



การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ
โรคพราเดอร์-วิลลี และแองเจิลแมน
ด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน **SNRPN**

Laboratory Diagnostics for
Prader willi/Angelman syndrome
using Methylation Specific PCR for **SNRPN** gene

คู่มือปฏิบัติงาน



ออรุณวรรณ ปลั่งอ่อน

หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี
และแองเจิลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์
ของยีน *SNRPN*

Laboratory Diagnostics for Prader-Willi
/Angelman Syndrome using Methylation-Specific
PCR for *SNRPN* gene.

ออรุณวรรณ ปลั่งอ่อน

หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คำนำ

คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนด้วยวิธีการเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ยีน *SNRPN* เล่มนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางสำหรับ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ หรือนักเทคนิคการแพทย์ และบุคลากรที่ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั้งในโรงพยาบาลที่สังกัดกระทรวงสาธารณสุข สังกัดมหาวิทยาลัย หรือห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ของเอกชน โดยมีขอบเขตเนื้อหาเกี่ยวกับการการรับส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ การวิเคราะห์หาความผิดปกติดีเอ็นเอในผู้ป่วยกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน ด้วยวิธีการเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ยีน *SNRPN* การแปลผลและการรายงานผลการทดสอบ รวมถึงสรุปปัญหา อุปสรรค แนวทางแก้ไข ป้องกันปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในทุกขั้นตอนของการทดสอบ อีกทั้งยังมีข้อเสนอแนะงานวิจัยเพิ่มเติม เรื่องการระบุสาเหตุกลไกการเกิดโรคของผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนครอบครัวของผู้ป่วย ทั้งช่วยลดความกังวลและลดการเป็นกลับซ้ำในลูกคนถัดไป

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเนื้อหาในคู่มือจะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่าน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้านอณูพันธุศาสตร์ในผู้ป่วยกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนและผู้ป่วยโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ ที่ใช้เทคนิคการตรวจที่คล้ายคลึงกัน หากคู่มือเล่มนี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนมีความยินดีน้อมรับคำแนะนำและแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็นจากผู้อ่านทุกท่านเพื่อนำไปปรับปรุงแก้ไขต่อไป

ออรุณวรรณ ปลั่งอ่อน
มีนาคม 2566

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ อ.อารีรัตน์ หนูนวล อาจารย์ประจำหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ที่ช่วยให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขคู่มือเล่มนี้จนทำให้เนื้อหาสมบูรณ์มากขึ้น

ขอบคุณเพื่อนร่วมงาน คุณจริยา ข่ายม่าน คุณพรศิริ แสงมณี และคุณพรรธภา นิชานนท์ ที่มีส่วนร่วมในการรวบรวมข้อมูล ช่วยถ่ายภาพประกอบเนื้อหาในคู่มือ และคอยให้กำลังใจในการทำคู่มือเล่มนี้จนสำเร็จ

ออรุณวรรณ ปลั่งอ่อน

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญแผนภูมิ	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขต	2
นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ	3
บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ	5
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	5
ลักษณะงานที่ปฏิบัติ	5
โครงสร้างการบริหารจัดการ	8
บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข	12
หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	12
วิธีการปฏิบัติงาน	12
1.ด้านบุคลากร	12
2.สถานที่และสภาพแวดล้อม	13
3.เครื่องมือห้องปฏิบัติการ น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง	13
4.กระบวนการก่อนการทดสอบ (pre-examination processes)	13
5.กระบวนการทดสอบ (examination Processes)	15
6.การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการทดสอบ	16
7.กระบวนการหลังการทดสอบ (post-examination processes)	16
8.การรายงานผล (reporting of results)	17
9.การออกผลการทดสอบ	17
10.การจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ	17

	หน้า
เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน	17
แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
1.แนวคิดการจัดการกระบวนการก่อนทดสอบ	21
2.วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	27
2.1.การสกัดดีเอ็นเอด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	28
2.2.การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ซิลิกาเมทริกซ์	29
3.การทำไบซัลต์ คอนเวอร์ชัน (bisulfite conversion)	29
4.โรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจลแมน	32
4.1.ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน	32
4.2.กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน	33
5.วิธีการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน	36
5.1.การทดสอบเมทิลเลชันสเปคิฟิฟิซีอาร์ยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน	37
5.2.การตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	39
5.2.1.ชนิดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	39
5.2.2.บัฟเฟอร์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	39
บทที่ 4 เทคนิคในการปฏิบัติงาน	41
แผนปฏิบัติงาน	41
ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	43
1.การรับส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์สำหรับตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ	43
2.การลงทะเบียนรับและออกรหัส	46
3.การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)	50
3.1. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA	50
3.2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มจากตัวอย่างน้ำคร่ำ	54
3.3. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มจากตัวอย่างเลือด	60
4.การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ	63

	หน้า
5.การทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน	68
5.1.ไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแบบวิธีดั้งเดิม	68
5.2.ไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันชุดน้ำยาสำเร็จรูป	70
6.การทำเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคฟิชัวร์ของยีน <i>SNRPN</i>	72
7.การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)	84
8.การแปลผลและการรายงานผลการทดสอบ	94
8.1.การแปลผลการทดสอบ	94
8.2.การรายงานผลการทดสอบ	96
วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน	98
จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน	102
บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน	106
ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไข	106
แนวทางพัฒนา	111
ข้อเสนอแนะ	113
บรรณานุกรม	114
ภาคผนวก	118
ภาคผนวก ก ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์	118
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการรับบริการทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา	120
ภาคผนวก ค สูตรและวิธีการเตรียมสารในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ	
เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น	
สเปคซิฟิคฟิชัวร์ของยีน <i>SNRPN</i>	121
ภาคผนวก ง วิธีการนับจำนวนเซลล์น้ำคร่ำด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์	130
ภาคผนวก จ สรุปข้อไม่สอดคล้องหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์	
ปีงบประมาณ 2563-2564	132
ประวัติผู้เขียน	133

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ชนิดสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์และประเภทการทดสอบ	22
ตาราง 2 แนวทางปฏิบัติในการเก็บตัวอย่าง การขนส่งและการเก็บรักษา	25
ตาราง 3 แนวทางปฏิบัติในการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจในงานตรวจวิเคราะห์ห้อณูพันธุศาสตร์	26
ตาราง 4 วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้กันทั่วไป	27
ตาราง 5 กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS)	34
ตาราง 6 กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรคแอนเจิลแมน (AS)	36
ตาราง 7 วิธีการทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) ในปัจจุบัน	37
ตาราง 8 วิธีการทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคแอนเจิลแมน (AS) ในปัจจุบัน	37
ตาราง 9 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์จากงานวิจัย Kubota T ปี ค.ศ. 1997	38
ตาราง 10 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์จากงานวิจัย Hussain Askree S ปี ค.ศ. 2011	38
ตาราง 11 รายการตรวจสอบคุณลักษณะสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจิลแมน	44
ตาราง 12 เทคนิคและข้อพึงระวังในการรับและลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์	48
ตาราง 13 ปริมาตรสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA	52
ตาราง 14 สารเคมีในแต่ละขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์น้ำคร่ำและเลือดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม	56
ตาราง 15 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิฟิซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> การทดสอบชุดแรก (Kubota's primer set)	80
ตาราง 16 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิฟิซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> การทดสอบชุดที่ 2 (Alternative primer set)	81
ตาราง 17 สภาวะการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิฟิซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i>	83

สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพ 1	หลอดเก็บเลือดฝาสีม่วง (EDTA tube) สำหรับงานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ	24
ภาพ 2	หลักการทำให้ bisulfite conversion เพื่อเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สถานะเมทิลเลชันของยีน <i>SNRPN</i> ด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปซิฟิฟิซาร์	31
ภาพ 3	แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยา deamination ของเบสไซโตซีน (Cytosine, C) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ (HSO3) ในการทำให้ bisulfite conversion	32
ภาพ 4	แบบจำลองการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ imprinting บนโครโมโซมคู่ที่ 15 บริเวณ 15q11-q13 (PWS/AS region)	33
ภาพ 5	สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA Kit	53
ภาพ 6	การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารฟีนอลคลอโรฟอร์ม	57
ภาพ 7	เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)	73
ภาพ 8	ทิปบรรจุกล่องขนาดต่างๆ	74
ภาพ 9	หลอดทดลองขนาดต่างๆที่ใช้ในงานอณูชีววิทยา	75
ภาพ 10	ตู้ฟิซาร์และการจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ในการทำฟิซาร์	75
ภาพ 11	ตัวอย่างใบงาน (work sheet) สำหรับบันทึกการทำฟิซาร์	80
ภาพ 12	แสดงการเลื่อนหลอดไปแถวใหม่หลังจากเติมสารเคมีหลอดนั้นลงในหลอดมาสเตอร์มิกซ์เสร็จสิ้น	82
ภาพ 13	เทคนิคปิเปตดูดสารขึ้น-ลง (pipette up and down) เพื่อผสมสาร	82
ภาพ 14	รูปแบบการวางหลอดที่เหมาะสมกับเครื่องฟิซาร์แต่ละแบบ	83
ภาพ 15	ชุดเครื่องมือวัสดุและอุปกรณ์สำหรับการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	85
ภาพ 16	ผงเจลอะกาโรสชนิด Low gelling/melting temperature	85
ภาพ 17	การตรวจสอบสอระนาบพื้นโต๊ะด้วยการใช้ลูกน้ำวัดระนาบพื้นผิว	86
ภาพ 18	การประกอบแม่พิมพ์ขึ้นรูปเจลอะกาโรสและหีสรางหลุมเจล (well)	87
ภาพ 19	แสดงการขั้นตอนการซังเจลอะกาโรสและแช่ผงเจลใน TAE buffer	88
ภาพ 20	ขั้นตอนการละลายเจลด้วยไมโครเวฟ	89

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 21	ขั้นตอนการเทเจลอะกาโรสลงแม่พิมพ์
ภาพ 22	ขั้นตอนการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส
ภาพ 23	ขั้นตอนการย้อมเจลด้วย ethidium bromide และการถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง gel documentation
ภาพ 24	ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ของการทดสอบเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน
ภาพ 25	ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ของการทดสอบเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน
ภาพ 26	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแสดงลักษณะผลการทดสอบที่มีคุณภาพและน่าเชื่อถือได้ของการทดสอบเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยไพรเมอร์ชุดแรก
ภาพ 27	อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแสดงลักษณะผลการทดสอบที่มีคุณภาพและน่าเชื่อถือได้ของการทดสอบเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยไพรเมอร์ชุดสอง
ภาพ 28	แบบจำลองผลการทดสอบเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนรูปแบบใหม่ที่นำเสนอในคู่มือนี้
ภาพ 29	สไลด์นับจำนวนเซลล์ (ฮีโมไซโตมิเตอร์)

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิ 1 โครงสร้างองค์กร (Organization Chart)	9
แผนภูมิ 2 โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)	10
แผนภูมิ 3 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity chart)	11
แผนภูมิ 4 แผนปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเคอร์-วิลลี และแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i>	42

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลี (Prader-willi syndrome, PWS) และแองเจิลแมน (Angelman syndrome, AS) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีสาเหตุการเกิดโรคจากความผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 15 แขนข้างยาวที่ตำแหน่ง q11-q13 ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า “PWS/AS region” โดยความชุกของโรค PWS พบประมาณ 1:10,000 ถึง 1: 30,000 และโรค AS พบประมาณ 1:12,000 ถึง 1: 20,000 (1-3) โรคกลุ่มนี้จัดอยู่ในโรคหายาก (rare disease) พบได้น้อย แต่ตัวโรคมีความรุนแรงสูง ผู้ป่วยมักจะมีลักษณะอาการพัฒนาการล่าช้าตั้งแต่แรกเกิด และอาการจะรุนแรงขึ้นจนไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองในชีวิตประจำวันได้ แม้เป็นโรคที่รักษาไม่หาย แต่การตรวจวินิจฉัยโรคตั้งแต่ช่วงต้นของอายุ และเข้ารับการรักษาทันที จะช่วยให้การพยากรณ์โรคดีขึ้น ทำให้ผู้ป่วยช่วยเหลือตัวเองเบื้องต้นในชีวิตประจำวันได้ ซึ่งจะช่วยลดภาระของผู้ปกครอง การตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแองเจิลแมนในปัจจุบัน ใช้เกณฑ์การวินิจฉัยทางคลินิกโรคพราเดอร์-วิลลีที่พัฒนาขึ้นในปี 1993 (4) และโรคแองเจิลแมนใช้เกณฑ์ที่ถูกพัฒนาโดยคณะกรรมการที่ปรึกษาทางวิทยาศาสตร์ของมูลนิธิ US Angelman Syndrome (5) ซึ่งเป็นเกณฑ์ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าแม่นยำ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยด้วยอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวในผู้ป่วยบางรายที่การดำเนินโรคไม่ชัดเจนไม่ครบตามเกณฑ์การวินิจฉัยทางคลินิก อาจต้องใช้ระยะเวลาานพอสมควร ดังนั้นจึงมีการนำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการมาช่วยยืนยันการวินิจฉัยทางคลินิก (Confirmatory diagnostics testing) ซึ่งทำได้อย่างรวดเร็ว ช่วยให้แพทย์วินิจฉัยโรคมีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น เพื่อนำไปสู่การรักษาที่เหมาะสมและทันเวลา

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแองเจิลแมนที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ เปิดบริการทดสอบมาตั้งแต่ปี 2550 เป็นต้นมา ด้วยรหัสกรรมบัญชีกลาง 37512 ราคาทดสอบ 2,500 บาท ซึ่งราคาครอบคลุมที่กรรมบัญชีกลางเบิกได้ ตรวจด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* (Methylation-Specific PCR for *SNRPN* gene) ที่พัฒนาขึ้นเอง (In-house method) โดยใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์อ้างอิงจากการศึกษาของ Kubota T และคณะปี ค.ศ. 1997 และ Hussain Askree S และคณะ ปี ค.ศ. 2011 (28, 29) ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่น่าเชื่อถือซึ่งเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ ใช้น้ำยาพีซีอาร์และสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นเอง และมีกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ (method validation) เพื่อยืนยันแล้วว่ามีผลถูกต้องและแม่นยำก่อนนำมาใช้จริง ปริมาณตัวอย่างส่งตรวจ มีประมาณ 2-3 ตัวอย่างต่อเดือนซึ่งเป็นจำนวนที่ค่อนข้างน้อย การใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปที่มีราคาแพงและมีอายุการเก็บสั้นเพียง 1-2 ปี จึงไม่เหมาะสมเพราะจะทำให้ต้นทุนทดสอบสูงเกินราคา

การทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นเอง แม้ว่าจะมีข้อดีเรื่องต้นทุนทดสอบต่ำกว่าชุดทดสอบสำเร็จรูป แต่หากเปรียบเทียบขั้นตอนการปฏิบัติงาน วิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองจะมีการเตรียมน้ำยาเอง ยุ่งยากกว่าการทดสอบสำเร็จรูป

จากการเก็บข้อมูลอัตราการเกิดอุบัติเหตุที่เกิดขึ้นกับการทดสอบด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ของหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ตั้งแต่ปี 2563-2565 พบว่ามีการทำซ้ำหลายครั้งในหนึ่งตัวอย่างทดสอบ ร้อยละ 30 และพบการแปลผลผิดเป็นผลบวกลงจำนวนหนึ่ง เหตุการณ์ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเกิดการรายงานผลคลาดเคลื่อนขึ้นได้ การวิเคราะห์สาเหตุผั่งก้างปลาจากอัตราอุบัติเหตุของหน่วยงาน พบว่าข้อผิดพลาดที่ทำให้เกิดการซ้ำ มีสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงานเอง (human error) ที่ขาดความรู้ความเข้าใจ รวมถึงลักษณะงานเป็นงานละเอียดที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ระดับตติยภูมิ งานมีหลายขั้นตอนต่อเนื่องกัน ซึ่งต้องใช้ประสบการณ์ความชำนาญเฉพาะด้านของผู้ปฏิบัติงานที่จะทำให้การทดสอบสำเร็จลุล่วง จากปัญหาดังกล่าว จึงจัดทำคู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน ด้วยเทคนิคการเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ปฏิบัติงานหรือผู้ร่วมที่ทำงานทดแทนในการตรวจทดสอบทางห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยวิธีเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN*
2. เพื่อเป็นคู่มือในการกำกับตรวจสอบการปฏิบัติงาน เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าคนทำงานสามารถปฏิบัติงานตามวิธีการที่กำหนดได้อย่างสม่ำเสมอและมีประสิทธิภาพ
3. เป็นเครื่องมือในการฝึกอบรมและสอนงาน
4. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานใช้อ้างอิงมิให้เกิดความผิดพลาดในการปฏิบัติงาน
5. เพื่อให้ผู้รับบริการได้รับการแปลผลการทดสอบที่ถูกต้อง

ขอบเขต

คู่มือนี้สำหรับผู้ปฏิบัติงานด้านอณูพันธุศาสตร์ ใช้เป็นแนวปฏิบัติในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน มีขอบเขตเนื้อหาเกี่ยวกับชนิดสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ การเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเมทิล

เลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* การควบคุมคุณภาพการทดสอบ การแปลผลการทดสอบ และการรายงานผลการทดสอบให้ผู้รับบริการ

นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ (Molecular genetics testing) หมายถึง ตรวจหาความผิดปกติของสารพันธุกรรม ด้วยการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลแบบต่างๆ เช่น เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction ,PCR), เทคนิคการไฮบริไดเซชัน (Hybridization), เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing), เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction fragment length polymorphism) และเทคนิคเน็กซ์ เจนเนอเรชัน ซีควนซิง (Next Generation sequencing, NGS) เป็นต้น

สิ่งส่งตรวจ (specimens) หมายถึง เลือด น้ำคร่ำ เลือดจากสายสะดือ (หรือเซลล์เพาะเลี้ยงจากสิ่งส่งตรวจ) หรือชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่ใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

โรคพราเดอร์-วิลลี (Prader-Willi , PWS) หมายถึง โรคทางพันธุกรรมที่มีลักษณะทางคลินิกที่พบได้บ่อย ได้แก่ มีภาวะกล้ามเนื้อตึงตัวน้อย (hypotonia) การกินอาหารลำบากในช่วงวัยทารก ต่อมาในวัยเด็กจะกินจุและเป็นโรคอ้วน มีพัฒนาการล่าช้าทั้งด้านการเคลื่อนไหวและภาษา

โรคแองเจิลแมน (Angelman, AS) หมายถึง โรคทางพันธุกรรมที่มีลักษณะทางคลินิกหลากหลาย ได้แก่ มีการพัฒนาล่าช้าแบบรุนแรงโดยเฉพาะพัฒนาการด้านการพูด หรือมีสติปัญญาบกพร่อง มีอาการเดินเซ หรือแขนขาสั่น และมีพฤติกรรมที่เฉพาะ เช่น หัวเราะบ่อยไม่สมเหตุสมผล มีขนาดศีรษะเล็ก และมักพบอาการชักได้บ่อย

การทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน (bisulfite conversion) หมายถึง ขั้นตอนการเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยสารเคมี เพื่อทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีภาวะเมทิลเลชัน (methylation) และดีเอ็นเอปกติที่ไม่มีภาวะเมทิลเลชัน (unmethylation) ด้วยการใช้สารไบซัลไฟต์ (bisulfite, NaHSO_3) เข้าปฏิกิริยาดีเอมีเนชัน (deamination) ออกจากเบสไซโตซีน (cytosine, C) ทำให้ดีเอ็นเอปกติที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิล (methyl group) เบสไซโตซีน (cytosine, C) จะถูกเปลี่ยนเป็นเบสยูราซิล (uracil, U) แต่ถ้าดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิล เบสไซโตซีนจะไม่เปลี่ยนแปลงคงสภาพเช่นเดิม

พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) หมายถึง ปฏิกิริยาถูกใช้ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน (amplification) ดีเอ็นเอที่เราศึกษาอย่างจำเพาะในหลอดทดลองให้เพิ่มจำนวนมากเป็นล้านเท่าในเวลาสั้น เป็นเทคนิคที่ใช้การแพร่หลายมากที่สุดในงานด้วยอนุพันธุศาสตร์ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

พีซีอาร์ ไซเคิล (PCR cycle) หมายถึง วงรอบของการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีการควบคุมอุณหภูมิและเวลา เพื่อให้พีซีอาร์เกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอน denaturation ขั้นตอน annealing และขั้นตอน extension

ซิงเกิ้ลเพล็กซ์พีซีอาร์ (singleplex PCR) หมายถึง พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ศึกษาโดยไพรเมอร์เพียง 1 คู่

มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) หมายถึง พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เดียว

เมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* (Methylation-Specific PCR (MS-PCR) for *SNRPN* gene) หมายถึง พีซีอาร์รูปแบบหนึ่งที่ใช้ตรวจภาวะเมทิลเลชันที่เบสไซโตซีนบนโปรโมเตอร์ของยีน *SNRPN* สำหรับตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน

อัลลีล (allele) หมายถึง ยีนที่ควบคุมลักษณะเดียวกันจะอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซมคู่ที่เหมือนกัน โดยอาจมีรูปแบบของยีนเหมือนหรือต่างกันได้ รูปแบบของยีนนี้เรียกว่าอัลลีล ปกติแล้วยีนที่กำหนดลักษณะหนึ่ง ๆ จะถูกควบคุมโดยอัลลีล 2 อัลลีลที่มาจากพ่อและจากแม่

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) หมายถึง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์การแยก การทำบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอหรือผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าพาดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง คือเจล ซึ่งการเคลื่อนที่ขึ้นขนาดและรูปร่าง ทำให้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างออกจากกันได้ แล้วทำการตรวจสอบดีเอ็นเอในเจลด้วยการย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และนำไปถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

บทที่ 2

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

ปฏิบัติงานในฐานะนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีประสบการณ์ทางการตรวจวิเคราะห์ด้านอณูพันธุศาสตร์ ที่หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โดยใช้ความรู้ ความสามารถ ความชำนาญงาน ทักษะ และประสบการณ์สูง ในด้านงานตรวจวิเคราะห์เอ็นเอด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ ปฏิบัติงานที่ต้องทำการศึกษา ค้นคว้า ทดลอง วิเคราะห์ สังเคราะห์และวิจัย เพื่อพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์ของรายการทดสอบเดิม แก้ปัญหาในงานตรวจวิเคราะห์ที่มีความยุ่งยาก รวมถึงพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ใหม่เพื่อเปิดบริการรายการทดสอบใหม่ และปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย

ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

ลักษณะงานที่ปฏิบัติในด้านต่างๆ 4 ด้าน ได้แก่ ด้านปฏิบัติการ ด้านการวางแผน ด้านการประสานงาน และด้านการบริการ มีรายละเอียดดังนี้

1. ด้านการปฏิบัติการ

(1) ปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์เอ็นเอด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ในสิ่งส่งตรวจของผู้รับบริการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม ได้แก่ ผู้ป่วยกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน ผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะ ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *MECP2* และการกลายพันธุ์ของยีน *ARX* รวมถึงตรวจคัดกรองภาวะดาวซินโดรมก่อนคลอดด้วยเทคนิคคิวเอฟพีซีอาร์ (QF-PCR for aneuploidy screening: chromosome 13 18 21) และการตรวจคัดกรองยีนเสี่ยงแพ้ยาก่อนการใช้ยาบางชนิด ได้แก่ ตรวจยีน *HLA-B*15:02* เพื่อคัดกรองความเสี่ยงแพ้ยาคาร์บามาซีปีน (carbamazepine) ตรวจยีน *HLA-B*58:01* เพื่อคัดกรองความเสี่ยงแพ้ยาอัลโลพูรินอล (allopurinol) และตรวจยีน *CYP2C19* เพื่อคัดกรองความเสี่ยงแพ้ยาโคลพิโดเกรล (clopidogrel) งานตรวจวิเคราะห์เอ็นเอเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเป็นลักษณะงานที่ยุ่งยากซับซ้อนระดับตติยภูมิ ต้องใช้กระบวนการทดสอบทางห้องปฏิบัติการหลายขั้นตอนดังนี้ 1) การรับสิ่งส่งตรวจ 2) การสกัดดีเอ็นเอ 3) การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน 4) การทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 5) การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 6) และการรายงานผล โดยผลการทดสอบจะถูกส่งต่อให้แพทย์เจ้าของไข้ใช้ในการประกอบการวินิจฉัยทางคลินิก เพื่อค้นหาสาเหตุ แนวทางการรักษาและพยากรณ์โรค วิเคราะห์ความรุนแรง ติดตามผลการรักษา การป้องกันและเฝ้าระวังโรค

(2) กำหนดวิธีการทดสอบและเป็นแกนนำหลักในรายการทดสอบเปิดใหม่ ได้แก่

คู่มือปฏิบัติงาน

5

รายการทดสอบตรวจคัดกรองยีน HLA-B*58:01 (ยีนเสี่ยงแพ้ยา allopurinol) และรายการทดสอบ CYP2C19 genotyping (ยีนเสี่ยงแพ้ยา clopidogrel) รวมถึงการพัฒนาเทคนิคทริปเปิ้ลพีทรีพีท ไพร์ม พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นเอง (inhouse triplet repeat-primed PCR, inhouse TP-PCR) ทดแทนการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปที่มีราคาแพงในรายการทดสอบเดิมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะ กำหนดคุณลักษณะเฉพาะของเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ น้ำยา และควบคุมการใช้เครื่องมือต่างๆ ของหน่วยงานด้านอนุพันธุศาสตร์ เพื่อใช้ในการปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ การจัดทำแผนการจัดซื้อเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ น้ำยา โดยมีการกำหนดคุณลักษณะเฉพาะต่องานตรวจด้านอนุพันธุศาสตร์ จัดทำแผนบำรุงรักษาและแผนสอบเทียบเครื่องมือประจำปีในหน่วยงานด้านอนุพันธุศาสตร์ และติดตามการดำเนินการให้เป็นไปตามแผน

(3) การจัดทำเอกสารวิชาการ โดยจัดทำคู่มือที่เกี่ยวข้องกับงานในความรับผิดชอบ เพื่อพัฒนามาตรฐานการปฏิบัติงานให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ได้แก่ คู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจและตรวจสอบปริมาณ/คุณภาพดีเอ็นเอ คู่มือการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไบซัลไฟต์คอนเวอร์ชัน (bisulfite conversion) คู่มือการตรวจวิเคราะห์กลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ คู่มือการตรวจวิเคราะห์กลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะด้วยเทคนิคแฟรกเมนต์ อะแนลลิซิส (Fragment analysis) คู่มือการตรวจวิเคราะห์พาหะกลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เปราะด้วยเทคนิคทริปเปิ้ลพีทรีพีท ไพร์ม พีซีอาร์ (triplet repeat-primed PCR, TP-PCR) คู่มือการใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ (Genetics Analyzer) คู่มือการทำเซาเทิร์น บลอต อะแนลลิซิส (Southern blot analysis) สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคโครโมโซมเอ็กซ์เปราะ คู่มือการเตรียมโพรบ Stb12.3 และการตรวจสอบความถูกต้องของโพรบ (probe validation) คู่มือการเตรียมน้ำยาสารเคมีสำหรับงานทางอนุพันธุศาสตร์และคู่มือการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส รวมถึงทำงานวิจัยและเผยแพร่ผลงานทางด้านวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อพัฒนางานวิชาการ ได้แก่ งานวิจัยที่เกี่ยวกับการรวมข้อมูลผลการทดสอบและวิเคราะห์ผล มีผลงานนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการคณะแพทยศาสตร์จำนวน 2 เรื่อง ในปี 2557 และปี 2562 และทำงานวิจัยด้านวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ร่วมกับอาจารย์ประจำหน่วย โดยมีผลงานวิจัยเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 4 ฉบับ ตั้งแต่ปี 2557 ปี 2558 และปี 2563

(4) ให้บริการวิชาการด้านต่างๆ ช่วยสอนนักศึกษา/นักศึกษาแพทย์และแพทย์ต่อยอดเฉพาะทางที่มาฝึกอบรมดูงานที่หน่วยงานมนุษยพันธุศาสตร์ ได้แก่ การสอนเกี่ยวกับหลักการและวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอนุพันธุศาสตร์ ให้คำปรึกษา แนะนำ

2. ด้านการวางแผน

(1) วางแผนงานในการเปิดรายการการทดสอบใหม่ของหน่วยงาน เช่น CYP2C19

genotyping โดยการเลือกเทคนิคการทดสอบที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความถูกต้องและ
น่าเชื่อถือ และการคำนวณต้นทุนการทดสอบแล้วใกล้เคียงกับราคาจากกรมบัญชีกลางมากที่สุด

(2) วางแผนแก้ปัญหาที่เกิดจากการปฏิบัติงาน โดยจัดทำเป็นโครงการพัฒนางานของ
หน่วยเพื่อปรับปรุงขั้นตอนการปฏิบัติงานเดิม เช่น โครงการจัดทำวิธีการมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอ
จากน้ำคร่ำและเซลล์เพาะเลี้ยงจากน้ำคร่ำ เพื่อใช้ในการทดสอบก่อนคลอดที่ต้องการใช้ดีเอ็นเอ
มากกว่าปกติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุน เพื่อให้การดำเนินงานบรรลุเป้าหมายและ
ผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนด

(3) วางแผนปฏิบัติงานขอการรับรอง ISO 15189 ในรายการทดสอบดังนี้ การตรวจหา
ความผิดปกติทางพันธุกรรมกลุ่มอาการโครโมโซมเอ็กซ์เพรессในการวินิจฉัยภาวะปัญญาอ่อนที่ไม่
ทราบสาเหตุในสิ่งส่งตรวจด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ และการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ในผู้ป่วย
กลุ่มอาการพราดอร์-วิลลีและแอนเจลแมน

(4) วางแผนสั่งซื้อน้ำยา สารเคมี อุปกรณ์ประจำปีที่ใช้ในงานด้านอณูพันธุศาสตร์ และ
ทำรายการสั่งซื้อแจ้งไปยังหน่วยจ่ายกลาง

3. ด้านการประสานงาน

ประสานงานกับหน่วยงานดังต่อไปนี้

(1) ห้องปฏิบัติการส่งต่อภายนอก เช่น ณ ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ ศูนย์จีโนมิกส์
ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อการจัดส่งตัวอย่าง และการรับส่งใบรายงานผลการ
ทดสอบ

(2) หน่วยงานเงินรายได้ เพื่อการออกใบเสร็จให้ผู้ป่วยในกรณีตัวอย่างส่งตรวจมาจาก
โรงพยาบาลภายนอกที่ไม่มีสัญญาในระบบเงินเชื่อ

(3) ฝ่ายไอที เพื่อแจ้งปัญหาที่เกิดจากโปรแกรมรับลงทะเบียนและการรายงานผล

(4) แพทย์ พยาบาล เจ้าหน้าที่ OPD/ward หรือโรงพยาบาลนอก กรณีสิ่งส่งตรวจมี
ปัญหา/ไม่เหมาะสม หรือแจ้งผลเบื้องต้นในรายการทดสอบคัดกรองแพ้ยาเป็นผลบวกในคนไข้จาก
Ward หรือประสานงานแพทย์เจ้าของไข้เพื่อขอเลือดพ่อหรือแม่เพื่อตรวจยืนยันผล

(5) เจ้าหน้าที่ธุรการสาขาวิชาพยาธิวิทยา เพื่อจัดส่งรายการเรียกเก็บเงินจากรายการส่ง
ตรวจจากโรงพยาบาลภายนอกประจำเดือน

(6) ผู้ป่วย กรณีแพทย์ประจำหน่วยต้องการนัดผู้ป่วยมารับคำปรึกษาทางพันธุกรรม

(7) หน่วยจ่ายกลางของสาขาวิชา เพื่อจัดซื้อจัดจ้าง และการตรวจสอบครุภัณฑ์ประจำปี

(8) ฝ่ายเภสัชกรรม เพื่อจัดส่งและรวบรวมข้อมูลคนไข้ที่ผลการตรวจคัดกรองยีนแพ้ยา
ให้ผลเป็นบวก

(9) ฝ่ายวิศวกรรมหรือช่างของบริษัทผู้ขาย เพื่อแจ้งซ่อมเครื่องมืออุปกรณ์ชำรุด

4. ด้านการบริการ

(1) ฝึกอบรม ถ่ายทอดความรู้ ทางด้านวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ และการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์แก่ผู้ปฏิบัติงานใหม่ และนักศึกษา นักศึกษาแพทย์ แพทย์ประจำบ้านต่อยอดที่มาฝึกอบรม ติวงาน เยี่ยมชมที่หน่วยงาน

(2) ถ่ายทอดความรู้ และฝึกอบรมเชิงปฏิบัติ เรื่องเทคนิคซีควนซิ่ง อะแนลลิซิส (sequencing analysis) ให้กับผู้ปฏิบัติงานหน่วยงานอื่นๆ เช่น ผู้ปฏิบัติงานหน่วยรหัสจีเอ็ม และผู้ปฏิบัติงานหน่วยจุลชีววิทยา

(3) เป็นผู้ช่วยสอนเรื่องการสกัดดีเอ็นเอและเทคนิคพีซีอาร์ให้กับนักศึกษาแพทย์ในรายวิชาสอน Human Genetics

(4) ให้คำปรึกษาแนะนำทางโทรศัพท์แก่แพทย์ พยาบาล หรือผู้รับบริการ เกี่ยวกับรายละเอียดการทดสอบ เช่น การเก็บตัวอย่างส่งตรวจที่เหมาะสมกับงานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ การเลือกวิธีการทดสอบให้เหมาะสมกับอาการทางคลินิก การให้ข้อมูลเกี่ยวกับความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบ และจำนวนเวลาทดสอบ (Turnaround time, TAT)

(5) ให้คำปรึกษา แนะนำเบื้องต้นทางโทรศัพท์แก่แพทย์ที่ต้องการส่งตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อวินิจฉัยโรคอื่นๆที่นอกเหนือจากรายการทดสอบที่เปิดบริการ โดยจะสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูลยีนรีวิว (GeneReview) และจะติดต่อประสานงานกับหน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถาบันส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อสอบถามว่ามีการเปิดบริการทดสอบโรคดังกล่าวหรือไม่ และจะแจ้งข้อมูลกลับแก่แพทย์

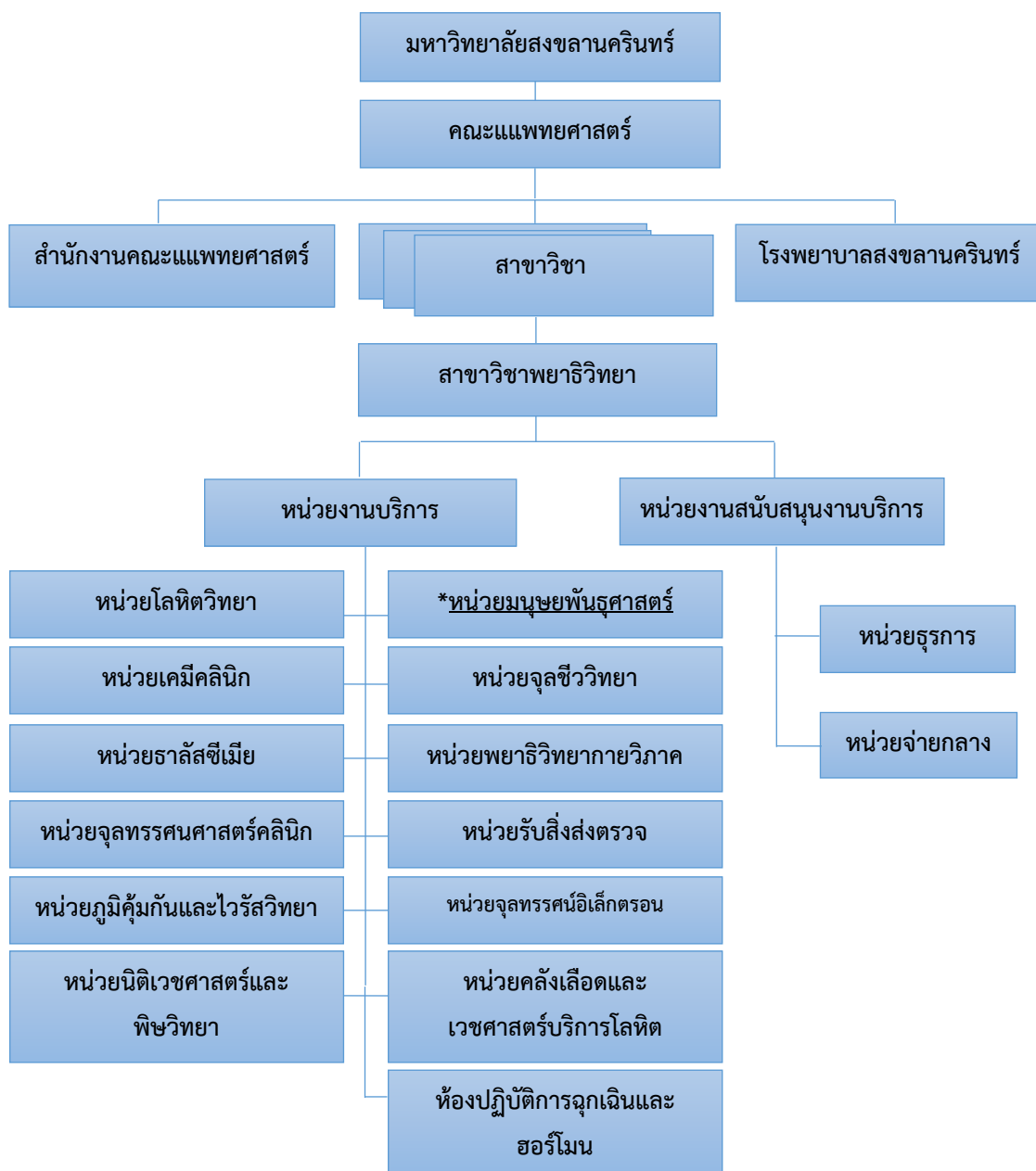
(6) มีส่วนร่วมจัดทำเอกสารวิชาการรูปแบบวิดีโอในหนังสือออนไลน์ Binta book เรื่อง Molecular genetic testing testing technique-polymerase chain reaction and electrophoresis หัวข้อเรื่องการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และเทคนิคพีซีอาร์ในวิชาเรียน Human genetics เพื่อเผยแพร่ความรู้ด้านเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่สนับสนุนภารกิจของหน่วยงานให้แก่ นักศึกษาแพทย์

โครงสร้างการบริหารจัดการ

หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยาเป็นหน่วยงานที่อยู่ในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีโครงสร้างบริหารจัดการดังนี้

1. โครงสร้างองค์กร (Organization Chart)
2. โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)
3. โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity chart)

โครงสร้างองค์กร (Organization Chart)



*หน่วยงานที่ผู้จัดทำคู่มือสังกัด

แผนภูมิ 1 โครงสร้างองค์กร (Organization Chart)

คู่มือปฏิบัติงาน

9

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลส์และแอนเจลแมน
ด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN

โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)



*หน่วยงานที่ผู้จัดทำคู่มือสังกัด

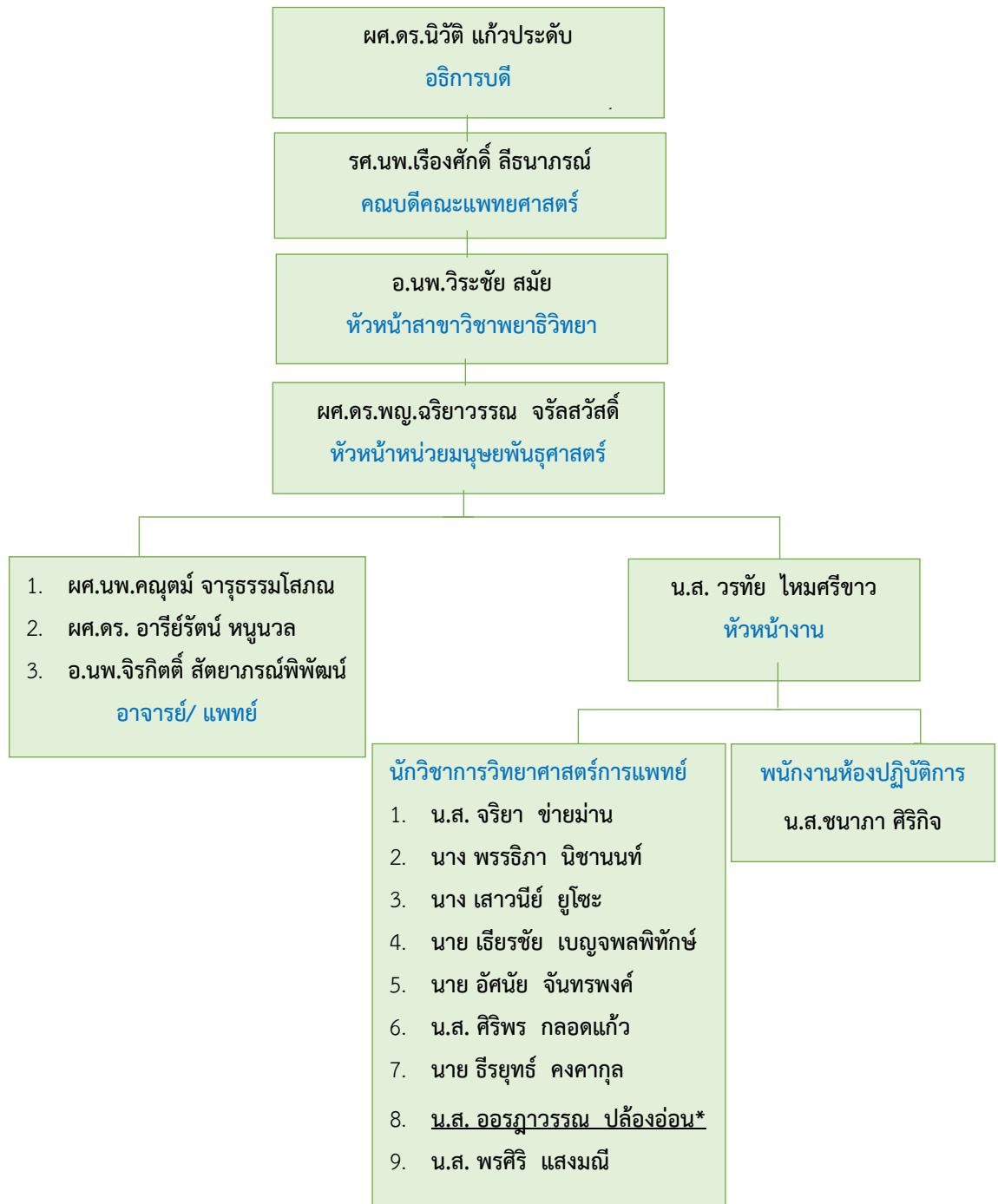
แผนภูมิ 2 โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)

โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity chart)

คู่มือปฏิบัติงาน

10

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลส์และแอนเจลแมน
ด้วยเทคนิคไมโครอาร์เรย์-สเปกโตรเมทรีของยีน SNRPN



*ผู้จัดทำคู่มือ

แผนภูมิ 3 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (Activity chart)

บทที่ 3

หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

การตรวจวินิจฉัยโรคพราเตอร์-วิลลี และแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ ยีน *SNRPN* ที่ห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ยึดหลักการทำงานตามค่านิยมหลัก 6 ประการ ได้แก่ สมรรถนะวิชาชีพ (competency) มุ่งเน้นคุณภาพ (quality focus) มุ่งเน้นผู้รับบริการ (customer focus) การปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง (continuous quality improvement) การทำงานเป็นทีม (teamwork) และการมีจิตสำนึกด้านความเสี่ยงและความปลอดภัย (risk and safety awareness) โดยใช้หลักเกณฑ์การปฏิบัติงานตามระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ตามข้อกำหนดวิชาการ 10 ข้อ ได้แก่ ด้านบุคลากร ด้านสถานที่และสภาพแวดล้อม ด้านเครื่องมือห้องปฏิบัติการน้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง ด้านกระบวนการก่อนการทดสอบ (Pre-examination processes) ด้านกระบวนการทดสอบ (Examination processes) ด้านการสร้างเชื่อมั่นในคุณภาพผลการทดสอบ ด้านกระบวนการหลังการทดสอบ (Post-examination processes) การรายงานผล การออกผล และด้านการจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ รวมถึงใช้หลักฐานเชิงประจักษ์ที่ได้จากการสืบค้นงานวิจัยการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องมาประยุกต์ใช้พัฒนากระบวนการทดสอบให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องรวดเร็ว ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ที่จะนำไปใช้ในการวินิจฉัย ค้นหาสาเหตุ รักษา พยากรณ์ วิเคราะห์ความรุนแรง ติดตามผลการรักษา การป้องกันและเฝ้าระวังโรคได้ทันทั่วถึง

