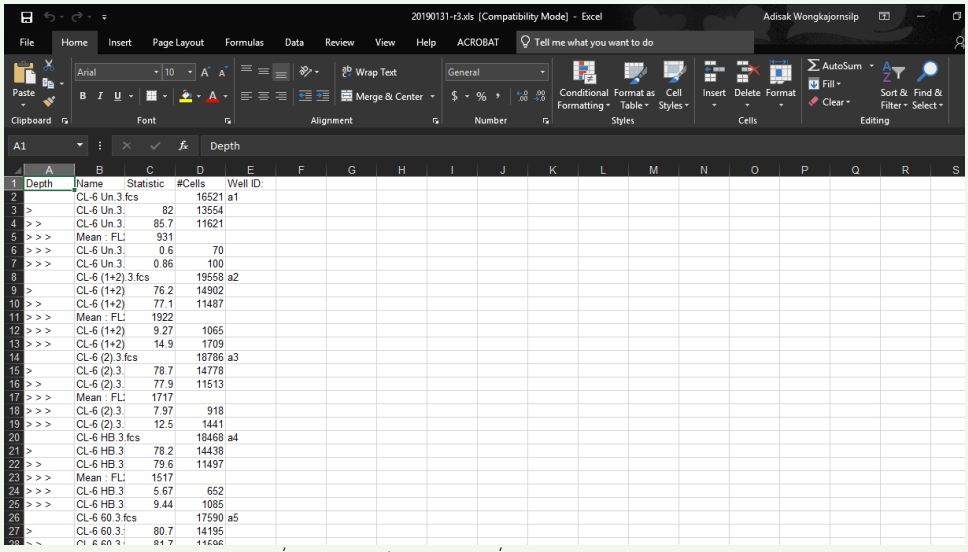
↓

จากนั้นเลือก File → Save As → Excel เพื่อส่งออกค่าทางสถิติสำหรับนำไปวิเคราะห์ใน GraphPad Prism



ภาพที่ 32 การบันทึกข้อมูล statistics เป็นไฟล์ excel

ข้อมูลใน Excel นำไปสร้างกราฟใน Graphpad



20190131-r3.xls [Compatibility Mode] - Excel

Depth	Name	Statistic	#Cells	Well ID:
	CL-6 Un.3.fcs		16521	a1
>	CL-6 Un.3.	82	13554	
> >	CL-6 Un.3.	85.7	11621	
> > >	Mean : FL:	931		
> > >	CL-6 Un.3.	0.6	70	
> > >	CL-6 Un.3.	0.86	100	
	CL-6 (1+2).3.fcs		19558	a2
>	CL-6 (1+2)	76.2	14902	
> >	CL-6 (1+2)	77.1	11487	
> > >	Mean : FL:	1922		
> > >	CL-6 (1+2)	9.27	1065	
> > >	CL-6 (1+2)	14.9	1709	
	CL-6 (2).3.fcs		18786	a3
>	CL-6 (2).3.	78.7	14778	
> >	CL-6 (2).3.	77.9	11513	
> > >	Mean : FL:	1717		
> > >	CL-6 (2).3.	7.97	918	
> > >	CL-6 (2).3.	12.5	1441	
	CL-6 HB.3.fcs		18468	a4
>	CL-6 HB.3.	78.2	14438	
> >	CL-6 HB.3.	79.6	11497	
> > >	Mean : FL:	1517		
> > >	CL-6 HB.3.	5.67	652	
> > >	CL-6 HB.3.	9.44	1085	
	CL-6 60.3.fcs		17590	a5
>	CL-6 60.3.	80.7	14195	