วิธีการปฏิบัติงาน

การตรวจวินิจฉัยโรคพราเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ที่ห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ใช้วิธีการการปฏิบัติงานตามระบบบริหารจัดการห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ตามมาตรฐาน ISO 15189: 2012 ตามข้อกำหนดวิชาการ 10 ข้อ ดังนี้

1. ด้านบุคลากร

บุคลากรที่ทำการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ ยีน *SNRPN* ที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ เป็นนักวิชาการ

วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่มีความสามารถด้านอนุพันธุศาสตร์ ที่ได้รับคัดเลือกจากบุคคลที่มีคุณสมบัติเหมาะสม มีการกำหนดรายละเอียดการปฏิบัติงานชัดเจน โดยบุคลากรต้องผ่านเกณฑ์การประเมินสมรรถนะ ปีละ 1 ครั้ง ทั้งด้านสมรรถนะทั่วไป (general competency) และสมรรถนะด้านหน้าที่รับผิดชอบ (functional competency) รวมถึงมีการส่งเสริมให้มีการฝึกอบรม เพื่อการพัฒนาด้านวิชาชีพอย่างต่อเนื่อง และบุคลากรทุกคนต้องจัดทำข้อตกลงในการเก็บรักษาความลับทางห้องปฏิบัติการ

2. สถานที่และสภาพแวดล้อม

ห้องปฏิบัติการทางอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์มีพื้นที่ที่เพียงพอกับกิจกรรมการปฏิบัติงานต่างๆ ประกอบด้วย 2 ห้อง คือ ห้อง Pre-PCR และห้อง Post-PCR เพื่อให้การทดสอบเป็นไปอย่างมีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งมีการจัดพื้นที่และสภาพแวดล้อมให้มีความปลอดภัยทั้งกายภาพและชีวภาพต่อผู้ปฏิบัติงานและบุคคลอื่นๆ จากภายนอก มีการตรวจบันทึกสภาพแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง เช่น ตรวจแสงสว่าง รวมทั้งบำรุงรักษาพื้นที่อย่างสม่ำเสมอเพื่อให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานได้ตามที่กำหนด

3. เครื่องมือห้องปฏิบัติการ น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง

ห้องปฏิบัติการบริหารจัดการให้มีเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลืองเพื่อใช้งานอย่างเหมาะสมเพียงพอต่อการให้บริการ มีการคัดเลือกเครื่องมือให้สามารถนำมาใช้งานได้ตามวัตถุประสงค์ มีระบบการดูแลบำรุงรักษา การสอบเทียบอย่างสม่ำเสมอจนมั่นใจว่าพร้อมใช้งานตามที่กำหนด จัดวางเครื่องมือในสถานที่และสภาวะที่ปลอดภัย มีวิธีปฏิบัติในการบำรุงรักษา เคลื่อนย้าย และวิธีการใช้งานเครื่องมือและมีวิธีปฏิบัติเมื่อเกิดเหตุฉุกเฉิน มีระบบในการจัดการน้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง ซึ่งรวมถึงการเก็บรักษา มีการตรวจสอบเพื่อยอมรับ (validation) การจัดระบบควบคุมสินค้า และการจัดทำบันทึกที่เกี่ยวข้อง

4. กระบวนการก่อนการทดสอบ (Pre-examination processes)

ห้องปฏิบัติการมีการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนก่อนการทดสอบ เพื่อให้สิ่งส่งตรวจจากผู้รับบริการมีคุณภาพและเหมาะสมสำหรับการทดสอบ โดยมีการกำหนดวิธีการขอส่งตรวจ การจัดเก็บสิ่งส่งตรวจ การบ่งชี้ตัวอย่างที่เหมาะสม การนำส่งสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีที่ถูกต้องและปลอดภัย การกำหนดเกณฑ์การรับและปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ ตลอดจนจัดทำคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อสื่อสารกับผู้รับบริการ ทั้งนี้เพื่อสร้างความมั่นใจในผลการตรวจวิเคราะห์แก่แพทย์และผู้รับบริการอื่นๆในการใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ เพื่อช่วยในการตัดสินใจ ดูแลรักษาผู้ป่วย โดยกระบวนการก่อนทดสอบประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ 2) การเก็บสิ่งส่งตรวจจาก

ผู้ป่วยและผู้รับบริการ 3)การนำส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการ 4) และการลงทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจและการจัดการตัวอย่างก่อนทดสอบ มีวิธีการปฏิบัติงานดังนี้

4.1. การขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ แพทย์ทำการส่งตรวจผ่านทางใบขอตรวจทาง

ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ ซึ่งข้อมูลในใบขอตรวจมีความสำคัญต่อการทดสอบและการแปลผล ดังนั้นแพทย์ผู้ขอตรวจจะต้องระบุรายละเอียดต่างๆ อย่างครบถ้วนและความถูกต้อง ก่อนส่งสิ่งส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการ ข้อมูลสำคัญที่ต้องระบุ ได้แก่ เลขที่ผู้ป่วย (HN) อายุ เพศ วัน เดือน ปีเกิด ชื่อแพทย์ที่ส่งตรวจ หน่วยงานที่ส่งตรวจ เช่น ชื่อคลินิก หอผู้ป่วย หรือสถานพยาบาลที่ส่งตรวจ ชนิดและตำแหน่งสิ่งส่งตรวจ รายการที่ขอตรวจ การวินิจฉัยโรคหรือข้อมูลทางคลินิกที่จำเป็นสำหรับการทดสอบและการแปลผล เช่น ประวัติครอบครัว การเดินทาง การสัมผัสโรคติดต่อ และข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

4.2. การเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยและผู้รับบริการ สิ่งส่งตรวจปฐมนุติทาง

อณูพันธุศาสตร์ หมายถึง เลือด น้ำคร่ำ เลือดจากสายสะดือ (หรือเซลล์เพาะเลี้ยงจากสิ่งส่งตรวจ) ซึ่งมีสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอเป็นส่วนประกอบ การเก็บสิ่งส่งตรวจเลือดทำโดยนักเทคนิคการแพทย์พยาบาล แพทย์ เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำเลือด และบรรจุเลือดใส่หลอดฝาม่วงซึ่งมีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA การเก็บน้ำคร่ำหรือเลือดจากสายสะดือ ทำโดยสูติแพทย์ที่ชำนาญ เจาะเก็บน้ำคร่ำและบรรจุในไซริง และเก็บเลือดจากสายสะดือบรรจุในหลอดฝาม่วงชนิด EDTA การนำส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการ สิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ต้องจัดเก็บในภาชนะและอุณหภูมิที่เหมาะสม ช่วงควบคุม 2-8 องศาเซลเซียส (ห้ามแช่แข็ง) และควรส่งมายังห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษยศาสตร์ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อลดการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง กรณีห้องปฏิบัติการได้รับสิ่งส่งตรวจไม่สมบูรณ์ที่เกิดจากการนำส่งไม่เหมาะสม ทางห้องปฏิบัติการจะติดต่อผู้นำส่งทันทีตามความเหมาะสมและแจ้งให้ทราบเกี่ยวกับมาตรการที่ต้องดำเนินการแก้ไขเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำ

4.3. การลงทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจและการจัดการก่อนทดสอบ ห้องปฏิบัติการมีการ

กำหนดหลักเกณฑ์การรับและปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ โดยผู้รับสิ่งส่งตรวจต้องประเมินสิ่งส่งตรวจตามเกณฑ์การรับและปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ และรับลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจที่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนดเข้าสู่ระบบอิเล็กทรอนิกส์ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (HIS) หากพบสิ่งส่งตรวจไม่ได้คุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด จะต้องบันทึกเป็นลายลักษณ์อักษรและประสานกับหน่วยงานที่ส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อจัดการแก้ไข รวมถึงมีการจัดการตัวอย่างก่อนทดสอบ ตัวอย่างที่รอการตรวจวิเคราะห์ ต้องเก็บรักษาให้ตัวอย่างปลอดภัยและป้องกันการสูญหาย เสียหาย เสื่อมสภาพ ต้องจัดเก็บในพื้นที่ควบคุมการเข้า

ออกของบุคคลภายนอก จัดเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิที่เหมาะสม (2–8 องศาเซลเซียส) และเก็บในระยะเวลาที่กำหนด

5. กระบวนการทดสอบ (Examination Processes)

ห้องปฏิบัติการมีการควบคุมคุณภาพในกระบวนการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิเคชันอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบ มีความถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้ โดยทางห้องปฏิบัติการฯ เลือกใช้วิธีการทดสอบที่มีมาตรฐานในระดับสากลหรือระดับประเทศ รวมทั้งมีกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการก่อนนำมาใช้ มีการทวนสอบและทบทวนวิธีการทดสอบที่เลือกใช้อย่างสม่ำเสมอ และจัดทำวิธีการปฏิบัติงาน โดยกระบวนการทดสอบประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การสกัดดีเอ็นเอ 2) การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ bisulfite conversion 3) การทำเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิเคชันอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน 4) การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5.1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป ในปัจจุบันชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปมีวางจำหน่ายหลายรูปแบบ โดยทางห้องปฏิบัติการฯ เลือกใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ชื่อทางการค้า Flexigene ยี่ห้อ Qiagen ซึ่งเป็นยี่ห้อที่มีความน่าเชื่อถือลำดับต้นๆ ในท้องตลาด อย่างไรก็ตามทางห้องปฏิบัติการมีการประเมิน (verification) ก่อนนำมาใช้จริง เพื่อยืนยันว่าชุดสกัดมีประสิทธิภาพตามที่ผู้ผลิตกล่าวอ้าง

5.2. การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน

เป็นขั้นตอนเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยสารเคมีไบซัลไฟต์ (bisulfite) เพื่อใช้ในการบ่งชี้การเกิดภาวะเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ โดยทางห้องปฏิบัติการฯ ใช้น้ำยาสำเร็จรูป ชื่อการค้าอีแซด ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โกลด์ คิท (EZ DNA Methylation-Gold Kit) รหัสสินค้า Cat No. D5005&D5006 ยี่ห้อไซโม รีเสิร์ช (Zymo research) ที่ผ่านขั้นตอนการทดลองใช้แล้วให้ผลถูกต้องตามที่ผู้ผลิตกล่าวอ้าง

5.3. การทำเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิเคชันอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน

เป็นมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่ห้องปฏิบัติการฯ พัฒนาขึ้นเองโดยใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์อ้างอิงจากการศึกษาของ Kubota T และคณะปี ค.ศ. 1997 และ Hussain Askree S และคณะ ปี ค.ศ. 2011 ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล โดยทางห้องปฏิบัติการฯ มีการทดสอบ

ความถูกต้องของวิธีการ (method validation) ก่อนนำมาใช้ ด้วยการทดสอบในตัวอย่างควบคุมผลบวก และตัวอย่างควบคุมผลลบแล้วให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง

5.4. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นเทคนิคการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านอณูพันธุศาสตร์ ทางห้องปฏิบัติการฯ เลือกใช้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจลในการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์จากการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ด้วยเหตุผล อะกาโรสเป็นเจลที่เตรียมง่าย ต้นทุนไม่สูง ไม่อันตรายและใช้เวลาไม่นานในการวิเคราะห์

6. การสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการทดสอบ

เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพผลการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ทางห้องปฏิบัติการฯ มีการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control, IQC) ด้วยการใช้ตัวอย่างควบคุม (Quality control Sample, QC sample) ทำการทดสอบพร้อมตัวอย่างวิเคราะห์ในทุกชุดการทดสอบ ตัวอย่างควบคุมที่ใช้มี 2 ประเภท คือ ตัวอย่างควบคุมผลบวก และตัวอย่างควบคุมผลลบ โดยใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรค PWS และดีเอ็นเอผู้ป่วยโรค AS เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวก และใช้ดีเอ็นเอของคนปกติ (คนที่ไม่เป็นโรค PWS/AS) เป็นตัวอย่างควบคุมผลลบ นอกจากนี้ยังมีการทำการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) ร่วมกับอีกสองสถาบัน เพื่อประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการและประเมินผลการทดสอบ ช่วยสร้างความมั่นใจในกระบวนการทดสอบและคุณภาพผลการทดสอบ

7. กระบวนการหลังการทดสอบ (Post-examination processes)

กระบวนการหลังการทดสอบ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การทบทวนผลการทดสอบ และการจัดเก็บรักษาและการกำจัดตัวอย่างทดสอบ โดยทางห้องปฏิบัติการฯ มีกระบวนการทบทวนผลการทดสอบ 2 ระดับ โดยเมื่อการทดสอบเสร็จสิ้น ผู้ปฏิบัติงานทดสอบมีหน้าที่สรุปผลการทดสอบเบื้องต้น จัดทำใบรายงานผลและลงนาม จากนั้นส่งใบรายงานให้กับผู้ควบคุมดูแลห้องปฏิบัติการ (Laboratory Supervisor) เพื่อทบทวนผลการทดสอบและลงนาม จากนั้นใบรายงานผลถูกส่งต่อให้แก่แพทย์ประจำหน่วยทำหน้าที่ตรวจรับรองผลการทดสอบและลงนาม (approve) และผลการทดสอบจะการทวนสอบผลการตรวจ (verification) อีกครั้ง ก่อนเผยแพร่ในระบบ HIS ของโรงพยาบาล เพื่อรายงานผลกับแพทย์เจ้าของไข้และจัดส่งผลการทดสอบไปยังแพทย์ที่ส่งตรวจจากโรงพยาบาลภายนอก โดยการจัดเก็บรักษาและการกำจัดตัวอย่างทดสอบทางห้องปฏิบัติการฯ มีกำหนดระยะเวลาเก็บรักษาตัวอย่างทดสอบตามระยะเวลาการออกผลการทดสอบและมีการกำหนด

อายุการเก็บรักษาส่งส่งตรวจปฐมภูมิ เป็นระยะเวลา 2 เดือน หลังจากออกผลเสร็จสิ้น กรณีดีเอ็นเอ อายุการเก็บรักษา 20 ปี

8. การรายงานผล (Reporting of results)

ห้องปฏิบัติการมีการกำหนดวิธีการรายงานผล เพื่อให้การรายงานผลถูกต้อง ชัดเจน โดยกำหนดรูปแบบใบรายงานผล ผู้มีอำนาจในการรายงานผล วิธีการรายงานผล รอบเวลาการรายงานผล แนวปฏิบัติในการรายงานผลค่าวิกฤติ การแก้ไขรายงานผล การรักษาความลับของผลการทดสอบ ทั้งนี้เพื่อสร้างความมั่นใจให้แก่ผู้รับบริการว่ารายงานผลที่ได้รับไปมีความถูกต้องและเชื่อถือได้

9. การออกผลการทดสอบ

ห้องปฏิบัติการมีวิธีปฏิบัติงานที่ชัดเจนสำหรับการออกผลการทดสอบรวมถึงรายละเอียดของผู้ที่ออกผลและผู้รับผล เพื่อให้มั่นใจว่า ผลที่ออกมีความถูกต้อง มีการสื่อสารข้อมูลที่มีผลทางคลินิก กรณีผลการทดสอบมีค่าในช่วงวิกฤติจะต้องแจ้งผู้ที่เกี่ยวข้องที่มีอำนาจในทันที การแก้ไขรายงานผล ต้องแสดงข้อมูลเดิมไว้และสื่อได้ชัดเจนว่า ผลการทดสอบใดเป็นผลเดิมและผลที่แก้ไข

10. การจัดการข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ

ระบบข้อมูลทางห้องปฏิบัติการหมายถึงข้อมูลผลการทดสอบและข้อมูลต่างๆที่เป็นผลผลิตของห้องปฏิบัติการที่จัดเก็บอยู่ในระบบคอมพิวเตอร์และระบบที่ไม่ใช้คอมพิวเตอร์ ที่สามารถเรียกข้อมูลมาดูได้โดยผู้มีสิทธิ์เข้าถึงข้อมูล เพื่อให้มั่นใจว่าระบบข้อมูลทางห้องปฏิบัติการไม่มีการสูญหายเปลี่ยนแปลง รั่วไหล หรือถูกทำลายโดยบังเอิญหรือโดยผู้ไม่มีสิทธิ์ ทางห้องปฏิบัติการจึงจัดให้มีระเบียบปฏิบัติในการใช้คอมพิวเตอร์ การเข้าถึงข้อมูลและข้อมูลที่จำเป็นในการให้บริการที่ตรงตามความต้องการ การรักษาความปลอดภัยของระบบ การลงบันทึกข้อมูลและรายงานผล การเก็บรักษา และการเรียกข้อมูล การบำรุงรักษาเครื่องคอมพิวเตอร์และโปรแกรมรวมถึงการบำรุงรักษาระบบ นอกจากนี้ยังมีการกำหนดผู้มีสิทธิ์ใช้คอมพิวเตอร์ ผู้มีสิทธิ์เข้าถึงข้อมูลผู้ป่วยและผู้รับบริการ มีผู้รับผิดชอบบำรุงรักษาระบบข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์อย่างชัดเจน

เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน

การตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิกพีซีอาร์ยีน *SNRPN* ที่ห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุชพันธุศาสตร์ มีเงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการปฏิบัติงาน ดังนี้

1. **สถานที่และสภาพแวดล้อม** การแยกห้องปฏิบัติการเป็นห้อง Pre-PCR และห้อง Post PCR เป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยลดโอกาสการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ในงานอณูพันธุศาสตร์ กรณีห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่มีพื้นที่จำกัดที่ไม่สามารถแยกเป็นสองห้องได้ อาจใช้การแบ่งพื้นที่ Pre-PCR และพื้นที่ Post-PCR

2. **เครื่องมือห้องปฏิบัติการ น้ำยาและวัสดุสิ้นเปลือง** ได้แก่ ปิเปต เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องฟิวส์ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinets class II, BSC class II) เป็นต้น เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องมือดังกล่าวมีคุณภาพตามที่กำหนดจึงต้องมีการสอบเทียบปีละ 1 ครั้ง รวมทั้งน้ำยาสำหรับทำพีซีอาร์ก็เช่นกัน เช่น Taq DNA polymerase และไพรเมอร์ ซึ่งเป็นน้ำยาที่มีส่วนสำคัญต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR efficiency) การเปลี่ยนหลอดหรือการเปลี่ยนยี่ห้อ หรือการเตรียมไพรเมอร์ต่างล็อตกัน อาจส่งผลต่อการทดสอบ ดังนั้นทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงน้ำยา ต้องทำการตรวจสอบเพื่อยอมรับก่อนในจริงในตัวอย่างทดสอบ

3. **ห้องปฏิบัติการต้องมีคู่มือส่งตรวจที่ใช้สำหรับผู้ป่วยและผู้ให้บริการห้องปฏิบัติการ**

โดยต้องมีข้อมูลที่ระบุเรื่องต่อไปนี้ สถานที่ตั้งของห้องปฏิบัติการ รายการทดสอบของห้องปฏิบัติการ รวมถึงการทดสอบที่ส่งตรวจต่อห้องปฏิบัติการอื่น เวลาทำการ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างที่จำเป็น (ปริมาตรของตัวอย่างปฐมภูมิ) คำแนะนำสำหรับการกรอกแบบคำขอตรวจที่สมบูรณ์ คำแนะนำในการเตรียมการของผู้ป่วย คำแนะนำสำหรับการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยและการขนส่งตัวอย่าง ไปยินยอมการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ เกณฑ์การยอมรับปฏิเสธตัวอย่าง ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการทดสอบ ห้องปฏิบัติการมีนโยบายคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคล และขั้นตอนการร้องเรียนของห้องปฏิบัติการ

4. **การจัดทำใบขอตรวจ** จำเป็นต้องมีข้อมูลดังต่อไปนี้เป็นอย่างน้อย

- ระบุตัวผู้ป่วย เพศ วัน เดือน ปีเกิด และรายละเอียดสถานที่ตั้ง/รายชื่อผู้ติดต่อของผู้ป่วยและการบ่งชี้ผู้ป่วย
- ชื่อ /ข้อมูลระบุของแพทย์ หรือบุคลากรอื่นๆที่มีอำนาจที่จะขอตรวจ
- ประเภทตัวอย่างปฐมภูมิ ตำแหน่งทางกายวิภาคของตัวอย่าง
- การทดสอบที่ขอตรวจ
- ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยและการขอตรวจ เพื่อประสิทธิภาพการทดสอบและการแปลผล
- วันเวลาการเก็บตัวอย่างปฐมภูมิหากเกี่ยวข้อง
- วันที่และเวลารับตัวอย่าง

5. **การเก็บส่งตรวจจากผู้ป่วยและผู้รับบริการ** ต้องมีการบ่งชี้ผู้ป่วยและควรมีการ

ตรวจสอบว่าผู้ป่วยตรงตามข้อกำหนด ต้องเก็บตัวอย่างเลือดให้ปริมาณเหมาะสมกับขนาดบรรจุ ข้างหลอดต้องระบุชื่อผู้ป่วย HN วันที่และเวลาเก็บ

6. การบ่งชี้ตัวผู้ป่วยไม่ถูกต้อง เกิดการสลับตัวอย่าง จะทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน

7. การใช้หลอดเลือดผิดประเภท การเก็บเลือดตรวจทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้สารกันเลือดแข็งไม่ถูกต้อง เช่น การใช้หลอดฝาเขียวที่มีสารกันเลือดแข็ง heparin จะทำให้สาร heparin ปนเปื้อนไปกับดีเอ็นเอซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์

8. การระบุวิธีการนำส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการ ควรระบุไว้ในคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการให้ชัดเจน เพื่อลดสิ่งส่งตรวจไม่สมบูรณ์ที่เกิดจากการนำส่งไม่เหมาะสม

9. ผลกระทบต่อการจัดการตัวอย่างก่อนการทดสอบที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิการเก็บตัวอย่างอยู่นอกช่วง 2-8 องศาเซลเซียส หรือเก็บระยะเวลาเกินกว่ากำหนด จะทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ ส่งผลกระทบให้เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สมบูรณ์

10. ควรระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ระหว่างตัวอย่างในกระบวนการทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

11. ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน การปฏิบัติงานทดสอบที่ต้องสัมผัสกับตัวอย่างติดเชื้อหรือสารเคมีอันตราย ต้องสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (Personal Protective Equipment, PPE) ได้แก่ ถุงมือ/ถุงมือกันสารเคมี เสื้อกาวน์แขนยาวจุ่มปลายแขน รองเท้าแบบหุ้มปลายเท้าที่ป้องกันสารเคมีได้ และแว่นนิรภัย โดยต้องเลือกใช้ PPE ให้เหมาะสมกับระดับความเสี่ยง

12. การรายงานผลและการออกผล ควรกำหนดให้ผู้จัดทำรายงานกับผู้ทวนสอบผลเป็นคนละคนกัน เพื่อทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของผลการทดสอบ

13. เนื้อหาใบรายงานผล ต้องมีข้อมูลที่ครบถ้วนดังนี้

- ชื่อห้องปฏิบัติการและสถานที่ตั้ง
- อัตตลักษณ์ผู้ป่วยและสถานที่ผู้ป่วยในแต่ละหน้า
- ชื่อหรือระบุเฉพาะอื่นๆของผู้ร้องขอและรายละเอียดการติดต่อ
- วันที่เก็บตัวอย่างปฐมภูมิ (และเวลา หากมีข้อมูลและมีความเกี่ยวข้องกับการดูแลผู้ป่วย)
- ประเภทตัวอย่างปฐมภูมิ
- ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ตามความเหมาะสม
- ระบุอัตตลักษณ์ของการทดสอบทั้งหมดที่ได้รับการดำเนินการโดยห้องปฏิบัติการรับตรวจต่อ
- ผลการทดสอบ รายงานในหน่วย SI หน่วยที่สลับกลับไปยังหน่วย SI หรือหน่วยอื่นๆที่ใช้งานได้

- i. ช่วงค่าอ้างอิง ค่าการตัดสินใจทางคลินิกหรือแผนภาพ/กราฟอ่านค่าที่สนับสนุนการตัดสินใจทางคลินิก
- j. การแปลผล หากเหมาะสม
- k. ความเห็นอื่นๆ เช่น บันทึกเตือน หรืออธิบาย คุณภาพหรือความเพียงพอของตัวอย่างปฐมภูมิซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์หรือการแปลผลจากห้องปฏิบัติการรับตรวจต่อ การใช้วิธีการทดสอบที่ยังอยู่ในขั้นตอนพัฒนา เป็นต้น
- l. ระบุอัตลักษณ์ของบุคคลของบุคคลผู้ทบทวนผลและมีอำนาจการออกรายงานผล (ถ้าไม่มีในใบรายงาน ให้มีพร้อมใช้งานได้เมื่อจำเป็น)
- m. ระบุการทดสอบที่ทำในฐานะเป็นส่วนหนึ่งของ โครงการวิจัยหรือการพัฒนาที่ยังไม่มีการยืนยันด้าน คุณลักษณะทางประสิทธิภาพ
- n. วันที่ในใบรายงานผลและเวลาการออกผล (ถ้าไม่มีในใบรายงาน ให้มีพร้อมใช้งานได้เมื่อจำเป็น)
- o. เลขหน้าจากจำนวนหน้าทั้งหมด (เช่น "หน้า 1 จาก 5 หน้า", "หน้า 2 จาก 5 หน้า")

14. การแก้ไขรายงานผล ต้องแสดงข้อมูลเดิมไว้และสื่อได้ชัดเจนว่า ผลการทดสอบใดเป็นผลเดิมและผลที่แก้ไข

15. การกำหนดการเข้าถึงข้อมูลในเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีข้อมูลผู้ป่วย ควรมีการกำหนดการเข้าถึงโดยต้องใช้รหัสระบุตัวตนในการเข้าถึงระบบข้อมูลผู้ป่วย เพื่อการทวนสอบและการรักษาความลับของผู้ป่วย

แนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนด้วยเทคนิคทิลเลชัน-สเปคโตรฟลูออโรเมตริกของยีน *SNRPN* ที่ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จัดทำขึ้นด้วยแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งประกอบด้วยเนื้อหาประเด็นหลัก 5 หัวข้อ ได้แก่ 1) แนวคิดการจัดการกระบวนการก่อนทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ 2) งานวิจัยเกี่ยวกับวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3) งานวิจัยเกี่ยวกับการทำไบอัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน 4) งานวิจัยเกี่ยวกับโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจิลแมน 5) งานวิจัยเกี่ยวกับวิธีการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การจัดการกระบวนการก่อนทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์

การเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย การขนส่งสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการและการเก็บรักษาตัวอย่างตรวจ เป็นกระบวนการก่อนทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์มีผลกระทบต่อการเสื่อมคุณภาพดีเอ็นเอจากระบบการจัดการไม่เหมาะสม จากการทบทวนวรรณกรรมพบข้อผิดพลาดในกระบวนการก่อนทดสอบ เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนหรือล้มเหลวหรือล่าช้า โดยพบความถี่ข้อผิดพลาดในกระบวนการก่อนทดสอบ ประมาณ 60-70% ของข้อผิดพลาดในห้องปฏิบัติการทั้งหมด (6) ดังนั้นแนวทางปฏิบัติในกระบวนการก่อนทดสอบที่เหมาะสมจะช่วยรักษาคุณภาพดีเอ็นเอให้คงที่ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา ผู้เขียนคู่มือจึงได้รวบรวมแนวทางปฏิบัติที่เหมาะสมในการจัดการกระบวนการก่อนทดสอบ มีรายละเอียดดังนี้

1.1. ชนิดสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมกับการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ สิ่งส่งตรวจ

ปฐมภูมิทางอณูพันธุศาสตร์มีหลายชนิด ได้แก่ เลือด (whole blood) ชิ้นเนื้อ (tissue) เซลล์กระพุ้งแก้ม (buccal cells) ชิ้นเนื้อจาก paraffin block น้ำคร่ำ (amniotic fluid, AF) เลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ (cord blood) และชิ้นเนื้อรก (chorionic Villus sampling, CVS) โดยตัวอย่างแต่ละชนิดมีทั้งข้อดีข้อเสีย ผู้ส่งตรวจควรเลือกชนิดตัวอย่างให้เหมาะสมกับประเภทการทดสอบ เพื่อลดข้อผิดพลาดในการทดสอบ แสดงดังตาราง 1

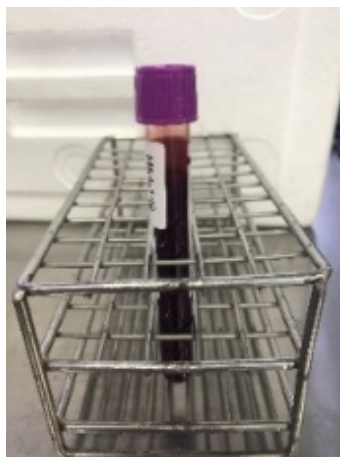
ตาราง 1 ชนิดสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์และประเภทการทดสอบ (7-9)

ชนิด สิ่งส่งตรวจ	ประเภทการทดสอบทาง อณูพันธุศาสตร์	ข้อดี/ข้อเสีย
เลือด (Whole blood, EDTA blood) ประกอบด้วยเซลล์ เม็ดเลือดขาวที่มีสาร พันธุกรรมของผู้ป่วย	- การตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม หรือ ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นๆ เช่น ตรวจความเป็นพ่อแม่ลูก หรือตรวจยีนเสี่ยงแพ้ยา - ตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary cancer) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia)	<u>ข้อดี</u> - การเก็บตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอไม่ยุ่งยาก - ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดี <u>ข้อเสีย</u> - ไม่เหมาะสมกับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งที่เกิดขึ้นเอง (sporadic cancer)
ชิ้นเนื้อ (tissue) ประกอบด้วยเซลล์ หลายชนิด	- การตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม หรือ ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นๆ ในผู้ป่วยบางรายที่ไม่สามารถเก็บเลือดได้ - ตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง sporadic cancer จากชิ้นเนื้อสงสัยมะเร็ง	<u>ข้อดี</u> - ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดี <u>ข้อเสีย</u> - การเก็บตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอยุ่งยากกว่าตัวอย่างเลือด
เซลล์กระพุ้งแก้ม (buccal cells)	- การตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม หรือ งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออื่นๆ ในผู้ป่วยบางรายที่ไม่สามารถเก็บเลือดได้ เช่น เด็กเล็ก เจาะเลือดยาก หรือผู้ป่วยฮีโมฟีเลีย	<u>ข้อดี</u> - เก็บตัวอย่างแบบไม่รุกราน noninvasive <u>ข้อเสีย</u> - ขั้นตอนสกัดยุ่งยากกว่าเลือด - ได้ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำกว่าตัวอย่างจากเลือดและชิ้นเนื้อ เพราะในน้ำลายมีเอนไซม์ที่สามารถทำลายดีเอ็นเอได้
น้ำคร่ำ (Amniotic fluid, AF) ประกอบด้วย เซลล์ที่หลุดมาจาก เยื่อหุ้มของทารก การเจาะนิยมทำ ในช่วงอายุครรภ์ 16- 18 สัปดาห์	- การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด	<u>ข้อดี</u> - ผลทดสอบน่าเชื่อถือมากกว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อรก <u>ข้อเสีย</u> - ได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยในผู้ป่วยบางราย โดยเฉพาะที่เจาะที่อายุครรภ์ต่ำกว่า 16 สัปดาห์ - อาจต้องใช้ระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ - ผลการทดสอบอาจคลาดเคลื่อนได้ หากน้ำคร่ำมีการปนเลือดแม่มา

ตาราง 1 (ต่อ) ชนิดสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์และประเภทการทดสอบ

ชนิด สิ่งส่งตรวจ	ประเภทการทดสอบทาง อณูพันธุศาสตร์	ข้อดี/ข้อเสีย
เลือดจากสายสะดือทารก ในครรภ์ (cord blood) สามารถเจาะได้ตั้งแต่อายุ ครรภ์ 18 สัปดาห์ขึ้นไป	- การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด	ข้อดี - ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากกว่า ถ้าเทียบกับ ตัวอย่างน้ำคร่ำ ข้อเสีย - เก็บตัวอย่างเลือดจากสายสะดือยุ่งยากกว่า เก็บน้ำคร่ำ
ชิ้นเนื้อรก (CVS) บางส่วนประกอบด้วย เซลล์ทารก การเจาะนิยม ทำในช่วงอายุครรภ์ 11- 14 สัปดาห์	- การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด	ข้อดี - ตรวจได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยจึงลดระยะเวลา วิตกกังวลของมารดา และยุติการตั้งครรภ์ง่าย และปลอดภัยหากทารกในครรภ์มีความ ผิดปกติ ข้อเสีย - การแปลผลอาจคลื่อนคลาด เพราะอาจมีชิ้น เนื้อแม่ปนมาด้วย

1.2. การเลือกใช้หลอดเก็บเลือดสำหรับงานตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ เลือดเป็น
สิ่งส่งตรวจที่นิยมใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการทุกประเภท ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดหลอดเก็บเลือด
ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลการทดสอบถูกต้อง แต่หากเลือกใช้หลอดเก็บเลือดผิดประเภท อาจทำให้ผล
การทดสอบคลาดเคลื่อนหรือล้มเหลวได้ เพื่อให้การเลือกใช้หลอดเก็บเลือดได้ง่าย จึงมีแยกแยะชนิด
หลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (anti-coagulant) ต่างชนิดกัน ด้วยสีฝาหลอด ได้แก่ หลอดฝาสีม่วง
(EDTA tube) หลอดฝาสีเขียว (lithium/sodium heparin tube) ฝาหลอดสีแดง (หลอด serum
clot activator) หลอดฝาสีฟ้า (หลอด coagulation, sodium citrate) และหลอดฝาสีดำ (หลอด
ESR) (10) โดยงานด้านอณูพันธุศาสตร์ตรวจระดับดีเอ็นเอ ควรเก็บตัวอย่างเลือดด้วยหลอดฝาสีม่วง
(EDTA tube) ซึ่งมีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ที่มีคุณสมบัติไปจับกับแคลเซียมเอาไว้ ทำให้เลือดไม่
แข็งตัว คงรักษาสภาพของเม็ดได้ดี รูปร่างของเม็ดเลือดจึงยังเหมือนเดิมมากที่สุด



ภาพ 1 หลอดเก็บเลือดฝาสีม่วง (EDTA tube) สำหรับงานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

1.3. การจัดเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย การนำส่ง และการเก็บรักษา

การจัดเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย ผู้จัดเก็บควรให้ความสำคัญในเรื่องนี้ ได้แก่ การเตรียมผู้ป่วยตามข้อกำหนดเฉพาะของแต่ละการทดสอบ การระบุตัวผู้ป่วยให้ถูกต้อง การเก็บตัวอย่างชนิดของสิ่งส่งตรวจให้ถูกต้อง เช่น เก็บเลือด EDTA blood สำหรับส่งตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาณของสิ่งส่งตรวจต้องเพียงพอต่อการทดสอบ การเก็บตัวอย่างในสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิที่เหมาะสม หากไม่นำส่งห้องปฏิบัติการทันทีให้จัดเก็บตามข้อกำหนดของการทดสอบนั้นๆ

1.4. การนำส่งตัวอย่างตรวจและการเก็บรักษา ผู้ส่งตรวจควรบรรจุสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยให้เรียบร้อยในภาชนะขนย้ายที่ป้องกันการหกหรือแตก แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ไม่เกินเวลาที่กำหนด โดยแนวทางปฏิบัติที่ถูกต้องในการเก็บตัวอย่าง การขนส่งและการเก็บรักษาตัวอย่างระหว่างรอสกัดดีเอ็นเอ จะทำให้ตัวอย่างมีคุณภาพคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บ ซึ่งจะช่วยรักษาความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอไว้ได้ แสดงดังตาราง 2 นอกจากนี้การเก็บในระยะยาวอาจเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับใช้ทดสอบหรือใช้ในงานวิจัยในอนาคต ดังนั้นผู้เขียนได้รวบรวมข้อมูล แนวทางปฏิบัติในการเก็บรักษาตัวอย่างในระยะยาวในงานตรวจวิเคราะห์หอยพยาธิศาสตร์ แสดงในตาราง 3

ตาราง 2 แนวทางปฏิบัติในการเก็บตัวอย่าง การขนส่งและการเก็บรักษา (7, 9)

สิ่งส่งตรวจ	ปริมาณที่เหมาะสม	ภาชนะการจัดเก็บ	ข้อแนะนำ	ข้อระวัง
เลือด (whole blood)	3-6 มิลลิลิตร ควรใส่ ปริมาณเลือด ให้เหมาะสม หลอดแต่ละ ขนาด	หลอดเก็บเลือดฟาสี ม่วง (EDTA tube) สำหรับตรวจวิเคราะห์ ระดับดีเอ็นเอ	- หลังเจาะและถ่ายเลือดเข้า หลอดเก็บ ต้องผสมเลือดให้เข้า กันกับ EDTA จนแน่ใจว่าเลือด ไม่แข็งตัว - ควรจัดส่งทันทีภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าส่งไม่ทันภายในวัน เดียวให้แช่ตู้เย็นที่ 2-8 °C แล้ว ส่งวันรุ่งขึ้น	- ห้ามแช่แข็ง และ ไม่ต้องปั่นเลือดก่อนส่ง - ไม่ควรใช้หลอดฟาสี เขียว (heparin tube) เพราะจะทำให้ดีเอ็นเอ คุณภาพต่ำลง
ชิ้นเนื้อ (tissue)	อย่างน้อย 3X3 ตาราง มิลลิเมตร (50-200 มิลลิกรัม)	ใช้หลอดแห้งและปลอด เชื้อ โดยไม่ต้องมี fixative ใดๆ หรือหลอดบรรจุ sterile isotonic saline หรือ tissue culture medium	- ใช้ได้ทั้ง fresh (นำส่งทันที) และ frozen tissue (-70 °C ต้องมี dry ice) - ถ้าส่งในหลอด saline ควรแช่ น้ำแข็งก่อนส่ง	- fresh tissue ห้าม แช่ formalin
น้ำคร่ำ amniotic fluid (AF)	10-20 มิลลิลิตร	หลอดหรือไซริงค์ปลอด เชื้อ (sterile tube)	- ส่งน้ำคร่ำที่อุณหภูมิห้อง ภายใน 24 ชั่วโมง - น้ำคร่ำต้องไม่มีเลือดแม่ปน	- ควรแบ่งน้ำคร่ำส่วน หนึ่งไปเพาะเลี้ยงเซลล์ ไว้ ถ้าต้องการดีเอ็นเอ ปริมาณมากขึ้น
เลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ (cord blood)	0.5-2 มิลลิลิตร	หลอดเก็บเลือดฟาสี ม่วง (EDTA tube) สำหรับตรวจวิเคราะห์ ระดับดีเอ็นเอ	- หลังเจาะและถ่ายเลือดเข้า หลอดเก็บ ต้องผสมเลือดให้เข้า กันกับ EDTA จนแน่ใจว่าเลือด ไม่แข็งตัวเป็นลิ่ม - ควรจัดส่งทันที ถ้าส่งไม่ทัน ภายในวันเดียวให้แช่ตู้เย็นที่ 2- 8 °C แล้วส่งวันรุ่งขึ้น	- ห้ามแช่แข็ง และ ไม่ต้องปั่นเลือดก่อนส่ง - ห้ามใช้หลอดฟาสีเขียว (heparin tube) เพราะจะทำให้ดีเอ็นเอ คุณภาพต่ำลง
ชิ้นเนื้อรก (Chorionic villus sample, CVS)	30 มิลลิกรัม	หลอดปลอดเชื้อที่บรรจุ sterile isotonic saline หรือ tissue culture medium	- การเก็บชิ้นเนื้อรกต้องตัดส่วน ชิ้นเนื้อแม่ (maternal tissue) ออกให้หมด - ควรแช่หลอดเก็บตัวอย่างใน น้ำแข็ง ขณะนำส่ง	- ตัวอย่างห้าม ปนเปื้อนชิ้นเนื้อของ แม่

ตาราง 3 แนวทางปฏิบัติในการเก็บรักษาส่งตรวจในงานตรวจวิเคราะห์ห่ออนุพันธุศาสตร์ (8, 11)

ชนิดสิ่งส่งตรวจ (Specimen type)	สารชีวโมเลกุล เป้าหมาย ที่สนใจศึกษา (Target)	อุณหภูมิเก็บรักษา (Temperature)	ระยะเวลาเก็บรักษา (Duration)
เลือด (Whole blood, EDTA tube) (8)	DNA	อุณหภูมิห้อง 20-25°C (RT)	ไม่เกิน 24 ชั่วโมง
		ตู้เย็น 2-8°C	ไม่เกิน 72 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บนานกว่านั้น ไม่ควรเกิน 6 วัน
	RNA	ตู้เย็น 4°C	ไม่เกิน 72 ชั่วโมง
น้ำเหลือง (Plasma) (8)	DNA	อุณหภูมิห้อง 20-25°C	ไม่เกิน 24 ชั่วโมง
		ตู้เย็น 2-8°C	5 วัน
		ตู้แช่แข็ง -20 °C	นานกว่า 5 วัน
		ตู้แช่แข็ง -80°C	9 เดือน ถึง 41 เดือน
	RNA	ตู้เย็น 4°C	ไม่เกิน 24 ชั่วโมง
หยดเลือดแห้งบน กระดาษกรอง (Dried blood spot) (11)	RNA	อุณหภูมิห้อง 20-25°C	ไม่เกิน 3 เดือน
		ตู้เย็น 4°C	ไม่เกิน 1 ปี
		ตู้แช่แข็ง -20°C	ไม่เกิน 4 ปี
	DNA	อุณหภูมิห้อง 20-25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 73 ± 5%	ไม่เกิน 10 ปี
น้ำคร่ำ (Amniotic fluid) (8)	DNA	2-8°C	ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

1.5. ข้อผิดพลาดก่อนกระบวนการทดสอบ (Pre-examination) ที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยงานพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พบ ประเมินร้อยละ 35 ของข้อผิดพลาดทั้งหมด (ภาคผนวก จ) โดยข้อผิดพลาดก่อนกระบวนการ ทดสอบของงานด้านอนุพันธุศาสตร์ที่พบบ่อยลำดับแรก ได้แก่ การใช้สารกันเลือดแข็งไม่ถูกต้อง ตัวอย่างเช่น ใช้หลอดเก็บเลือดผิดเป็น heparin ฝาสีเขียว ซึ่งเลือดจากหลอด heparin จะไม่ เหมาะสมกับงานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการใช้สาร heparin จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการ ทดสอบ เช่น สกัดดีเอ็นเอได้น้อยกว่าเกณฑ์ที่กำหนด เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ อาจทำให้ผลคลาดเคลื่อน หรือล้มเหลวไม่ได้ผลการทดสอบ ส่งผลกระทบต่อคนที่ต้องเจ็บตัวซ้ำใน การเจาะเลือดใหม่ และเสียเวลา

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในงานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในงานด้าน
อณูพันธุศาสตร์ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีสองรูปแบบหลัก ได้แก่ การ
สกัดดีเอ็นเอแบบ Solution based และแบบ Solid phase (ตาราง 4)

ตาราง 4 วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้กันทั่วไป (12, 13)

DNA extraction method (Main category)	DNA extraction method (Subcategory)	DNA extraction protocol stage			
		1.Cell lysis	2. Denaturation of nucleoproteins /inactivation of cellular enzymes	3.Removal of contaminants	4.DNA precipitation
1.Solution -based DNA extraction methods	1.1 Salting out methods	-SDS -SDS/ proteinase K -TritonX-100	- Proteinase K - Laundry powder	-Potassium acetate -Sodium acetate -sodium chloride	-Ethanol -Isopropanol
	1.2 Organic solvent/ chaotropes methods	-SDS -SDS/ proteinase K	-Guanidine thiocyanate -Phenol	-Phenol -Phenol- chloroform -Phenol- chloroform, isoamyl alcohol	-Sodium acetate/ Ethanol -Sodium acetate/ Isopropanol
2.Solid- based DNA extraction methods	2.1 Glass milk/silica resin methods	-SDS -TritonX-100	-Guanidine thiocyanate	-Glass milk (silica in chaotropic buffer) -Silica matrix -Diatomaceous earth	-Ethanol -Isopropanol
	2.2 Anion exchange methods	-Heat	-Chelex -Chelex/ proteinase k	-Chelex	-N/A
	2.3 Magnetic beads methods	-SDS	-N/A	-Sodium chloride/ polyethylene glycol	-Magnetic beads

โดยคู่มือเล่มนี้จะกล่าวถึงเฉพาะการสกัดแบบ Solution based (ตาราง 4 ข้อ 1.2) แบบ Organic solvent และการสกัดแบบ Solid phase (ตาราง 4 ข้อ 2.1) แบบ silica resin methods ซึ่งเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยซิลิกาเมทริกซ์ โดยสองวิธีนี้เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ ณ ห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีรายละเอียดหลักการสกัดดีเอ็นเอแต่ละวิธีดังนี้

2.1. การสกัดดีเอ็นเอด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การสกัดดีเอ็นเอด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents methods) จัดอยู่ในกลุ่มวิธีสกัดแบบ Solution base (12) เป็นวิธีดั้งเดิมที่ถูกใช้มาตั้งแต่ ปี ค.ศ.1950 จนถึงปัจจุบัน ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก (14) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Cell lysis หมายถึง การล้างเซลล์หรือการทำให้ขึ้นเนื้อขนาดเล็กลงด้วยการสับหรือบด กรณีสกัดดีเอ็นเอจากเลือด การล้างจะช่วยกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงออก เพื่อลดปริมาณโปรตีนฮีม (heme protein) ที่เป็นตัวรบกวนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ หากโปรตีนฮีมปนเปื้อนติดไปกับดีเอ็นเอก็ไม่สามารถกำจัดได้อีก ด้วยเหตุนี้เลือดที่จับตัวเป็นก้อนทำให้การล้างฮีมออกทำได้ยากขึ้น จึงทำให้ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำมีการปนเปื้อนโปรตีนฮีม (15) กรณีส่งตรวจชิ้นเนื้อ ต้องเพิ่มขั้นตอนการสับตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กลงให้ได้มากที่สุด หรือใช้การแช่ชิ้นเนื้อในไนโตรเจนเหลว เพื่อทำให้แข็งตัว แล้วใช้ครกบดให้ละเอียด ซึ่งทุกขั้นตอนทำด้วยอุปกรณ์และเทคนิคปลอดเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation of proteins หมายถึง การทำให้เซลล์แตกและย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ใช้สารละลาย lysis buffer ที่มีองค์ประกอบของเกลือ ($MgCl_2$ และ $NaCl$) สาร non-ionic (NP-40 หรือ SDS หรือ Triton X-100) และเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteinase k) ทำให้เซลล์แตกกลายเป็น lysate cell ที่มีองค์ประกอบของดีเอ็นเอปะปนอยู่กับโปรตีน จากนั้นใช้เอนไซม์ Proteinase k จะย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง

ขั้นตอนที่ 3 Removal of contaminants การกำจัดสารโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ โดยใช้สารละลายอินทรีย์ ที่เรียกว่า denaturation buffer ได้แก่ สาร phenol-chloroform หรือ formamide หรือ Guanidine hydrochloride ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และแยกชั้นแยกตัวออกจากดีเอ็นเอ

ขั้นตอนที่ 4 DNA precipitation การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลหรือไอโซโพรพานอล ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 100 และล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70

2.2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยซิลิกาเมทริกซ์

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ซิลิกาเมทริกซ์ (Silica resin methods) จัดอยู่ในกลุ่มวิธีการสกัดแบบ Solid-phase เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาเป็นชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายทั่วไป ตัวอย่างเช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชื่อการค้า Qiaamp mini spin kit วิธีการนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค. ศ. 1979 โดย Vogelstein และ Gillespie ได้ค้นพบว่าการใช้ซิลิกาในรูปแบบผงแก้วทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์แยกออกจากกันได้ และต่อมาในปี 1989 มีการใช้วิธีการสกัดแบบ Solid-phase สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดเป็นครั้งแรก โดย McCormick ซึ่งเป็นผู้ตีพิมพ์เทคนิคการใช้อนุภาคที่ไม่ละลายน้ำที่มีส่วนประกอบของซิลิกอนที่มีลักษณะทางเคมีคล้ายกับฟีนอล และมีปฏิกิริยากับโปรตีน ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยเทคนิคเหล่านี้จะดูดซับดีเอ็นเอภายใต้สภาวะ pH และปริมาณเกลือที่เหมาะสม ซึ่งมีหลักการดังต่อไปนี้ 1) การจับไฮโดรเจนด้วยสาร chaotropic ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่ชอบน้ำ 2) การแลกเปลี่ยนไอออนิกด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุลบภายใต้สภาวะที่เป็นน้ำและ 3) กลไกการแยกตามความจำเพาะและขนาด โดยการสกัดดีเอ็นเอเทคนิค Solid phase แบบ Silica resin methods ส่วนใหญ่ที่ขายในท้องตลาดเป็นแบบสปินคอลัมน์ (Spin column) ซึ่งสามารถจับดีเอ็นเอภายใต้แรงเหวี่ยงด้วยการใช้ซิลิกาเมทริกซ์อนุภาคแก้วหรือผงดินเบาเป็นตัวพาการแลกเปลี่ยนประจุลบ โดยทั่วไปสารประกอบเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับการปรับสภาพโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH เฉพาะเพื่อเปลี่ยนเป็นรูปแบบทางเคมี โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ Silica resin methods ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การย่อยเซลล์เม็ดเลือดโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เฉพาะจนได้เป็น lysate cells

ขั้นตอนที่ 2 นำ lysate cells ผ่านกับคอลัมน์และหมุนเหวี่ยง โดยขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์ที่สภาวะ pH และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม โปรตีนบางชนิดและสารประกอบทางชีวเคมีอื่น ๆ อาจจับตัวกับคอลัมน์ได้บางส่วนเช่นกัน แต่จะถูกกำจัดออกในภายหลังโดยใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ในขั้นตอนล้างดีเอ็นเอ

ขั้นตอนที่ 3 การล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70

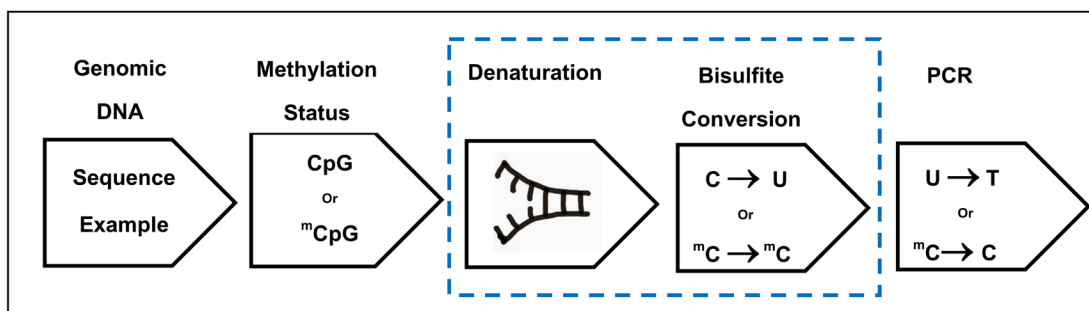
ขั้นตอนที่ 4 การละลายดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อหรือ TE buffer

3. การทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน

ไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน (Bisulfite conversion) เป็นวิธีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอด้วยสารเคมีไบซัลไฟต์ เพื่อทำให้เกิดความต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีสภาวะเมทิลเลชัน (methylation) กับดีเอ็นเอที่ไม่มีสภาวะเมทิลเลชัน (unmethylation) (16) โดยทั่วไปสภาวะเมทิลเลชันมักเกิดบริเวณโปร

โมเตอร์ของยีน (ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะเบส CG ซ้ำต่อกันเป็นจำนวนมาก เรียกว่า CpG island) มีหน้าที่เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังมีบางกลุ่มยีนที่เรียกว่า Imprinting gene (ซึ่งหมายถึง ปรากฏการณ์ทางพันธุศาสตร์อย่างหนึ่งที่ยีนหนึ่งๆ จะแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับมาจากพ่อหรือแม่เท่านั้น) ใช้กลไกการเกิดเมทิลเลชันในการควบคุมการแสดงออกของยีนจากพ่อและจากแม่ โดยการเกิดภาวะเมทิลเลชันของยีนเกิดจากเบส C บริเวณ CpG ถูกเติมหมู่เมทิล (CH_3) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส C ที่ติดกับ G ซึ่งจะส่งผลให้ยีนไม่มีการแสดงออก ด้วยเหตุนี้กระบวนการเมทิลเลชันจึงเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนกลุ่ม Imprinting gene หากกลไกดังกล่าวผิดปกติไป ก็จะสามารถนำสู่โรคทางพันธุกรรมในกลุ่มยีน Imprinting ได้ (17) ตัวอย่างเช่น กลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน (PWS/AS) เป็นต้น ดังนั้นการวิเคราะห์หาความผิดปกติของสถานะเมทิลเลชันของยีน Imprinting (ยีน *SNRPN*) จึงเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน (18)

ขั้นตอนการทำ bisulfite conversion เพื่อเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สถานะเมทิลเลชันของยีน Imprinting (ยีน *SNRPN*) ด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิซิตีอาร์ ดังภาพ 2 (19) เริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอปกติ (Genomic DNA) ซึ่งอาจจะมีภาวะเมทิลเลชันหรือไม่มีภาวะเมทิลเลชัน ซึ่งดังกล่าวไม่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบทั่วไป เพราะการเกิดเมทิลเลชันมีเพียงการเติมหมู่เมทิลที่เบส C ที่ติดกับ G ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส หรือที่เรียกว่า epigenetics ดังนั้นจึงต้องใช้สารเคมีไบซัลไฟต์เข้าไปเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอ เพื่อทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอที่มีสถานะเมทิลเลชัน (methylation) กับดีเอ็นเอที่ไม่มีสถานะเมทิลเลชัน (unmethylation) โดยการเกิด bisulfite conversion ด้วยสารไบซัลไฟต์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อดีเอ็นเอเกลียวคู่ถูกแยกเป็นสายเดี่ยวด้วยการทำให้ดีเอ็นเอให้เสียสภาพ (denaturation) ด้วยความร้อนหรือสารเคมี เมื่อดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวสารเคมีไบซัลไฟต์จะสามารถเข้าไปเปลี่ยนเบสไซโตซีน (Cytosine, C) ที่ไม่เกิดเมทิลเลชัน เปลี่ยนเป็นเบส Uracil (U) แต่ถ้าเบสไซโตซีนถูกเมทิลเลชัน (5-methyl cytosine, ^mC) คือ เบสไซโตซีนที่มีหมู่เมทิล (CH_3) อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 จะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา deamination เบสไซโตซีนยังคงสภาพเช่นเดิมไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่าน bisulfite conversion แล้ว ไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิซิตีอาร์ (MS-PCR) ในลำดับต่อไป โดยขั้นตอนการทำ bisulfite conversion ของดีเอ็นเอ ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก (ภาพ 2) ดังนี้



ภาพ 2 หลักการทำ bisulfite conversion เพื่อเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สถานะเมทิลเลชันของยีน Imprinting (ยีน *SNRPN*) ด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิฟิซาร์ (อธิบายคำย่อ CpG หมายถึงบริเวณที่มีเบส CG ซ้ำต่อกันเป็นจำนวนมาก เรียกว่า CpG island ^mC หมายถึง เบส C ที่โครงสร้างมีการเติมหมู่เมทิล และ C หมายถึง เบส C โครงสร้างปกติ)

(1) การทำให้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอเสียสภาพ (Denaturation) ด้วยความร้อนที่ 95

องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที หรือการใช้สารเคมีโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว

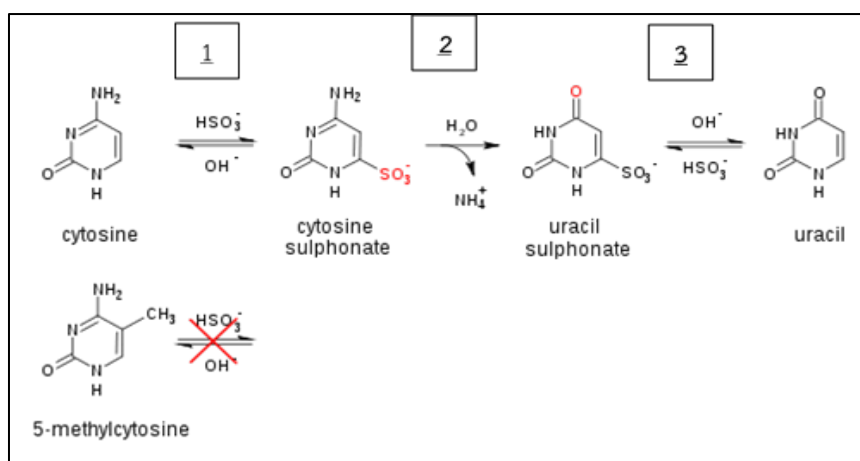
(2) การทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน ด้วยการใส่สารไบซัลไฟต์ bisulfite (HSO_3) ทำให้

เกิดปฏิกิริยา deamination เปลี่ยนแปลงเบสไซโตซีน (cytosine, C) เป็นยูราซิล (Uracil, U) ถ้าอยู่ในสถานะไม่เกิดเมทิลเลชัน เบส C จะถูกเปลี่ยนเป็น U แต่ถ้าเกิดเมทิลเลชัน เบส C จะไม่ถูกเปลี่ยนคงสภาพเป็นเบส C เช่นเดิม โดยขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา deamination ของเบส C เมื่อถูกทำปฏิกิริยาด้วยสารไบซัลไฟต์ (HSO_3) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย (ภาพ 3) ดังนี้

ขั้นตอน 1 Sulphonation คือ การเติม sulphonate group เข้าที่พันธะ 5-6 ของเบสไซโตซีน กลายเป็น Cytosine sulphonate โดยขั้นตอนนี้จะถูกควบคุมด้วย pH ความเข้มข้นของสารไบซัลไฟต์ และอุณหภูมิ การเกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้า (Forward reaction) จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อ pH ต่ำ และปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse reaction) จะเกิดขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น

ขั้นตอน 2 Hydrolytic deamination คือ Cytosine sulphonate ถูกดึง amine group (NH_2) ออกด้วยปฏิกิริยา hydrolysis กลายเป็น Uracil sulphonate ขั้นตอนนี้จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยสาร sulphite สาร bisulphite และสาร acetate anions

ขั้นตอน 3 Desulphonation คือ การกำจัด sulphonate group โดยการเติมสารประเภท อัลคาไลน์ (alkali) ทำให้กลายเป็นเบส Uracil



ภาพ 3 แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยา deamination ของเบสไซโตซีน (Cytosine, C) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารไบซัลไฟต์ (HSO_3^-) ในการทำ bisulfite conversion ของดีเอ็นเอ **แถวบน** คือ เบส C โครงสร้างปกติ เมื่อผ่านกระบวนการ bisulfite conversion (ขั้นตอน 1 Sulphonation ขั้นตอน 2 Hydrolytic deamination ขั้นตอน 3 Desulphonation) จะทำให้เบส C (cytosine) ถูกเปลี่ยนเป็น U (uracil) **แถวล่าง** คือ เบส C ที่มีการเติมหมู่เมทิล (CH_3) เมื่อผ่านกระบวนการ bisulfite conversion เบส C ที่มีการเติมหมู่เมทิล จะไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆ ยังคงสภาพเดิม ไม่เปลี่ยนเป็น U

ที่มาของภาพ https://en.wikipedia.org/wiki/Bisulfite_sequencing#/media/File:Bisulfite_conversion.svg

4. โรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน

4.1. ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน (PWS/AS)

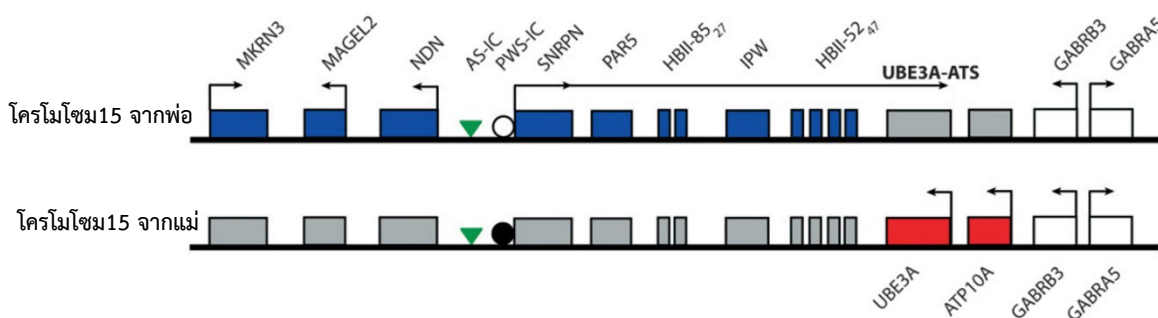
ผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) มักมีภาวะกล้ามเนื้อตึงตัวน้อยแบบรุนแรง (severe hypotonia) ทำให้การกินอาหารลำบากในช่วงวัยทารก ต่อมาในวัยเด็กจะค่อยๆ กินจุและพัฒนาเป็นโรคอ้วนผิดปกติ มีพัฒนาการล่าช้าทั้งด้านการเคลื่อนไหวและภาษา (delay developmental of motor and language) ผู้ป่วยแต่ละรายมีระดับความรุนแรงของความบกพร่องในกระบวนการรับรู้ที่แตกต่างกัน มีพฤติกรรมโดดเด่นที่พบได้บ่อย เช่น มีอารมณ์เกรี้ยวกราด (temper tantrums) ตื้อรั้น (stubbornness) มีบุคลิกย้ำคิดย้ำทำ (obsessive-compulsive characteristic) การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ไม่สมบูรณ์ แสดงลักษณะระบบสืบพันธุ์พัฒนาไม่สมบูรณ์ (genital hypoplasia) พบในทั้งเพศหญิงและเพศชาย โดยส่วนใหญ่อยู่ในภาวะไม่เจริญพันธุ์ มีบุตรยาก (infertility) ผู้ป่วยมักมีรูปร่างไม่สูง ลักษณะของใบหน้ามีตาเหล่ (strabismus) อาจพบลักษณะกระดูกสันหลังคด (scoliosis) ได้บ่อย และอาจมีการขาดภาวะการขาดอินซูลินจากโรคเบาหวานซึ่งจะเกิดขึ้นในคนที่เป็โรคอ้วน (20)

ผู้ป่วยโรคแอนเจิลแมน (AS) มีลักษณะทางคลินิกหลากหลาย ได้แก่ มีการพัฒนาล่าช้าแบบรุนแรง (severe developmental delay) หรือมีความพิการทางปัญญา (intellectual

disability) พัฒนาการช้าด้านการพูดแบบรุนแรง (severe developmental delay of language) มีอาการเดินเซหรือแขนขาสั่น (ataxia of gait) และมีพฤติกรรมที่เฉพาะ เช่น มีความสุขที่มีบ่อย หัวเราะรอยยิ้ม และความตื่นตัวง่าย มีขนาดศีรษะเล็ก (microcephaly) และมักพบอาการชักได้บ่อย พัฒนาการล่าช้าจะสังเกตเห็นเป็นครั้งแรกที่อายุประมาณหกเดือน แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางที่ หลากหลายมักจะปรากฏหลังจากอายุหนึ่งปี และอาจใช้เวลาหลายปีก่อนที่การวินิจฉัยทางคลินิกที่ ถูกต้องเป็นที่เห็นได้ชัด (21) ลักษณะทางคลินิกจะมีการแสดงออกอย่างมีความสุข และการเดินที่ไม่ มั่นคงพร้อมด้วยการยกแขนขึ้นเป็นที่สังเกตได้โดยทั่วไป ในบางครั้งลักษณะใบหน้าสามารถบอกลถึง การวินิจฉัยได้ แต่โดยปกติแล้วลักษณะใบหน้าจะไม่โดดเด่น (21)

4.2. กลไกการเกิดโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน

โรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน (PWS/AS) เกิดจากความผิดปกติของยีนในบริเวณ ชิ้นส่วนแขนข้างยาวของโครโมโซม 15 ตำแหน่ง q11-q13 ที่เรียกว่า PWS/AS critical region ยีน บริเวณนี้มีการแสดงออกในรูปแบบ imprinting gene (แสดงดังภาพ 4) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ทางพันธุ ศาสตร์อย่างหนึ่งที่ยีนหนึ่งๆ จะแสดงออกเฉพาะเมื่อได้รับมาจากพ่อหรือแม่เท่านั้น โดยยีนที่ แสดงออกจากแท่งโครโมโซมที่มาจากพ่อ จะเรียกว่า paternally expressed genes และยีนที่ แสดงออกจากโครโมโซมที่มาจากแม่ เรียกว่า maternally expressed genes (18, 22)



ภาพ 4 แบบจำลองการควบคุมการแสดงออกของยีนแบบ Imprinting บนโครโมโซมคู่ที่ 15 บริเวณ 15q11-q13 (PWS/AS region) ที่มาภาพคัดลอกจากในบทความของ M Lalande ค.ศ. 2007 (23) จากภาพ อธิบายว่า บริเวณ PWS-IC (สัญลักษณ์วงกลม) เป็นศูนย์กลางควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณ PWS region (PWS imprinting center) ซึ่งควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนบนโครโมโซมที่มาจากพ่อเท่านั้น (สัญลักษณ์บล็อก สีน้ำเงินคือยีนที่มีการแสดงออก) ได้แก่ ยีน *MKRN3* *MAGEL2* *NDN* และ *SNRPN* แต่ยีนบริเวณดังกล่าวบน โครโมโซมที่มาจากแม่จะไม่มีแสดงออก (สัญลักษณ์บล็อกสีเทาคือยีนที่ไม่มีแสดงออก) ในทางกลับกันยีน *UBE3A* และ *ATP10A* บนโครโมโซมที่มาจากแม่เท่านั้นที่มีการแสดงออก (สัญลักษณ์บล็อกสีแดงคือยีนที่มีการแสดงออก) แต่ยีนทั้งสองบนโครโมโซมที่มาจากพ่อจะไม่มีการแสดงออก บริเวณ AS-IC (สัญลักษณ์สามเหลี่ยมสีเขียว) เป็น ศูนย์กลางควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณ AS region (AS imprinting center)

(1) กลไกทางพันธุกรรม (genetic mechanism) ที่ทำให้เกิดโรคพราดอร์-วิลลี

สาเหตุเกิดจากสูญเสียการทำงานของยีนบนโครโมโซม 15 ที่มาจากพ่อที่เรียกว่า Paternal imprinting gene อยู่ในบริเวณ PWS/AS region (15q11-q13) ซึ่งมีกลไกทางพันธุกรรมการเกิดโรค PWS หลายแบบ (ตาราง 5) ได้แก่

- การขาดหายของยีนบริเวณ 15q11-q13 บนโครโมโซม 15 ที่มาจากพ่อ (15q11-q13 paternal deletion) ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS ประมาณร้อยละ 65-75
- การมีโครโมโซม 15 ทั้งสองแท่งมาจากแม่ (Maternal uniparental disomy 15, maternal UPD15) ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS ประมาณร้อยละ 20-30
- ความผิดปกติของกลไก Imprinting ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณ PWS/AS region (Imprinting defect, ID) ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS ประมาณร้อยละ 2
- ความผิดปกติของกลไก Imprinting (Imprinting defect, ID) ที่เกิดการขาดหายของบริเวณ imprinting center (IC) ของยีนบริเวณ PWS/AS region (ID with IC deletion) ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS น้อยกว่าร้อยละ 0.5
- ความผิดปกติของแท่งโครโมโซม 15 แบบ Unbalanced chromosome rearrangement ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS น้อยกว่าร้อยละ 1

โดยกลไกเกิดโรค PWS ทุกรูปแบบจะเกิดความเสี่ยงการเป็นโรคกลับซ้ำในลูกคนถัดไป (sibling risk) แตกต่างกัน (ตาราง 5) โดยถ้ากลไกการเกิดโรคแบบ 15q11-q13 deletion หรือ maternal UPD15 ความเสี่ยงเป็นกลับซ้ำจะเท่ากับ ร้อยละ 1 แต่ถ้ากลไกเกิดจาก ID with IC deletion หรือ unbalanced chromosome rearrangement ความเสี่ยงการเป็นกลับซ้ำในพี่น้องจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50 ดังนั้นครอบครัวของผู้ป่วยควรได้รับคำปรึกษาทางพันธุกรรม และควรมีการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด (Prenatal testing) ในกรณีหญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงของ sibling risk เพิ่มขึ้น (20)

ตาราง 5 กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรคพราดอร์-วิลลี (PWS)

กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรค PWS	สัดส่วนที่พบในผู้ป่วย PWS	สัดส่วนการเป็นโรคกลับซ้ำในลูกคนถัดไป
15q11-q13 paternal deletion	ร้อยละ 65-75	น้อยกว่า ร้อยละ 1
Maternal UPD15	ร้อยละ 20-30	น้อยกว่า ร้อยละ 1
ID without IC deletion	ร้อยละ 2	น้อยกว่า ร้อยละ 1
ID with deletion in IC	น้อยกว่า ร้อยละ 0.5	ร้อยละ 50 ถ้าพ่อมี IC deletion
Unbalanced chromosome rearrangement	น้อยกว่า ร้อยละ 1	ร้อยละ 50

หมายเหตุ: IC= Imprinting Center, ID=Imprinting defect, UPD=uniparental disomy

(2) กลไกทางพันธุกรรม (genetic mechanism) ที่ทำให้เกิดโรคแอสเพอร์เกอร์

สาเหตุเกิดจากการสูญเสียการแสดงออกของยีนบนโครโมโซม 15 ที่มาจากแม่ที่เรียกว่า Maternally imprinted UBE3A gene อยู่ในบริเวณ PWS/AS region (15q11-q13) ซึ่งมีกลไกทางพันธุกรรมทำให้เกิดโรคหลายแบบ (ตาราง 6) ได้แก่

- การขาดหายของยีนบริเวณ 15q11-q13 บนโครโมโซม 15 ที่มาจากแม่ (15q11-q13 maternal deletion) ซึ่งพบในผู้ป่วย AS ประมาณร้อยละ 65-75
 - การมีโครโมโซม 15 ทั้งสองแท่งมาจากพ่อ (Paternal uniparental disomy 15, paternal UPD15) ซึ่งพบในผู้ป่วย AS ประมาณร้อยละ 3-7
 - ความผิดปกติของกลไก Imprinting ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณ PWS/AS region (Imprinting defect, ID) ซึ่งพบในผู้ป่วย AS ประมาณร้อยละ 2.5-3
 - ความผิดปกติของกลไก Imprinting (Imprinting defect, ID) ที่เกิดการขาดหายของบริเวณ imprinting center (IC) ของยีนบริเวณ PWS/AS region (ID with IC deletion) ซึ่งพบในผู้ป่วย PWS น้อยกว่าร้อยละ 0.3
 - ความผิดปกติของแท่งโครโมโซม 15 แบบ Unbalanced chromosome rearrangement ซึ่งพบในผู้ป่วย AS น้อยกว่าร้อยละ 1
 - การกลายพันธุ์ยีน UBE3A แบบ point mutation พบในผู้ป่วย AS ประมาณร้อยละ 11
 - ความผิดปกติอื่นๆ ที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัดอีกประมาณร้อยละ 10
- โดยกลไกการเกิดโรค AS ทุกรูปแบบจะเกิดความเสี่ยงที่จะเป็นกลับซ้ำในลูกคนถัดไป (sibling risk) แตกต่างกัน (ตาราง 6) โดยกลไกเกิดจากแบบ deletion และ UPD ความเสี่ยงเท่ากับ ร้อยละ 1 แต่ถ้ากลไกเกิดจาก UBE3A mutation หรือ Unbalanced chromosome translocation หรือ ID with IC deletion ความเสี่ยงจะเพิ่มสูงขึ้น เป็นร้อยละ 50 ดังนั้นหญิงการตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยง sibling risk สูง จึงควรมีการทดสอบก่อนคลอดเช่นกัน (21)

ตาราง 6 กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรคแองเจิลแมน (AS)

กลไกทางพันธุกรรมของการเกิดโรค AS	สัดส่วนที่พบในผู้ป่วย AS	สัดส่วนการเป็นโรคกลับซ้ำในลูกคนถัดไป
15q11-q13 maternal deletion	ร้อยละ 65-75	น้อยกว่า ร้อยละ 1
Paternal UPD15	ร้อยละ 3-7	น้อยกว่า ร้อยละ 1
ID without IC deletion	ร้อยละ 2.5-3	น้อยกว่า ร้อยละ 1
ID with deletion in IC	น้อยกว่า ร้อยละ 0.3	ร้อยละ 50 ถ้าแม่มี IC deletion
Unbalanced chromosome rearrangement	น้อยกว่า ร้อยละ 1	ร้อยละ 50
UBE3A pathogenic variant	ร้อยละ 11	ร้อยละ 50 ถ้าแม่มี UBE3A pathogenic variant
"Other" - no identifiable molecular abnormality	ร้อยละ 10	ไม่มีข้อมูล

หมายเหตุ: IC= Imprinting Center, ID=Imprinting defect, UPD=uniparental disomy

5. วิธีการตรวจทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีและแองเจิลแมน (PWS /AS)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรค PWS/AS ด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีหลากหลายวิธี แสดงในตาราง 7 และ 8 โดยแต่ละวิธีการมีความสามารถในการตรวจหากลไกการเกิดโรค PWS/AS (ตาราง 5 และ 6) ได้แตกต่างกัน โดยปัจจุบันวิธีทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่นำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทั้งในทางคลินิกและงานวิจัยมีรายละเอียด ดังนี้

- DNA methylation analysis ได้แก่ methylation-specific PCR หรือ Southern blot analysis
- Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)
- Fluorescent in situ hybridization (FISH)
- Chromosomal microarray (CMA) และ CMA-SNP array
- Uniparental disomy (UPD) analysis
- DNA Sequencing

โดยในคู่มือเล่มนี้กล่าวถึงเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิเคชันอาร์

ตาราง 7 วิธีการทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) ในปัจจุบัน (20)

วิธีทดสอบ	กลไกพันธุกรรมการเกิดโรค PWS	สัดส่วน PWS ที่ตรวจพบ
DNA methylation analysis	Deletions, UPD & ID	มากกว่า ร้อยละ 99
MS-MLPA	Deletions, UPD & ID	มากกว่า ร้อยละ 99
FISH	Deletions	ร้อยละ 65-75
CMA	Deletions	ร้อยละ 65-75
CMA-SNP array	Deletions & some UPDs	ร้อยละ 80-90
UPD analysis	UPD and ID	ร้อยละ 20-30
DNA sequencing	ID with IC deletions	น้อยกว่า ร้อยละ 1

หมายเหตุ: IC = imprinting center; ID = imprinting defect; UPD = uniparental disomy

ตาราง 8 วิธีการทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคแอสเพอร์เกอร์ (AS) ในปัจจุบัน (21)

วิธีทดสอบ	กลไกพันธุกรรมการเกิดโรค AS	สัดส่วน AS ที่ตรวจพบ
DNA methylation analysis	15q11.2-q13del, UPD, ID	ประมาณ ร้อยละ 80
MS-MLPA	15q11.2-q13del, UPD, ID	ประมาณ ร้อยละ 80
FISH	15q11.2-q13del	ประมาณ ร้อยละ 68
CMA	15q11.2-q13del, UPD	ร้อยละ 70-75
UPD analysis	UPD	ร้อยละ 3-7
AS IC deletion analysis (MLPA, qPCR)	ID	น้อยกว่า ร้อยละ 0.3
UBE3A sequence analysis	UBE3A seq variant	ประมาณ ร้อยละ 11
UBE3A gene-targeted del/dup analysis (CMA)	UBE3A del/dup	น้อยมาก (Rare)

หมายเหตุ: IC = imprinting center, ID = imprinting defect; UPD = uniparental disomy, del/dup = deletion/duplication

5.1. การทดสอบเมทิลเลชั่นสเปคิฟิซิตีเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี และแอสเพอร์เกอร์

การศึกษาของ Sutcliffe และคณะ ปี ค.ศ. 1994 และ Buiting และคณะ ปี ค.ศ. 1995 ที่ผ่านมามีการค้นพบว่าการเติมหมู่เมทิลบนโปรโมเตอร์ของยีน *SNRPN* มีความแตกต่างกันระหว่างโครโมโซมที่มาจากพ่อและมาจากแม่ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค PWS รวมถึงการศึกษาของ Zeschnigk ปี

1997 พบว่า CpG บนโปรโมเตอร์ยีน *SNRPN* จากโครโมโซมที่มาจากแม่อยู่ในภาวะเมทิลเลชันมากกว่า 96% ขณะที่โครโมโซมที่มาจากพ่อจะไม่เกิดภาวะเมทิลเลชัน ด้วยเหตุผลนี้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอบนโปรโมเตอร์ของยีน *SNRPN* ด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค PWS/AS ในปัจจุบัน รวมถึงวิธีการนี้ยังมีประสิทธิภาพในการตรวจหาความผิดปกติที่เป็นสาเหตุทางพันธุกรรมของโรค PWS/AS ได้ทั้งสามรูปแบบ ได้แก่ แบบ deletion แบบ uniparental disomy และแบบ Imprinting defect และยังสามารถวินิจฉัยแยกโรค PWS ออกจาก AS ได้อีกด้วย (18, 22, 24, 25, 26) โดยการทดสอบใช้หลักการตรวจหาภาวะเมทิลเลชันบนโปรโมเตอร์ของยีน *SNRPN* ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่เกิดเมทิลเลชันของยีน *SNRPN* ที่มาจากโครโมโซมแม่ ที่เรียกว่า maternal methylation primers และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ไม่เกิดเมทิลเลชันของยีน *SNRPN* ที่มาจากโครโมโซมพ่อ ที่เรียกว่า paternal unmethylation primers ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านการทำ bisulfite conversion มาก่อน จากการทบทวนวรรณกรรมพบงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้วิธีเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค PWS/AS มีหลายการศึกษา (27-29) คู่มือเล่มนี้จะกล่าวถึงเพียงสองงานวิจัย ได้แก่ Kubota T และคณะปี ค.ศ. 1997 และ Hussain Askree S และคณะ ปี ค.ศ. 2011 ซึ่งเป็นงานวิจัยที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์นำข้อมูลไพรเมอร์มาประยุกต์ใช้ในงานบริการตรวจทดสอบด้วยวิธีการเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อวินิจฉัยโรค PWS/AS โดยแสดงลำดับ นิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ในตาราง 9 และ 10 ตามลำดับ

ตาราง 9 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์จากงานวิจัย Kubota T และคณะปี ค.ศ. 1997 (28)

ชื่อไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทป์ไพรเมอร์ (5'-3')	ผลพีซีอาร์ (base pair)
SNRPN-M_F	Maternal methylation	5'-TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTG-3'	174
SNRPN-M_R	Maternal methylation	5'-AACCTTACCCGCTCCATCGCG-3'	
SNRPN-P_F	Paternal unmethylation	5'-GTAGGTGGTGGTGGTATGTTAGGT-3'	100
SNRPN-P_R	Paternal unmethylation	5'-ACATCAAAACATCTCCAACAACCA-3'	

ตาราง 10 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์จากงานวิจัย Hussain Askree S และคณะ ปี ค.ศ. 2011 (29)

ชื่อไพรเมอร์		ลำดับนิวคลีโอไทป์ไพรเมอร์ (5'-3')	ผลพีซีอาร์ (base pair)
Alt-MF	Maternal methylation	5'-TCGATGGTATTTTGTTCGTTTCGTATTGGGGCGC-3'	152
Alt-MR	Maternal methylation	5'-ACCCATATCCCTTACCCACTACGATTACCCCG-3'	
Alt-PF	Paternal unmethylation	5'-TTGATGGTATTTTGTGGTGGTATTGGGGTGT-3'	100
Alt-PR	Paternal unmethylation	5'-ACCACAGACACCCACAATAAACCTATCACAA-3'	

5.2. การตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยหลักการแยก (separate) ชิ้นดีเอ็นเอด้วยการเคลื่อนที่ผ่านเจลตัวกลางในสนามไฟฟ้า ชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ จึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดต่างกันออกจากกันได้ อิเล็กโตรโฟรีซิสที่นิยมใช้มีสองแบบ ได้แก่ แบบแคปิลลารี (Capillary electrophoresis) และแบบเจล (Gel electrophoresis) โดยแบบแคปิลลารีจะต้องใช้เครื่องมือพิเศษราคาแพง เช่น เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Genetic Analyzer) ซึ่งขั้นตอนการทำงานเป็นแบบอัตโนมัติ ไม่ยุ่งยาก ส่วนแบบเจลนิยมใช้กันทั่วไปเพราะใช้เครื่องมืออุปกรณ์ราคาไม่แพง แต่มีขั้นตอนการทำงานหลายขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมเจล การเตรียมบัฟเฟอร์ การโหลดตัวอย่างลงเจล การรันอิเล็กโตรโฟรีซิส การย้อมเจลด้วยสีย้อมเรืองแสง และการตรวจสอบผลเจลด้วยการส่องด้วยแสง UV (ultraviolet) มีรายละเอียดแนวคิดในแต่ละขั้นตอนดังนี้ (30)

5.2.1. ชนิดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เจลตัวกลางที่นิยมใช้มีสองชนิด ได้แก่ เจลชนิดอะคริลามิด (Acrylamide gel) และเจลชนิดอะกาโรส (Agarose gel) การเลือกใช้ชนิดเจลจะขึ้นกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในแต่ละการทดสอบ โดยเจลอะคริลามิดมีความสามารถในการแยกชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 5-500 bp ได้ดี และสามารถแยก 1 bp ออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามเจลอะคริลามิดมีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยาก และมีความเป็นพิษสูง นิยมในงานบางประเภท เช่น งานแยกโปรตีน และงาน sequencing แบบ slab gel ส่วนเจลอะกาโรส มีความสามารถในการแยกต่ำกว่าเจลอะคริลามิด แต่มีช่วงการแยกกว้างกว่า และสามารถแยกดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ขนาด 50bp ถึง หลายเมกะเบส อีกทั้งมีขั้นตอนการเตรียมง่ายไม่ยุ่งยาก และไม่เป็นพิษ จึงนิยมใช้ในงานพีซีอาร์ทั่วไป เจลอะกาโรสที่มีขายทั่วไปมีคุณสมบัติของเจลอะกาโรสหลายแบบ ได้แก่ เจลอะกาโรสแบบมาตรฐาน (High-melting-temperature) เจลอะกาโรสแบบ Low-melting/Gelling-temperature เจลอะกาโรสแบบ Chemically Modified และเจลอะกาโรสแบบ Electroendo-Osmosis (30)

5.2.2. บัฟเฟอร์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ native หรือ double stranded DNA มี 3 แบบ ได้แก่ Tris-acetate and EDTA (TAE, pH 8.0) Tris-borate and EDTA (TBE, pH8.0) และ Tris-phosphate (TPE, pH7.5-7.8) ซึ่งนิยมใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-1X โดยบัฟเฟอร์ TAE การใช้ซ้ำหรือใช้เป็นเวลานานจะทำให้คุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงควรมีการกำหนดอายุการใช้งานของ TAE ให้ชัดเจน เพื่อลดผลเสียในระหว่างการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ส่วน

บัฟเฟอร์ TBE และ TPE มีคุณสมบัติการเป็น buffer ที่สูงกว่า TAE จึงใช้ซ้ำได้นานกว่า แต่อย่างไรก็ตาม TBE และ TPE มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ TAE และลักษณะการเคลื่อนที่ดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TAE จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าใน TBE และ TPE ประมาณ 10% จึงทำให้การแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ในบัฟเฟอร์ TAE แยกได้ดีกว่าใน TBE และ TPE แต่ถ้าดีเอ็นเอขนาดเล็กสามารถแยกได้ดีพอๆกัน บัฟเฟอร์มีคุณสมบัติเป็นต่าง (pH 7.5-8.0) จึงทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอในการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เคลื่อนที่ผ่านเจลตัวกลางจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสจะคำนวณได้ด้วยสูตร $V = IR$ (V = voltage, I =amperes, R =resistance (ohms)) และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่มีดังต่อไปนี้

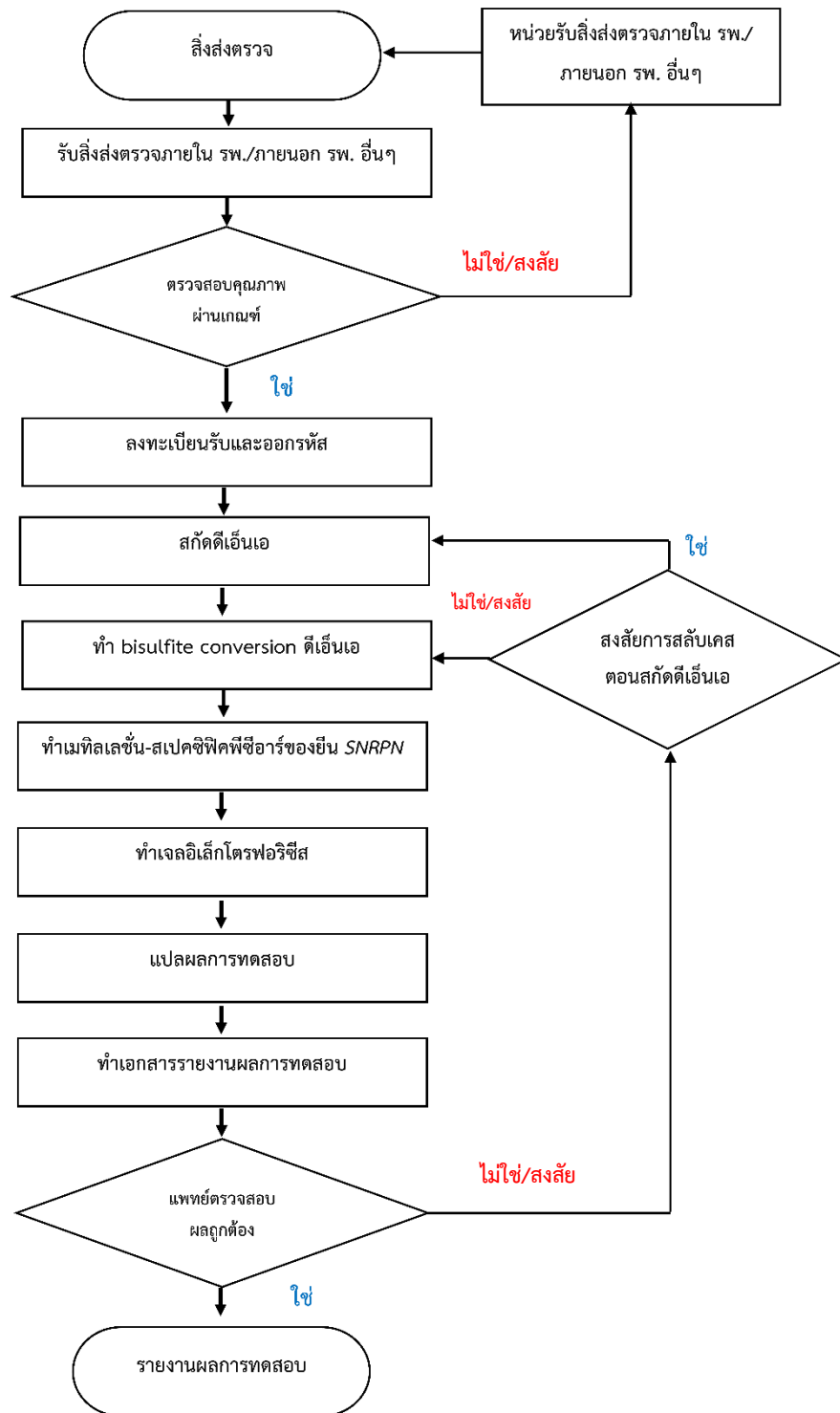
- กระแสไฟฟ้า (โมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าขนาดเล็ก)
- ความเข้มข้นของเจล เจลความเข้มข้นน้อยดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าความเข้มข้นมาก
- รูปร่างของดีเอ็นเอ เช่น แบบเกลียว (Superhelical) แบบวงกลม (circular Nickedcircular) และแบบเส้น (linear) ทั้ง 3 แบบมีอัตราเคลื่อนที่ผ่านเจลอะกาโรสต่างกัน
- การใช้ความต่างศักย์ เมื่อเพิ่มความต่างศักย์จะให้ความสามารถในการแยกด้วยเจลอะกาโรสลดลง การแยกดีเอ็นเอที่ขนาด > 2 kb ในเจลอะกาโรส ควรใช้ความต่างศักย์ไม่เกิน 5-8 โวลต์ต่อเซนติเมตร (V/cm)
- ชนิดเจลอะกาโรส มี 2 แบบหลัก คือ 1) เจลแบบมาตรฐาน (standard) มีจุดหลอมเหลว (Melting temperature) 85-95 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิแข็งตัวเป็นเจล (Gelling temperature) 36-42 องศาเซลเซียส และเจลแบบอุณหภูมิในการหลอมเหลวต่ำ (Low-melting temperature) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 65 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิแข็งตัวเป็นเจล (gelling temperature) 30-35 องศาเซลเซียส
- การเคลื่อนที่ดีเอ็นเอในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสขึ้นกับความแรงของไอออนของบัฟเฟอร์ ถ้าไม่มีไอออน (ใช้น้ำแทนบัฟเฟอร์) จะไม่มีไอออนนำกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอก็จะไม่เคลื่อนที่ ถ้าบัฟเฟอร์มีความแรงของไอออนสูง (กรณีใช้ผิด เป็น 10X buffer) การนำกระแสไฟฟ้ามาก เกิดความร้อนสูงมาก อาจทำให้เจลหลอมเหลวได้ (30)