ภาพที่ 33 ตัวอย่างไฟล์ Excel ที่ส่งออกจากโปรแกรม FlowJo

5. ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน

5.1 กรณีไม่พบแถบโปรตีนหรือแถบโปรตีนมีความเข้มต่ำ

สาเหตุที่อาจเกิดขึ้น	แนวทางการแก้ไข
การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ไม่เพียงพอ	ตรวจสอบระยะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อนชักนำการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้ OD_{600} ประมาณ 0.3–0.5 ตามเงื่อนไขที่กำหนด
สภาวะการชักนำการแสดงออกของโปรตีนไม่เหมาะสม	ปรับความเข้มข้นของ IPTG อุณหภูมิ และระยะเวลาการชักนำให้เหมาะสม
การแสดงออกของโปรตีนก่อนการชักนำ	ใช้ starter culture ที่เหมาะสม และพิจารณาเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ HB2151 เพื่อลดการแสดงออกของโปรตีนก่อนการชักนำ
การถ่ายโอนโปรตีน (protein transfer) ไปยังเมมเบรนไม่สมบูรณ์	ย้อมเมมเบรนด้วย Ponceau S เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายโอน และปรับสภาวะการถ่ายโอนให้เหมาะสม
ปริมาณโปรตีนที่โหลดไม่เพียงพอ	ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนและปรับปริมาณโปรตีนที่โหลดให้เหมาะสม
การตรวจจับด้วยแอนติบอดีไม่มีประสิทธิภาพ	ตรวจสอบคุณภาพของ primary และ secondary antibodies ใช้สารละลายแอนติบอดีที่เตรียมใหม่เมื่อจำเป็น และปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม
พลาสมิดหรือยีนเป้าหมายสูญหาย	ตรวจสอบพลาสมิดด้วย PCR หรือ DNA sequencing คัดเลือก single colony ใหม่ และทดสอบการแสดงออกของโปรตีนซ้ำ พร้อมจัดเก็บเชื้อ stock ที่ผ่านการตรวจสอบ

5.2 การไม่พบสัญญาณเรืองแสงในการตรวจด้วย Flow Cytometry

สาเหตุที่อาจเกิดขึ้น	แนวทางการแก้ไข
แอนติบอดีไม่เหมาะสมกับเทคนิค Flow Cytometry	ตรวจสอบข้อมูลการใช้งานแอนติบอดีและความสามารถในการตรวจจับแอนติเจนบนผิวเซลล์ โดยใช้ rabbit anti-E-tag ร่วมกับ goat anti-rabbit IgG-PE ตามระบบตรวจจับที่กำหนด
ความเข้มข้นของแอนติบอดีต่ำเกินไป	ปรับปริมาณแอนติบอดีในช่วง 0.1–1.0 μg/test ตามเงื่อนไขการทดลอง โดยการทดลองเดิมพบว่าปริมาณ 0.5 μg/test สามารถแยกประชากรที่ให้สัญญาณบวกและลบได้ชัดเจน
การจับระหว่าง HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์ไม่เพียงพอ	ตรวจสอบคุณภาพ HuScFv และปรับสภาวะการจับ เช่น ความเข้มข้น ระยะเวลา และอุณหภูมิ ให้เหมาะสม
การตั้งค่าช่องตรวจวัดหรือพารามิเตอร์ไม่เหมาะสม	ตรวจสอบการเลือกช่อง PE ค่า Gain และ Threshold รวมถึงผล Daily QC ก่อนวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.3 การปนเปื้อนในสารสกัดโปรตีน Soluble HuScFv

สาเหตุที่อาจเกิดขึ้น	แนวทางการแก้ไข
การทำลายเซลล์แบคทีเรียด้วย sonication ไม่สมบูรณ์	ตรวจสอบประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ และปรับสภาวะ sonication ให้เหมาะสม
มีเศษเซลล์หรือเซลล์แบคทีเรียตกค้างในสารสกัด	ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเศษเซลล์และเก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) หากจำเป็นให้พิจารณากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 µm โดยตรวจสอบผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพโปรตีน
การเก็บรักษา Soluble HuScFv ไม่เหมาะสม	หลีกเลี่ยงการเก็บที่ 4°C เป็นเวลานาน แบ่งตัวอย่างเป็น aliquots และเก็บที่ −20°C หรือ −80°C ตามความเหมาะสม
โปรตีนเสื่อมสภาพระหว่างการเก็บรักษา	ลดการแช่แข็งและละลายซ้ำ และตรวจสอบคุณภาพโปรตีนด้วย SDS-PAGE หรือ Western blotting รวมถึงทดสอบความสามารถในการจับก่อนใช้งาน
ต้องการเตรียม Soluble HuScFv ใหม่	สามารถเก็บตัวอย่างแบคทีเรียในรูปแบบ cell pellet ที่อุณหภูมิ −20°C หรือ −80°C ตามวิธีที่ผ่านการตรวจสอบ และนำมาสกัดโปรตีนใหม่เมื่อจำเป็น