บทที่ 4

เทคนิคในการปฏิบัติงาน

แผนปฏิบัติงาน

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแองเจิลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* (Laboratory Diagnostics for Prader-willi /Angelman syndrome using Methylation-Specific PCR for *SNRPN* gene) ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจหลักการตรวจวิเคราะห์ด้านอณูพันธุศาสตร์ ดังต่อไปนี้ 1) การตรวจสอบคุณภาพสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ 2) การรับและลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจ 3) การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ 3) การทำ bisulfite conversion ดีเอ็นเอ 4) การทำพีซีอาร์และข้อจำกัดของพีซีอาร์แต่ละประเภท 5) การคำนวณปริมาณสารสัมพันธ์ในการเตรียมสารเคมี 6) การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 7)การแปลผลการทดสอบ 8) และความรู้ความเข้าใจด้านระบบคุณภาพ ISO 15189 รวมถึงยังต้องมีทักษะที่จำเป็นอื่นๆ ได้แก่ ทักษะการใช้ปิเปต ทักษะการใช้เครื่องมือ เช่น เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่อง centrifuge และตู้ชีววินัย เป็นต้น โดยผู้ปฏิบัติงานต้องนำความรู้และทักษะดังกล่าวมาวางแผนการปฏิบัติการทดสอบให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำทันเวลาที่กำหนด ลดการสูญเสียจากการทำซ้ำ ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดประสิทธิผลสูงสุด โดยแผนปฏิบัติงานตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแองเจิลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* แสดงดังแผนภูมิ 4



แผนภูมิ 4 แผนปฏิบัติงานตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจิลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิเคชันของยีน SNRPN

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชันสเปคซิฟิฟิซาร์ของยีน *SNRPN* ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ 1) การรับส่งตรวจทางอนุพันธุศาสตร์ 2) การลงทะเบียนรับและออกรหัส 3) การสกัดดีเอ็นเอ 4) การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ 5) การทำ bisulfite conversion ดีเอ็นเอ 6) การทำเมทิลเลชันสเปคซิฟิฟิซาร์ของยีน *SNRPN* 7) การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 8) การแปลผลการทดสอบ 9) และการจัดทำเอกสารใบรายงานผลการทดสอบ ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงาน ดังนี้

1. การรับส่งตรวจทางอนุพันธุศาสตร์สำหรับตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจลแมน

ชนิดสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจลแมนของหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ มี 2 ชนิดหลัก ได้แก่ กรณีส่งตรวจแบบหลังคลอด (postnatal) จะใช้สิ่งส่งตรวจเลือดหลอดฝาสีม่วง (EDTA tube) ปริมาตร 3-6 มิลลิลิตร แต่กรณีตรวจแบบก่อนคลอด (prenatal) จะใช้น้ำคร่ำ ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร หรือใช้เลือดจากสายสะดือที่บรรจุในหลอดหลอดฝาสีม่วง ปริมาตร 0.5-2 มิลลิลิตร โดยควรจัดส่งสิ่งส่งตรวจทันทีภายใน 24 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่าง กรณีส่งไม่ทันภายใน 24 ชั่วโมง ให้เก็บรักษาสิ่งส่งตรวจไว้ตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม 2-8 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็งโดยเด็ดขาด แล้วจัดส่งในวันถัดไป

สิ่งส่งตรวจถูกส่งมาที่ห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ จาก 2 ช่องทางหลัก ได้แก่ สิ่งส่งตรวจจากภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และสิ่งส่งตรวจจากภายนอก (โรงพยาบาลอื่นๆ) โดยหน่วยรับส่งตรวจ (OPD Lab หรือ Center Lab) สาขาวิชาพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นศูนย์กลางรับส่งตรวจจากทั้งภายในและภายนอกโรงพยาบาล มีหน้าที่กระจายสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆตามใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ (request form) แต่กรณีสิ่งส่งตรวจบางชนิด เช่น น้ำคร่ำ และเลือดจากสายสะดือจากคลินิกอัลตราซาวด์ หรือสิ่งส่งตรวจที่ส่งผ่านไปรษณีย์จากโรงพยาบาลภายนอก จะถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์โดยตรง เมื่อสิ่งส่งตรวจถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์มีหน้าที่รับส่งตรวจตามขั้นตอนที่กำหนด ซึ่งมีขั้นตอนในการปฏิบัติ ดังนี้

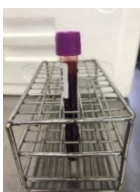
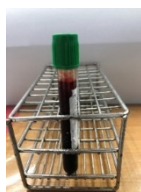
(1) ใช้โปรแกรม Molecular diag เข้าถึงข้อมูลใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการแบบออนไลน์เมื่อสิ่งส่งตรวจภายในส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ กรณีส่งตรวจจากภายนอก ตัวอย่างตรวจจะถูกส่งมาพร้อมกับใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ

(2) ตรวจสอบข้อมูลใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ

อนุพันธุศาสตร์แสดงในภาคผนวก ก) ต้องมีการระบุรายละเอียดที่จำเป็นสำหรับการส่งตรวจอย่างครบถ้วน ได้แก่ ชื่อ-สกุลผู้ป่วย เลขที่ผู้ป่วย (HN) อายุ เพศ ชื่อแพทย์หรือผู้มีอำนาจขอส่งตรวจ หน่วยงานที่ส่งตรวจ ชนิดสิ่งส่งตรวจ รายการที่ขอตรวจ การวินิจฉัยโรคหรืออาการทางคลินิก วันที่และเวลาเจ้าหน้าที่ได้รับสิ่งส่งตรวจ และตรวจสอบรายละเอียดข้างลวดตัวอย่างว่าตรงกับข้อมูลในใบขอส่งตรวจหรือไม่

(3) ตรวจสอบคุณลักษณะของสิ่งส่งตรวจ ตามรายการตรวจสอบคุณลักษณะสิ่งส่งตรวจเลือดและน้ำคร่ำทางอนุพันธุศาสตร์สำหรับตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจลแมน (ตาราง 11) หากพบว่าคุณลักษณะเหมาะสมให้ดำเนินการรับสิ่งส่งตรวจเข้าระบบ แต่กรณีคุณลักษณะไม่เหมาะสมให้ปฏิเสธการรับสิ่งส่งตรวจ กรณีสิ่งส่งตรวจที่นอกเหนือจากเลือดและน้ำคร่ำให้ใช้เกณฑ์ตามตารางแนวทางปฏิบัติในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ การขนส่งและการเก็บรักษา (ตาราง 2)

ตาราง 11 รายการตรวจสอบคุณลักษณะสิ่งส่งตรวจทางอนุพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจลแมน

รายการตรวจสอบ คุณลักษณะสิ่งส่งตรวจ	ลักษณะเหมาะสม กับงานทางอนุพันธุศาสตร์ รับสิ่งส่งตรวจ (✓)	ลักษณะไม่เหมาะสม กับงานทางอนุพันธุศาสตร์ ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ (✗)
1.ภาชนะบรรจุ		
• ตัวอย่างเลือด	หลอดฝาสีม่วง (EDTA tube) ในการเก็บเลือดส่งตรวจ 	หลอดเก็บเลือดผิดประเภท โดยมักพบการใช้ผิดเป็นหลอดฝาสีเขียว (heparin tube) ได้บ่อยที่สุด 
• ตัวอย่างน้ำคร่ำ	ควรปิดปลอกเข็มปลายไซริง (syringe) ให้แน่น ป้องกันน้ำคร่ำหกรั่วไหล	ไซริงน้ำคร่ำที่หกรั่วไหล
2.ปริมาณ		
• ตัวอย่างเลือด	เลือด 3-6 มิลลิลิตร	เลือด น้อยกว่า 2 มิลลิลิตร

ตาราง 11 (ต่อ) รายการตรวจสอบคุณลักษณะสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจิลแมน

รายการตรวจสอบ คุณลักษณะสิ่งส่งตรวจ	ลักษณะเหมาะสม กับงานทางอณูพันธุศาสตร์ รับสิ่งส่งตรวจ (✓)	ลักษณะไม่เหมาะสม กับงานทางอณูพันธุศาสตร์ ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ (✗)
2.ปริมาณ (ต่อ)		
• ตัวอย่างน้ำคร่ำ	น้ำคร่ำ 10-20 มิลลิลิตร	น้ำครำน้อยกว่า 10 มิลลิลิตร จะพิจารณาเป็นกรณี โดยจะตรวจสอบปริมาณเซลล์เบื้องต้น กรณีอายุครรภ์สูงปริมาณเซลล์มากพอจะไม่ปฏิเสธ แต่ถ้าอายุครรภ์น้อยปริมาณเซลล์น้อยจะโทรแจ้งแพทย์ผู้ส่งว่ามีแนวโน้มอาจไม่ได้ผลการตรวจ เนื่องจากปริมาตรน้อยกว่าที่กำหนด และให้แพทย์ตัดสินใจว่าจะส่งตรวจหรือไม่
3.ลักษณะภายนอกที่สังเกตได้		
• ตัวอย่างเลือด	เลือดสีแดงสดแบบปกติ	เลือดมีสภาพใสผิดปกติหรือสีคล้ำผิดปกติ หรือจับกันเป็นก้อน หรือหนืดผิดปกติ
• ตัวอย่างน้ำคร่ำ	น้ำคร่ำ เหลือง ใสสีฟางขาว 	น้ำคร่ำปนเลือดปริมาณมากจนน้ำคร่ำเป็นสีแดง 
4.การบ่งชี้ข้อมูลข้างหลอด		
ตัวอย่างเลือดและน้ำคร่ำ	มีข้อมูลที่ระบุชัดเจนข้างหลอด ได้แก่ ข้อมูลผู้ป่วยชื่อ-สกุลผู้ป่วย HN วันที่เก็บ ward/ OPD และโรงพยาบาล	ไม่มีข้อมูลผู้ป่วยชื่อ-สกุลผู้ป่วย และ HN และ ward/ OPD และโรงพยาบาล
5.ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ (request form) และ/หรือเอกสารยินยอมการเจาะน้ำคร่ำ		
ตัวอย่างเลือดและน้ำคร่ำ	- มี request form มาพร้อมตัวอย่างเลือดหรือน้ำคร่ำ และรายละเอียดข้อมูลครบถ้วน - กรณีตัวอย่างน้ำคร่ำ มีเอกสารลงนามผู้ป่วยยินยอมให้เจาะและรับทราบข้อจำกัดของการเจาะน้ำคร่ำ	- ไม่มี request form มาพร้อมกับตัวอย่างหรือมี request form แต่ข้อมูลไม่ครบถ้วน - กรณีตัวอย่างน้ำคร่ำ ไม่มีเอกสารลงนามผู้ป่วยยินยอมให้เจาะและรับทราบข้อจำกัดของการเจาะน้ำคร่ำ

(4) ขั้นตอนการปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

- โทรแจ้งกับทางหน่วยรับส่งตรวจ เพื่อปฏิเสธการรับส่งตรวจพร้อมกับแจ้งสาเหตุที่ต้องปฏิเสธ
- ทำการยกเลิกใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยการขีดเส้นทแยงจากมุมด้านล่างซ้ายมือไปที่มุมด้านบนขวามือบนใบขอส่งตรวจด้วยปากกาสีแดงพร้อมเซ็นชื่อผู้ทำการยกเลิกและวันที่กำกับ
- บันทึกรายละเอียดที่ได้โทรแจ้งกับทางหน่วยรับส่งตรวจ ซึ่งประกอบด้วย วันและเวลาที่แจ้ง ชื่อผู้รับเรื่องและผู้แจ้งเรื่อง ชื่อสกุลของผู้ป่วยที่ปฏิเสธส่งตรวจ สาเหตุที่ยกเลิกและผลที่แจ้ง ในแบบฟอร์ม Incidence report

(5) กรณีที่ปฏิเสธส่งตรวจที่ไม่ได้มาตรฐานไปแล้ว แต่แพทย์ยืนยันให้ทำการตรวจ มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

- แจ้งกับแพทย์ผู้ส่งตรวจว่า การตรวจวิเคราะห์ด้วยตัวอย่างส่งตรวจที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลให้การตรวจคลาดเคลื่อน หรืออาจไม่ได้ผลการตรวจ
- กรณีแพทย์ยืนยันการตรวจจากตัวอย่างตรวจที่ไม่เหมาะสม ให้บันทึกข้อความ “สิ่งส่งตรวจไม่ได้มาตรฐานแต่แพทย์ยืนยันให้ทำการตรวจ” ไว้ด้านล่างสุดซ้ายมือในใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ ด้วยปากกาสีแดง และเซ็นชื่อ วันที่ เดือน ปี กำกับไว้ด้วย
- การบันทึกผลในระบบคอมพิวเตอร์เครือข่าย (HIS) ต้องพิมพ์ข้อความ “สิ่งส่งตรวจไม่ได้มาตรฐานแต่แพทย์ยืนยันให้ทำการตรวจ” ทั้งตัวอย่างที่ได้ผลการตรวจและไม่ได้ผลการตรวจ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ควรปฏิบัติงานตามขั้นตอนที่กำหนดข้างต้นด้วยความรอบคอบและระมัดระวัง โดยผู้เขียนคู่มือได้รวบรวมเทคนิคการปฏิบัติการและข้อพึงระวังในการรับลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจไว้ใน ตาราง 12

2. การลงทะเบียนรับและออกรหัส

นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ดำเนินการลงทะเบียนรับตัวอย่างเพื่อระบุรหัสตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Molecular diag โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

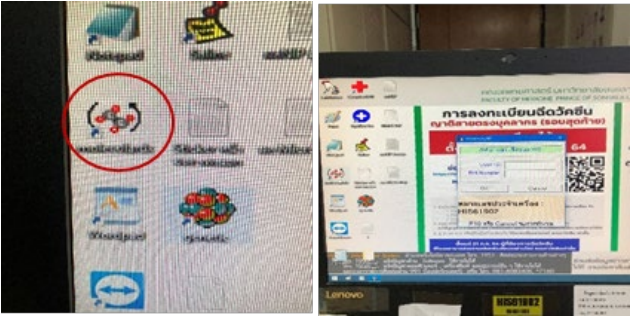
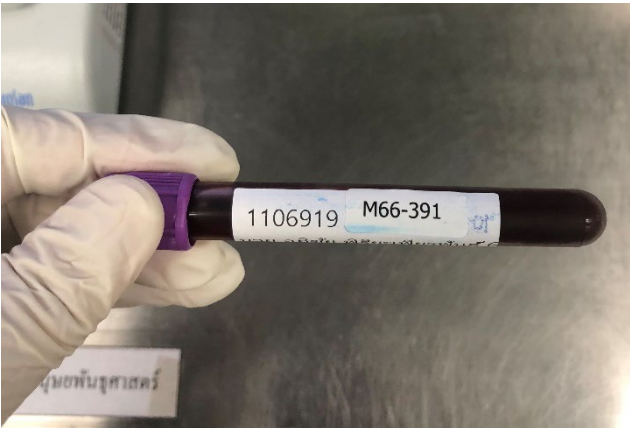
(1) ระบุรหัสตัวอย่างตามที่กำหนดและออกรหัสเรียงตามลำดับ

โค้ด	รายการทดสอบ	วิธีการให้ลำดับ	ตัวอย่างการให้รหัส
M	รายการทดสอบทางอณูพันธุศาสตร์ที่ตรวจทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา	M-ปี-ลำดับที่	M65-0001 M65-0002
F	รายการทดสอบเซลล์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เทคนิค FISH	F-ปี-ลำดับที่	F65-0001
S	รายการทดสอบอณูพันธุศาสตร์ส่งต่อโรงพยาบาลศิริราช	S-ปี-ลำดับที่	S65-0001
X	รายการทดสอบสก็ดดีเอ็นเอ	X-ปี-ลำดับที่	X65-0001

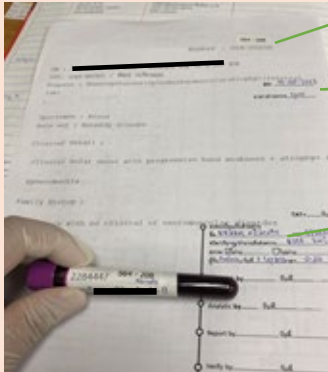
(2) กรณีส่งส่งตรวจจากภายในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ต้องพิมพ์ใบขอส่งตรวจออนไลน์ และบันทึกลักษณะตัวอย่างที่เห็นจริงจากข้างหลอดตัวอย่างลงบนใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการ

(3) กรณีส่งส่งตรวจจากภายนอกโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เจ้าหน้าที่ต้องบันทึกข้อมูลจากใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มาพร้อมตัวอย่างส่งตรวจ ลงในโปรแกรม Molecular diag เพื่อทำการออกรหัสและปฏิบัติตามขั้นตอนเดียวกับส่งส่งตรวจภายใน

ตาราง 12 เทคนิคและข้อพึงระวังในการรับและลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์

ขั้นตอนการรับลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจ	เทคนิคและข้อพึงระวัง
1.ตัวอย่าง (เลือดบรรจุหลอด EDTA ฝาม่วง) ถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ 	(1) กรณีตัวอย่างมาก่อนเวลา 16:30 น ต้องลงทะเบียนส่งตรวจให้เสร็จสิ้นภายในวันที่ส่งตรวจส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ Turnaround time (TAT) ถูกต้องตามความจริง ซึ่งผู้ป่วยจะได้รับผลประโยชน์สูงสุด ถ้าการรายงานผลการทดสอบอยู่ภายใน TAT ที่กำหนด
2.ตรวจสอบคุณภาพสิ่งส่งตรวจ และใช้โปรแกรม Molecular diag เข้าถึงข้อมูลใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการแบบออนไลน์ ลงทะเบียนรับและออกรหัสตัวอย่าง  	(2) ติดสติ๊กเกอร์ Lab Number ข้างหลอดตัวอย่างในตำแหน่งที่มองเห็นชัดเจน ระวังไม่ให้ปิดทับข้อมูลอื่น และควรติดในตำแหน่งใกล้เคียงกับชื่อและ HN เพื่อให้่ายในการทวนสอบในขั้นตอนต่อไป (3) ระบุรายการทดสอบไว้ข้างหลอดด้วย เพื่อให้่ายในการทวนสอบในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ (4) กรณีสิ่งส่งตรวจมีคุณภาพไม่ผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด ควรปฏิเสธสิ่งส่งตรวจตามขั้นตอนที่กำหนด และเขียนบันทึกรายงานอุบัติการณ์ (5) นำอุบัติการณ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการรับสิ่งส่งตรวจทั้งปี มาวิเคราะห์หาสาเหตุ หาแนวทางแก้ไข และนำมาปรับปรุงขั้นตอนการปฏิบัติงานให้ดียิ่งขึ้น

ตาราง 12 (ต่อ) เทคนิคและข้อพึงระวังในการรับและลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจทางอณูพันธุศาสตร์

ขั้นตอนการรับลงทะเบียนสิ่งส่งตรวจ	เทคนิคและข้อพึงระวัง
3.พิมพ์ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการแบบออนไลน์ เพื่อบันทึกการรับสิ่งส่งตรวจดังแสดง  1.รหัสตัวอย่าง 2.วันเดือนปีเกิด 3.ชื่อ HN ผู้ป่วย ชนิด/ปริมาณและ คุณภาพสิ่งส่งตรวจ ชื่อผู้รับ วันที่ และเวลารับ	(6) บันทึกรายละเอียด ชื่อ HN ผู้ป่วยชนิด/ปริมาณและคุณภาพสิ่งส่งตรวจ ชื่อผู้รับ วันที่ และเวลารับตามข้อมูลข้างหลอดตัวอย่าง เพื่อช่วยลดโอกาสในการสลับตัวอย่าง (7) บันทึกข้อมูลชนิดสิ่งส่งตรวจให้ชัดเจน เช่น คนท้องที่เจาะเลือดส่งตรวจ มาพร้อมกับน้ำคร่ำ ชื่อเจ้าของสิ่งส่งตรวจทั้งสองชนิดจะเป็นชื่อเดียวกัน หากระบุไม่ชัดเจนอาจเกิดความสับสนได้ ตัวอย่าง น้ำคร่ำ ควรลงบันทึกว่า บุตรในครรภ์ของ.....และควรระบุชนิดสิ่งส่งตรวจเป็น AF (amniotic fluid)
4.บันทึกข้อมูลรับสิ่งส่งตรวจ ลงในสมุดทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจให้ครบถ้วน	(8) บันทึกข้อมูลผู้ป่วยให้ครบถ้วน ได้แก่ ชื่อ-สกุลผู้ป่วย เลขที่ผู้ป่วย (HN) อายุ เพศ วันเดือนปีเกิดผู้ป่วย ชื่อแพทย์หรือผู้มีอำนาจขอส่งตรวจ หน่วยงานที่ส่งตรวจ ชนิดสิ่งส่งตรวจ รายการที่ขอตรวจ การวินิจฉัยโรคหรืออาการทางคลินิก วันที่และเวลาเจ้าหน้าที่ได้รับสิ่งส่งตรวจ (9) ข้อมูลดังกล่าวจะมีประโยชน์เพื่อสำรองข้อมูลไว้กรณีระบบคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาลมีปัญหาและใช้ในการทำงานวิจัยในอนาคตได้
5.เก็บตัวอย่างรอลงทะเบียนไว้ในตู้เย็น 2-8 °C 	(10) เก็บตัวอย่างที่รอรับลงทะเบียนไว้ในตู้แช่เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพสิ่งส่งตรวจให้คงที่ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา

3. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจิลแมนที่หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่ เลือดหลอดฝาสีม่วง (EDTA tube) ปริมาตร 3-6 มิลลิลิตร แต่กรณีการตรวจแบบก่อนคลอด (prenatal test) จะใช้ตัวอย่างน้ำคร่ำ ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร หรือใช้เลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ ปริมาตร 0.5-2 มิลลิลิตร ที่เก็บตัวอย่างด้วยหลอดหลอดฝาสีม่วง โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดจะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ชื่อการค้า FlexiGene DNA Kit ผลิตโดยบริษัท QIAGEN และกรณีตัวอย่างน้ำคร่ำจะสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม โดยวิธีการนี้สกัดดีเอ็นเอจากน้ำคร่ำ 10-20 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50-80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตร คิดเป็นเนื้อดีเอ็นเอ ประมาณ 1-3 ไมโครกรัม (ปริมาณดีเอ็นเอขึ้นกับอายุครรภ์ของน้ำคร่ำ) ซึ่งเป็นความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำ bisulfite conversion ดีเอ็นเอในขั้นตอนถัดไป และกรณีพิเศษที่จำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่ลักษณะไม่เหมาะสม เช่น เลือดหลอดฝาสีเขียว (heparin tube) หรือเลือดที่เก็บนานเกิน 7 วัน เพื่องานวิจัยหรือตัวอย่างไม่สามารถเก็บเพิ่มได้แล้ว การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มจะเป็นวิธีการที่จะทำให้ได้ดีเอ็นเอคุณภาพดีกว่าการสกัดด้วยวิธีการอื่นๆ

โดยคู่มือเล่มนี้จะกล่าวถึงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปชื่อการค้า FlexiGene DNA Kit การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำคร่ำด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

3.1. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA

ชุดสกัด FlexiGene DNA ประกอบด้วยน้ำยาสารเคมี 4 ชนิด ได้แก่ FG1 (lysis buffer) FG2 (denaturation buffer ที่ประกอบด้วยสารเคมี guanidine hydrochloride ซึ่งเป็นสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพและช่วยกำจัดโปรตีนออกจากสายดีเอ็นเอ) FG3 (hydration buffer) และ Proteinase K (เอนไซม์ย่อยโปรตีน) การสกัดดีเอ็นเอใช้เลือดเริ่มต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณดีเอ็นเอสุดท้ายประมาณ 30-45 ไมโครกรัม เลือดส่วนที่เหลือจะเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นเลือดสำรอง (Backup blood) ที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอเพิ่มในกรณีต้องทำซ้ำหรือเกิดปัญหาบางประการ ขั้นตอนการปฏิบัติงานการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปทางการค้า FlexiGene DNA ยี่ห้อ QIAGEN (ภาพ 5) มีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานที่อ้างอิงจากเอกสารประกอบชุดน้ำยาสกัด FlexiGene DNA ยี่ห้อ QIAGEN ดังต่อไปนี้

- (1) เตรียมชุดสกัด FlexiGene DNA ตรวจสอบความเพียงพอของปริมาณสาร
- (2) เตรียมเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ให้พร้อมใช้งาน ได้แก่ ตู้ชีวนิรภัย (BSC class II)

เครื่อง water bath เครื่อง heating block เครื่อง centrifuge ที่รองรับหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร เครื่องเขย่าผสม (vortex) ปีเปตขนาด P1000 P200 P20 หลอดทดลองขนาด 15 และ 2 มิลลิลิตร และทิป (Tips)

(3) ปีเปต FG1 ซึ่งเป็น lysis buffer ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวอย่างเลือด 1 มิลลิลิตรลงในหลอด ผสมเลือดกับ FG1 ให้เข้ากัน ด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex) เป็นเวลา 5 วินาที

คำแนะนำ กรณีต้องการสกัดเลือดที่น้อยกว่าหรือมากกว่า 1 มิลลิลิตร ต้องมีการปรับปริมาตร FG1 FG2 และ proteinase k แสดงในตารางที่ 13

(4) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แบบ swing-out rotor ที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที

(5) เทส่วนของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง และวางคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูที่สะอาด ประมาณ 2 นาที เพื่อดูดซับของเหลวส่วนเหลือ ควรสังเกตว่าตะกอนเซลล์ยังคงอยู่ในหลอด

ข้อควรระวัง บางกรณีตะกอนเซลล์อาจหายไปในช่วงตอนการเทของเหลวทิ้ง จึงควรเทของเหลวทิ้งช้าๆ และสังเกตตะกอนเซลล์ขณะเท

(6) เติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase k ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม FG2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์อยู่

(7) นำหลอดไป vortex จนกว่าตะกอนเซลล์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ข้อควรระวัง กรณี vortex นานเกิน 1 นาที แต่ตะกอนเซลล์ยังไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีลักษณะเหนียวคล้าย jelly ให้เติม FG 2 เพิ่มอีก 0.3 มิลลิลิตร แล้ว vortex อีกครั้ง จนเป็นเนื้อเดียวกัน

(8) นำหลอดไปวางใน water bath ตั้งอุณหภูมิที่ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที ควรใช้ water bath แบบเขย่า

ข้อสังเกต ถ้าหลอดตัวอย่างเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียวก้านมะกอก จะหมายถึงมีการย่อยสลายโปรตีนแล้ว หากครบเวลาแล้วยังไม่เปลี่ยนสีเป็นโทนสีเขียวก้านมะกอก ให้เพิ่มเวลาในข้อ 8 อีกครั้งละ 5 นาที จนกว่าสีจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวก้านมะกอก

(9) เติม isopropanol (100%) ที่เย็นจัด (ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมซ้ำๆ โดยกลับหลอดแบบ invert อย่างน้อย 20 ครั้ง หรือจนกระทั่งดีเอ็นเอตกตะกอนรวมตัวกัน ลักษณะคล้ายกลุ่มเส้นด้ายสีขาว

ข้อสังเกต บางกรณีอาจไม่เห็นสายดีเอ็นเอรวมกลุ่มกัน ซึ่งเกิดจากปริมาณตะกอนเซลล์เริ่มต้นน้อย ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นได้ กรณีเลือดผู้ป่วยมีปริมาณเม็ดเลือดขาวน้อยกว่าเกณฑ์ปกติ

(10) เทของเหลวทั้งหมด (รวมตะกอนดีเอ็นเอด้วย) ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งจะเป็นหลอดเก็บสต็อกดีเอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที **ข้อแนะนำ** กรณีตัวอย่างที่ไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอ ให้เพิ่มความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 10,000 g 5 นาที

(11) ดูดของเหลวทิ้ง ด้วยความระมัดระวัง โดยสังเกตดูตะกอนดีเอ็นเอยังคงอยู่ในหลอด

(12) เติม ethanol 70% ที่เย็นจัด (ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน)

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ vortex เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 g เวลา 3 นาที

ข้อแนะนำ กรณีตัวอย่างที่ไม่เห็นตะกอนดีเอ็นเอ ให้ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 g เวลา 3 นาที

(13) ดูดของเหลวทิ้ง ด้วยความระมัดระวัง โดยสังเกตดูตะกอนดีเอ็นเอยังคงอยู่ในหลอด

(14) เปิดฝาหลอดและวางไว้ให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง (air-dry) ประมาณ 5 นาที

ข้อควรระวัง ควรหลีกเลี่ยงการทำให้ตะกอนแห้งเกินไป (over-drying) เพราะจะทำให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกันยากมากขึ้น จากนั้นเติม FG3 ประมาณ 150-180 ไมโครลิตร (ขึ้นกับปริมาณตะกอน) ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายด้วยการใช้เครื่อง heating block แบบเขย่าได้ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม

(15) จัดการของเสียที่เหลือจากขั้นตอนการสกัด ถ้าเป็นของเหลว เช่น เลือด หรือน้ำคร่ำ ให้ฆ่าเชื้อโรคด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (ชื่อการค้า virkon) ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที ก่อนทิ้งลงถังแดง ส่วนของเสียแบบอื่น ได้แก่ หลอด ทิป ทิชชูเปื้อนเลือด ให้ใส่ถุงสองชั้น ปิดปากถุงให้สนิท แล้วทิ้งลงถังแดง กำจัดผ่านระบบขยะอันตรายตามประกาศคณะฯ

ผู้เขียนคู่มือได้สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA Kit เป็นภาพพร้อมคำอธิบายซึ่งจะทำให้ผู้อ่านเข้าใจได้ดีขึ้น (ภาพ 5)

ตาราง 13 ปริมาตรสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA

สารเคมี	ปริมาตรเลือด			
	0.5 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร	2 มิลลิลิตร	3 มิลลิลิตร
Buffer FG1 ()	1.25 มิลลิลิตร	2.5 มิลลิลิตร	5 มิลลิลิตร	7.5 มิลลิลิตร
Buffer FG2	0.25 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร
Proteinase K, Qiagen	2.5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	15 ไมโครลิตร
100% isopropanol	0.25 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร
70% isopropanol	0.25 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	1.0 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร
Buffer FG3	0.1 มิลลิลิตร	0.15-0.2 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร	0.3 มิลลิลิตร



ภาพ 5 สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA Kit (15 ขั้นตอน)



ภาพ 5 (ต่อ) สรุปลขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FlexiGene DNA Kit (15 ขั้นตอน)

3.2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มจากตัวอย่างน้ำคร่ำ

วิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Phenol chloroform DNA extraction) เป็นวิธีการมาตรฐานสำหรับการสกัดดีเอ็นเอซึ่งเหมาะสมกับสิ่งส่งตรวจทุกชนิด ทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ใช้วิธีดังกล่าวในการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำคร่ำที่ต้องการดีเอ็นเอมากกว่า 2 ไมโครกรัม (ที่ความเข้มข้น 50-80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) โดยรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานที่อ้างอิงจากหนังสือ Cold Spring Harbor protocols เรื่อง. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents (14) มีดังนี้

3.2.1. การเตรียมสารเคมี เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

(1) เตรียมสารเคมีให้พร้อมใช้งาน ได้แก่ สารเคมีฟีนอล (Phenol) : คลอโรฟอร์ม (Chloroform) : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol) อัตราส่วน 25:24:1 (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) สารเคมี Chloroform : Isoamylalcohol อัตราส่วน 24:1 (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) สารไอโซโพรพานอลความเข้มข้น 100 % ที่เย็นจัด (100 % Cold Isopropanal) สารเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด (70 % cold ethanol) สาร Lysis buffer (สูตรการเตรียมใน

ภาคผนวก ค) สาร 10% SDS (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) เอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สาร 3 M Sodium Acetate pH 5.2 (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) และสาร TE buffer (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) โดยปริมาตรสารเคมีที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำคร่ำด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มแสดงในตาราง 14

เทคนิคและข้อควรระวัง

- สาร Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol อัตราส่วน 25:24:1 ต้องเตรียมก่อนใช้งาน อย่างน้อย 1 คืน ถ้าไม่ได้เตรียมไว้ก่อนแต่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในขณะนั้น ให้ใช้วิธีการเติมแยก ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องเติมสาร Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ให้แยกเติมสาร Phenol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติมสาร Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- สารไอโซโพรพานอลความเข้มข้น 100 % ที่เย็นจัด และสารเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด ควรจัดเก็บไว้ในตู้ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

(2) เตรียมเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ให้พร้อมใช้งาน ได้แก่ ตู้ชีวนิรภัย (BSC class II) ตู้ดูดไอสารเคมี (fume Hood) เครื่อง water bath แบบเขย่า (หรือเครื่อง heating block แบบเขย่า) เครื่อง centrifuge ที่รองรับหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร เครื่องเขย่าผสม (vortex) และปิเปต P100 P200 P20 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทิว

เทคนิคและข้อควรระวัง ฟีนอลคลอโรฟอร์ม เป็นสารเคมีอันตรายที่มีไอระเหย จึงต้องปฏิบัติงานในตู้ดูดไอสารเคมีและสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล ได้แก่ เสื้อกาวน์แขนยาว ถุงมือยาง แว่นตากันกระเด็นและสวมรองเท้าแบบหุ้มปลายเท้ามิดชิด เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

3.2.2. การประเมินจำนวนเซลล์น้ำคร่ำ

เขย่าโซริงน้ำคร่ำให้เซลล์กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งน้ำคร่ำประมาณ 10-15 ไมโครลิตร นำไปหยดใส่สไลด์นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) และนับจำนวนเซลล์ (วิธีการนับเซลล์แสดงในภาคผนวก ง) จากนั้นนำข้อมูลเซลล์จากการนับมาคำนวณปริมาตรเซลล์ทั้งหมดซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้ในการประเมินปริมาตรสาร Lysis buffer ที่เหมาะสม (ตาราง 14) เพื่อให้การสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ปริมาณดีเอ็นเอสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์เริ่มต้น

เทคนิคและข้อควรระวัง

- การประมาณจำนวนเซลล์เซลล์น้ำคร่ำหลังปั่นเหวี่ยงด้วยการประเมินด้วยสายตาเปรียบเทียบกับตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือด อาจเกิดความผิดพลาดสูง เพราะน้ำคร่ำอาจมีองค์ประกอบอื่นปนมาด้วย เช่น ซีรัม หรือการปนเปื้อนจากเลือดแม่ รวมถึงขนาดเซลล์น้ำคร่ำที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว 8 เท่า ซึ่งหมายถึงตะกอนเซลล์ที่ขนาดเท่ากัน ตะกอนเซลล์น้ำคร่ำจะมีปริมาณเซลล์น้อยกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว 8 เท่า ดังนั้นการประมาณจำนวนเซลล์จากขนาดตะกอนเซลล์น้ำคร่ำ จึงมีโอกาสผิดพลาดสูง
- กรณีเซลล์น้ำคร่ำแช่ตู้เย็นข้ามคืนจะทำให้เซลล์น้ำคร่ำแตกตะกอนและเซลล์กระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นขั้นตอนการผสมตัวอย่างน้ำคร่ำที่ตกตะกอนอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เช่น ได้เซลล์น้ำคร่ำน้อยหรือมากกว่าความจริง หาก ซึ่งส่งผลให้ปริมาณเซลล์จากการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ไม่สอดคล้องกับปริมาณเซลล์จริง จึงควรเขย่าน้ำคร่ำให้นานพอจนมั่นใจว่าเซลล์กระจายตัวสม่ำเสมอ

3.2.3. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

■ การย่อยเซลล์

(1) นำตัวอย่างน้ำคร่ำจากไซริง (10-20 มิลลิลิตร) แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด ($4 \times 1.5 = 6$ มิลลิลิตร) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูส่วนของเหลว (supernatant) ที่งอกขึ้นประมาณ 3-4 รอบ จนน้ำคร่ำหมดไซริง จากนั้นรวมตะกอนทั้ง 4 หลอด ไว้ในหลอดเดียวกัน

(2) นำมาเติม lysis buffer ปริมาตร 475 ไมโครลิตร (เหมาะสมกับปริมาณเซลล์ทั้งหมดไม่เกิน 1.2×10^6 เซลล์) จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัว (กรณีเซลล์มากกว่า 1.2×10^6 เซลล์ ให้เพิ่มปริมาตร lysis buffer ตามตาราง 14)

ตาราง 14 สารเคมีในแต่ละขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์น้ำคร่ำและเลือดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม

สารเคมีในแต่ละขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ	จำนวนเซลล์น้ำคร่ำทั้งหมด		เลือด 1-2 มิลลิลิตร
	จำนวนเซลล์ที่นับด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์		(Whole blood)
	$\leq 1.2 \times 10^6$ เซลล์	$1.2-1.8 \times 10^6$ เซลล์	$7-14 \times 10^6$ เซลล์
การย่อยเซลล์	1X	1.2X	
สาร Lysis buffer	475 ไมโครลิตร	570 ไมโครลิตร	1,140 ไมโครลิตร
สาร 10% SDS solution	25 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร
สาร Proteinase K ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร	35 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร
รวมปริมาตรสารเคมี (ขั้นตอนการย่อยเซลล์)	530 ไมโครลิตร	635 ไมโครลิตร	1,220 ไมโครลิตร
คำแนะนำ ในการเลือกใช้หลอดทดลองในขั้นตอนการย่อยเซลล์	1.5 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร	15 มิลลิลิตร
สกัดด้วยสารฟีนอลคลอโรฟอร์ม			
สาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1)	600 ไมโครลิตร	650 ไมโครลิตร	1,300 ไมโครลิตร
สาร chloroform : Isoamylalcohol (24:1)	600 ไมโครลิตร	650 ไมโครลิตร	1,300 ไมโครลิตร
การตกตะกอนดีเอ็นเอ			
สาร 100% Isopropanol	550 ไมโครลิตร	600 ไมโครลิตร	1,300 ไมโครลิตร
สาร 3 M sodium acetate pH 5.2	55 ไมโครลิตร	60 ไมโครลิตร	ไม่เติม
การล้างตะกอนดีเอ็นเอ			
สาร 70% Ethanol	200 ไมโครลิตร	200 ไมโครลิตร	500 ไมโครลิตร

(3) เติมนิวไคม์ proteinase K ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเติม 10% SDS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร สังเกตลักษณะเซลล์ที่ยังไม่ถูกย่อยจนเซลล์แตก สารละลายจะมีความขุ่น (กรณีเซลล์มากกว่า 1.2×10^6 เซลล์ ให้เพิ่ม proteinase K และ 10% SDS ตามตาราง 14)

(4) เขย่าผสม (vortex) ประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้เซลล์แตก สังเกตลักษณะ สารละลายเซลล์จะใสขึ้น ซึ่งเรียกว่า cell lysate

(5) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง water bath หรือเครื่อง heating block แบบเขย่าได้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เทคนิคและข้อควรระวัง

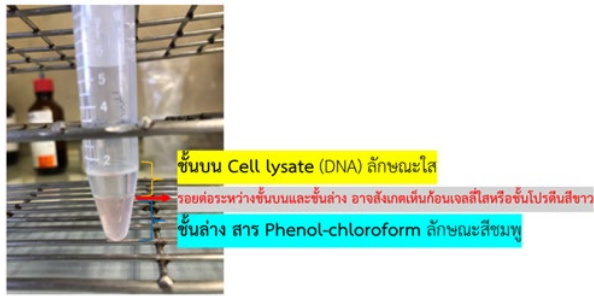
- ปริมาณเซลล์ที่มากเกินไป หรือการใช้ปริมาตรสารเคมีในการสกัดไม่เหมาะสม (สาร lysis buffer สาร 10% SDS สาร proteinase K) กับปริมาณเซลล์เริ่มต้น จะส่งผลให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอลดลงอย่างเห็นได้ชัด
- แนวทางการแก้ไขปัญห ปริมาณเซลล์ไม่เหมาะสมกับปริมาตรสารเคมีในการสกัด ได้แก่การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์โดยใช้ตัวอย่างน้ำคร่ำที่เขย่าผสมจนเซลล์กระจายตัวทั่วทั้งไซริง และการใช้ปริมาตรสารเคมีสกัดดีเอ็นเอตามปริมาณที่กำหนด (ตาราง 14) แต่บางกรณีน้ำคร่ำปั่นขึ้นเหวอาจทำให้การนับเซลล์การผิดพลาดไม่สอดคล้องกับปริมาณเซลล์จริง ซึ่งมีแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวด้วยการสังเกตความขุ่นหรือสังเกตก่อนเจลลีหนืดในสารละลายเซลล์หลังย่อยเสร็จ กรณีพบว่ายังมีความขุ่น หรือมีก้อนเจลลีหนืดมาก ให้เพิ่มปริมาณสารเคมีสกัดอีกประมาณ 20 % ของปริมาณที่เติมเริ่มต้น และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ต่ออีกครั้งละ 10 นาทีและสังเกตว่าความขุ่นลดลงหรือไม่ ก้อนเจลลียังปรากฏอีกหรือไม่ ถ้าจะปรากฏลักษณะดังกล่าวอยู่ให้บ่มต่อครั้งละ 10 นาที จนกว่าสารละลายเซลล์จะถูกย่อยสมบูรณ์ สังเกตจากสารละลายเซลล์มีลักษณะใสและไม่มีก้อนหนืดคล้ายเจลลี

■ การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารฟีนอลคลอโรฟอร์ม

(6) จากนั้นเติมสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิมในหลอด (1 volume of sample) ประมาณ 600 ไมโครลิตร ลงในหลอด cell lysate จากนั้นกลับหลอดไปมาแบบ invert mix ผสมให้เข้ากันแบบนุ่มนวล เป็นเวลา 5 นาที (กรณีปริมาตรที่มีอยู่เดิมมากกว่า 600 ไมโครลิตร ก็ได้เติมสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol เท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิม)

(7) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็นสองชั้น โดยชั้นบน คือสารละลายเซลล์ สังเกตมีลักษณะใส ชั้นล่างคือสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol สังเกตมีสีชมพูอ่อน (ภาพ 6)

(8) ดูดสารละลายส่วนบน (DNA) ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดใหม่)



ภาพ 6 การสกัดดีเอ็นเอด้วยสารฟีนอลคลอโรฟอร์ม

(9) ทำซ้ำข้อ 9-11 อีก 1 รอบ

(10) จากนั้นนำหลอดในข้อ 12 มาเติมสาร chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิมในหลอด (1 volume of sample) ประมาณ 600 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมาแบบ invert mix ผสมให้เข้ากันแบบนุ่มนวล เป็นเวลา 5 นาที (กรณีปริมาตรที่มีอยู่เดิมมากกว่า 600 ไมโครลิตร ก็ได้เติมสารเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิม)

(11) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 5 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็นสองชั้น โดยชั้นบน คือสารละลายเซลล์ สังเกตมีลักษณะใส ชั้นล่างคือสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol สังเกตมีสีใสเช่นกัน

(12) ดูดสารละลายส่วนบนซึ่งมีลักษณะใส ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดใหม่)

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ขั้นตอน invert mix (ข้อ 9 และข้อ 12) หลังเติมสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol เป็นขั้นตอนความสำคัญที่ช่วยดึงโปรตีนที่เกาะกับดีเอ็นเอให้ละลายไปอยู่ในชั้นฟีนอล ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนโปรตีนลดลง การผสมแบบ invert mix ควรทำด้วยความนุ่มนวล ห้าม Vortex โดยเด็ดขาด เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอขาดชำรุดเสื่อมสภาพ (degraded) ได้ และควรใช้เวลาให้ครบตามเวลาที่กำหนด

- ขั้นตอนการดูดสารละลายดีเอ็นเอ (ชั้นบน) ไปใส่หลอดใหม่ (ข้อ 11 และข้อ 15) ไม่ควรดูดชั้นโปรตีนสีขาวซึ่งอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้น cell lysate และ phenol-chloroform (ภาพ 13) ติดไปด้วย

■ การตกตะกอนดีเอ็นเอ

(13) นำสารละลายเซลล์ในข้อ 12 มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 100% Isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิมในหลอด (1 volume of sample) ประมาณ 550 – 600 มิลลิลิตร และเติมสาร 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 110-120 ไมโครลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0.3 M) ผสมสารโดยพลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ฟรีซที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(14) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อรวมตกตะกอนดีเอ็นเอ และดูดส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่

เทคนิคและข้อควรระวัง

- สาร 100% ethanol ซึ่งหาได้ง่ายกว่า 100% Isopropanol สามารถใช้ขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอได้ แต่ปริมาณการใช้งานจะต่างกัน โดยถ้าใช้สาร 100% ethanol ต้องใช้ปริมาณเป็น 2 เท่าของปริมาณที่มีอยู่เดิมในหลอด (2 volume of sample) ตัวอย่างเช่น ขั้นตอนเดิมเคยใช้สาร 100% Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ถ้าเปลี่ยนเป็นใช้ 100% ethanol แทน จะต้องเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า ซึ่งเท่ากับ 1,200 ไมโครลิตร
- เซลล์น้ำคร่ำเป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเป็นส่วนใหญ่ แต่เซลล์ส่วนใหญ่จากตัวอย่างเลือดจะเป็นเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยเหตุนี้ดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเซลล์น้ำคร่ำจะมีคุณภาพด้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเลือด โดยคุณภาพดีเอ็นเอจากเซลล์น้ำคร่ำจะมีลักษณะดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์มีการขาดขาดเชื่อมสภาพ (degraded DNA) ปนอยู่กับดีเอ็นเอที่สภาพสมบูรณ์ (Intact DNA) จากปัญหาดังกล่าวส่งผลให้มีการสูญเสียดีเอ็นเอบางส่วนไปในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารเคมีช่วยตกตะกอนดีเอ็นเอ เช่น 3 M Sodium acetate pH 5.2 จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารละลายไกลโคเจน (Glycogen solution) ที่สามารถช่วยตกตะกอนดีเอ็นเอได้เช่นกัน โดยการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Glycogen Solution ความเข้มข้น 10 mg/ml ต้องใช้ Glycogen Solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (คิดเป็น glycogen 10 ไมโครกรัม) ต่อสารละลายดีเอ็นเอ 500 ไมโครลิตร
- ความเย็นจะช่วยให้การตกตะกอนดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นควรใช้ 100% Isopropanol ที่เย็นจัดในการตกตะกอน โดยควรแบ่งสาร 100% Isopropanol ใส่ขวดดูแรน (duran bottle) แล้วจัดเก็บไว้ในตู้ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน และขั้นตอนการแช่ฟรีซที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เป็นขั้นตอนสำคัญไม่ควรละเลย

■ การล้างตะกอนดีเอ็นเอ

(15) เติม 70% ethanol เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และพลิกหลอดกลับไปมาแบบ invert mix ประมาณ 5 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 16,000 g เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ทิ้ง

■ การละลายตะกอนดีเอ็นเอ

(16) เปิดฝาหลอด และวางดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที เพื่อระเหย ethanol ที่ตกค้าง จากนั้นเติม Tris-HCl EDTA pH 8.0 (TE buffer) ประมาณ 20-50 ไมโครลิตร ขึ้นกับขนาดตะกอน และเขย่าหลอดช่วยให้ดีเอ็นเอละลายที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องเขย่า ประมาณ 2 ชั่วโมง

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ควรใช้ TE buffer pH 8.0 ในการละลายตะกอนดีเอ็นเอที่จะเก็บเป็นสต็อกดีเอ็นเอ (stock DNA) เพราะ TE buffer มี pH เป็นด่างจะช่วยรักษาคุณภาพดีเอ็นเอได้คงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนน้ำมี pH 6-7 ค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพได้ง่ายกว่าสภาวะด่าง
- ไม่ควรวางตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง นานเกิน 15 นาที เพราะจะทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเกินไป ซึ่งส่งผลให้ดีเอ็นเอละลายยากขึ้น โดยดีเอ็นเอที่ละลายไม่สมบูรณ์จะส่งผลเสียต่อขั้นตอนถัดไป

3.3. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มจากตัวอย่างเลือด 1-2 มิลลิลิตร

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (Whole blood) ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม โดยรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานที่อ้างอิงจากหนังสือ Cold Spring Harbor protocols เรื่อง. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents (14) ดังนี้

3.3.1. การเตรียมสารเคมีเครื่องมือวัสดุและอุปกรณ์

(1) เตรียมสารเคมีให้พร้อมใช้งาน ได้แก่ สาร Phenol: Chloroform:

Isoamylalcohol อัตราส่วน 25:24:1 (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) สารเคมี Chloroform : Isoamylalcohol อัตราส่วน 24:1 (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) สารไอโซโพรพานอลความเข้มข้น 100 % ที่เย็นจัด (100 % Cold Isopropanol) สารเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด (70 % cold ethanol) สาร Lysis buffer (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) สาร 10% SDS (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) เอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และสาร TE buffer (สูตรการเตรียมในภาคผนวก ค) โดยปริมาตรสารเคมีที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์มแสดงในตาราง 14

เทคนิคและข้อควรระวัง

- สาร Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol อัตราส่วน 25:24:1 ต้องเตรียมก่อนใช้งานอย่างน้อย 1 คืน ถ้าไม่ได้เตรียมไว้ก่อนแต่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในขณะนั้น ให้ใช้วิธีการเติมแยก ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องเติมสาร Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ให้แยกเติมสาร Phenol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติมสาร Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- สารไอโซโพรพานอลความเข้มข้น 100 % ที่เย็นจัด และสารเอทานอลความเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด ควรจัดเก็บไว้ในตู้ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

(2) เตรียมเครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ให้พร้อมใช้งาน ได้แก่ ตู้ชีวนิรภัย (BSC class II) ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood) เครื่อง water bath แบบเขย่า (หรือเครื่อง heating block แบบเขย่า) เครื่อง centrifuge ที่รองรับหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร เครื่องเขย่าผสม (vortex) และปิเปต P1000 P200 P20 หลอดทดลองขนาด 1.5 และ 15 มิลลิลิตร และทิปทุกขนาด

เทคนิคและข้อควรระวัง ฟีนอลคลอโรฟอร์ม เป็นสารเคมีอันตรายที่มีไอระเหย จึงต้องปฏิบัติงานในตู้ดูดไอพิษ (fume hood) และสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล (PPE) ได้แก่ เสื้อกาวน์แขนยาว ถุงมือยาง แว่นตานิรภัยและสวมรองเท้าแบบหุ้มปลายเท้ามิดชิด เพื่อความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน

3.3.2. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

■ การล้างเม็ดเลือดแดงออกด้วย TE buffer

(1) เขย่าหลอดเลือดพลิกหลอดขึ้นลงประมาณ 5- 10 ครั้ง แล้วปิเปตเลือด 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดใหม่ ขนาด 15 มิลลิลิตร

(2) เติม TE buffer ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในหลอด 15 มิลลิลิตรที่มีเลือดอยู่ จากนั้นเขย่าผสม (vortex) ประมาณ 1-2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 g เป็นเวลา 5 นาที

(3) เทของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ยังอ่อนนุ่มนวล สังเกตตะกอนเซลล์ว่ายังคงอยู่ก้นหลอด และทำซ้ำ ข้อ 4 และข้อ 5 อีก 2 ครั้ง จนตะกอนเซลล์เป็นสีขาว

เทคนิคและข้อควรระวัง

- กรณีล้างเม็ดเลือดด้วย TE buffer จำนวน 3 ครั้งแล้ว แต่ตะกอนเซลล์ยังไม่เป็นสีขาว ให้เพิ่มรอบการล้างจนกว่าตะกอนเซลล์จะเป็นสีขาวอีก 1-2 รอบ แต่กรณีเลือดเป็นก้อน (clotted) หรือเลือดที่เก็บนานเกิน 7 วัน การล้างเพิ่มในรอบที่ 4-5 อาจไม่ช่วยให้ตะกอนเซลล์ขาวขึ้นและยังคงตะกอนเซลล์สีแดงปนเลือดอยู่ก็อาจเกิดขึ้นได้ กรณีให้ดำเนินการต่อในขั้นถัดไป

- กรณีจำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่จับกันไม่เหมาะสม เช่น หลอดเลือดฝาดเขียว (heparin tube) ให้รับดำเนินการล้างเลือดด้วย TE buffer เพื่อเม็ดเลือดแดงออก ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเทคนิคที่จะช่วยให้ได้คุณภาพดีเอ็นเอดีขึ้น

■ การย่อยเซลล์

(4) นำหลอดตะกอนเซลล์ข้อ 5 มาเติม lysis buffer ปริมาตร 1,140 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อทำให้ตะกอนเซลล์กระจายตัว ซึ่งจะช่วยให้การย่อยเซลล์ดีขึ้น

(5) เติมเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม 10% SDS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อทำให้เซลล์แตกจะช่วยให้การย่อยเซลล์ดีขึ้น

(6) เขย่าผสม (vortex) เพื่อทำให้เซลล์แตก ประมาณ 5-10 นาที หรือนานจนกว่าสังเกตเห็นลักษณะเซลล์ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (cell lysis)

(7) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง water bath block แบบเขย่าได้ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าการย่อยเซลล์จะสมบูรณ์ สังเกตจากสารละลายเซลล์จะใสขึ้น มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและไม่มีพบบก้อนเจลลี่ (jelly)

เทคนิคและข้อควรระวัง กรณีสังเกตเห็นการย่อยยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งมีลักษณะสารละลายเซลล์ยังไม่ใส หรือปรากฏก้อนเจลลี่หนืด แก้ปัญหาโดยเพิ่มปริมาณสารเคมี (lysis buffer proteinase K และ 10% SDS) อีกประมาณ 20 % ของปริมาตรที่เติมเริ่มต้น จากนั้นนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วสังเกตว่าความใสและก้อนเจลลี่ยังปรากฏอีกหรือไม่ ถ้ายังปรากฏลักษณะดังกล่าวอยู่ให้บ่มต่ออีกครั้งละ 30 นาที จนกว่าสารละลายเซลล์จะถูกย่อยสมบูรณ์ ซึ่งสังเกตจากสารละลายเซลล์มีลักษณะใสและไม่มีก้อนหนืดคล้ายเจลลี่

■ การสกัดด้วยสารเคมีฟีนอลคลอโรฟอร์ม

(8) เติมสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 1,300

ไมโครลิตร ลงในนำหลอดสารละลายเซลล์ที่ย่อยสมบูรณ์แล้ว จากนั้นพลิกหลอดกลับหลอดไปมา แบบ invert mix ผสมให้เข้ากันแบบนุ่มนวล เป็นเวลา 5 นาที

(9) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 10 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็นสองชั้น โดยชั้นบนคือสารละลายเซลล์มีลักษณะใส (ดีเอ็นเอ) ชั้นล่างคือสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol สังเกตมีสีชมพูอ่อน (ภาพ 6)

(10) ค่อยๆดูดสารละลายส่วนบน (ดีเอ็นเอ) ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร (หลอดใหม่) และทำซ้ำข้อ 10-12 อีก 1 รอบ

(11) นำหลอดในข้อ 12 เติมสาร chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 1,300 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมาแบบ invert mix ผสมให้เข้ากันแบบนุ่มนวล เป็นเวลา 5 นาที

(12) ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 10 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็นสองชั้น โดยชั้นบนคือสารละลายเซลล์มีลักษณะใส ชั้นล่างคือสาร chloroform : Isoamylalcohol สังเกตมีสีใสเช่นกัน

(13) ค่อยๆดูดสารส่วนบนซึ่งมีลักษณะใส ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร (หลอดใหม่)

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ขั้นตอน invert mix (ข้อ 9 และข้อ 12) หลังเติมสาร Phenol : chloroform : Isoamylalcohol เป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยดึงโปรตีนที่เกาะกับดีเอ็นเอให้ละลายไปอยู่ในชั้นฟีนอล ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนโปรตีนลดลง การผสมสารพลิกกลับไปกลับมาแบบ invert mix ควรทำด้วยความนุ่มนวล ห้าม Vortex โดยเด็ดขาด เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอขาดชำรุดเสื่อมสภาพ (degraded) ได้ และควรผสมสารแบบ invert mix ให้ครบเวลาตามที่กำหนด

- ขั้นตอนการดูดสารละลายดีเอ็นเอ (ชั้นบน) ไปใส่หลอดใหม่ (ข้อ 12 และข้อ 15) ไม่ควรดูดชั้นโปรตีนสีขาวซึ่งอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้น cell lysate และ phenol-chloroform (ภาพ 13) ดึงไปด้วย เพราะจะทำให้คุณภาพดีเอ็นเอต่ำลง

■ การตกตะกอนดีเอ็นเอ

(14) นำหลอดในข้อ 15 มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 100% Isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1,300 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารโดยพลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 10 ครั้ง จะสังเกตเห็นสายดีเอ็นเอ ลักษณะคล้ายกลุ่มเส้นด้วยสีขาว

เทคนิคและข้อควรระวัง

- สาร 100% ethanol ซึ่งหาได้ง่ายกว่า 100% Isopropanol สามารถใช้ขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอได้ แต่ปริมาณการใช้งานจะต่างกัน โดยถ้าใช้สาร 100% ethanol ต้องใช้ปริมาณเป็น 2 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่เดิมในหลอด (2 volume of sample) ตัวอย่างเช่น ขั้นตอนเดิมเคยใช้สาร 100% Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ถ้าเปลี่ยนเป็นใช้ 100% ethanol แทน จะต้องเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า ซึ่งเท่ากับ 1,200 ไมโครลิตร

- ความเย็นจะช่วยให้การตกตะกอนดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นควรใช้ 100%

Isopropanol ที่แช่เย็นจัดในการตกตะกอน โดยควรแบ่งสาร 100% Isopropanol ใส่ขวดดูแรน (duran bottle) แล้วจัดเก็บไว้ในตู้ฟรีซที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน

■ การล้างตะกอนดีเอ็นเอ

(15) เติม 70% ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดใหม่) จากนั้นใช้ปลายทิวขนาด 200 ไมโครลิตร เกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอในหลอด ข้อ 16 มาใส่ในหลอดที่เติม 70% ethanol ไว้แล้ว และพลิกหลอดกลับไปมาแบบ invert mix ประมาณ 5 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

(16) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อรวมตกตะกอนดีเอ็นเอให้ตกกันหลอด และดูส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่

เทคนิคและข้อควรระวัง กรณีผู้ปฏิบัติงานใหม่ ขั้นตอนในข้อ 17 การใช้ปลายทิวเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอไปใส่หลอดใหม่ อาจมีโอกาสทำให้ตะกอนดีเอ็นเอตกหล่นได้ แก้ปัญหาโดยให้ค่อยๆดูด 100% Isopropanol ในหลอด ข้อ 16 บางส่วนทิ้ง คงเหลือปริมาตรสารในหลอดประมาณ 1.5 มิลลิลิตร (ต้องระวังไม่ให้ดูดดีเอ็นเอ เข้าไปในปลายทิวเพราะจะเอาออกยากมาก) จากนั้นเทตะกอนดีเอ็นเอ ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดใหม่) และปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อรวมตกตะกอนดีเอ็นเอให้ตกกันหลอด และดูส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อรวมตกตะกอนดีเอ็นเอให้ตกกันหลอด และดูส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่

■ การละลายตะกอนดีเอ็นเอ

(17) เปิดฝาหลอด วางดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที เพื่อระเหย ethanol ที่ตกค้าง จากนั้นเติม Tris-HCl EDTA pH 8.0 (TE buffer) ประมาณ 150-200 ไมโครลิตร ขึ้นกับขนาดตะกอน จากนั้นเขย่าหลอดช่วยให้ดีเอ็นเอละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-4 ชั่วโมง

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ควรใช้ TE buffer pH 8.0 ในการละลายตะกอนดีเอ็นเอที่จะเก็บเป็นสต็อกดีเอ็นเอ (stock DNA) เพราะ TE buffer มี pH เป็นด่างจะช่วยรักษาคุณภาพดีเอ็นเอได้คงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนน้ำมี pH 6-7 ค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพได้ง่ายกว่าสภาวะด่าง

- ไม่ควรวางตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง นานเกิน 15 นาที เพราะจะทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งเกินไป จะส่งผลให้ดีเอ็นเอละลายยากขึ้น โดยดีเอ็นเอที่ละลายไม่สมบูรณ์จะส่งผลเสียต่อขั้นตอนถัดไป

4. การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

เมื่อดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะนำมาตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอ ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์หรือเทคนิคด้านอณูชีววิทยาอื่นๆในลำดับถัดไป การตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอัลตราไวโอเล็ต (Ultra violet, UV) และความยาวคลื่นแสงที่ตามองเห็น (Visible light, Vis) ด้วย

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เรียกว่าวัดค่า Optical density (OD) โดยกรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) ดูดกลืนแสง (Absorbance, A) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) โปรตีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และองค์ประกอบอื่นๆ (เช่น สารกลุ่มเกลือ) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (A_{230}) การวัดค่าสเปกโตรโฟโตมิเตอร์จะใช้กฎของเบียร์ - แลมเบิร์ต (Beer - Lambert) ในการคำนวณหาความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก โดยกฎของเบียร์ - แลมเบิร์ตจะถูกใช้เพื่อกำหนดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกที่ไม่ทราบค่าโดยไม่ต้องใช้เส้นโค้งมาตรฐาน ซึ่งจะช่วยให้เชื่อมโยงปริมาณแสงที่กรดนิวคลีอิกดูดกลืนกับความเข้มข้นของโมเลกุลกรดนิวคลีอิกที่ดูดกลืน โดยใช้หน่วยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 (A_{260}) ต่อไปนี้

สำหรับดีเอ็นเอ A_{260} 1 หมายถึง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

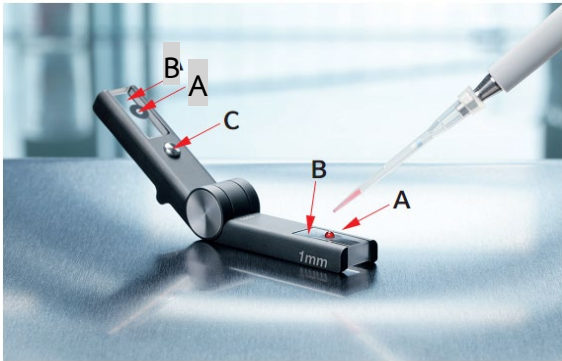
สำหรับอาร์เอ็นเอ A_{260} 1 หมายถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

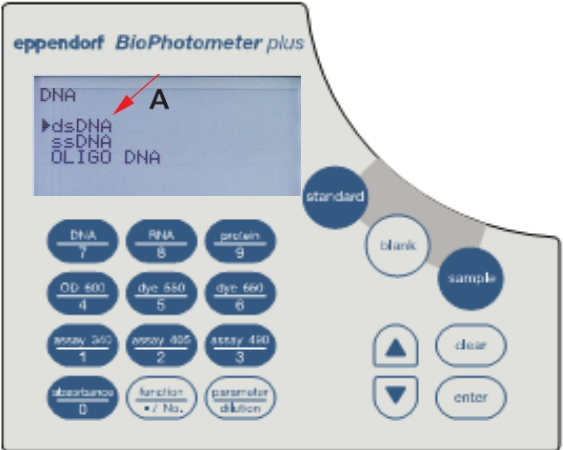
ใช้ค่าข้างต้นเป็นปัจจัยการแปลงความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก ด้วยการแปลงค่า OD เป็นความเข้มข้นของตัวอย่างกรดนิวคลีอิกที่ไม่ทราบค่า (31)

คุณภาพความบริสุทธิ์ของกรดนิวคลีอิกตรวจสอบโดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} ถ้าดีเอ็นเอได้ค่า A_{260}/A_{280} ระหว่าง 1.65–1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่าดีเอ็นเอมีโปรตีนหรือสารฟีนอล (ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด) ปะปนอยู่ และอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{230} ถ้าได้ค่า 2.0 ถึง 2.2 แสดงว่าดีเอ็นเอไม่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มเกลือ (ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด) สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรได้ค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 2 (31)

อย่างไรก็ตามการวัดค่า OD ก็ไม่สามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอในเชิงโครงสร้างโมเลกุลได้ โดยดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างโมเลกุลคงสภาพสมบูรณ์ จะเรียกว่า Intact DNA ส่วนดีเอ็นเอที่โครงสร้างไม่สมบูรณ์มีบางส่วนขาดถูกตัดเป็นท่อน จะเรียกว่า degraded DNA โดยการตรวจสอบคุณภาพเชิงโครงสร้างของโมเลกุลดีเอ็นเอใช้การตรวจสอบด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (Agarose gel) ที่ความเข้มข้น 0.8-1.0% ดีเอ็นเอคุณภาพดีโครงสร้างโมเลกุลคงสภาพสมบูรณ์ จะปรากฏเป็นก้อนรวมกลุ่มกัน ส่วนดีเอ็นเอที่โครงสร้างไม่สมบูรณ์จะปรากฏแบนแถบดีเอ็นเอ (smear) (30) ทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ใช้เครื่อง Biophotometer ยี่ห้อ eppendorf ในการวัดการดูดกลืนแสงของสารพันธุกรรม (วัด OD) โดยเครื่อง Biophotometer ใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงแบบ single beam photometer with reference beam ด้วยแหล่งกำเนิดแสงแบบ Xenon flash light วัดได้ทั้งช่วงแสงความยาวคลื่น VIS และ UV และสามารถวัดสารพันธุกรรมปริมาณน้อย 2-3 ไมโครลิตรได้ด้วยไมโครคิวเวทท์ (microcuvette) ขนาด path length 1 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ 2.5 ถึง 1500 นาโนกรัมต่อ

ไมโครลิตร (ng/ul) โดยขั้นตอนการปฏิบัติงานในการวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Biophotometer ยี่ห้อ eppendorf มีดังนี้

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	เทคนิคและข้อพึงระวัง
1. เตรียมเครื่อง Biophotometer ให้พร้อมใช้  ช่องใส่คิวเวทท์	● ตัวเครื่องควรต่อกับเครื่องสำรองไฟ โดยควรเสียบปลั๊กเครื่องสำรองไฟก่อน แล้วจึงเปิดเครื่อง สวิตช์เปิด-ปิดที่อยู่ด้านหลังตัวเครื่อง
2. เตรียมไมโครคิวเวทท์สำหรับวัดสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (บริเวณ A คือพื้นที่หยดตัวอย่าง)  Figure 2: The μCuvette: A: Sample application area and optical measurement window B: Quartz plates C: Spacer https://www.news-medical.net/whitepaper/20151120/Highly-Precise-Photometric-Measurements-of-Nucleic-Acids-or-Proteins-using-Eppendorf-c2b5Cuvette-G10.aspx	● เลือกใช้คิวเวทท์ที่เหมาะสม โดยการวัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสำหรับเครื่องรุ่นนี้ จะต้องใช้ไมโครคิวเวทท์ซึ่งรองรับการวัดสารพันธุกรรมปริมาณน้อย ด้วยปริมาตรตัวอย่างเพียง 2-3 ไมโครลิตร แสดงดังภาพข้อ 2

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	เทคนิคและข้อพึงระวัง
3. การทำ Blank (1) เลือกโหมดการวัดจากปุ่มที่หน้าจอหลัก การวัดดีเอ็นเอ กดปุ่ม 7 (DNA) และเลื่อนให้ลูกศรไปอยู่ที่ตำแหน่ง dsDNA แล้วกดปุ่ม Enter ตัวเครื่องจะพร้อมใช้งานในโหมดการวัดดีเอ็นเอ  https://www.marshallscientific.com/v/vspfiles/specs/biophotometer%20plus%20manual.pdf (2) นำไมโครคิวเวทท์มาเปิดฝ้าออก (ดังภาพข้อ 2) และล้าง (บริเวณ A) ด้วยน้ำสะอาดก่อนใช้งาน (3) ทำ blank โดยการหยดน้ำยา blank ลงบนไมโครคิวเวทท์ (บริเวณ A เพียงด้านเดียว) แล้วประกบไมโครคิวเวทท์ทั้งสองข้างเข้าหากัน จะทำให้น้ำยา blank สัมผัสกับบริเวณ A ของอีกข้างหนึ่ง จากนั้น นำไมโครคิวเวทท์วางลงในช่องใส่คิวเวทท์ แล้วกดปุ่ม blank ตัวเครื่องจะพร้อมใช้งานในโหมดการวัดตัวอย่างดีเอ็นเอ	● น้ำยา blank คือน้ำยาชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายดีเอ็นเอ กรณีใช้ TE buffer ละลายดีเอ็นเอ ก็ต้องใช้ TE buffer ทำ blank ● ควรล้างบริเวณ A ของไมโครคิวเวทท์ด้วยน้ำสะอาด ประมาณ 3 ครั้ง ก่อนทำ Blank ● ควรเช็ดบริเวณ A ของไมโครคิวเวทท์ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ หรือกระดาษชำระเนื้อหนาไม่มีขน เพื่อป้องกันเศษขนปนเปื้อนไปกับตัวอย่าง จะทำให้รบกวนการดูดกลืนแสง ซึ่งจะมีผลต่อค่า OD
4. การวัดตัวอย่างดีเอ็นเอ (1) นำสารละลายสต็อกดีเอ็นเอที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันมาปั่นตก (spin down) เพื่อให้ของเหลวใต้ฝาหลอดตกลงก้นหลอดซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียได้ (2) ปิเปิดตัวอย่างดีเอ็นเอจากหลอดสต็อก ประมาณ 2-3 ไมโครลิตร หยดลงบนไมโครคิวเวทท์ (บริเวณ A เพียงด้านเดียว) ดังภาพข้อ 2	● ควรสังเกตฟองอากาศทุกครั้ง หลังหยดตัวอย่างและประกบไมโครคิวเวทท์ หากเกิดฟองอากาศ ต้องกำจัดออกด้วยการประกบไมโครคิวเวทท์ซ้ำหลายครั้งจะทำให้ฟองอากาศแตกได้ หรืออาจใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง หากสังเกตเห็นฟองอากาศขณะหยดตัวอย่างบนไมโครคิวเวทท์

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	เทคนิคและข้อพึงระวัง
(3) จากนั้นประกบไมโครคิวเวทท์ทั้งสองข้างเข้าหากัน ซึ่งจะทำให้ตัวอย่างดีเอ็นเอสัมผัสกับบริเวณ A ของอีกข้างหนึ่ง ควรสังเกต ฟองอากาศ หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นต้องกำจัดออก จากนั้นนำไมโครคิวเวทท์วางในช่องใส่คิวเวทท์แล้วกดปุ่ม sample เครื่องจะแสดงค่าความเข้มข้นและคุณภาพของตัวอย่างดีเอ็นเอ ดังภาพ The image shows a digital display from a DNA quantification instrument. At the top, it reads 'dsDNA' on the left and '#001' on the right. The main display shows '70.0' in large digits, followed by 'µg/mL'. Below this, there are two columns of smaller numbers: '0.694E230' and '1.408E260' on the right, and '1.97260/280' and '2.03260/230' on the left. At the bottom right, it shows '0.715E280' and '0.002E340'. https://www.marshallscientific.com/v/vspfiles/specs/biophotometer%20plus%20manual.pdf (4) การวัดตัวอย่างดีเอ็นเอถัดไปที่ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายตัวเดียวกัน สามารถวัด OD แบบต่อเนื่องโดยไม่ต้องทำ blank ใหม่ โดยทำการเช็ดตัวอย่างเดิมออกจากคิวเวทท์ก่อนแต่ไม่ต้องล้างน้ำ จากนั้นหยดตัวอย่างดีเอ็นเอใหม่ลงบนไมโครคิวเวทท์ และกดปุ่ม sample (5) เมื่อวัดตัวอย่างดีเอ็นเอเสร็จสิ้น ให้กดปุ่ม enter และ กดปุ่ม 7 (DNA) เพื่อคืนกลับหน้าจอหลัก (6) นำไมโครคิวเวทท์ล้างบริเวณ A ด้วยน้ำสะอาดประมาณ 3-5 ครั้ง และเช็ดให้สะอาดก่อนเก็บลงกล่อง	● ฟองอากาศจะรบกวนการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง จะทำให้ค่า OD ที่ได้เคลื่อนคลาด ● กรณีวัดตัวอย่างต่อเนื่อง แต่เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ละลายด้วยตัวทำละลายคนละชนิดกัน ให้ทำการล้างไมโครคิวเวทท์และทำ blank ใหม่ เมื่อมีการเปลี่ยนชนิดตัวอย่าง ● กรณีปิเปตดีเอ็นเอจากหลอดสต็อกแล้วได้ก้อนดีเอ็นเอหนืดติดขึ้นมา นั้นหมายถึงสต็อกดีเอ็นเอยังละลายไม่สมบูรณ์ จึงไม่ควรนำวัด OD เพราะค่าความเข้มข้นที่ได้จะไม่ใช่ว่าที่แท้จริงของตัวอย่าง ● เครื่องรุ่นนี้มีหน่วยแสดงผลความเข้มข้นดีเอ็นเอหลายแบบ ได้แก่ µg/mL ng/µL pmol/ µL µmol/L และ pmol/mL
5. ปิดเครื่อง เมื่อใช้เครื่องเสร็จให้กดปุ่มคืนหน้าจอหลัก แล้วปิดสวิตช์ด้านหลังของตัวเครื่อง และเลื่อนฝาปิดช่องใส่คิวเวทท์ทุกครั้งที่ใช้จนเสร็จ เพื่อป้องกันฝุ่น	

บางกรณีจะทำการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8% ควบคู่ไปกับการวัดการดูดกลืนแสง (OD) ในการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอในตัวอย่างส่งตรวจบางรายที่สงสัยว่าดีเอ็นเออาจเกิดการเสื่อมสภาพ เช่น ตัวอย่างที่สกัดจากเลือดสีคล้ำ หรือดีเอ็นเอที่มีปัญหาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่สำเร็จ

5. การทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน (bisulfite conversion)

การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยการทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันเป็นขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของการทำเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์สำหรับตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจิลแมน ซึ่งทางห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีวิธีการทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชัน จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่ วิธีดั้งเดิม (conventional method) และชุดน้ำยาสำเร็จรูป (commercial kit)

สิ่งที่ต้องรู้และข้อควรระวัง กระบวนการ bisulfite conversion เป็นขั้นตอนสำคัญที่จะส่งผลกระทบต่อขั้นตอนลำดับถัดไป หาก กระบวนการ bisulfite conversion เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ที่เรียกว่า incomplete bisulfite conversion จะทำให้ยังคงดีเอ็นเอโครงสร้างปกติหลงเหลืออยู่ ที่เรียกว่า Unmodified DNA ซึ่งจะส่งผลให้การทดสอบเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN เพื่อวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน มีโอกาสเกิดผลลบลง (false negative) เพิ่มขึ้น ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานจึงปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวังและปฏิบัติตามขั้นตอนการทำ bisulfite conversion อย่างเคร่งครัด

5.1. การทำไบซัลไฟต์คอนเวอร์ชันแบบวิธีดั้งเดิม

การเตรียมสารเคมีและขั้นตอนการปฏิบัติงานอ้างอิงจากงานวิจัยของ Frommer M และคณะ ปี ค.ศ.1992 (16)

5.1.1. การเตรียมสารเคมี/อุปกรณ์/เครื่องมือ

- (1) สารละลาย 5 M Sodium bisulfite ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง วิธีการเตรียมแสดงภาคผนวก ก
- (2) สารละลาย 3 M NaOH ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง วิธีการเตรียมแสดงภาคผนวก ค
- (3) สารละลาย 20 mM Hydroquinone ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง และใช้ภาชนะที่บดแสงระหว่างการเตรียมเพื่อหลีกเลี่ยงแสงสว่าง และวิธีการเตรียมแสดงภาคผนวก ค
- (4) สารละลาย 10 M Ammonium acetate วิธีการเตรียมแสดงภาคผนวก ค
- (5) สารละลาย ethanol ความเข้มข้น 70 % และ ethanol ความเข้มข้น 100% แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส
- (6) Mineral oil (ultrapure)
- (7) ชุด kit สำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Illustra blood genomicPrep mini Spin kit หรือ QIAamp DNA mini kit หรือ commercial kit อื่นที่ผ่านขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้แล้ว
- (8) อุปกรณ์ ได้แก่ ปิเปต ทิป หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร pH-indicator strips และ vacuum flask
- (9) เครื่องมือ ได้แก่ เครื่อง heat box เครื่องชั่ง เครื่อง centrifuge ที่รองรับหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร และเครื่องปั๊มดูดสุญญากาศ (vacuum pump)

5.1.2. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

(1) ละลายดีเอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ปริมาตรท้ายสุด 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องแบบเขย่าหลอดประมาณ 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

(2) เติม 3 M NaOH ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นท้ายสุด final concentration เท่ากับ 0.3 โมลาร์) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที และลดอุณหภูมิทันทีด้วยการแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นตก (spin down)

(3) เติมสารละลาย 20 mM hydroquinone ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 M sodium bisulfite ปริมาตร 520 ไมโครลิตร ค่อยๆเติม mineral oil ไว้ด้านบนผิวหน้า นำไปปั่นตก

ข้อควรระวัง ควรเติม mineral oil ให้เพียงพอคลุมผิวหน้าของสารในหลอด เพื่อป้องกันการระเหย แต่หากเติมมากเกินไป อาจส่งผลให้อุณหภูมิในหลอดเปลี่ยนแปลงได้

(4) นำไปวางในเครื่อง heat box บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 16-17 ชั่วโมง

(5) นำดีเอ็นเอที่ทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแล้ว ทำบริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปยี่ห้อ Illustra blood genomicPrep mini Spin kit โดยวิธีการทำตามคู่มือของทางบริษัท และในขั้นตอนสุดท้ายชะ (elute) ดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร (หลอดใหม่)

(6) นำหลอดข้อ 5 เติม 3 M NaOH ปริมาตร 11 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นท้ายสุด เท่ากับ 0.3 โมลาร์) และวางที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที

(7) จากนั้นเติม 10 M Ammonium acetate ปริมาตร 34 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นท้ายสุด เท่ากับ 3 โมลาร์) เพื่อปรับสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแล้ว ให้สภาพเป็นกลาง (neutralize DNA)

(8) เติม 100% ethanol ปริมาตร 340 ไมโครลิตร แล้วผสมแบบกลับหลอดไปมา (Invert mix) ให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง นำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือที่ -70 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30-60 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

เทคนิค การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ควรใช้ 100% ethanol ที่แช่เย็นจัด ซึ่งจะช่วยให้ดีเอ็นเอตกตะกอนได้ดีขึ้น

(9) นำมาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 g เป็นเวลา 30 นาที และดูส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ทิ้ง

(10) เติมสารละลาย 70 % ethanol ที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน

ดีเอ็นเอจากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 g เป็นเวลา 10 นาที และดูส่วน supernatant ที่

(11) เปิดฝาหลอดวางให้ ethanol ระเหยจากตะกอนดีเอ็นเอ ประมาณ 10-15 นาที

(12) นำตะกอนดีเอ็นเอที่ทำการทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแล้ว ละลายด้วยน้ำ กลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการดีดกันหลอดประมาณ 4-5 ครั้ง และปั่นตก จำนวน 4-5 รอบ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายดีขึ้น

(13) นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำไบซัลไฟต์คอนเวอร์ชันแล้ว มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดสารพันธุกรรม และเขียนความเข้มข้นที่ได้ไว้ข้างหลอด

(14) ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาทดสอบด้วยเมทิลเลชั่น-สเปซิฟิคพีซีอาร์ได้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอทดสอบ

5.2. การทำไบซัลไฟต์คอนเวอร์ชันด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูป

5.2.1. การเตรียมสารเคมี/อุปกรณ์/เครื่องมือ

ทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ใช้ชุดน้ำยาลำเร็จรูป EZ DNA Methylation-Gold Kit สำหรับทำไบซัลไฟต์คอนเวอร์ชัน ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีที่ต้องเตรียมก่อนใช้งาน 2 ชนิด ได้แก่ สาร CT Conversion reagent และสาร M-Wash buffer โดยขั้นตอนการปฏิบัติงานอ้างอิงจากเอกสารประกอบชุดน้ำยา สำเร็จรูป EZ DNA Methylation-Gold Kit รหัสสินค้า Cat No. D5005&D5006 ยี่ห้อ Zymo research มีรายละเอียด ดังนี้

(1) สาร CT Conversion reagent มีลักษณะเป็นผงบรรจุในหลอดสีขาว มีขั้นตอนการเตรียมก่อนใช้งาน ดังนี้

a) เติมน้ำปลอดเชื้อ 900 ไมโครลิตร เติม M-Dilution buffer 300 ไมโครลิตร และ M-Dissolving buffer 50 ไมโครลิตร

b) เขย่า หรือ vortex เป็นระยะ ประมาณ 10 นาที จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ควรเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ห้ามใช้ความร้อน

ข้อควรระวัง CT Conversion reagent เป็นสารที่สลายตัวง่าย ควรเลี้ยงแสงสว่าง ควรเตรียมก่อนใช้และใช้หมดทันทีหลังละลาย แต่หากจำเป็นต้องเก็บ ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นาน 1 สัปดาห์ หรือเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นาน 1 เดือน

(2) สาร M-Wash buffer เป็นสารที่เตรียมครั้งเดียวตอนเปิดใช้งานครั้งแรก มีรายละเอียดขั้นตอนการเตรียมสาร ดังนี้ M-wash buffer ปริมาตร 24 มิลลิลิตร เติม 100% ethanol ปริมาตร 96 มิลลิลิตร

5.2.2. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

(1) เตรียมดีเอ็นเอปริมาณ 0.5-2 ไมโครกรัมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ปริมาตรท้ายสุด เท่ากับ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 1- 2 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ข้อควรระวัง ดีเอ็นเอที่ละลายไม่สมบูรณ์จะส่งผลให้การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค bisulfite conversion เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการทำเมทิลเลชัน-สเปซิฟิคพีซีอาร์

(2) เติมนสารละลาย CT Conversion reagent ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ลงในหลอดดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน และปั่นตก (spindown)

เทคนิค ควรใช้ปิเปตดูดสารขึ้นลงประมาณ 2-3 ครั้ง ในการผสมให้เข้ากัน แทนการ vortex เนื่องจากอาจส่งผลให้ดีเอ็นเอขาดเป็นสายสั้นๆได้

(3) นำหลอดดีเอ็นเอวางในเครื่อง thermo cycle รันเครื่องด้วยโปรแกรมดังนี้

อุณหภูมิ	98 องศาเซลเซียส	เวลา	10 นาที (ขั้นตอน denaturation)
อุณหภูมิ	64 องศาเซลเซียส	เวลา	2 ชั่วโมง 30 นาที
อุณหภูมิ	4 องศาเซลเซียส	เก็บเพื่อรอขั้นตอนถัดไปได้	นานถึง 20 ชั่วโมง

ข้อควรระวัง ดีเอ็นเอที่ละลายไม่สมบูรณ์ จะทำให้ขั้นตอน denaturation ที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ แยกเป็นสายเดี่ยว เกิดแบบไม่สมบูรณ์เช่นกัน

(4) นำคอลัมน์ที่มากับชุด kit (Zymo-Spin IC column) มาประกอบเข้ากับหลอดที่รองรับของเสีย และเติม M-Binding buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร

(5) ปิเปตดีเอ็นเอทั้งหมดจากข้อ 3 มาเติมในคอลัมน์ Zymo-Spin IC column ที่ประกอบไว้แล้ว ปิดฝาคอลัมน์ ผสมให้เข้ากันแบบกลับหลอดไปมา (invert mix) ประมาณ 20 ครั้ง

(6) นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งของเสียที่ออกจากคอลัมน์ ซึ่งอยู่ในหลอดที่รองรับของเสีย

เทคนิค ควรใช้ปิเปตดูดของเสียในหลอดรองรับของเสียทิ้ง แทนการเทเพื่อลดการเปื้อนบริเวณขอบหลอดของเสีย ซึ่งจะไปเปื้อนต่อที่ roter ของ centrifuge จนเกิดการกัดกร่อน

(7) ปิเปต M-Wash buffer ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที

(8) ปิเปต M-Desulphonation buffer ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15-20 นาที หลังจากบ่มครบตามเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที

ข้อควรระวัง ขั้นตอนนี้จะเกิดปฏิกิริยา desulphonation ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาที่เหมาะสม ไม่ควรต่ำกว่า 15 นาที

(9) ปิเปต M-Wash buffer ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม M-Wash buffer 200 ไมโครลิตรอีกครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที

(10) นำ Zymo-Spin IC column ออกจากหลอดรับของเสีย แล้วนำไปประกอบกับหลอดอันใหม่ (หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร) เพื่อเก็บดีเอ็นเอ (ที่ผ่านการทำ bisulfite conversion) ซึ่งอยู่ในคอลัมน์

(11) เติม M-Elution buffer 10-15 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อชะดีเอ็นเอ (ที่ผ่านการทำ bisulfite treat แล้ว) ออกจากคอลัมน์ **เทคนิค** ควรเติม M-Elution buffer ปริมาณตรงกลางคอลัมน์และระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

(12) วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแล้วด้วยเครื่องวัดสารพันธุกรรม เขียนความเข้มข้นที่ได้ไว้ข้างหลอด โดยความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 70-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

(13) จัดเก็บดีเอ็นเอที่ทำไบซัลไฟต์ คอนเวอร์ชันแล้ว ระหว่างรอทดสอบ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การทำเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN

การทำเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนที่ห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้นใช้เอง โดยใช้วิธีเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN จำนวน 2 ชุดการทดสอบ โดยการทดสอบชุดแรก (Kubota's primer set) ใช้ไพรเมอร์ที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Kubota (1997) (28) ซึ่งแสดงลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ไว้ในตาราง 9 และการทดสอบชุดที่ 2 (Alternative primer set) ใช้ไพรเมอร์ที่อ้างอิงจากการศึกษาของ Hussain Askree S (2011) (29) ซึ่งแสดงลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์ไว้ในตาราง 10 โดยการเตรียมเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์ การเตรียมสารเคมี/น้ำยาพีซีอาร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และขั้นตอนการปฏิบัติงานมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สิ่งที่ต้องรู้และข้อควรระวัง

- **การเกิด preferential amplification** หมายถึง การเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า หรือการเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ได้เพียงไพรเมอร์คู่เดียวจากดีเอ็นเอต้นแบบเฮเทอโรไซกัส ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่นำไปสู่การเกิดผลบวกложได้ (false positive) โดยเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์ยีน SNRPN เป็นมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นใช้เฉพาะภายในหน่วยงานมนุษย์พันธุศาสตร์ โดยเทคนิคนี้ได้ผ่านขั้นตอนการหาสถานะที่เหมาะสม เพื่อลดการเกิด preferential amplification แล้ว และได้กำหนดเป็นแนวทางปฏิบัติที่เหมาะสมของการทดสอบ (optimized protocol) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ไม่ใช่ชุดทดสอบสำเร็จรูป อีกทั้งยังมีความซับซ้อนหลายขั้นตอน เป็นเทคนิคที่ต้องขึ้นกับทักษะความชำนาญ ความละเอียด ความรอบคอบของผู้ปฏิบัติงานเป็นหลัก

รวมถึงปัจจัยด้านอื่นๆด้วย เช่น ความพร้อมเครื่องมือและอุปกรณ์ โดยหากเกิดข้อผิดพลาดจากผู้ปฏิบัติงาน หรือเครื่องมืออุปกรณ์ ก็จะเป็นปัจจัยที่อาจทำให้เกิด preferential amplification ได้ ด้วยเหตุนี้ผู้ปฏิบัติงานจึงควรปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติที่เหมาะสมของการทดสอบที่กำหนดอย่างเคร่งครัด (32-35)

- **การเกิด allele dropout** หมายถึง การที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เพิ่มปริมาณอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งทั้งที่ ดีเอ็นเอต้นแบบมีอัลลีลนั้นอยู่ จากการศึกษาของ Hassain Askree ปี ค.ศ. 2011 (29) ทำให้พบว่า การทดสอบ เมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Kubota ปี ค.ศ.1997 ทำให้เกิดผลบวกของโรคพร่า เดอร์วิลลีในตัวอย่างหนึ่งรายซึ่งไม่มีอาการของโรคชัดเจน ผลการสืบค้นหาสาเหตุการเกิด allele dropout พบว่า ดีเอ็นเอต้นแบบเกิดความแปรปรวนในนิวคลีโอไทด์เดียว หรือ สนิพ (single nucleotide polymorphism, SNP) ที่เป็นตำแหน่งจับไพรเมอร์ paternal unmethylation reverse primer โดย SNP อยู่ตรงกับตำแหน่งที่ 2 นับจากปลาย 3' ของไพรเมอร์ ซึ่งจะทำการระบวนการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (extension) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เกิดขึ้น ทำให้อัลลีลดังกล่าวไม่ถูกเพิ่มปริมาณ