5.4 จำนวนเซลล์ HubCCA1 หรือ MMNK1 ไม่เพียงพอสำหรับการทดลอง

สาเหตุที่อาจเกิดขึ้น	แนวทางการแก้ไข
การวางแผนจำนวนเซลล์ไม่เพียงพอ	คำนวณจำนวนเซลล์ตามจำนวนกลุ่มทดลอง และเตรียมเซลล์สำรองเพื่อรองรับการสูญเสียระหว่างการเตรียมตัวอย่าง
เซลล์ยังไม่ฟื้นตัวหลังการละลายจากการแช่แข็ง	เพาะเลี้ยงให้เซลล์ฟื้นตัวและมีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ โดยอาจถ่ายเลี้ยงเซลล์อย่างน้อย 2 ครั้งตามแนวทางของห้องปฏิบัติการก่อนนำไปทดลอง
การเตรียมเซลล์ทำให้เซลล์เสียหาย	เลือกวิธีแยกเซลล์ที่เหมาะสม เช่น Accutase และหลีกเลี่ยงการสัมผัสเอนไซม์นานเกินความจำเป็น
โปรตีนบนผิวเซลล์ได้รับผลกระทบจากการแยกเซลล์	ตรวจสอบความเหมาะสมของวิธีแยกเซลล์ต่อแอนติเจนเป้าหมาย และลดระยะเวลาการสัมผัสเอนไซม์ตามที่จำเป็น
เซลล์มีความมีชีวิตต่ำหรือสูญเสียระหว่างการเตรียม	ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วย Trypan Blue exclusion assay และปรับขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การล้าง และการปั่นเหวี่ยงเพื่อลดการสูญเสียเซลล์

6. ข้อเสนอแนะ

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์การจับระหว่างแอนติบอดี HuScFv กับแอนติเจนบนผิวเซลล์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry ผู้จัดทำมีข้อเสนอแนะสำหรับการปฏิบัติงานดังต่อไปนี้

- **การเตรียมเซลล์และการควบคุมคุณภาพตัวอย่าง**

ควรเลือกใช้เซลล์ที่มีสภาพสมบูรณ์และเหมาะสมต่อการทดลอง โดยใช้เอนไซม์ Accutase ในการแยกเซลล์ และควบคุมระยะเวลาการสัมผัสเอนไซม์ให้เหมาะสม เพื่อลดผลกระทบต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์ พร้อมทั้งเตรียมเซลล์ให้กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว (single-cell suspension) เพื่อลดการจับกลุ่มของเซลล์ (cell aggregation) และดำเนินการย้อมแอนติบอดีภายในระยะเวลาที่เหมาะสมหลังการเก็บเกี่ยวเซลล์ นอกจากนี้ ผู้เขียนเลือกใช้ไมโครเพลตก้นวี (V-bottom plate) เพื่อช่วยให้เซลล์รวมตัวเป็นตะกอนบริเวณก้นหลุม และลดการสูญเสียเซลล์ระหว่างขั้นตอนการล้างและดูดสารละลายออก

- **การควบคุมคุณภาพและการเก็บรักษา HuScFv**

ควรตรวจสอบคุณภาพของ HuScFv ก่อนนำไปทดสอบ และเตรียมสารละลายโปรตีนใหม่เมื่อจำเป็น หากมีการเก็บรักษาควรแบ่งตัวอย่างเป็นส่วนย่อย (aliquots) และหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและละลายซ้ำ (repeated freeze–thaw cycles) เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเสื่อมสภาพของโปรตีนและการสูญเสียความสามารถในการจับกับแอนติเจนเป้าหมาย