6.1. เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

(1) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycle) หรือเครื่องพีซีอาร์

เทคนิคและข้อควรระวัง ควรจัดเตรียมเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมให้ระบบไฟฟ้าต่อพ่วงกับเครื่องสำรองไฟ (ภาพ 7) เพื่อป้องกันการเครื่องดับระหว่างทำงานและป้องกันความเสียหายของระบบเมนบอร์ด (mainboard) กรณีเกิดไฟตกหรือไฟดับ



ภาพ 7 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)

(2) ปิเปต (pipette) ขนาด P2 (0.2-2 ไมโครลิตร) ขนาด P20 (2-20 ไมโครลิตร)

และขนาด P200 (2-200 ไมโครลิตร) **เทคนิคและข้อควรระวัง** ควรมีการสอบเทียบปิเปต เพื่อทวนสอบความถูกต้องและเที่ยงตรงของเครื่องมืออย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง และควรแยกชุดปิเปตในแต่ละงานเพื่อลดการปนเปื้อนข้ามในแต่ละขั้นตอน (cross contamination) ได้แก่ ปิเปตสำหรับทำพีซีอาร์ ปิเปตสำหรับเตรียมดีเอ็นเอ และปิเปตสำหรับงานเจลอเล็กโตรโฟรีซิส

(3) ทิปปลอดเชื้อ (Sterile tip) ขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร ขนาด 2-20 ไมโครลิตร และ

ขนาด 20-200 ไมโครลิตร **เทคนิคและข้อควรระวัง** ควรเลือกใช้ทิปให้เหมาะสมกับงาน ทิปที่ใช้ควรมีประสิทธิภาพและต้นทุนไม่สูงเกินความจำเป็น โดยทิปมีสองประเภทหลัก (ภาพ 8) ได้แก่ ทิปแบบมีไส้กรอง (filter tip) ราคาประมาณ 1.8-2 บาทต่อชิ้น และทิปแบบไม่มีไส้กรอง ราคาประมาณ 0.3-0.5 บาทต่อชิ้น การเลือกใช้ทิปที่ช่วยลดต้นทุน ตัวอย่างเช่น การปิเปตน้ำยาพีซีอาร์ เช่น ไพร์เมอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตอาจเลือกใช้ทิปแบบไม่มีไส้กรอง ส่วนการปิเปตดีเอ็นเอและเอนไซม์ Taq DNA polymerase ควรใช้ทิปแบบมีไส้กรอง เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนดีเอ็นเอเข้าไปในปิเปตที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามจากตัวอย่างหนึ่งไปสู่อีกตัวอย่างหนึ่ง (sample carryover)

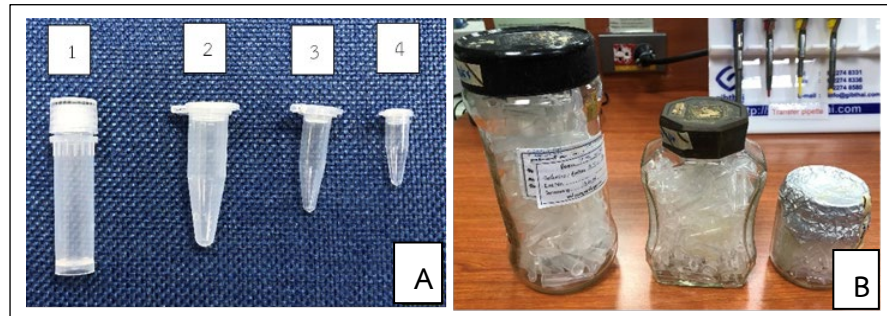


ภาพ 8 ทิปบรรจุกล่องขนาดต่างๆ

ภาพ A ทิปแบบไม่มีไส้กรอง หมายเลข 1 คือ ทิปขนาด 1000 ไมโครลิตร หมายเลข 2 คือ ทิปขนาด 200 ไมโครลิตร หมายเลข 3 คือ ทิปขนาด 10 ไมโครลิตร ภาพ B ทิปแบบมีไส้กรอง หมายเลข 4 คือ ทิปมีไส้กรองขนาด 1000 ไมโครลิตร หมายเลข 5 ทิปมีไส้กรองขนาด 200 ไมโครลิตร หมายเลข 6 ทิปมีไส้กรองขนาด 20 ไมโครลิตร หมายเลข 7 คือทิปมีไส้กรองขนาด 10 ไมโครลิตร

(4) หลอดทดลองปลอดเชื้อ (Sterile tube) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร และ 0.2 มิลลิลิตร

เทคนิคและข้อควรระวัง การใช้หลอดทดลองขนาดต่างๆ (ภาพ 9) ที่ราคาต่ำกว่าปกติ จากประสบการณ์พบว่าคุณภาพเนื้อพลาสติกอาจจะบางกว่าปกติทำให้แตกง่ายหรือฝาปิดไม่สนิท ตัวอย่างเช่น หลอด 0.2 มิลลิลิตรบางรุ่นฝาปิดปิดไม่สนิททำให้ปริมาตรสารในหลอดระเหยไปขณะทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์มากกว่า 10% ซึ่งส่งผลให้พีซีอาร์ล้มเหลวได้



ภาพ 9 หลอดทดลองขนาดต่างๆที่ใช้ในงานอนุชีววิทยา

ภาพ A หมายเลข 1 คือ หลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร หมายเลข 2 คือหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หมายเลข 3 คือหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร หมายเลข 4 คือหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ภาพ B หลอดทดลองที่บรรจุในขวดแก้วเพื่อนำไป autoclave ทำให้ปราศจากเชื้อก่อนใช้งาน

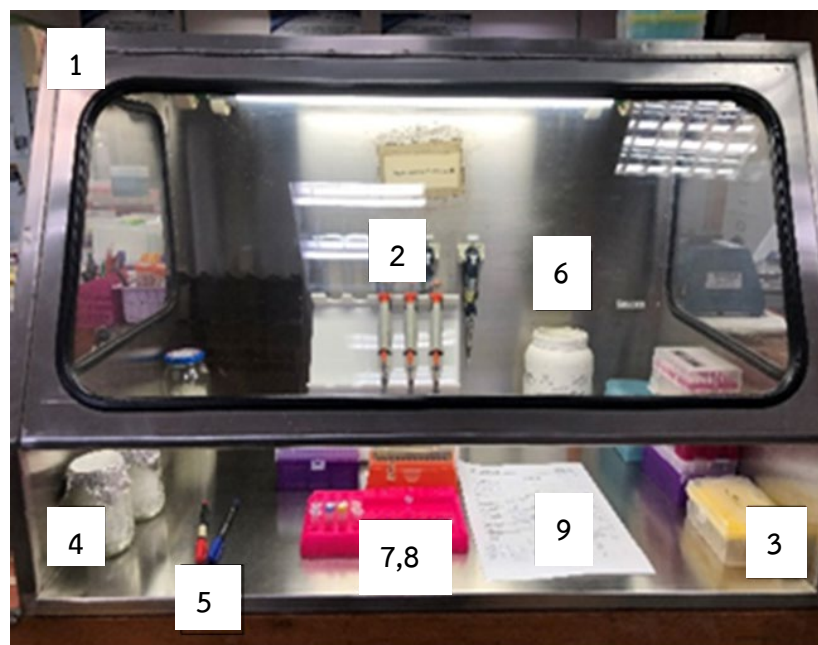
(5) ที่วางหลอดทดลอง (rack) (ภาพ 10 หมายเลข 7)

(6) ตู้สำหรับทำพีซีอาร์ (ภาพ 10 หมายเลข 1) **เทคนิค** ตู้สำหรับทำพีซีอาร์ ควรเป็นตู้ที่ทำด้วยสแตนเลสและควรติดหลอดยูวีมาเชื่อมต่อภายในตู้ บางห้องปฏิบัติการใช้ตู้ชีวนิรภัย (Biosafety cabinet, BSC)

(7) ภาชนะรองรับของเสียทิปและหลอดทดลองในการทำพีซีอาร์ (ภาพ 10 เลข 6)

(8) ควรจัดเตรียมองค์ประกอบของการทำพีซีอาร์ให้พร้อมก่อนทำพีซีอาร์ ดังภาพ 10

หมายเหตุ การจัดวางสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ



ภาพ 10 ตู้พีซีอาร์และการจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ในการทำพีซีอาร์

หมายเลข 1 คือ ตู้สำหรับทำพีซีอาร์ หมายเลข 2 คือ ปิเปต หมายเลข 3 คือ ทิป หมายเลข 4 คือ หลอดทดลอง หมายเลข 5 คือ ปากกา permanent หมายเลข 6 คือ ภาชนะที่รองรับทิปใช้แล้ว หมายเลข 7 คือ rack ที่วางหลอดทดลอง หมายเลข 8 คือ น้ำยาพีซีอาร์ หมายเลข 9 คือใบงาน (work sheet) บันทึกการทำพีซีอาร์

6.2. การเตรียมสารเคมี/น้ำยาในปฏิกิริยาพีซีอาร์

6.2.1. การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* จะใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite conversion แล้ว นำมาเตรียมที่ความเข้มข้น 70-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ul) ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* โดยทั่วไปตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องใช้ในหนึ่งชุดการทดสอบ ประกอบด้วยตัวอย่าง 2 ประเภท ได้แก่ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ และตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับการควบคุมคุณภาพ โดยตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมคุณภาพของการทำเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* มีจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมผลลบ (คนปกติ) ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมผลบวกโรคมะเร็งเต้านม-วิลลี่ ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมผลบวกโรคมะเร็งลำไส้ และหลอดทดสอบที่ไม่มีการเติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ซึ่งเป็นหลอดควบคุมที่ช่วยใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนในปฏิกิริยาพีซีอาร์

6.2.2. การเตรียมไพรเมอร์สำหรับการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* (working primers)

- (1) การทดสอบชุดแรก (Kubota's primer set) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่
 - ไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ primer *SNRPN*-unmodified (F+R) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ primer *SNRPN*-unmodified_F (เส้น forward) และ primer *SNRPN*-unmodified_R (เส้น reverse) ผสมในหลอดเดียวกัน
 - ไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ primer *SNRPN*-M (F+R) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ primer *SNRPN*-M_F (เส้น forward) และ primer *SNRPN*-M_R (เส้น reverse) ผสมในหลอดเดียวกัน
 - ไพรเมอร์คู่ที่ 3 คือ primer *SNRPN*-P (F+R) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ primer *SNRPN*-P_F (เส้น forward) และ primer *SNRPN*-P_R (เส้น reverse) ผสมในหลอดเดียวกัน
- (2) การทดสอบชุด 2 (Alternative primer set) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่
 - ไพรเมอร์คู่ที่ 1 คือ primer Alternative-M (F+R) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ primer Alternative-M_F (เส้น forward) และ primer Alternative-M_R (เส้น reverse) ผสมในหลอดเดียวกัน
 - ไพรเมอร์คู่ที่ 2 คือ primer Alternative-P (F+R) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ primer Alternative-P_F (เส้น forward) และ primer Alternative-P_R (เส้น reverse) ผสมในหลอดเดียวกัน
- (3) สูตร/ตัวอย่างการคำนวณ และวิธีการเตรียมไพรเมอร์
 - สูตรการคำนวณปริมาณสารสัมพันธ์ $C1V1=C2V2$ โดย

C1 คือความเข้มข้นของสต็อกไพรเมอร์ V1 คือปริมาตรของสต็อกไพรเมอร์ที่ต้องใช้

C2 คือความเข้มข้นไพรเมอร์ที่ต้องการ V2 คือปริมาตรสุดท้ายของไพรเมอร์ที่ต้องการ

- ตัวอย่างการคำนวณ เช่น ถ้าต้องการเตรียมไพรเมอร์ 1 คู่ ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (uM) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์เส้น forward และเส้น reverse ผสมในหลอดเดียวกัน ปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการเท่ากับ 100 ไมโครลิตร (uL) โดยเตรียมจากสต็อกไพรเมอร์ (Stock primer) ความเข้มข้น 100 uM วิธีการคำนวณและวิธีการเตรียมมีรายละเอียด ดังนี้

การคำนวณ สูตร $C1V1 = C2V2$

โดย $C1 = 100 \text{ uM}$ $V1 = ?$ $C2 = 5 \text{ uM}$ $V2 = 100 \text{ uL}$

แทนค่าสูตร $100 \text{ uM} \times V1 = 5 \text{ uM} \times 100 \text{ uL}$

$V1 = 5 \text{ uL}$

ดังนั้นใช้ไพรเมอร์แต่ละเส้น ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

- วิธีการเตรียม โดยเติมน้ำปราศจากเชื้อลงในหลอด ปริมาตร 90 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสต็อกไพรเมอร์เส้น forward ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในหลอด และปิเปตสต็อกไพรเมอร์เส้น reverse ปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง ประมาณ 5-10 ครั้ง และปั่นตก สามารถใช้งานได้ทันทีหลังเตรียมเสร็จ

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ถ้าเตรียมสารปริมาณมากควรแบ่งสาร (aliquot) เป็นหลายหลอด เพื่อลดจำนวนครั้งของการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze-thaw) และการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียของสารแต่ละหลอด ซึ่งเป็นภาวะที่จะทำให้ไพรเมอร์เสื่อมสภาพได้เร็วขึ้น

- ควรระบุหมายเลขชุดสารเคมี (lot number) ที่เตรียมและวันเตรียม เพื่อใช้ทวนสอบกรณีผลการทดสอบล้มเหลว และป้องกันการเกิดซ้ำ

6.2.3. การเตรียมสารละลายนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs)

(1) ใช้สูตรการคำนวณปริมาณสารสัมพันธ์ $C1V1 = C2V2$ เช่นกัน

(2) ตัวอย่างการคำนวณ เช่น ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย dNTPs ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (uL) โดยเตรียมจากสต็อก dNTPs ความเข้มข้น 100 mM ที่ประกอบด้วย dNTP แต่ละชนิดจำนวน 4 หลอด ได้แก่ dATP dGTP dCTP และ dTTP แสดงวิธีการคำนวณและวิธีการเตรียมมีรายละเอียด ดังนี้

การคำนวณ สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

โดย $C_1 = 100 \text{ mM}$ $V_1 = ?$ $C_2 = 2.5 \text{ mM}$ $V_2 = 100 \text{ uL}$

แทนค่าสูตร $100 \text{ mM} \times V_1 = 2.5 \text{ mM} \times 100 \text{ uL}$

$V_1 = 2.5 \text{ uL}$

ดังนั้นใช้ dNTP แต่ละชนิด (dATP dGTP dCTP และ dTTP) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร

(3) วิธีการเตรียม เติมน้ำปราศจากเชื้อลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 ไมโครลิตร (uL) จากนั้นปิเปต dATP 2.5 uL dGTP 2.5 uL dCTP 2.5 uL และ dTTP 2.5 uL ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง ประมาณ 5-10 ครั้ง และปั่นตก (สามารถใช้งานได้ทันทีหลังเตรียมเสร็จ) การเก็บรักษา ควรเก็บในตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -10 ถึง -30 องศาเซลเซียส และอายุการเก็บรักษาไม่เกิน 6 เดือน

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ถ้าเตรียมสารปริมาณมากควรแบ่งสาร (aliquot) เป็นหลายหลอด เพื่อลดจำนวนครั้งของการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze-thaw) และการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียของสารแต่ละหลอด ซึ่งเป็นภาวะที่จะทำให้สารละลาย dNTP เสื่อมสภาพได้เร็วขึ้น

- ควรระบุหมายเลขชุดสารเคมี (lot number) ที่เตรียมและวันเตรียม เพื่อใช้ทวนสอบกรณีผลการทดสอบล้มเหลว และป้องกันการเกิดซ้ำ

6.2.4. Taq DNA polymerase

Taq DNA polymerase โดยทั่วไปจะขายมาเป็นชุดพร้อมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10X และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 mM หรือ 25 mM ขึ้นกับแต่ละบริษัท

เทคนิคและข้อควรระวัง ควรใช้ชนิด/ยี่ห้อ Taq DNA polymerase ให้ตรงกับระเบียบปฏิบัติ (protocol) ของแต่ละการทดสอบที่กำหนดไว้ เพราะ Taq DNA polymerase แต่ละชนิด/ยี่ห้ออาจมีผลทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดมากขึ้นหรือน้อยกว่าเดิมได้ หากจำเป็นต้องเปลี่ยนชนิด/ยี่ห้อ Taq DNA polymerase ควรมีการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของการทดสอบที่ใช้ Taq DNA polymerase ชนิดใหม่ ก่อนใช้งานจริง

6.2.5. Betaine

Betaine เป็นสารที่ช่วยเพิ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ (adjuvant) ทำหน้าที่ช่วยลดการจับกันเองแบบไม่จำเพาะ (secondary structure) ของดีเอ็นเอ มีขายทั่วไปทั้งในรูปแบบสารละลายและผง โดยรูปแบบสารละลายความเข้มข้นของสต็อกจะเท่ากับ 5 โมลาร์ (M) แต่ถ้าซื้อมาเป็นผงควรเตรียมตามคำแนะนำของบริษัท

6.3. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

(1) เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion แล้วให้ได้ความ

เข้มข้น 70-100 ng/ul โดยการเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ปลอดเชื้อ

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ปริมาณดีเอ็นเอที่มากหรือน้อยกว่าที่กำหนดจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง จนอาจส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมหรือผลลบปลอมเกิดขึ้นได้

- ควรเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion แล้วไว้ในตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -10 ถึง -30 องศาเซลเซียสเท่านั้น เพราะโครงสร้างดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion แล้วจะเสื่อมสภาพได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอปกติ

(2) จัดเตรียมเครื่องมืออุปกรณ์ให้พร้อมใช้งาน โดยทำความสะอาดตู้สำหรับทำพีซีอาร์ และอุปกรณ์ เช่น ปิเปตและ rack ด้วย 70 % แอลกอฮอล์ และเปิดหลอดยูวีฆ่าเชื้ออย่างน้อย 10 นาที

(3) เตรียมสารเคมีสำหรับพีซีอาร์การทดสอบแรก (ตาราง 15) และการทดสอบที่ 2 (ตาราง 16) ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน โดยนำสารเคมีออกมาวางให้ละลายจากสภาพแข็งเป็นของเหลวก่อนใช้งาน

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ควรเก็บสารเคมีสำหรับพีซีอาร์ไว้ในตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิที่ -10 ถึง -30 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยลดเสื่อมสภาพจากการปนเปื้อนแบคทีเรีย

- ควรแบ่งสาร (aliquot) แต่ละชนิดเป็นหลายหลอด เพื่อลดจำนวนครั้งของการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze-thaw) ของสารแต่ละหลอดซึ่งเป็นภาวะที่จะทำให้สารเคมีต่างๆเสื่อมสภาพได้เร็วขึ้น

(4) จัดเตรียมใบงาน (work sheet) สำหรับบันทึกการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิเคชันพีซีอาร์ของยีน SNRPN โดยทำการคำนวณปริมาตรสารเคมีสำหรับพีซีอาร์แต่ละชนิด เพื่อทำมาสเตอร์มิกซ์ของปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละชุดการทดสอบ (ตาราง 15 และตาราง 16) และบันทึกผลคำนวณในใบงาน (ตัวอย่างใบงานแสดงดังภาพ 11)

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ควรจัดทำใบงานของแต่ละการทดสอบเพื่อช่วยให้การทำงานง่ายและลดข้อผิดพลาดเดิมสารเคมีไม่ครบถ้วนหรือเดิมสารเคมีซ้ำ

- ใบงานควรประกอบด้วย การระบุรายละเอียดตัวอย่าง รายละเอียดสารเคมีสำหรับทำพีซีอาร์ หมายเลขชุดสารเคมี (lot number) ที่เตรียมและวันเตรียม ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารเคมี ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมี ปริมาตรต่อหลอดทดลอง (1X) ปริมาตรของมาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์ (เช่นจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 5 ปริมาตรของมาสเตอร์มิกซ์เท่ากับ 5.5X) สภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR cycle) และการตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

- การระบุหมายเลขชุดสารเคมี (lot number) ที่เตรียมและวันเตรียม ทำเพื่อใช้ทวนสอบหาสาเหตุของปัญหากรณีผลการทดสอบล้มเหลว และช่วยป้องกันการเกิดซ้ำ

หน่วยปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม 06.00.00.00 หน้า 1 จาก 1

MS-PCR for PWS/AS (Ref 1: Kubota's primer set)

Sample/Hospital
1. AS/AS - 04 6
2. AS - 05 7
3. AS - 06 8
4. 9
5. 10

PCR Reaction

Step	Reagent	Lot No.	stock	Final concentration	1X (ul)	5. X
☐	sterile D.W.	<u>150</u>	-	-	<u>2.9</u>	<u>5.8</u>
☐	Betaine	<u>10/16</u>	5 M	1 M	2.0	<u>16</u>
☐	Buffer (Immolase)	<u>5/16</u>	10X	1X	1.0	<u>9</u>
☐	MgCl2	<u>6</u>	50 mM	1.5 mM	0.3	<u>3.6</u>
☐	dNTPs	<u>150</u>	2.5 mM	0.2 mM	0.8	<u>1.6</u>
☐	primer SNRPN-unmodified (F+R)	<u>150</u>	5 pmole/ul	0.2 pmole/ul	0.4	<u>3.2</u>
☐	primer SNRPN-M (F+R)	<u>150</u>	5 pmole/ul	0.4 pmole/ul	0.8	<u>1.6</u>
☐	primer SNRPN-P (F+R)	<u>123</u>	5 pmole/ul	0.6 pmole/ul	1.2	<u>9.6</u>
☐	Taq polymerase (Immolase)	<u>150</u>	5U/ul	0.6 U	0.06	<u>0.45</u>
☐	Treated DNA	<u>150</u>	(~100 ng/ul)	-	<u>15.5</u>	<u>77.5</u>
	Total volume				10 ul	

Lab No. _____ PCR condition (MJ1/.....) PWS/AS, Total time 2.08 hrs

1. Normal (Negative-PWS/AS) AS/AS - 04/16 Temperature Time Cycle
2. PWS positive control AS/AS - 05/16 96°C 10 min 1
3. AS positive control AS/AS - 06/16 96°C 30 sec
4. AS/AS - 04 64°C 30 sec 135
5. AS - 05 72°C 1 min
6. AS - 06 72°C 10 min 1
7. unmodified PWS 15°C 5 min
8. AS
9.
10.
11.

หน่วยปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม 06.00.00.00 หน้า 2 จาก 2

Electrophoresis

Concentration of agarose gel	Marker load	Sample load	Voltage
2.5 % in 1XTAE buffer	100 bp ladder (100 ng/ul) 5 ul	10ul + loading dye 2 ul	100 V for 50 min

Result Kubota primer set

Picture	No. of lane	Interpretation	Remark
	1	100 bp ladder (100 ng/ul) 5 ul	
	2	AS/AS - 04/16	AS/AS - 04/16
	3	AS/AS - 05/16	AS/AS - 05/16
	4	AS/AS - 06/16	AS/AS - 06/16
	5	AS/AS - 04	AS/AS - 04
	6	AS - 05	AS - 05
	7	AS - 06	AS - 06
	8	unmodified PWS	unmodified PWS
	9	AS	AS
	10	AS	AS
	11	AS	AS

Note

Technician Dr. Asst. Prof. Dr. Jitaporn Supervisor Dr. Jitaporn
Dr. Asst. Prof. Dr. Jitaporn (นางสาวจรรยาพร ปัสสงรัมย์) Dr. Jitaporn (นางสาวจรรยาพร ปัสสงรัมย์) Dr. Jitaporn (นางสาวจรรยาพร ปัสสงรัมย์)

ภาพ 11 ตัวอย่างใบงาน (work sheet) สำหรับบันทึกการทำพีซีอาร์

(A) ใบงานด้านหน้า แสดงรายละเอียดตัวอย่าง รายการสารเคมีและสภาวะสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (B) ใบงานด้านหลัง แสดงการตรวจสอบผลพีซีอาร์ด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตาราง 15 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิเคชันพีซีอาร์ของยีน SNRPN การทดสอบชุดแรก (Kubota's primer set)

สารเคมีสำหรับทำพีซีอาร์ การทดสอบชุดแรก (Reagents)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Initial concentration)	ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration)	ปริมาตรต่อ หลอดทดลอง 1X (ul)
sterile D.W.	-	-	
Betaine	5M	1M	2.0
Buffer	10X	1X	1.0
MgCl2	50 mM	1.5 mM	0.3
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	0.8
Primer SNRPN-unmodified (F+R)	5 uM	0.2 uM	0.4
primer SNRPN-M (F+R)	5 uM	0.4 uM	0.8
primer SNRPN-P (F+R)	5 uM	0.6 uM	1.2
Taq polymerase	5U/ ul	0.6 U	0.06
DNA	(70-100 ng/ul)		0.5
Total volume			10 ul

ตาราง 16 สารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* การทดสอบชุดที่ 2 (Alternative primer set)

สารเคมีสำหรับพีซีอาร์ การทดสอบชุดที่ 2 (Reagents)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (Initial concentration)	ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration)	ปริมาตรต่อ หลอดทดลอง 1X (ul)
sterile D.W.	-	-	
Betaine	5M	1M	2.0
Buffer	10X	1X	1.0
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.3
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	0.8
primer Alternative-M (F+R)	5 uM	0.1 uM	0.2
primer Alternative-P (F+R)	5 uM	0.5 uM	1.0
Taq polymerase	5U/ ul	0.6 U	0.06
DNA	(70-100 ng/ul)		0.5
Total volume			10 ul

(5) จัดเตรียมหลอดทดลองซึ่งประกอบด้วยหลอดมาสเตอร์มิกซ์ (master mix tube) ขนาด 500 ไมโครลิตร และหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยระบุรหัสแต่ละตัวอย่างบนฝาหลอดหรือด้านข้างหลอดพีซีอาร์

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ควรเลือกใช้ปากกาแบบ permanent ซึ่งจะลบไม่ได้ในการเขียนรหัสตัวอย่างที่ฝาหลอด ควรเลือกใช้น้ำเงินและสีดำมากกว่าสีเขียวกับสีแดง เพราะสีเขียวกับสีแดงมักจะเลือนออกง่ายติดไม่ทน
- ควรมีการระบุหมายเลขลำดับหลอดควบคุมไปกับหมายเลขตัวอย่าง และควรเรียงหมายเลขลำดับหลอดให้ตรงกับที่บันทึกไว้ในใบงานด้วย เนื่องจากบ่อยครั้งที่พบเหตุการณ์หมึกปากกาที่ฝาหลอดเลือนจนหมายเลขตัวอย่างไม่ชัดเจนซึ่งเกิดจากหลอดทดลองต้องสัมผัสกับอุณหภูมิสูง ดังนั้นการมีหมายเลขลำดับหลอดกำกับไว้ด้วยจะยืนยันหมายเลขตัวอย่างได้

(6) ทำมาสเตอร์มิกซ์ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยปิเปตสารทุกตัว (ยกเว้นดีเอ็นเอ) ตามปริมาณที่คำนวณไว้ในใบงาน ใส่ในหลอดมาสเตอร์มิกซ์ขนาด 500 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยการดูดปิเปตขึ้นลงประมาณ 5-6 ครั้ง และปั่นตก (spin down)

เทคนิคและข้อควรระวัง

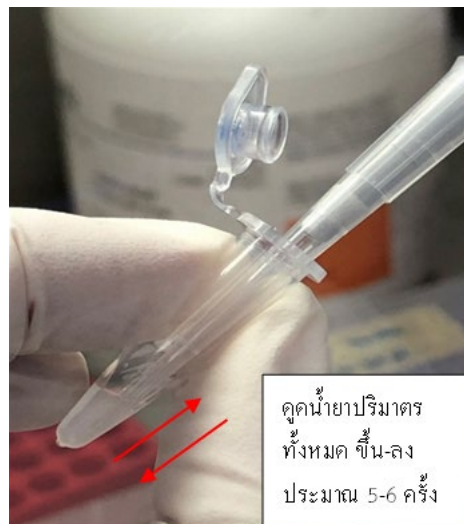
- เทคนิคการคำนวณน้ำยามาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์ หากต้องการทำพีซีอาร์จำนวน 9 หลอด ควรคำนวณมาสเตอร์มิกซ์สำหรับพีซีอาร์เกินจากจำนวนที่ต้องการ ประมาณ 0.5-1 หลอด เป็น 9.5-10 X เพื่อชดเชยกรณีปริมาตรขาดอันเนื่องมาจากการปิเปต (pipette error)
- ควรใช้การเลื่อนหลอดไปแถวใหม่หลังจากที่เติมสารเคมีในหลอดมาสเตอร์มิกซ์แล้ว (ภาพ 12) และ

ทำเครื่องหมาย ☒ ในใบงาน เพื่อช่วยลดข้อผิดพลาดในการเตรียมมาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์ไม่ครบถ้วนหรือเติมสารเคมีซ้ำ



ภาพ 12 แสดงการเลื่อนหลอดไปแถวใหม่หลังจากเติมสารเคมีหลอดนั้นลงในหลอดมาสเตอร์มิกซ์เสร็จสิ้น

- การผสมน้ำยามาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ควรใช้เทคนิคปิเปตดูดสารขึ้น-ลง (pipette up and down) (ภาพ 13) โดยการปรับปิเปตให้ปริมาณเป็น 1.5-2 เท่าของปริมาณสารทั้งหมด และดูดน้ำยาปริมาณทั้งหมดขึ้นลงซ้ำๆ ประมาณ 5-6 ครั้ง หรือนำน้ำยามาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์เป็นเนื้อเดียวกัน วิธีการนี้จะช่วยลดการกระเด็นของน้ำยาไปบริเวณฝา ซึ่งเป็นบริเวณที่เสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อน (contamination)



ภาพ 13 เทคนิคปิเปตดูดสารขึ้น-ลง (pipette up and down) เพื่อผสมสาร

(7) ทำการแบ่งน้ำยามาสเตอร์มิกซ์ใส่หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร หลอดละ 9.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละตัวอย่าง เติมลงในหลอดพีซีอาร์แต่ละหลอดนั้นๆ ให้ตัวอย่างตรงกับที่ระบุไว้ที่หลอด ควรทำด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันการสลับตัวอย่าง

เทคนิคและข้อควรระวัง ควรใช้เทคนิคการเติมดีเอ็นเอทีละตัวอย่างและเลื่อนหลอดที่ใช้แล้วไปแถวใหม่ (ภาพ 12) เพื่อช่วยลดโอกาสการสลับตัวอย่าง ควรเปิดฝาหลอดดีเอ็นเอทีละตัวอย่าง หลังจากเติมเสร็จ ปิด

ฝาและเลื่อนหลอดไปแถวใหม่พร้อมกับระบุรหัสตัวอย่างลงบนฝาหลอด รวมถึงควรจัดเก็บดีเอ็นเอให้เรียงตามลำดับการใช้งาน เพื่อใช้ทดสอบกรณีผลการทดสอบเกิดข้อสงสัยบางอย่าง

(8) นำหลอดมาปั่นตก จากนั้นนำเข้าเครื่องพีซีอาร์และรันตามโปรแกรมในตาราง 17
ตาราง 17 สภาวะการทำปฏิกิริยาเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวน วงรอบ (cycle)
Initiation denaturation	95	10 นาที	1 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	64	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	10 นาที	1 รอบ
Hold	15	5 นาที	



ภาพ 14 รูปแบบการวางหลอดที่เหมาะสมกับเครื่องพีซีอาร์แต่ละแบบ

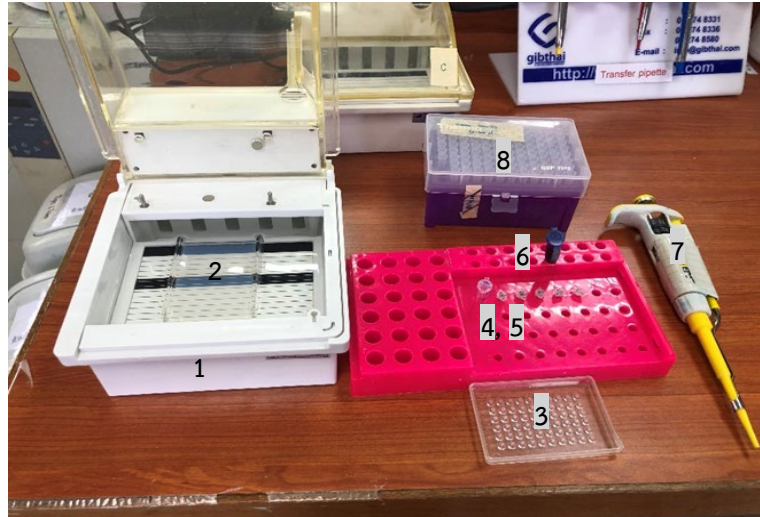
เทคนิคและข้อควรระวัง เทคนิคการวางหลอดในเครื่องพีซีอาร์บางรุ่นที่ไม่มีแท่นช่วยวางหลอดเหมือนในภาพ 14 (A) ควรวางให้หลอดกระจายตัวแบบสมมาตร เพื่อช่วยกระจายแรงกดทับที่หลอดพีซีอาร์ได้ใกล้เคียงกัน เพื่อป้องกันหลอดชำรุดได้ ภาพ 14 (B) เป็นรุ่นที่มีแท่นช่วยวางหลอดซึ่งจะช่วยกระจายแรงกดทับที่หลอดพีซีอาร์ได้ ดังนั้นการวางหลอดแบบสมมาตรอาจไม่จำเป็นมากนัก

7. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

เป็นวิธีการตรวจสอบผลการทำเมทิลเลชั่น-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* โดยใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2.5% ทำการรันในแท่งคอล์เล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน (Horizontal Electrophoresis Systems) ด้วยบัฟเฟอร์ชนิด Tris-acetate-EDTA ความเข้มข้น 1X (1X TAE) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที (ภาพ 15) มีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงาน ดังนี้

7.1. เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

- (1) เครื่องทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน (Horizontal electrophoresis systems) (ภาพ 15 หมายเลข 1) ประกอบด้วยชุดเครื่องมือสำหรับเตรียมอะกาโรสเจลแบบแนวนอน ได้แก่ ถาดเตรียมเจล ถาดสำหรับขึ้นรูปเจลขนาดต่างๆ และหวี (ภาพ 18)
- (2) ขวดสำหรับเตรียมเจล และถุงมือกันร้อน
- (3) เพาเวอร์ซัพพลาย ที่สามารถจ่ายกระแสไฟ ได้อย่างน้อย 100 โวลต์ (V) และ 200 มิลลิแอมแปร์ (mA)
- (4) ไมโครเวฟสำหรับให้ความร้อนเพื่อละลายเจล
- (5) เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี (gel documentation system)
- (6) ปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร และทิปปลอดเชื้อ (ภาพ 15 หมายเลข 7 และ 8)
- (7) จานผสมตัวอย่าง (ภาพ 15 หมายเลข 3)
- (8) อ่างสำหรับใส่สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ภาพ 23 A)
- (9) อุปกรณ์ตักเจล



ภาพ 15 ชุดเครื่องมือวัสดุและอุปกรณ์สำหรับการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
 หมายเลข 1 คือ เครื่องทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวนอน หมายเลข 2 คือ เจลอะกาโรส หมายเลข 3 คือ จานผสมสีกับตัวอย่าง หมายเลข 4 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA size standards) หมายเลข 5 คือ PCR product หมายเลข 6 คือ Gel-loading dye ชนิด Xylene cyanol หมายเลข 7 คือ ปิเปต หมายเลข 8 คือ ทิป

7.2. สารเคมีสำหรับทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

(1) อะกาโรสเจล (Agarose gel)

เทคนิคและข้อควรระวัง ควรเลือกใช้เจลอะกาโรส ชนิด Low gelling/melting temperature เพราะเป็นเจลชนิดที่เตรียมง่ายเหมาะกับผู้ใช้งานทุกคน มีลักษณะแข็งตัวช้ากว่าเจลแบบทั่วไปเพราะค่า gelling Temperature ต่ำ ประมาณ $34.5-37.5^{\circ}\text{C}$ รวมทั้งมีค่าอิเล็กโตรเอนโดสโมซิสต่ำ (EEO) และมีค่า gel strength สูง ทำให้มั่นใจได้ว่ากรดนิวคลีอิกจะเคลื่อนที่ด้วยอิเล็กโตรโฟรีติกได้สูง และเกิด background ต่ำ ทำให้ผลการทดสอบคมชัด แปลผลง่าย



ภาพ 16 ผงเจลอะกาโรสชนิด Low gelling/melting temperature

- (2) สารละลาย 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร การเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ค
- (3) บัฟเฟอร์ชนิด Tris-acetate-EDTA ความเข้มข้น 50X (50XTAE buffer) และความ

เข้มข้น 1X (1XTAE buffer) การเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ค

ข้อควรระวัง ควรเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 1X TAE ทันที เมื่อใช้งานครบ 2 ครั้ง เพราะบัฟเฟอร์ที่ใช้ซ้ำหลายครั้งจะมีการแตกตัวของไอออนลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอลดลงและเกิดความร้อนขึ้น จนทำให้แถบดีเอ็นเอไม่คมชัด หรือความสามารถในการแยกขนาดลดลง

(4) Gel-loading dye ชนิด Xylene cyanol การเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ค

ข้อควรระวัง การใช้ Gel-loading dye ชนิดอื่นๆที่มีส่วนผสมของสาร Bromophenol blue อยู่ด้วย ตัวอย่างเช่น Gel Loading Dye, Purple (6X) ยี่ห้อ NEB (NEB #B7025) อาจไม่เหมาะสมกับการทดสอบนี้ เพราะการเคลื่อนที่ของผลพีซีอาร์ (PCR product) จะอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกับการเคลื่อนที่ของ Gel-loading dye ชนิด Bromophenol blue ใน 2.5% Agarose gel ซึ่งส่งผลให้ความเข้มของแถบผลพีซีอาร์ลดลงเพราะถูกบังด้วย Gel-loading dye ชนิด Bromophenol blue

(5) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA size standards) ชนิด 100 bp DNA ladder ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร การเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ค

(6) สารย้อมดีเอ็นเอชนิด ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ค หรืออาจใช้สารชนิด SYBR Gold ความเข้มข้นตามข้อบ่งชี้จากบริษัทผู้ผลิต

7.3. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

(1) ประกอบชุดแม่พิมพ์สำหรับเตรียมเจลอะกาโรส ซึ่งประกอบด้วยถาดแม่พิมพ์และหวีเพื่อสร้างหลุมสำหรับโหลดดีเอ็นเอ

เทคนิคและข้อควรระวัง

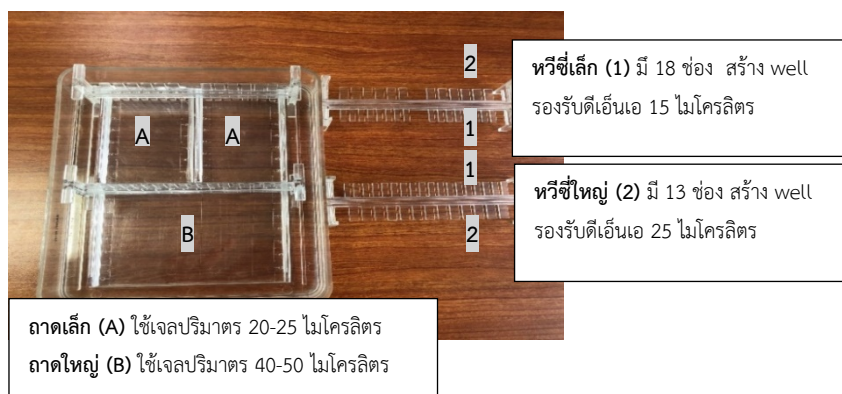
- ควรเตรียมเจลบนโต๊ะพื้นเรียบพื้นผิวเป็นระนาบเดียวกัน หากพื้นผิวเอียงไม่เป็นระนาบเดียวกันจะส่งผลให้เจลทั้งแผ่นไม่เป็นระนาบเดียวกันเช่นกันซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ผลการรันจะปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่เป็นระนาบเดียวกันทั้งแถบ เกิดการเอียงด้านใดด้านหนึ่ง ปัญหานี้แก้ไขได้ด้วยการใช้ลูกน้ำวัดระดับพื้นผิววางในถาดเจล เพื่อตรวจสอบระนาบพื้นก่อนการเทเจล (ภาพ 17)



ภาพ 17 การตรวจสอบระนาบพื้นโต๊ะด้วยการใช้ลูกน้ำวัดระดับพื้นผิว

- การเลือกใช้หวีสร้างหลุมเจล (well) ควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ (ภาพ 18)

ตัวอย่างเช่น ถ้าผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ควรเลือกใช้หัวรีซีใหญ่ ถ้าผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เลือกใช้หัวรีซีได้ทั้งสองแบบ แต่อย่างไรก็ตามหากผลผลิตพีซีอาร์มี PCR efficiency ต่ำ (หมายถึงการเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ได้น้อยกว่าปกติ) ควรเลือกใช้หัวรีซีเล็กและควรเทเจลให้ค่อนข้างบางจะช่วยให้แถบดีเอ็นเอในเจลเล็กโครฟอริซิสชัดมากขึ้น

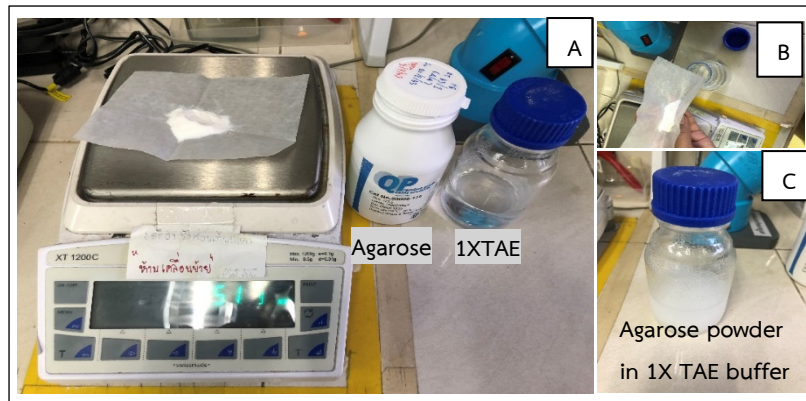


ภาพ 18 การประกอบแม่พิมพ์ขึ้นรูปเจลอะกาโรสและหัวรีซีสร้างหลุมเจล (well)

(2) ชั่งอะกาโรสเจล 2.5 กรัม และถ่ายผงเจลลงในขวดดูเรนที่บรรจุด้วย 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ภาพ 19) ผสมให้เจลกระจายตัวในบัฟเฟอร์ก่อนที่จะนำไปให้ความร้อน

เทคนิคและข้อควรระวัง

- การเทผงเจลลงในขวด 1X TAE ควรค่อยๆ เททีละน้อยพร้อมกับเขย่าไปด้วย เพื่อให้ผงเจลกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวป้องกันการจับตัวเป็นก้อนก่อนนำผงเจลไปละลายด้วยไมโครเวฟ จากประสบการณ์ผู้เขียนคู่มือเคยเจอกรณีที่นักศึกษาเทผงเจลทั้งหมดลงในขวดคราวเดียวกัน แล้วนำขวดเจลไปละลายด้วยไมโครเวฟทันทีโดยไม่รอให้เจลกระจายตัว ปรากฏว่าผงเจลที่จับตัวเป็นก้อนไม่สามารถละลายได้ แม้เพิ่มเวลาในการละลาย จนต้องเททิ้ง
- การแช่ผงเจลทิ้งไว้ใน 1X TAE buffer 10-15 นาที ก่อนนำเข้าไมโครเวฟ จะช่วยให้เจลละลายได้ดีขึ้น ลดการเกิดฟองอากาศขณะละลายเจลและใช้เวลาละลายเจลงน้อยกว่าเดิม กรณีไม่แช่เจลทิ้งไว้อาจจะใช้เวลาละลายเจนานขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์เจลเพิ่มขึ้นมากกว่าที่กำหนดไว้ เพราะน้ำในเจลระเหยมากขึ้น



ภาพ 19 แสดงการขั้นตอนการชั่งเจลอะกาโรสและแช่ผงเจลในขวด 1X TAE buffer

ภาพ A คือ การชั่งผงเจลอะกาโรส ภาพ B คือ การเทผงเจลลงในขวด 1X TAE buffer ภาพ C คือ การแช่ผงเจลทิ้งไว้ในขวด 1X TAE buffer