- **การกำหนดค่าพารามิเตอร์และการเก็บข้อมูลด้วยเครื่อง Flow Cytometer**

ควรกำหนดอัตราการไหลของตัวอย่าง (sample flow rate) ให้เหมาะสม และควบคุมอัตราการเก็บข้อมูลเพื่อลดโอกาสเกิดการตรวจวัดเซลล์ซ้อนทับกัน (coincidence) โดยกำหนดจำนวนเหตุการณ์ที่เก็บข้อมูล (event count) ให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์ตามวัตถุประสงค์และเกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) ของแต่ละการทดลอง ทั้งนี้ ควรใช้ค่าพารามิเตอร์และเงื่อนไขการเก็บข้อมูลที่สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มทดลอง เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลได้อย่างน่าเชื่อถือ

- **การกำหนดกลุ่มควบคุมและการวิเคราะห์ข้อมูล**

ควรใช้กลุ่มควบคุมที่เหมาะสม ได้แก่ unstained control, primary antibody control, secondary antibody control และ HB2151 lysate control เพื่อประเมินสัญญาณพื้นหลังและการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดี เนื่องจากการศึกษานี้ใช้สารเรืองแสง phycoerythrin (PE) เพียงชนิดเดียว จึงไม่จำเป็นต้องปรับค่าชดเชยสัญญาณเรืองแสง (fluorescence compensation) ระหว่างสี อย่างไรก็ตาม หากมีการใช้สารเรืองแสงหลายชนิดที่มีสัญญาณซ้อนทับกัน ควรใช้ single-stained controls สำหรับปรับค่าชดเชยสัญญาณ นอกจากนี้ ควรกำหนดประชากรเซลล์ที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยวิธี gating อย่างเป็นระบบ โดยใช้กราฟ FSC-A เทียบกับ FSC-H เพื่อคัดเลือกเซลล์เดี่ยว (singlets) จากนั้นใช้กราฟ FSC-A เทียบกับ SSC-A เพื่อเลือกประชากรเซลล์ที่สนใจ ก่อนวิเคราะห์สัญญาณเรืองแสง

- **การควบคุมความสม่ำเสมอและความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง**

ควรดำเนินการเตรียมตัวอย่าง การย้อมแอนติบอดี และการเก็บข้อมูลภายใต้เงื่อนไขที่สอดคล้องกันระหว่างกลุ่มทดลอง รวมถึงบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเซลล์ การเตรียม HuScFv และการตั้งค่าเครื่องมืออย่างครบถ้วน เพื่อช่วยลดความแปรปรวนของผลการทดลอง เพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูล และสามารถตรวจสอบย้อนหลังได้

บรรณานุกรม

1. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. Science. 1965;150(3698):910-1.
2. Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting. Sci Am. 1976;234(3):108-17.
3. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytometry A. 2004;62(2):169-73.
4. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol. 2004;4(8):648-55.
5. Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk TV, O'Hara SP, LaRusso NF. Physiology of cholangiocytes. Compr Physiol. 2013;3(1):541-65.
6. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2020;17(9):557-88.
7. Biosciences I. Flow Cytometry Bangalore Bioinnovation Centre [2025 Jun 25]. Available from: https://immunitasbio.com/services/flow-cytometry/.
8. Coulter B. Instructions for Use-CytoFLEX Flow Cytometer. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821 U.S.A.2015. 356 p.
9. Coulter B. CytoFLEX Platform-CytoFLEX, CytoFLEX S, and CytoFLEX LX Flow Cytometers. 250 S. Kraemer Blvd. Brea, CA 92821 U.S.A.2021. 696 p.
10. Abcam, company B. What is flow cytometry? [Available from: https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/guides/flow-cytometry-guide/what-is-flow-cytometry.
11. Scientific TF. How a Flow Cytometer Works [Available from: https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html.
12. FlowJo. Basic Tutorial Data Analysis Software for Flow Cytometry2018. 45 p.