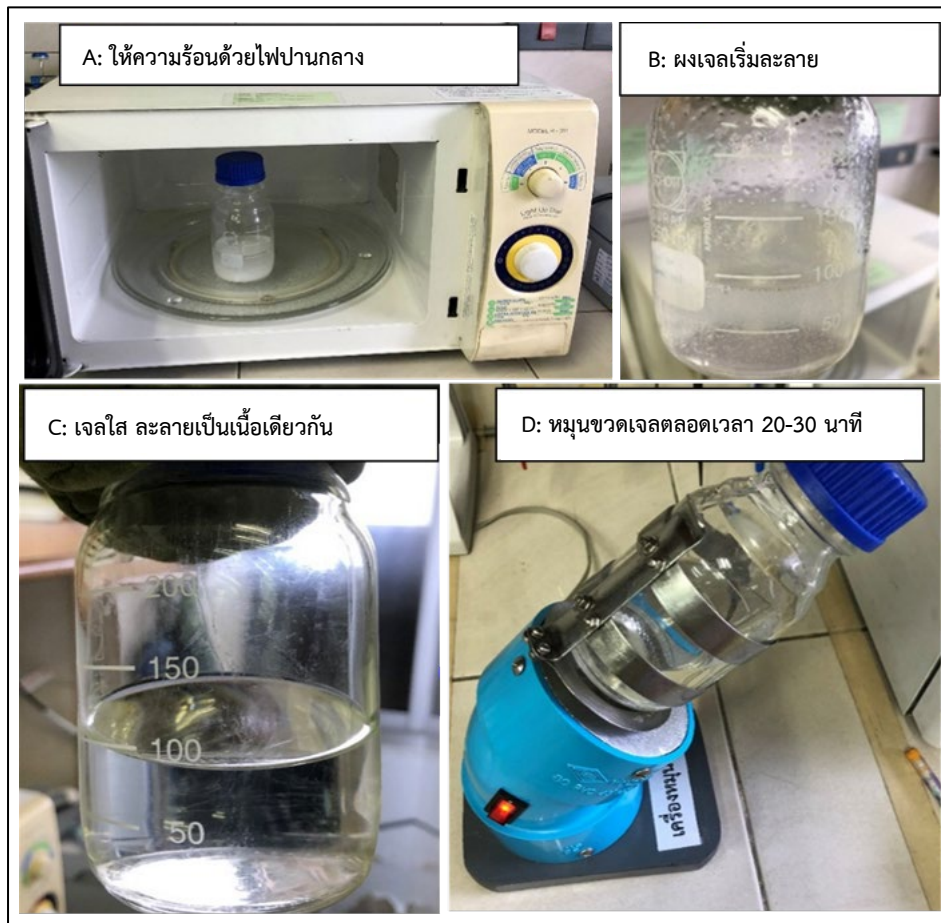
(3) นำขวดเจลมาให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งผงเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งเจลจะมีลักษณะใส จากนั้นพักสารละลายเจลไว้ประมาณ 30 นาที จนกระทั่งขวดเจลอุ่นพอที่จะสัมผัสขวดเจลด้วยมือเปล่าได้ (ภาพ 20)

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ต้องสวมถุงมือกันร้อนทุกครั้งขณะละลายเจลเพื่อความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน
- การละลายเจลด้วยไมโครเวฟ (ภาพ 20) นำขวดเจลวางในไมโครเวฟ (ภาพ 20A) ควรปรับ

ความร้อนที่ระดับไฟปานกลาง (ประมาณ 600 วัตต์) ในช่วงเริ่มต้นของการละลายเจล จากนั้นสังเกตขวดเจลตลอดเวลา เมื่อเจลเริ่มร้อนแต่ยังไม่เดือด ให้นำขวดออกมาหมุนขวดเจลด้วยมือที่สวมถุงมือกันร้อน ผงเจลจะเริ่มละลายสังเกตจากเจลเริ่มใสขึ้นกว่าเดิม (ภาพ 20B) จากนั้นนำเจลกลับเข้าไปในไมโครเวฟอีกครั้ง สังเกตขวดเจลตลอดเวลา เมื่อเจลเริ่มร้อนแต่ยังไม่เดือด ให้นำขวดออกมาหมุนขวดอีกครั้ง แล้วนำเข้าไปในไมโครเวฟอีกครั้ง ทำซ้ำประมาณ 3-4 รอบ จนกระทั่งเจลจะใสเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพ 20C) จากนั้นนำเจลไปหมุนในเครื่องหมุนขวดเจล เป็นเวลา 20-30 นาที หากไม่มีเครื่องหมุนอาจใช้การหมุนด้วยมือ (ต้องสวมถุงมือกันความร้อน) เมื่อครบเวลานำเจลเทลงบนแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้แล้ว

- เทคนิคการรอเจลลดอุณหภูมิลงด้วยการหมุนขวดตลอดเวลา จะช่วยให้อุณหภูมิของเจลทุกส่วนใกล้เคียงกันมากที่สุด หากรอเจลลดอุณหภูมิแบบวางทิ้งไว้โดยไม่มีการเคลื่อนที่ของเนื้อเจล จะทำให้เนื้อเจลรอบนอกอุณหภูมิลงเร็วกว่าด้านใน ส่งผลให้เนื้อเจลแต่ละส่วนแข็งตัวไม่พร้อมกันหรืออาจมีเจลบางส่วนจับตัวเป็นก้อน

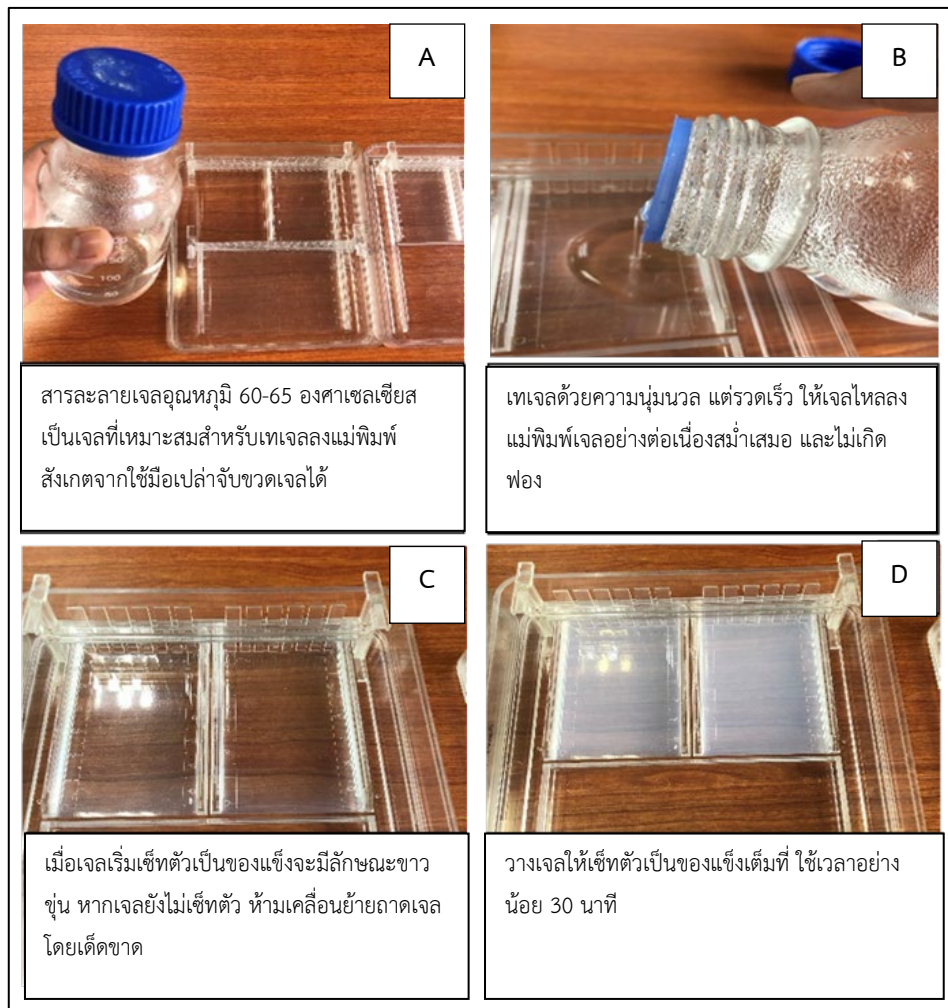


ภาพ 20 แสดงขั้นตอนการละลายเจลด้วยไมโครเวฟ (เรียงลำดับขั้นตอนจากภาพ A ถึง D)

(4) เทสารละลายเจลลงในภาชนะพิมพ์ที่เตรียมไว้ ความหนาเจลประมาณ 0.5 มิลลิเมตร วางให้เจลเซ็ทตัวอย่างน้อย 30 นาที ก่อนใช้งาน

เทคนิคและข้อควรระวัง

- อุณหภูมิเจลที่เหมาะสมสำหรับเทลงแม่พิมพ์ ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส โดยสังเกตได้จากการใช้มือสัมผัสขวดเจลได้แบบไม่เป็นอันตราย (ภาพ 21A)
- เทเจลด้วยความนุ่มนวลแต่รวดเร็ว ให้เจลไหลลงแม่พิมพ์อย่างต่อเนื่องสม่ำเสมอและไม่เกิดฟองอากาศ (ภาพ 21B)
- หลังเทเสร็จ เมื่อเจลเริ่มเซ็ทตัวเป็นของแข็งจะมีลักษณะขาวขุ่น (ภาพ 21C) หากเจลยังไม่เซ็ทตัว ห้ามเคลื่อนย้ายโดยเด็ดขาด และควรพักเจลไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลเซ็ทตัวแข็งเต็มที่ (ภาพ 21D) ควรใช้ 1X TAE buffer เทบนหน้าเจลเล็กน้อยหากไม่ใช้งานทันที เพื่อไม่ให้หน้าเจลแห้งระหว่างรอใช้งาน



ภาพ 21 แสดงขั้นตอนการเทเจลอะกาโรสลงแม่พิมพ์ (เรียงลำดับขั้นตอนจากภาพ A ถึง D)

(5) นำแท่งคอล์เล็กโตรโฟรีซิสมา (Electrophoresis chamber) ประกอบให้พร้อมใช้งาน จากนั้นเติม 1X TAE buffer ลงในแท่งคอล์เล็กโตรโฟรีซิส ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ภาพ 22A)

(6) เมื่อเจลพร้อมใช้งานให้ถอดหัวหรือออก และนำเจลวางในแท่งคอล์เล็กโตรโฟรีซิสที่มี 1X TAE buffer บรรจุอยู่แล้ว โดยสังเกตเจลต้องจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ 1X TAE หากระดับบัฟเฟอร์ไม่ท่วมเจลให้เติมเพิ่มขึ้นจนท่วมเจล (ภาพ 22B)

(7) เตรียมตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ผสมกับ Gel-loading dye ชนิด Xylene cyanol F โดยใช้ตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ต่อ Gel-loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ผสมให้เข้ากันในงานผสมตัวอย่าง (ภาพ 22C)

(8) เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA size standard) ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp

DNA ladder ปริมาตร 5 ul (500 นาโนกรัม) กับ Gel-loading dye ชนิด Xylene cyanol F ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในจานผสมตัวอย่าง

(9) นำตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) และดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) ที่ผสมกับ Gel-loading dye ไว้แล้วในจานผสมตัวอย่าง นำมาโหลดลงเจลที่วางอยู่ในแท่งอิเล็กโตรฟอรีซิสที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 6 โดยโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) ลงในหลุมแรกของเจล และโหลดตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ลงในหลุมเจลถัดไปตามลำดับ (ภาพ 22D) ควรระวังไม่ให้ดีเอ็นเอฟุ้งกระจาย

เทคนิคและข้อควรระวัง

- ผู้ปฏิบัติงานใหม่อาจมีอาการมือสั่นขณะโหลดเจล จนทำให้ตัวอย่างดีเอ็นเอฟุ้งกระจายขณะโหลด ควรแก้ปัญหาด้วยการใช้เทคนิคประคองปลายทิปขณะโหลดเจล โดยใช้นิ้วชี้ของมือซ้ายประคองปลายทิปขณะโหลดตัวอย่างลงหลุมเจล

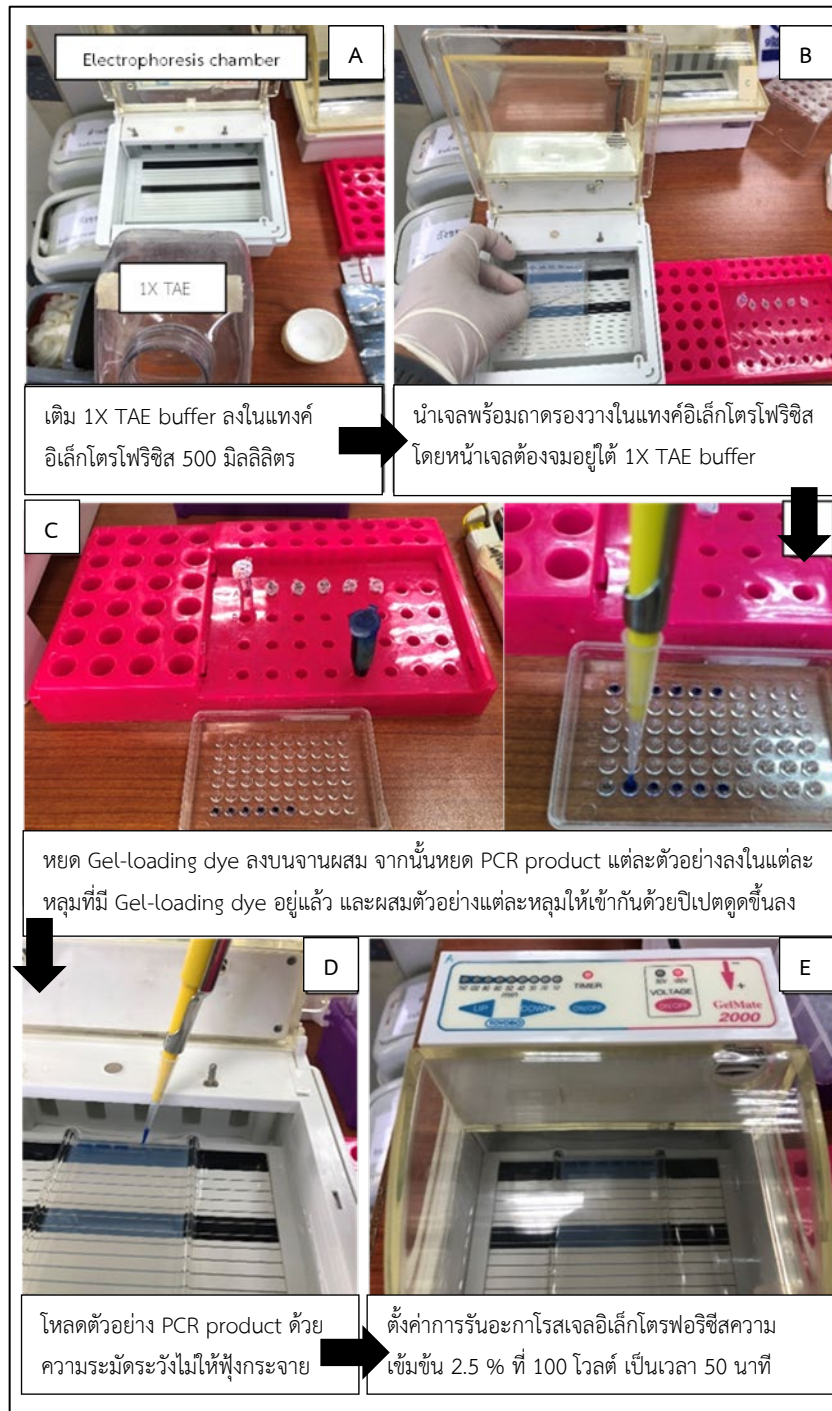
- ผู้ปฏิบัติงานใหม่ที่ยังขาดทักษะด้านการโหลดเจลจะทำให้ใช้โหลดเจลเวลานานกว่าปกติ ควรใช้เทคนิคการผสม gel-loading dye กับผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ทุกตัวอย่างไว้ในจานผสมให้เรียบร้อยก่อนแล้วทำการโหลดทุกตัวอย่างต่อเนื่องกัน

- หากผู้ปฏิบัติงานใหม่ทำการผสม loading dye ที่ละตัวอย่างแล้วโหลด อาจใช้เวลาในการโหลดเจลนานกว่าปกติ ซึ่งจะทำให้ตัวอย่างดีเอ็นเอในหลุมเจลที่โหลดก่อนหน้าแพร่กระจายออกมานอกหลุมเจลได้

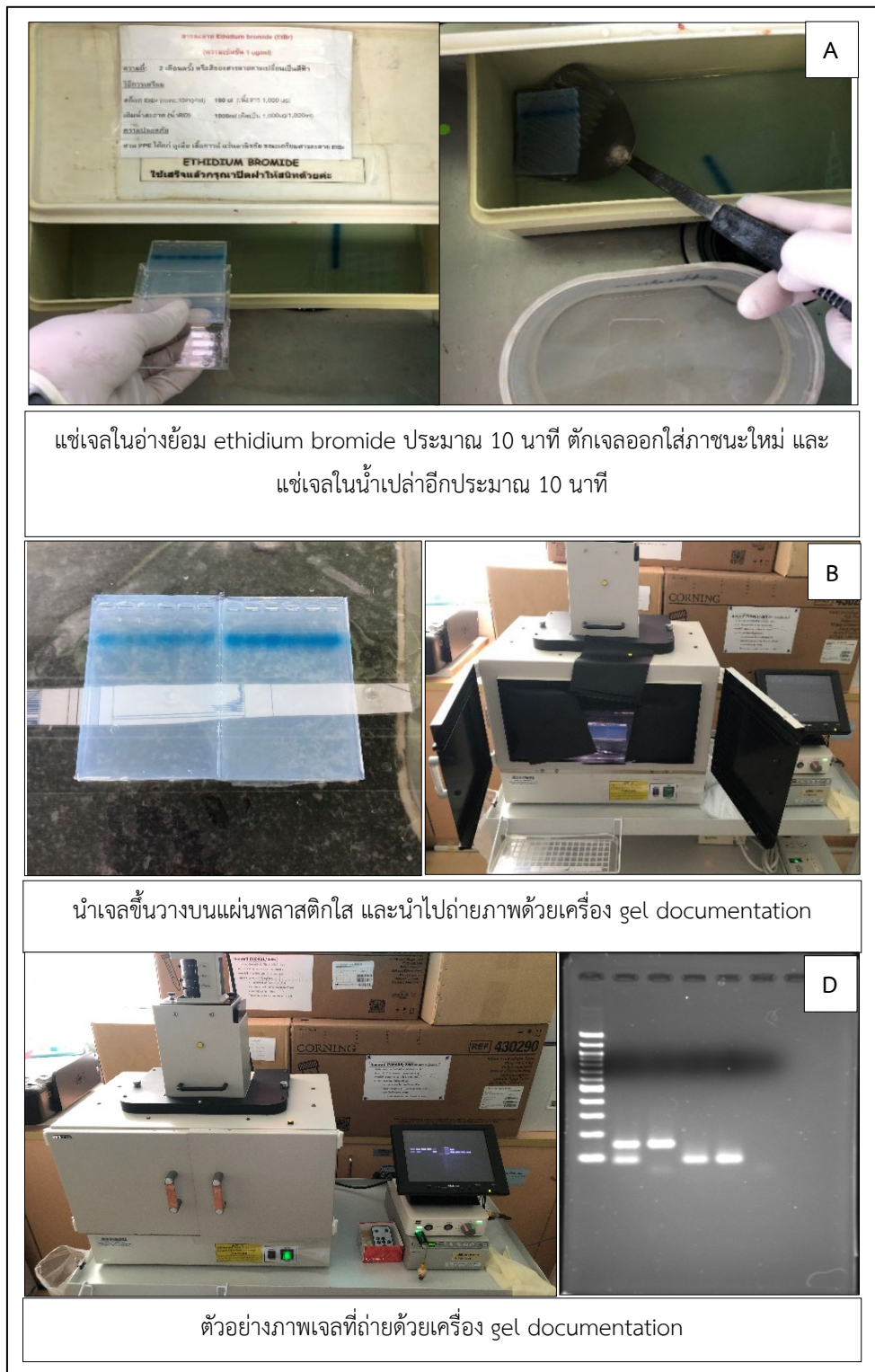
(10) เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จ กดรันเครื่องเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสที่ตั้งค่าไว้ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

(11) เมื่อครบเวลา ปิดเครื่องเจลอิเล็กโตรฟอรีซิสแล้วนำเจลออกจากแท่งอิเล็กโตรฟอรีซิสไปแช่ในอ่างสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำสะอาดอีก 10 นาที (ภาพ 23A) เพื่อช่วยลด background ทำให้ภาพเจลชัดมากขึ้น

(12) นำเจลมาวางบนแผ่นพลาสติกใส (ภาพ 23B) แล้วนำไปวางในเครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี (Gel documentation system) เพื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) และบันทึกรูปเจลเก็บไว้สำหรับรายงานผล (ภาพ 23D)



ภาพ 22 แสดงขั้นตอนการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (เรียงลำดับขั้นตอนจากภาพ A ถึง E)



ภาพ 23 ขั้นตอนการย้อมเจลด้วย ethidium bromide และการถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง (เรียงลำดับขั้นตอนจากภาพ A ถึง D) gel documentation

8. การแปลผลและการรายงานผลการทดสอบ

เจ้าหน้าที่นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ผู้ปฏิบัติงาน (operator หรือ technical) มีหน้าที่แปลผลการทดสอบตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด และจัดใบรายงานผลการทดสอบส่งต่อให้อาจารย์หรืออาจารย์แพทย์ผู้ควบคุมห้องปฏิบัติการ (Supervisor) ตรวจสอบผล หากผลการตรวจสอบไม่พบความบกพร่องเกิดขึ้น ใบรายงานผลจะส่งต่อไปยังแพทย์ประจำหน่วย เพื่อให้แพทย์เป็นผู้รับรองผลการทดสอบ (Approve) จากนั้นใบรายงานผลการทดสอบจะถูกรายงานไปยังแพทย์เจ้าของไข้ โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานดังนี้

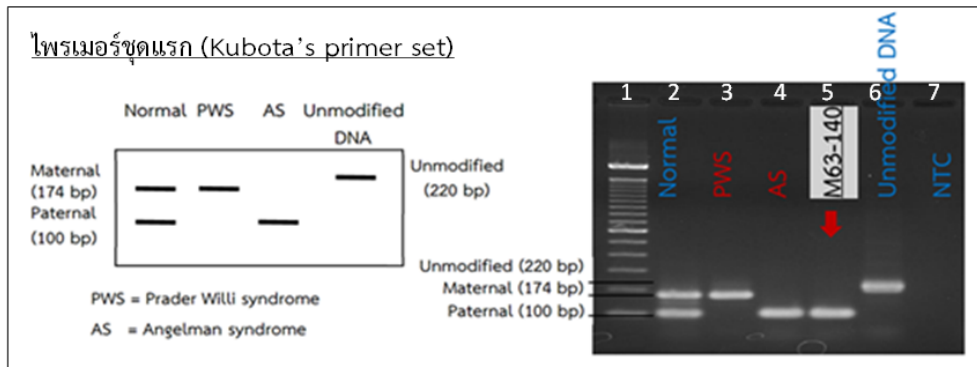
8.1. การแปลผลการทดสอบ

(1) เจ้าหน้าที่นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ผู้ปฏิบัติงาน (operator หรือ technical) มีหน้าที่แปลผลการทดสอบตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด (ข้อ a และข้อ b) โดยการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน ใช้ไพรเมอร์จำนวนสองชุดการทดสอบ ดังนั้นการแปลผลการทดสอบของไพรเมอร์ทั้งสองชุดต้องให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกันจึงจะจัดทำใบรายงานผลในลำดับถัดไป โดยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ตัวอย่างผลการทดสอบแสดงดังภาพ 24 และไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ตัวอย่างผลการทดสอบแสดงดังภาพ 25 ซึ่งมีหลักเกณฑ์การแปลผลการทดสอบของไพรเมอร์ทั้งสองชุด ดังนี้

a. หลักเกณฑ์การแปลผลการทดสอบไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set)

มีตัวอย่างผลการทดสอบแสดงดังภาพ 24 ซึ่งมีหลักเกณฑ์การแปลผลทดสอบ ดังนี้

- คนปกติ (normal) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ ได้แก่ ขนาด 220 bp คือ ดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านขั้นตอน bisulfite conversion (unmodified DNA) ขนาด 174 bp คือ อัลลีลจากแม่ (maternal allele) และขนาด 100 bp คือ อัลลีลจากพ่อ (paternal allele)
- ผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ ขนาด 174 bp คือ อัลลีลจากแม่ (maternal allele)
- ผู้ป่วยโรคแอนเจิลแมน (AS) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ ขนาด 100 bp คือ อัลลีลจากพ่อ (paternal allele)
- หากหลอดทดลองที่ไม่มีดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ขึ้น จะไม่แปลผลการทดสอบ
- หากผลทดสอบในตัวอย่างควบคุม (บวกและลบ) และตัวอย่างตรวจ ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 220 bp ขึ้น จะไม่แปลผลการทดสอบเช่นกัน เพราะเหตุการณ์นี้เกิดจากการทำ bisulfite conversion เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์จึงยังคงเหลือ unmodified DNA ปรากฏอยู่

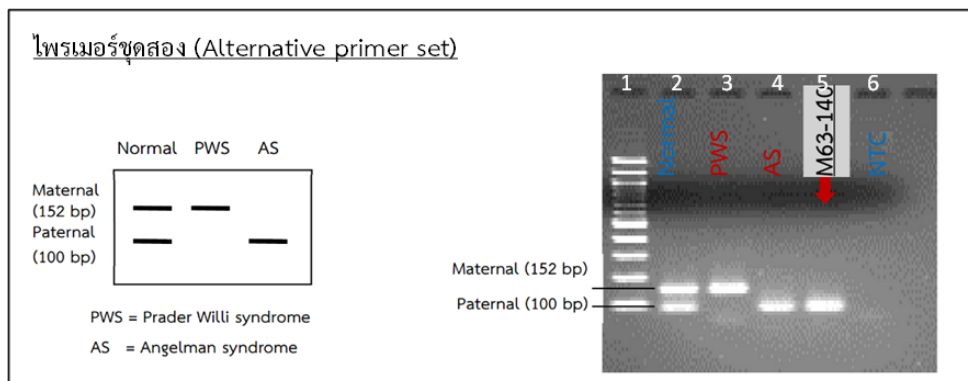


ภาพ 24 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิเคชันอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเดอร์-วิลลีและแองเจิลแมน โดยมีคำอธิบายคำย่อจากภาพ 32 ดังต่อไปนี้ “Maternal” หรือ Maternal allele หมายถึง อัลลีลหรือรูปแบบของยีน *SNRPN* ที่รับมาจากแม่ “Paternal” หรือ Paternal allele หมายถึง อัลลีลหรือรูปแบบของยีน *SNRPN* ที่รับมาจากพ่อ “Normal” หมายถึง คนปกติที่ไม่มีอาการของโรคพราเดอร์-วิลลีและแองเจิลแมน “PWS” หมายถึง ผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี (Prader-Willi syndrome) “AS” หมายถึง ผู้ป่วยโรคแองเจิลแมน (Angelman syndrome) “Unmodified DNA” หมายถึง ดีเอ็นเอโครงสร้างปกติที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากกระบวนการ bisulfite conversion “NTC” หรือ No template control หมายถึง หลอดทดลองที่ไม่เติมดีเอ็นเอ ทำเพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบ “bp” หรือ base pair หมายถึง จำนวนคู่เบส

b. หลักเกณฑ์การแปลผลการทดสอบไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set)

มีตัวอย่างผลการทดสอบแสดงดังภาพ 25 ซึ่งมีหลักเกณฑ์การแปลผลการทดสอบดังนี้

- คนปกติ (normal) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ ได้แก่ ขนาด 152 bp คือ อัลลีลจากแม่ (maternal allele) และขนาด 100 bp คือ อัลลีลจากพ่อ (paternal allele)
- ผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ คือ ขนาด 152 bp คือ อัลลีลจากแม่ (maternal allele)
- ผู้ป่วยโรคแองเจิลแมน (AS) ผลการทดสอบปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ คือ ขนาด 100 bp คือ อัลลีลจากพ่อ (paternal allele)
- หากหลอดทดลองที่ไม่มีดีเอ็นเอ (No Template control, NTC) ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ขึ้น จะไม่แปลผลการทดสอบ



ภาพ 25 ตัวอย่างผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิเคชันอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราดอร์-วิลลีและแองเจิลแมน โดยมีคำอธิบายคำย่อจากภาพ 33 ดังต่อไปนี้ “Maternal” หรือ Maternal allele หมายถึง อัลลีลหรือรูปแบบของยีน *SNRPN* ที่รับมาจากแม่ “Paternal” หรือ Paternal allele หมายถึง อัลลีลหรือรูปแบบของยีน *SNRPN* ที่รับมาจากพ่อ “Normal” หมายถึง คนปกติที่ไม่มีอาการของโรคพราดอร์-วิลลีและแองเจิลแมน “PWS” หมายถึง ผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลี (Prader-Willi syndrome) “AS” หมายถึง ผู้ป่วยโรคแองเจิลแมน (Angelman syndrome) “NTC” หรือ No template control หมายถึง หลอดทดลองที่ไม่เติมดีเอ็นเอทำเพื่อควบคุมคุณภาพการทดสอบ “bp” หรือ base pair หมายถึง จำนวนคู่เบส

(2) อาจารย์หรืออาจารย์แพทย์ที่ปรึกษาควบคุมห้องปฏิบัติการ (supervisor) ทำหน้าที่ตรวจสอบผลการทดสอบ ถ้าผลการทดสอบถูกต้องเป็นไปตามวิธีการแปลผลและไม่พบข้อบกพร่องในกระบวนการทดสอบ ผู้ปฏิบัติงาน (operator หรือ Technician) จะดำเนินการจัดทำเอกสารรายงานผลการทดสอบในลำดับถัดไป หากผลการทดสอบพบข้อบกพร่องจนส่งผลกระทบต่อความต้องการทดสอบ เช่น ผลการทดสอบจากจากไพรเมอร์สองชุดไม่สอดคล้องกัน ผลดังกล่าวจะถูกปฏิเสธ และผู้ปฏิบัติงาน (operator หรือ Technician) มีหน้าที่ต้องทำการทดสอบซ้ำทันที

8.2. การรายงานผลการทดสอบ

(1) การจัดทำเอกสารรายงานผลการ ผู้ปฏิบัติงาน (operator หรือ Technician) มีหน้าที่จัดทำใบรายงานผลการทดสอบ จำนวน 2 รูปแบบ คือ

- ใบรายงานผลแบบโปรแกรม Microsoft word ประกอบด้วยลายเซ็นของผู้ปฏิบัติงาน

(operator หรือ Technician) อาจารย์หรืออาจารย์แพทย์ที่ปรึกษาควบคุมห้องปฏิบัติการ (supervisor) และแพทย์ผู้รับรองผลการทดสอบ (approve)

- ใบรายงานผลในระบบ HIS ประกอบด้วยลายเซ็นของผู้ปฏิบัติงานจัดทำใบรายงานผล (Operator หรือ Technician) ผู้ทวนสอบความถูกต้องของใบรายงานผลก่อนออนไลน์ในระบบ HIS (verification) และแพทย์ผู้รับรองผลการทดสอบ (approve)

(2) ใบรายงานผลการทดสอบทั้งสองรูปแบบจะถูกส่งไปยังแพทย์ประจำหน่วยซึ่งมีหน้าที่รับรองผลการทดสอบ (approve) โดยแพทย์ประจำหน่วยมีสิทธิในการยับยั้งการรายงานผลการทดสอบหากผลการทดสอบออกมาไม่สอดคล้องกับอาการทางคลินิก หรือเกิดกรณีสงสัยในผลการทดสอบ ผู้ปฏิบัติงานต้องทำการทดสอบซ้ำตามคำแนะนำของแพทย์ผู้รับรองผลการทดสอบ

(3) ใบรายงานผลที่ผ่านการรับรองผล (approve) จากแพทย์ประจำหน่วยแล้ว จะเข้าสู่ขั้นตอนการรายงานผลการทดสอบให้กับแพทย์เจ้าของไข้ ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ

- การรายงานผลจากการขอตรวจภายในโรงพยาบาล จะรายงานในรูปแบบโปรแกรมออนไลน์ ในระบบ HIS

- การรายงานผลจากการขอตรวจโรงพยาบาลภายนอก จะรายงานในรูปแบบโปรแกรม Microsoft word และจัดส่งใบรายงานผลผ่านหน่วยงานรับส่งตรวจ กรณีส่งตรวจจากโรงพยาบาลในภาคใต้ตอนล่าง หรือผ่านไปรษณีย์แบบด่วน (EMS) กรณีส่งตรวจจากจังหวัดอื่นๆที่ไม่ใช่ภาคใต้ตอนล่าง

วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

วิธีการติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงานการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพร่าเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่น-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* มีรายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวชี้วัด
1.การรับสิ่งส่งตรวจ	ไม่พบอุบัติเหตุจากการรับสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสมเข้ากระบวนการทดสอบ
2.การสกัดดีเอ็นเอ	- ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด 1 มิลลิลิตร ตามระเบียบวิธีปฏิบัติงาน (protocol) ในคู่มือเล่มนี้ ควรมีปริมาณและคุณภาพที่ยอมรับได้ ดังนี้ - ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 20 ไมโครกรัม - ค่าการดูดกลืนแสง OD (260/280) ช่วงที่ยอมรับได้เท่ากับ 1.65–1.85 - ค่าการดูดกลืนแสง OD (260/230) ค่าที่ยอมรับได้ควรมากกว่า 2 <i>(อ้างอิงข้อมูลจากหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งใช้เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Biophotometer ยี่ห้อ Eppendorf หากวัดด้วยเครื่องอื่นค่าอาจแตกต่างจากเครื่องนี้)</i>
3.การเปลี่ยนดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ bisulfite conversion	- ดีเอ็นเอตั้งต้น 1.6 ไมโครกรัม (ตามระเบียบวิธีปฏิบัติงาน (protocol) ในคู่มือเล่มนี้) ควรมีปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอหลังการทำ bisulfite conversion ดังนี้ - ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้หลังกระบวนการ bisulfite conversion ประมาณ 1-1.5 ไมโครกรัม - ดีเอ็นเอความเข้มข้น ประมาณ 70-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร <i>(อ้างอิงข้อมูลจากหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งใช้เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Biophotometer ยี่ห้อ Eppendorf หากวัดด้วยเครื่องอื่นค่าอาจแตกต่างจากเครื่องนี้)</i> - ดีเอ็นเอที่ทำ bisulfite conversion แล้ว <u>ไม่ควร</u>มีดีเอ็นเอโครงสร้างปกติ (unmodified DNA)หลงเหลืออยู่ในปริมาณที่ทำให้มีการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ unmodified primers ได้ แต่หากกระบวนการ bisulfite conversion <u>เกิดแบบไม่สมบูรณ์</u> (ที่เรียกว่า Incomplete bisulfite conversion) จะส่งผลให้ยังมี unmodified DNA หลงเหลืออยู่ได้ โดยจะตรวจสอบการเกิด Incomplete bisulfite conversion (การเหลืออยู่ของ unmodified DNA) ได้จากผลผลิต พีซีอาร์ของการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ซึ่งจะปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 220 bp ขึ้นในตัวอย่างทดสอบที่เกิด Incomplete bisulfite conversion (มี unmodified DNA หลงเหลืออยู่)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวชี้วัด
4.การทำเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน	● ผลการทดสอบที่มีคุณภาพน่าเชื่อถือและแปลผลการทดสอบได้ของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน ต้องมีลักษณะดังนี้ 1) ผลการทดสอบในตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบด้วยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ให้ผลถูกต้อง ซึ่งมีลักษณะดังนี้ (ภาพ 34) - ตัวอย่างควบคุมผลลบคนปกติ (Normal) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบบน (ขนาด 174 bp) และแถบล่าง (ขนาด 100 bp) โดยความเข้มของแถบทั้งสองควรใกล้เคียงกัน (ภาพ 34 แถว 2) - ตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคพราดอร์-วิลลี (PWS) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์แถบเดียว ขนาด 174 bp (ภาพ 34 แถว 3) และโรคแอนเจิลแมน (AS) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์แถบเดียว ขนาด 100 bp (ภาพ 34 แถว 4) โดยความเข้มแถบทั้งสอง (แถว 3 และแถว 4) ควรใกล้เคียงกัน - หลอดควบคุมไม่เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ต้องไม่ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ (ภาพ 34 แถว 7) หากปรากฏแถบผลผลิต พีซีอาร์ใน NTC จะหมายถึงมีการปนเปื้อน (contamination) เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจะไม่แปลผลการทดสอบนั้น และต้องทำพีซีอาร์ใหม่ ภาพ 26 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงลักษณะผลการทดสอบที่มีคุณภาพและน่าเชื่อถือได้ของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนด้วยไพรเมอร์ชุดแรก มีรายละเอียดดังนี้ แถว 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder แถว 2 คือตัวอย่างควบคุมผลลบ (คนปกติ) แถว 3 คือตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคพราดอร์-วิลลี (PWS) แถว 4 คือ ตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคแอน เจิลแมน (AS) แถว 5 คือตัวอย่างทดสอบรหัส M63-140 แถว 6 คือตัวอย่างดีเอ็นเอโครงสร้างปกติที่ไม่ผ่านกระบวนการ bisulfite conversion (Unmodified DNA) แถว 7 คือ หลอดควบคุมไม่เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวชี้วัด
4.การทำเมทิลเลชัน-สเปคิฟิฟิซีอาร์ของ ยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคราเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมน (ต่อ)	2) ผลการทดสอบในตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบด้วยไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ให้ผลถูกต้อง ซึ่งมีลักษณะดังนี้ (ภาพ 35) - ตัวอย่างควบคุมผลลบคนปกติ (Normal) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์ จำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบบน (ขนาด 152 bp) และแถบล่าง (ขนาด 100 bp) โดยความเข้มของแถบทั้งสองควรใกล้เคียงกัน (ภาพ 35 แถว 2) - ตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคราเตอร์-วิลลี (PWS) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์แถบเดียว ขนาด 152 bp (ภาพ 35 แถว 3) และโรคแอนเจลแมน (AS) ต้องมีผลผลิตพีซีอาร์แถบเดียว ขนาด 100 bp (ภาพ 35 แถว 4) โดยความเข้มแถบทั้งสอง (แถว 3 และแถว 4) ควรใกล้เคียงกัน - หลอดควบคุมไม่เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ต้องไม่ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ (ภาพ 35 แถว 6) หากปรากฏแถบผลผลิต พีซีอาร์ใน NTC จะหมายถึงมีการปนเปื้อน (contamination) เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจะแปลผลการทดสอบนั้น และต้องทำพีซีอาร์ใหม่ ภาพ 27 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแสดงลักษณะผลการทดสอบที่มีคุณภาพและน่าเชื่อถือได้ของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิฟิซีอาร์ของยีน <i>SNRPN</i> เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคราเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมนด้วยไพรเมอร์ชุดสอง มีรายละเอียดดังนี้ แถว 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder แถว 2 คือตัวอย่างควบคุมผลลบ (คนปกติ) แถว 3 คือตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคราเตอร์-วิลลี (PWS) แถว 4 คือ ตัวอย่างควบคุมผลบวกโรคแอน เจลแมน (AS) แถว 5 คือตัวอย่างทดสอบรหัส M63-140 แถว 6 คือ หลอดควบคุมไม่เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	ตัวชี้วัด
4.การทำเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน (ต่อ)	3) ผลการทดสอบด้วยไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) และไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ต้องให้ผลสอดคล้องกัน ● ผลการทดสอบที่ไม่มีคุณภาพและไม่ควรแปลผลของการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน SNRPN เพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมน ต้องปรากฏลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนี้ 1) ตัวอย่างควบคุมผลลบคนปกติ (Normal) มีความเข้มของแถบผลผลิตพีซีอาร์แถบบนและล่าง แตกต่างกันเกิน 50 % ซึ่งหมายถึง มีการเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีแนวโน้มทำให้เกิดผลลบลง 2) หรือตัวอย่างควบคุมผลบวกผู้ป่วยโรค PWS หรือผู้ป่วยโรค AS ปรากฏผลเป็นสองแถบ ซึ่งไม่ถูกต้อง มีแนวโน้มที่ทำให้เกิดผลลบลง 3) หรือความเข้มของแถบผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างควบคุมผลบวก (ผู้ป่วยโรค PWS และผู้ป่วยโรค AS) แตกต่างกันเกิน 50 % ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก pipette error จนทำให้สัดส่วนไพรเมอร์เปลี่ยนไปจากสภาวะเดิมที่เหมาะสม จนทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิด preferential amplification ขึ้นได้ 4) หรือหลอดควบคุมไม่เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ขึ้น ซึ่งจะไม่แปลผลการทดสอบนั้น และต้องทำพีซีอาร์ใหม่ การทดสอบไพรเมอร์ด้วยชุดแรก (Kubota's primer set) ปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 220 bp ขึ้นในตัวอย่างทดสอบหรือตัวอย่างควบคุม แม้ว่าใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite conversion แล้วเป็นดีเอ็นเอต้นแบบก็ตาม ซึ่งสาเหตุเกิดจากกระบวนการทำ bisulfite conversion เกิดแบบไม่สมบูรณ์ (ที่เรียกว่า Incomplete bisulfite conversion) ซึ่งส่งผลให้ยังมี unmodified DNAหลงเหลืออยู่ได้
5.การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบผลพีซีอาร์	● เจลอะกาโรสที่มีคุณภาพ ตรวจสอบด้วยลักษณะทางกายภาพ ดังนี้ 1) ผิวหน้าเจลเรียบเนียน ไม่มีฟองอากาศในเนื้อเจล 2) เนื้อเจลแข็งตัวสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน สังเกตดูจากความขุ่นของเจลเท่ากันทุกพื้นที่ 3) ความหนาของเจลพอดี ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ไม่หนาหรือบางเกินไป 4) สังเกตจากดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) เคลื่อนที่แยกตามขนาดที่ถูกต้อง
6.การแปลผลการทดสอบ	● ไม่พบอุบัติการณ์การแปลผลการทดสอบผิด
7.การรายงานผลการทดสอบ	● ไม่พบอุบัติการณ์การรายงานผลผิด

จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานในหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ บุคลากรต้องมีความรับผิดชอบอย่างสูง เนื่องจากการทำงานเป็นงานที่ต้องมีความรับผิดชอบอย่างมาก จำเป็นต้องรักษาความลับของผู้ป่วย โดยไม่แจ้งผลการตรวจให้ผู้ป่วยหรือญาติผู้ป่วยหรือบุคคลใดๆทราบ จะต้องรายงานผลการตรวจให้แพทย์เจ้าของไข้ทราบเท่านั้นไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น หากมีความผิดพลาดเกิดขึ้นอาจทำให้เกิดความเสียหายถึงแก่ชีวิตของคนไข้ได้ โดยมีหลักการคือ

1. ประกอบวิชาชีพด้วยเจตนาดี โดยไม่คำนึงถึงฐานะ เชื้อชาติ ศาสนา สังคม หรือลัทธิการเมือง
2. ต้องปฏิบัติงานตามระเบียบข้อบังคับอย่างเคร่งครัด เช่น ไม่แจ้งผลการตรวจให้กับผู้ป่วยโดยตรง จะต้องแจ้งกับแพทย์เจ้าของไข้เท่านั้น
3. คำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ป่วยเป็นหลัก
4. ปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มกำลังความสามารถ รอบคอบ รวดเร็ว ซื่อสัตย์สุจริต ถูกต้อง เพื่อประโยชน์ของผู้รับบริการ

นอกจากยึดหลักปฏิบัติดังกล่าวแล้ว จำเป็นต้องปฏิบัติงานตามจรรยาบรรณของวิชาชีพ โดยเคร่งครัด ซึ่งจริยธรรมของบุคลากรห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ขึ้นกับข้อกำหนด/ข้อบังคับที่เกี่ยวข้องกับวิชาชีพที่สภาวิชาชีพแต่ละสาขาได้กำหนดไว้เป็นกฎบังคับสำหรับบุคลากรในสาขาวิชานั้น อย่างไรก็ตาม ในบางตำแหน่งงานของผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ เช่น ผู้ปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ ไม่มีสภาวิชาชีพหรือ องค์กรวิชาชีพตามกฎหมายที่จะดำเนินการได้ ดังนั้น นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ปฏิบัติงานในหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ทุกคนต้องปฏิบัติงานโดยยึดหลักจริยธรรมตามแนวทางที่สาขาวิชาพยาธิวิทยากำหนดไว้ในคู่มือคุณภาพ โดยจริยธรรมของบุคลากรห้องปฏิบัติการทุกตำแหน่ง ที่ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับการจัดการสิ่งส่งตรวจ การทดสอบ หรือข้อมูลผู้ป่วยหรือผู้รับบริการ มีความสำคัญต่อการปฏิบัติตามมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับทั้งในประเทศ และระดับสากล ดังนั้นนอกจากบุคลากรจะยึดถือปฏิบัติตามข้อบังคับของสภาวิชาชีพของตนเองแล้ว ยังต้องยึดหลักจริยธรรมตามแนวทางทั่วไปดังนี้

1. หลักการทั่วไป (General principle)

หลักการทั่วไปของจริยธรรมการดูแลสุขภาพ หมายถึง การปฏิบัติที่คำนึงถึงความสุขสบายและความปลอดภัยของผู้ป่วยเป็นเรื่องสำคัญ ความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยกับห้องปฏิบัติการนั้นมีความสัมพันธ์กันในฐานะผู้รับบริการและผู้ให้บริการ ซึ่งนับวันจะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น สิ่ง

ห้องปฏิบัติการจะต้องตระหนักถึงเป็นอันดับแรกคือ การกระทำที่มั่นใจได้ว่าผู้ป่วยได้รับความสุขสบาย ได้รับความสนใจอยู่ตลอดเวลา และให้บริการด้วยความเสมอภาค ไม่มีแบ่งแยก

2. การรวบรวมข้อมูล (Information collection)

ห้องปฏิบัติการต้องมีข้อมูลที่ถูกต้องและจำเป็นให้เพียงพอสำหรับการระบุตัวผู้ป่วยให้ถูกต้อง เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ห้ามเก็บข้อมูลอื่นๆ ของผู้ป่วยที่ไม่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ และผู้ป่วยต้องได้รับทราบว่ามีข้อมูลที่ถูกเก็บ ต้องการเก็บด้วยเหตุผลใด เพื่อความปลอดภัยของบุคลากร และผู้ป่วยอื่นๆ ข้อมูลบางอย่างจำเป็นต้องเก็บด้วย เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับโรคติดต่อ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บข้อมูลได้ตามสิทธิทางกฎหมายที่เกี่ยวข้อง การชำระเงิน การตรวจสอบสถานะการเงิน การบริหารจัดการการเงิน และปริมาณการใช้จ่าย

3. การเก็บสิ่งส่งตรวจ (Collection of primary samples)

การปฏิบัติใดๆ ในการเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยจะต้องได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ป่วย แต่วิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ปฏิบัติเป็นประจำและหากเกิดข้อผิดพลาดก็ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผู้ป่วยอย่างร้ายแรง เช่น การเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ไม่จำเป็นต้องมีการยินยอม เป็นลายลักษณ์อักษรก็ได้ การที่ผู้ป่วยมาแสดงตนที่ห้องปฏิบัติการพร้อมใบขอส่งตรวจและเต็มใจที่จะให้มีการเก็บสิ่งส่งตรวจตามปกติถือว่าเป็นการให้ความยินยอม ในกรณีของผู้ป่วยที่นอนบนเตียงของโรงพยาบาลมีสิทธิ์ที่จะปฏิเสธการเก็บสิ่งส่งตรวจได้ ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสถานะที่แสดงตนต่อผู้ปฏิบัติงานก็ตาม

แต่ในกรณีที่เทคนิคพิเศษในการเก็บสิ่งส่งตรวจ และเทคนิคนั้นมีโอกาสที่จะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหรือเกิดอันตรายร้ายแรงได้ ตัวอย่างเช่น การเจาะน้ำคร่ำต้องอธิบายให้ผู้ป่วยได้รับรู้ข้อมูลในการตัดสินใจด้วยตัวเอง และต้องได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรเสมอ

ในกรณีฉุกเฉิน ที่ไม่สามารถให้การยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรได้ในขณะนั้น สามารถที่จะดำเนินการต่อไปได้ในส่วนที่เห็นว่าจำเป็น ทั้งนี้เพื่อที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาที่ตนเอง

การทดสอบ/ตรวจวิเคราะห์บางชนิด เช่น การทดสอบทางพันธุกรรม ต้องมีการแนะนำเป็นพิเศษ ซึ่งกระทำโดยแพทย์ที่ต้องการส่งตรวจ ห้องปฏิบัติการไม่ควรที่จะติดต่อโดยตรงกับผู้ป่วย

ในการเก็บสิ่งส่งตรวจนั้น จะต้องจัดสถานที่ให้มีความเป็นส่วนตัวที่เพียงพอและเหมาะสมกับการเก็บสิ่งส่งตรวจนั้นๆ ในการเก็บสิ่งส่งตรวจจะต้องมีข้อมูลที่จำเป็นต่อการทดสอบครบถ้วน สิ่งส่งตรวจที่ส่งมาถึงห้องปฏิบัติการต้องมีความเหมาะสมตามเกณฑ์ในการทดสอบนั้นๆ ถ้าตัวอย่างไม่เหมาะสมตามที่กำหนดต้องปฏิเสธและแจ้งให้แพทย์ที่ส่งตรวจทราบเพื่อดำเนินการต่อไป

4. การปฏิบัติเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ (Performance of examination)

การตรวจวิเคราะห์ทุกชนิดในห้องปฏิบัติการจะต้องปฏิบัติตามที่เหมาะสมด้วยผู้ที่มีความชำนาญและมีความสามารถตามมาตรฐานวิชาชีพ การปลอมแปลง แก้ไข รายงานผลการทดสอบ เป็นพฤติกรรมที่ทำได้

พยาธิแพทย์หรือ ห้องปฏิบัติการสามารถกำหนดปริมาณงานที่จะรับไว้ตรวจวิเคราะห์ ด้วยเหตุผลอันสมควรตามแต่สถานการณ์ในขณะนั้น

5. การรายงานผลการทดสอบ (Reporting results)

รายงานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการถือเป็นสมบัติส่วนตัวและเป็นความลับของผู้ป่วยหรือผู้รับบริการ เปิดเผยได้โดยผู้มีอำนาจหน้าที่เท่านั้น ปรกติการรายงานผลการทดสอบจะถูกส่งให้แพทย์ผู้ขอส่งตรวจ หรือถ้าต้องการรายงานต่อบุคคลอื่นจะต้องได้รับคำยินยอมจากผู้ป่วยเสมอ แต่สามารถรายงานได้ถ้าเป็นความต้องการทางกฎหมาย รายงานผลการทดสอบเหล่านี้ ถ้าไม่สามารถสืบทวนไปถึงตัวผู้ป่วยได้ก็สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลในการศึกษาวิเคราะห์ทางระบาดวิทยา ประชากรศึกษา และทางสถิติ

การยินยอมให้นำรายงานผลไปให้บุคลากรกลุ่มอื่น เช่น แพทย์ที่ได้รับหน้าที่ให้คำปรึกษา จะต้องปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง ห้องปฏิบัติการจะต้องเขียนวิธีปฏิบัติในการที่จะดูแลใบขอส่งตรวจชนิดต่างๆ และการให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยเพื่อการดูแลรักษาที่เหมาะสม

นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการจะต้องสร้างความมั่นใจได้ว่า การรายงานผลนั้นมีความถูกต้องรวดเร็ว เป็น ประโยชน์ต่อผู้ป่วย และบางครั้งอาจต้องมีคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญด้วย

6. การเก็บและระยะเวลาในการเก็บข้อมูลทางการแพทย์ (Storage and retention of medical records)

ห้องปฏิบัติการจะต้องสร้างความมั่นใจให้เห็นว่าการเก็บข้อมูลทางการแพทย์ทั้งหลาย นั้น มีระบบป้องกันการสูญหายหรือเสียหายของข้อมูล หรือไม่ให้ผู้ที่ไม่มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องเข้าถึงข้อมูลได้ ระยะเวลาในการเก็บรักษาข้อมูลให้เป็นไปตามข้อกำหนดของวิชาชีพ ข้อกำหนดของสถาบัน บพัญญติ หรือกฎหมาย ของแต่ละประเทศหรือแต่ละสถานที่ เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับคดีความอาจเก็บไว้นานกว่าข้อมูลอื่นๆ ห้องปฏิบัติการจะต้องมีวิธีการเก็บข้อมูลของตนเอง โดยกำหนดวิธีการเก็บ ระยะเวลาการเก็บผู้รับผิดชอบ ผู้ตรวจสอบ ทั้งนี้จะต้องเก็บให้สามารถเข้าถึงและค้นหาโดยผู้มีอำนาจได้สะดวกและรวดเร็ว

7. การเข้าถึงข้อมูลทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (Access to medical laboratory records)

วิธีการเข้าถึงข้อมูลทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ แต่ละแห่งจะมีวิธีปฏิบัติที่ต่างกัน โดยปรกติแล้วการเข้าถึงข้อมูลนั้นกระทำโดยแพทย์ที่ส่งตรวจ แต่ในบางประเทศการเข้าถึงข้อมูลอาจกระทำโดย ผู้ที่ขอส่งการทดสอบ บุคลากรของห้องปฏิบัติการที่จะต้องใช้อข้อมูลในการ

ปฏิบัติงานตามปกติ หรือบุคลากรผู้มีอำนาจอื่นๆ นอกจากนี้การเข้าถึงข้อมูลของผู้ป่วยเด็กหรือผู้ป่วยที่มีความพิการทางจิตจะต้องปฏิบัติตามกฎหมายที่พิทักษ์สิทธิประโยชน์ของผู้ด้อยโอกาส ห้องปฏิบัติการจะต้องมีระบบการเข้าถึงข้อมูลและมีสถานที่เก็บข้อมูลทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ต่างๆ ตามกำหนดหรือบัญญัติของกฎหมาย

8. การใช้สิ่งส่งตรวจสำหรับการทดสอบที่ไม่ได้ระบุไว้ในใบของส่งตรวจ (Use of sample for examination purpose other than those requested)

การใช้สิ่งส่งตรวจไปทำการทดสอบอื่นๆ นอกเหนือจากการทดสอบที่ระบุไว้ในใบของส่งตรวจ โดยไม่ได้รับการยินยอมล่วงหน้า ทำได้เฉพาะในรายที่มีสิ่งส่งตรวจเหลือจากการวิเคราะห์ และต้องไม่เปิดเผยถึงตัวผู้ป่วยหรือ ใช้ได้ในกรณีที่รวมสิ่งส่งตรวจเข้าด้วยกันจนทำให้ไม่สามารถระบุถึงตัวผู้ป่วยได้ ดังนั้นแต่ละสถาบัน/ห้องปฏิบัติการจะต้องจัดทำนโยบายเกี่ยวกับการทดสอบสิ่งส่งตรวจ นอกเหนือจากการระบุไว้ในใบของส่งตรวจ โดยคำนึงถึงประเด็นทางกฎหมายด้วย

9. การจัดการเงิน/งบประมาณ (Financial arrangement)

ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จะต้องไม่เข้าไปยุ่งเกี่ยวกับการจัดการเรื่องการเงินของห้องปฏิบัติการรับตรวจต่อหรือผู้ให้การสนับสนุน ซึ่งการเข้าไปเกี่ยวข้องอาจเป็นในแง่สนับสนุนห้องปฏิบัติการรับตรวจต่อ หรือสนับสนุนส่งผู้ป่วยหรือ ยุ่งเกี่ยวกับอิสระในการตรวจประเมินของแพทย์ว่าวิธีไหนดีที่สุด

หากเป็นไปได้ ควรมีห้องสำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจโดยเฉพาะ แยกจากห้องปฏิบัติการ แต่หากทำไม่ได้ควรมีการจัดระบบการเงินแยกต่างหากออกไป

ห้องปฏิบัติการจะต้องหลีกเลี่ยงความขัดแย้งในแง่ผลประโยชน์ หากไม่สามารถทำได้ ผลประโยชน์นั้นจะต้องเปิดเผยชัดเจนและมีผลต่อการปฏิบัติงานน้อยที่สุด

บทที่ 5

ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไข

การนำแนวทางปฏิบัติจากคู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการกลุ่มอาการพราเดอร์-วิลลี และเอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมิลเลชั่น-สเปซิฟิคพีซีอาร์ไปใช้อาจประสบปัญหาอุปสรรคในการใช้งาน จึงขอเสนอแนะแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน ดังนี้

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
1.รับสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสมเข้าสู่กระบวนการทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากผู้ปฏิบัติงานใหม่ สาเหตุเกิดจากขาดประสบการณ์ในการตรวจรับสิ่งส่งตรวจในเชิงคุณภาพ เช่น ไม่สามารถแยกลักษณะตัวอย่างเลือดที่มีสีแดงปกติกับผิดปกติ หรือเลือดความหนืดน้อยกว่าปกติ หรือเลือดหนืดกว่าปกติ และแข็งตัวบางส่วน	1) สร้าง check list รายการที่ต้องตรวจสอบคุณภาพสิ่งส่งตรวจให้ครบถ้วน โดยใส่ในส่วนท้ายของใบขอตรวจ 2) ควรให้ผู้ที่มีประสบการณ์สูงทวนสอบการทำงานของผู้ปฏิบัติงานใหม่และแนะนำจุดบกพร่อง ช่วง 3 เดือนแรกในการปฏิบัติงาน 3) กรณีเกิดปัญหาให้เขียนรายงานอุบัติการณ์วิเคราะห์สาเหตุแนวทางแก้ไข เพื่อเพิ่มทักษะการเรียนรู้
2.คุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่ได้ปริมาณและคุณภาพที่กำหนด และการทำ bisulfite conversion ดีเอ็นเอเกิดไม่สมบูรณ์ ล้มเหลว ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากผู้ปฏิบัติงานใหม่ที่ไม่เข้าใจและตระหนักถึงหลักการของแต่ละขั้นตอน รวมถึงเป็นลักษณะงานซับซ้อนมีหลายขั้นตอน	1) จัดทำใบงาน (work sheet) การปฏิบัติงานที่มีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติ และระบุข้อควรระวังในแต่ละขั้นตอนโดยละเอียด และให้ทำเครื่องหมายถูก (✓) ในขั้นตอนที่ดำเนินการแล้วโดยทันทีในแต่ละขั้นตอน 2) ควรให้ผู้มีประสบการณ์สูงทวนสอบการทำงานของผู้ปฏิบัติงานใหม่และแนะนำจุดบกพร่อง ช่วง 3 เดือนแรกในการปฏิบัติงาน 3) กรณีเกิดปัญหาให้เขียนรายงานอุบัติการณ์วิเคราะห์สาเหตุแนวทางแก้ไข เพื่อเพิ่มทักษะการเรียนรู้
3. การปนเปื้อนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีโอกาสเกิดได้กับผู้ปฏิบัติงานทุกคน โดยสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน ขั้นตอนการปฏิบัติงาน พื้นที่ปฏิบัติงานและวัสดุเครื่องมืออุปกรณ์	ควรฝึกอบรมผู้ปฏิบัติงานใหม่และย้ำเตือนผู้ปฏิบัติงานทุกคนให้มีความรู้ความเข้าใจและความตระหนัก เรื่องข้อควรระวังหรือจุดเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อนในการทำพีซีอาร์ ได้แก่ ควรเลี่ยงการสัมผัสที่ฝ่ามือเมื่อหยิบหลอดทดลองจากขวด 1) ข้อระมัดระวังการใช้ทิป ไม่ควรเปิดฝากล่องทิปค้างไว้ตลอดเวลา และเมื่อปลายทิปสัมผัสกับบริเวณอื่นๆ ที่นอกเหนือจากภายในหลอดทดลองให้ทิ้งทิปทันที

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
3.(ต่อ) การปนเปื้อนในปฏิกิริยา พีซีอาร์ ซึ่งมีโอกาสเกิดได้กับผู้ปฏิบัติงานทุกคน โดยสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน ขั้นตอนการปฏิบัติงาน พื้นที่ปฏิบัติงานและวัสดุเครื่องมืออุปกรณ์	2) การใช้ปิเปตดูดสารในหลอดหรือขวดที่มีความลึก ควรเลือกใช้ทิวที่มีความยาวเหมาะสม ห้ามให้ปากขวดสัมผัสกับตัวปิเปตโดยเด็ดขาด หรืออาจใช้การแตะแกว่งขวดสารเล็กน้อยในขณะปิเปตสาร 3) แยกโซนพื้นที่การปฏิบัติงานพีซีอาร์ให้ชัดเจน โดยแบ่งเป็น 3 โซน ได้แก่ โซนการเตรียมน้ำยามาสเตอร์มิกซ์พีซีอาร์ โซนการเตรียมดีเอ็นเอ และโซนการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และควรแยกปิเปต ทิว หลอดทดลองแต่ละโซนให้ชัดเจน ไม่ให้ใช้ร่วมกัน 4) จัดทำกฎระเบียบการใช้ตู้ทำพีซีอาร์ โดยกำหนดให้มีการทำความสะอาดตู้พีซีอาร์เช็ดด้วย 70% แอลกอฮอล์และเปิด UV มาอย่างน้อย 10 นาที ก่อนและหลังการปฏิบัติงานทุกครั้ง รวมถึงถอดล้างปิเปตอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง 5) ควรเลือกใช้ทิวแบบมีไส้กรองกับบางขั้นตอนที่มีจุดเสี่ยงการปนเปื้อน เช่น การดูด Taq polymerase หรือดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอไปค้างอยู่ภายในปิเปต 6) น้ำยาสำหรับการทำพีซีอาร์ทุกตัว (ยกเว้น Taq polymerase) เช่น dNTP บัฟเฟอร์ MgCl₂ โปรเมอร์ ควรแบ่งเป็นหลอดปริมาณน้อย (aliquot) ใช้งานไม่เกิน 5 ครั้งต่อหลอด จะช่วยลดการปนเปื้อนได้
4. การทำพีซีอาร์ล้มเหลว แผลผลไม่ได้ ซึ่งอาจเกิดได้หลายลักษณะ เช่น การเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือการไม่มีผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) เกิดขึ้นเลย (No amplification) หรือหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ โดยเหตุการณ์ดังกล่าวมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น ความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน ขั้นตอนการปฏิบัติงาน พื้นที่ปฏิบัติงานและวัสดุเครื่องมืออุปกรณ์	1) จัดทำ PCR work sheet ที่ระบุชนิดยี่ห้อน้ำยาสำหรับทำพีซีอาร์ให้ชัดเจน เพื่อป้องกันการเติมน้ำยาผิดหรือเติมน้ำยาพีซีอาร์ไม่ครบองค์ประกอบพีซีอาร์ รวมถึงควรมีการระบุสถานะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไว้ด้วย กรณีเกิดปัญหาให้เขียนวิเคราะห์สาเหตุแนวทางแก้ไข ไว้ท้าย PCR work sheet เพื่อเพิ่มทักษะการเรียนรู้ 2) การเตรียมไพรเมอร์ ควรมีการควบคุมคุณภาพแต่ละชุด โดยการใช้การวัดการดูดกลืนแสง (OD_{260/280}) เพื่อให้ไพรเมอร์แต่ละชุดการเตรียมมีความเข้มข้นใกล้เคียงกัน 3) ควรมีการตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของน้ำยาสำหรับทำพีซีอาร์ทุกตัวทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนล็อต โดยเปรียบเทียบผลกับน้ำยาชุดเดิม

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
4.(ต่อ) การทำพีซีอาร์ล้มเหลว แพลผลไม่ได้ ซึ่งอาจเกิดได้หลายลักษณะ เช่น การเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือการไม่มีผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) เกิดขึ้นเลย (No amplification) หรือหลุดควบคุมที่ไม่ได้เติมดีเอ็นเอ (No template control, NTC) ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์ โดยเหตุการณ์ดังกล่าวมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น ความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน ขั้นตอนการปฏิบัติงาน พื้นที่ปฏิบัติงานและวัสดุเครื่องมืออุปกรณ์	4) ควรตรวจสอบความใช้ได้ (validation) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycle) และสอบเทียบปิเปต อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง เพื่อลดความผิดพลาดที่เกิดจากเครื่องมือ 5) กรณีงานพีซีอาร์แบบยากที่ต้องใช้เครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycle) เฉพาะรุ่น หรือต้องการการขึ้นลงของอุณหภูมิ (ramp rate) ของเครื่องแบบจำเพาะ ควรระบุให้ชัดเจนในใบงาน (PCR work sheet) เพื่อลดความผิดพลาดของเครื่องมือที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการทำพีซีอาร์ (PCR efficiency) 6) กรณีเกิดการปนเปื้อน (contamination) ในหลอด NTC (NTC ปรากฏแถบผลผลิตพีซีอาร์) ควรเปลี่ยนน้ำยามาสำหรับทำพีซีอาร์ทุกตัวในการทำซ้ำครั้งที่สอง 7) ผู้ปฏิบัติงานคนเดิมไม่ควรทำพีซีอาร์ซ้ำในตัวอย่างเดิมเกินสองครั้ง โดยการทำซ้ำครั้งที่สามควรเปลี่ยนคนทำเพื่อลดปัญหาที่เกิดจาก human error
5. การรายงานผลผิดพลาด ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การสลับเคส ผลพีซีอาร์เกิดเหตุการณ์ allele dropout ซึ่งหมายถึงการที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เพิ่มปริมาณอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งทั้งที่มี ดีเอ็นเอต้นแบบมีอัลลีลนั้นอยู่ หรือการเพิ่มจำนวนผลผลิต พีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์	1) <u>กรณีเกิดความไม่แน่ใจในผลการทดสอบและเกิดความสงสัยว่าการสลับตัวอย่างหรือไม่</u> ให้แก้ไขปัญหาโดยการวิเคราะห์สาเหตุก่อนว่าการสลับตัวอย่างเกิดมาตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอหรือไม่ ถ้าใช่ก็ให้ทำการสกัดดีเอ็นเอใหม่และทำการทดสอบซ้ำในทุกขั้นตอน โดยควรใช้มาตรการในการป้องกันการสลับตัวอย่าง ดังนี้ ○ ควรเรียงลำดับตัวอย่างในใบงานกับการเรียงหลอดทดลองในแต่ละขั้นตอนให้สอดคล้องกัน ควรเขียนระบุตัวเลขลำดับไว้บนหลอดคู่กับรหัสตัวอย่างด้วย ○ ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอควรใช้สติกเกอร์บ่งชี้รหัสตัวอย่างเพียงอันเดียวตลอดทั้งกระบวนการ โดยทุกครั้งที่มีการถ่ายโอนสารไปหลอดใหม่ให้ใช้สติกเกอร์รหัสตัวอย่างอันเดิม เพื่อป้องกันการสลับตัวอย่าง

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไขและพัฒนา
5.(ต่อ) การรายงานผลผิดพลาด ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การสลับเคส ผลพีซีอาร์เกิดเหตุการณ์ allele dropout ซึ่งหมายถึง การที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เพิ่มปริมาณอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งทั้งที่มี ดีเอ็นเอต้นแบบมีอัลลีลนั้นอยู่ หรือการเพิ่มจำนวนผลผลิต พีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์	○ การเขียนรหัสตัวอย่างบนฝาหลอดพีซีอาร์มีโอกาสถูกลบออกได้ง่ายเมื่อโดนความร้อนจากเครื่องพีซีอาร์ ดังนั้นจึงควรเขียนตัวเลขกำกับไว้ที่ข้อพับฝาหรือด้านข้างหลอดด้วย และควรเขียนลำดับตัวอย่างให้ตรงกับลำดับในใบงาน เพื่อใช้ตัวเลขบนฝาทวนสอบกรณีเกิดเหตุข้อความบนฝาเลื่อนจนอ่านไม่ออก ○ หลังโหลตเจลเสร็จควรจัดเรียงหลอดให้ตรงกับการโหลตตัวอย่างลงเจล และเก็บหลอดเปล่าไว้ทวนสอบลำดับการโหลตตัวอย่าง 2) <u>กรณีผลการทดสอบไม่ชัดเจนที่เกิดจากผลพีซีอาร์เกิด preferential amplification</u> ให้สังเกตจากตัวอย่างควบคุมผลลบ (คนปกติ) ซึ่งต้องมีแถบผลผลิตพีซีอาร์จำนวนสองแถบที่ความเข้มแถบใกล้เคียงกัน หากความเข้มของแถบแตกต่างกันเกินประมาณ 50% ให้แก้ไขปัญหาโดยการทำพีซีอาร์ซ้ำ โดยต้องวิเคราะห์ปัญหาว่าสาเหตุการเกิด preferential amplification เกิดจากอะไร แล้วแก้ไขให้ต้องจุด 3) <u>ข้อควรระวังในการแปลผลการทดสอบเมทิลเลชันสเปคซิฟิคพีซีอาร์ยีน SNRPN</u> ○ ควรแปลผลตัวอย่างทดสอบ (unknown sample) เปรียบเทียบตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) และตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control) ในแต่ละชุดการทดสอบนั้นๆ ○ ไม่ควรแปลผล ในกรณีที่หลอดควบคุมที่ไม่เติม ดีเอ็นเอ (No template control) ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ลักษณะดังกล่าวหมายถึงมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอในระบบพีซีอาร์นั้นซึ่งจะส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดในการแปลผล ○ ควรแปลผลจากพีซีอาร์สองชุดที่ให้ผลสอดคล้องกัน คือ ชุด Kubota primers และชุด Alternative primers

ปัญหาและอุปสรรค	แนวทางแก้ไข
5.(ต่อ) การรายงานผลผิดพลาด อาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การสลับเคส ผลพีซีอาร์เกิดเหตุการณ์ allele dropout ซึ่งหมายถึงการที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เพิ่มปริมาณอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งทั้งที่มี ดีเอ็นเอต้นแบบมีอัลลีลนั้นอยู่ หรือการเพิ่มจำนวนผลผลิต พีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification เกิดขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์	4) <u>การลดโอกาสแปลผลคลาดเคลื่อนด้วยตัวอย่างควบคุม</u> การทำการทดสอบตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างควบคุมผลบวก/ตัวอย่างควบคุมผลลบและหลอดNTC) ควบคู่ไปกับตัวอย่างทดสอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละชุด มีประโยชน์ในการช่วยตรวจสอบการเกิดข้อผิดพลาดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อช่วยลดโอกาสเกิดการแปลผลคลาดเคลื่อน ตัวอย่างเช่นหากเกิดเหตุการณ์ preferential amplification หรือ allele dropout ขึ้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ทำให้ผลการทดสอบในตัวอย่างควบคุมผลบวกและผลลบไม่ถูกต้อง จะแสดงถึงปฏิกิริยาพีซีอาร์ชุดนั้นเกิดข้อผิดพลาดไม่น่าเชื่อถือ ห้ามแปลผลการทดสอบ ผู้ปฏิบัติงานต้องวิเคราะห์หาสาเหตุข้อผิดพลาดและทำการทดสอบซ้ำ โดยเงื่อนไขการทดสอบเมทิลเลชั่นสเปคิฟิคพีซีอาร์ยีน SNRPN เพื่อตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการพราเดอร์วิลลีและเอนเจลแมนแต่ละชุดทดสอบ ควรประกอบด้วยตัวอย่างควบคุม 3 ประเภท ดังนี้ ○ ตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) หมายถึง ตัวอย่างคนปกติที่ไม่เป็นโรคพราเดอร์วิลลีและเอนเจลแมน ○ ตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control) หมายถึง ผู้ป่วยโรคพราเดอร์วิลลีและผู้ป่วยเอนเจลแมน ควรมีตัวอย่างทั้งสองแบบ ○ No template control (NTC) หมายถึง หลอดทดลองที่มีองค์ประกอบของทุกอย่างครบถ้วน ยกเว้นดีเอ็นเอ ใช้ตรวจสอบการเกิดการปนเปื้อนในปฏิกิริยาพีซีอาร์

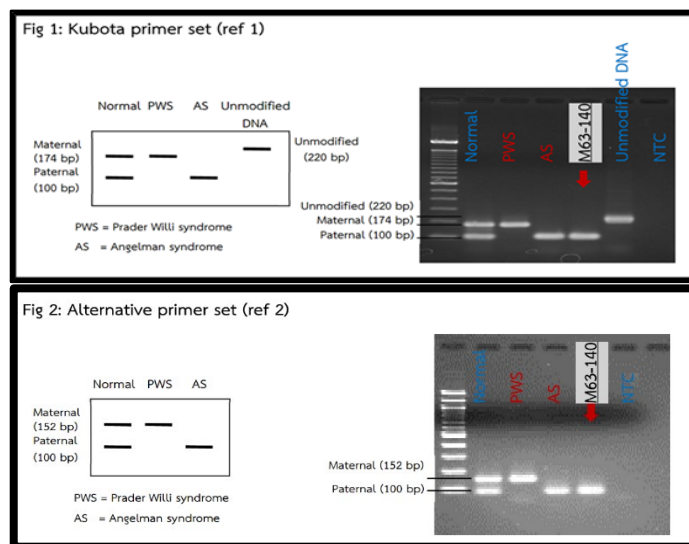
แนวทางพัฒนา

การทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจลแมนที่ใช้อยู่ที่ ณ ห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีข้อดีคือสามารถวินิจฉัยโรคได้สองโรคในการทดสอบเดียว แต่มีข้อด้อยคือไม่มียีนควบคุมภายใน (internal control gene) ที่เป็นอัลลีลอื่นแต่ใช้อัลลีลของยีน *SNRPN* ที่รับจากพ่อและแม่เป็นยีนควบคุมภายในซึ่งกันและกัน ซึ่งบางครั้งหากเกิดการเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์คู่ใดคู่หนึ่งมากกว่า ที่เรียกว่า preferential amplification หรือเกิดเหตุการณ์ allele dropout ซึ่งหมายถึงการที่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ไม่เพิ่มปริมาณอัลลีลใดอัลลีลหนึ่ง ทั้งที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีอัลลีลนั้นอยู่ จะมีแนวโน้มส่งผลให้เกิดผลบวกหลงเกิดขึ้นได้ (36-38) ปัจจุบันห้องปฏิบัติการหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์มีการแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการทำพีซีอาร์สองชุดการทดสอบและแปลผลร่วมกัน (ภาพ 36 A) โดยใช้ไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota's primer set) ที่อ้างอิงจาก Kubota T และคณะปี ค.ศ. 1997 และไพรเมอร์ชุดสอง (Alternative primer set) ที่อ้างอิงจาก Hussain Askree S และคณะ ปี ค.ศ. 2011 เพื่อลดปัญหาการเกิดผลบวกหลง อย่างไรก็ตามการทำพีซีอาร์สองชุดการทดสอบ ย่อมส่งผลให้ต้นทุนการทดสอบเพิ่มสูงขึ้นตามมา จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า Brown และคณะ ปีค.ศ. 2017 (39) ได้ทำการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพราเดอร์-วิลลี และแอนเจลแมนโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ maternal-methylation (เส้น forward และ reverse) ซึ่งเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 174 bp คู่ไพรเมอร์ paternal-unmethylation (เส้น forward และ reverse) ซึ่งเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 100 bp และใช้คู่ไพรเมอร์ *SNRPN*methV2 (เส้น forward และ reverse) ทำหน้าที่เป็นยีนควบคุมภายใน (internal control gene) ซึ่งเป็นอัลลีลตำแหน่งอื่น เพื่อเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 242 bp (โดยแถบขนาด 242 bp จะเป็นยีนควบคุมภายในที่จะปรากฏในทุกตัวอย่างทดสอบทั้งผลบวกและผลลบที่ใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ bisulfite conversion แล้วเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ) และการศึกษาของ Kosaki และคณะปีค.ศ.1997 (40) พบว่ามีการใช้คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวน unmodified DNA ซึ่งสร้างผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 145 bp เพื่อช่วยในการตรวจสอบการเกิด Incomplete bisulfite conversion (การเหลืออยู่ของ unmodified DNA) โดยถ้าปรากฏผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 145 bp เกิดขึ้นจะหมายถึงตัวอย่างทดสอบนั้นเกิด Incomplete bisulfite conversion (หรือการมี unmodified DNA หลงเหลืออยู่)

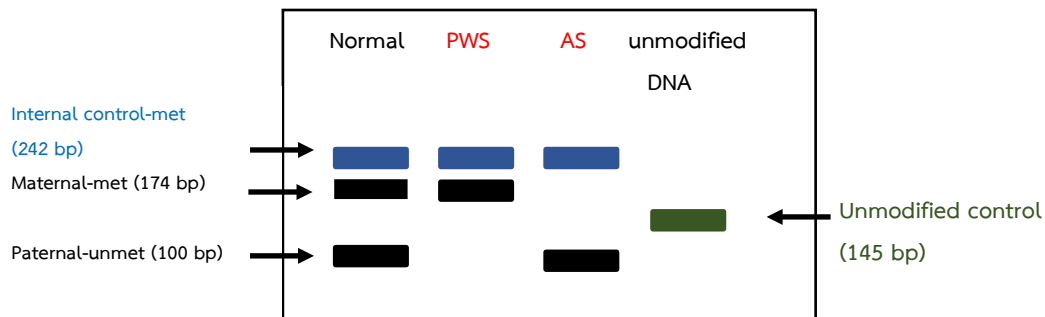
ผู้เขียนคู่มือจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาการทดสอบนี้ให้มีผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ และลดโอกาสเกิดผลบวกหลงด้วยการทำการทดสอบเดียวเพื่อช่วยลดต้นทุนการทดสอบ โดยเสนอแนวคิดรูปแบบพีซีอาร์ชุดใหม่ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ชุดแรก (Kubota

primer set) 2 คู่ไพรเมอร์ยืนความคมภายใน 1 คู่ ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Brown ปีค.ศ. 2017 (39) และไพรเมอร์ที่ตรวจสอบการเหลืออยู่ของ unmodified DNA อีก 1 คู่ ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Kosaki ปีค.ศ.1997 (40) โดยคู่ไพรเมอร์ maternal-methylation (เส้น forward และ reverse) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 174 bp คู่ไพรเมอร์ paternal-unmethylation (เส้น forward และ reverse) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 100 bp คู่ไพรเมอร์ยืนความคมภายใน (internal control gene) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 242 bp และคู่ไพรเมอร์ตรวจสอบการเหลืออยู่ของ unmodified DNA ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 145 bp โดยแสดงแบบจำลองผลการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนรูปแบบใหม่ ดังภาพ 36 (B)

(A) การทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนที่ใช้ในปัจจุบันใช้ไพรเมอร์สองชุดต่อการทดสอบแปลผลร่วมกัน



(B) แบบจำลองผลการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนรูปแบบใหม่ที่เสนอในคู่มือเล่มนี้



ภาพ 28 แบบจำลองผลการทดสอบเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* เพื่อวินิจฉัยโรคพราดอร์-วิลลีและแอนเจิลแมนรูปแบบใหม่ที่นำเสนอในคู่มือเล่มนี้

ข้อเสนอแนะ

เทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* (Methylation Specific PCR for *SNRPN* gene) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่มีความสามารถในการตรวจหาการเกิดโรค ได้สูงถึงร้อยละ 99 ของผู้ป่วยโรคพราเดอร์-วิลลี (PWS) และร้อยละ 80 ของผู้ป่วยโรคแองเจิลแมน (AS) ซึ่งครอบคลุมกลไกการเกิดโรคได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ 15q11.2-q13 deletion Uniparental disomy (UPD) และ Imprinting defect (ID) อย่างไรก็ตามยังเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตรวจพบกลไกการเกิดโรคแบบอื่นอีก 3 รูปแบบ ได้แก่ กลไกแบบ Imprinting center deletion (IC deletion) ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยโรค PWS น้อยกว่าร้อยละ 0.5 และพบได้ในผู้ป่วยโรค AS น้อยกว่าร้อยละ 0.3 กลไกการกลายพันธุ์ของยีน *UBE3A* ซึ่งได้อีกประมาณร้อยละ 11 ของผู้ป่วยโรค AS และกลไกแบบ Unbalanced chromosome rearrangement ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยโรค PWS และผู้ป่วยโรค AS น้อยกว่าร้อยละ 1 (ตาราง 7 และ 8) โดยกลไกการเกิดทั้งสามรูปแบบนี้ทำให้ความเสี่ยงที่ลูกคนถัดไปจะเป็นโรค (sibling risk) เพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 50 ดังนั้นในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการเข้ากันได้กับโรค PWS/AS อย่างชัดเจน แต่ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* อาจต้องใช้เทคนิคอื่นในการตรวจหาสาเหตุที่เทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN* ตรวจไม่ครอบคลุม ตัวอย่างเช่น ใช้เทคนิค Multiplex Ligation dependent probe amplification (MLPA) เพื่อตรวจหาสาเหตุ IC deletion เทคนิค Sequencing analysis เพื่อตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *UBE3A* หรือใช้เทคนิค Chromosomal microarray (CMA) เพื่อตรวจการขาดหายไปหรือการเกินของยีน *UBE3A* (*UBE3A* del/dup) (ตาราง 7 และ 8)

บรรณานุกรม

1. Dagli AI, Mueller J, Williams CA. Angelman Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
Copyright © 1993-2020, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
2. Driscoll DJ, Miller JL, Schwartz S, Cassidy SB. Prader-Willi Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
Copyright © 1993-2020, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
3. DW. SJaR. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. In: 3rd, editor. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1. Cold Spring Harbor2001.
4. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. Pediatrics. 1993;91(2):398-402.
5. Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, et al. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. American journal of medical genetics Part A. 2006;140(5):413-8.
6. Plebani M. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. The Clinical biochemist Reviews. 2012;33(3):85-8.
7. Boyanton Jr. BL, Crisan D. Sample Collection, Processing, and Storage for Molecular Genetic Testing. Laboratory Hematology Practice2012. p. 143-54.
8. Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M, Azari-Yam A, Hossieni Gharalari F, Safavi M, et al. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. Iran J Pathol. 2021;16(1):1-19.
9. Rainen L, Arbique JC, Asthana D, Earley MC, Geiszler RL, Krieg-Schneider F, et al. Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods: approved guideline: NCCLS; 2005.

10. Bayot ML, Tadi P. Laboratory Tube Collection. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
11. Chaisomchit S, Wichajarn R, Janejai N, Chareonsiriwatana W. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2005;36(1):270-3.
12. Griffiths L, Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. Journal of Biorepository Science for Applied Medicine. 2014;Volume 2:1-9.
13. Shetty PJ. Evolution of DNA Extraction Methods. American Journal of Biomedical Science and Research. 2020;8(1):39-45.
14. Green MR, Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. Cold Spring Harbor protocols. 2017;2017(4):pdb.prot093450.
15. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. Journal of forensic sciences. 1994;39(2):362-72.
16. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5 - methylcytosine residues in individual DNA strands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(5):1827-31.
17. Hall JG. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. American journal of human genetics. 1990;46(5):857-73.
18. Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittich B, Schwartz S, Nicholls RD, et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. Nature genetics. 1995;9(4):395-400.
19. Schumacher A. Schumacher's Guide #1: Bisulfite conversion of DNA for methylation finemapping2007.
20. Driscoll DJ, Miller JL, Schwartz S, Cassidy SB. Prader-Willi Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

21. Dagli AI, Mueller J, Williams CA. Angelman Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA): University of Washington, Seattle

University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.

22. Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, et al. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nature genetics*. 1994;8(1):52-8.

23. Lalande M, Calcianno MA. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(7):947.

24. Zeschnick M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Human molecular genetics*. 1997;6(3):387-95.

25. Gillessen-Kaesbach G, Gross S, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *Journal of medical genetics*. 1995;32(2):88-92.

26. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9821-6.

27. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman syndromes: Diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *American Journal of Medical Genetics*. 1997;73(3):308-13.

28. Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet*. 1997;16(1):16-7.

29. Hussain Askree S, Hjelm LN, Ali Pervaiz M, Adam M, Bean LJ, Hedge M, et al. Allelic dropout can cause false-positive results for Prader-Willi and Angelman syndrome testing. *J Mol Diagn*. 2011;13(1):108-12.

30. Sambrook J, Russell DW. Agarose gel electrophoresis. Cold Spring Harbor Protocols. 2006;2006(1):pdb. prot4020.
31. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques. 1997;22(3):474-6, 8-81.
32. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques. 1997;23(3):504-11.
33. Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. Methods in Ecology and Evolution. 2012;3(5):898-905.
34. Weissensteiner T, Lanchbury JS. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. Biotechniques. 1996;21(6):1102-8.
35. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012(63):e3998.
36. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol. 2004;42(5):1863-8.
37. Lee M, Leslie D, Squirrell D. Internal and External Controls for Reagent Validation. Edited by Edwards K, Logan J, Saunders N. 2004.
38. Maaroufi Y, de Bruyne J-M, Duchateau V, Scheen R, Crokaert F. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2006;48(2):183-91.
39. Brown A, Flintoff K, Felix C, Gillman C, Zamanpoor M, Love DR. Prader-Willi/Angelman Syndrome: a comparison study of MS-PCR and MS-MLPA. Medical Research Archives. 2017;5(Issue 9).
40. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL. Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. Am J Med Genet. 1997;73(3):308-13.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ (หน้า 1)

แบบฟอร์มส่งตรวจ (Request Form) หน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา		SD-FO-HG-SP-003
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทร 074-451-584, โทรสาร 074-212-908 วันที่ประกาศใช้ 3 มี.ค. 2564		หน้า 1 จาก 2 หน้า
ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ (งานด้านติเอ็นเอ)		
ชื่อ-นามสกุล ผู้ป่วย.....วันที่เก็บตัวอย่าง...../...../..... H.N.....วันเดือนปีเกิด...../...../..... อายุ.....ปี เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง		(สติ๊กเกอร์สำหรับข้อมูลผู้ป่วย)
ชื่อแพทย์ผู้ส่ง (ตัวบรรจง) Ward/OPD/โรงพยาบาล		
ชนิดสิ่งส่งตรวจ ☐ EDTA blood ☐ Amniotic fluid (AF)* ☐ Extracted DNA (..... ng/ μ L, total μ L) ☐ Other (ระบุ.....)	*สำหรับการตรวจก่อนคลอด (Prenatal diagnosis) 1. การตรวจก่อนคลอดทุกรายต้องติดต่อห้องปฏิบัติการก่อนส่งตรวจ 2. กรุณาให้ผู้ป่วยอ่านและเซ็นรับทราบคำชี้แจงการแปลผลและข้อจำกัด ในหน้า 2 ของเอกสารนี้ วิธีรับผล (กรุณากรอกข้อมูลตัวบรรจง) ☐ ทางไปรษณีย์ถึง ชื่อ-นามสกุล ที่อยู่รับผลตรวจ..... โทรศัพท์..... ☐ คำนำที่ส่งด้วยตนเอง ชื่อ-นามสกุล โทรศัพท์..... *** หากมีปัญหาคือต้องติดต่อ หรือแจ้งผลเบื้องต้นทางโทรศัพท์ โปรดระบุผู้รับผล ชื่อ-นามสกุล โทรศัพท์.....	
กรุณาระบุข้อมูลทางคลินิกเพิ่มเติม / ประวัติครอบครัว / พงสาวลี หรือพิมพ์ประวัติครอบครัวโดยย่อแนบมาด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการแปลผลการตรวจ		
Molecular Genetic Testing (DNA analysis) กรุณา X เลือกการตรวจใน ๐ ด้านนำการตรวจ		
Neurological Disorders ☐ Adrenoleukodystrophy, ALD ☐ ARX common mutation screening (exon 2) ☐ ARX whole gene sequencing (5 exons) ☐ Charcot-Marie-Tooth type 1 and HNPP (PMP22) ☐ DMRV (GNE) Mutation ☐ Dopa-responsive Dystonia (DYT1) / Primary Torsion Dystonia (PTD) ☐ Duchenne/Becker Muscular Dystrophy - MLPA ☐ Duchenne/Becker Muscular Dystrophy - Linkage ☐ Dysterlinopathy (Dysferlin) ☐ Fragile X Syndrome ☐ *Prenatal diagnosis for Fragile X syndrome ☐ Huntington Disease ☐ Kennedy Disease (SBMA) ☐ Metachromatic Leukodystrophy, MLD ☐ NemaLine Myopathy (ACTA1) ☐ Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD) ☐ Prader-Willi / Angelman Syndrome (MS-PCR analysis) ☐ Rett Syndrome (MECP2) ☐ Spinal Muscular Atrophy (SMA) ☐ Spinocerebellar Ataxia type 1, 2, 3 ☐ Wilson Disease Mutation	Hematological Disorders ☐ Factor XI Deficiency (F11) ☐ Factor XII / Hageman Deficiency (F12) ☐ Hemochromatosis (HFE) ☐ Hemophilia A (F8) Linkage ☐ Hemophilia A (F8) Mutation ☐ Hemophilia A (F8) Intron 22 Inversion ☐ Hemophilia B (F9) Mutation ☐ Thrombophilia-FII & FV HK ☐ Thrombophilia-FV Leiden ☐ Thrombophilia-MTHFR Mitochondrial Diseases ☐ Kearns Sayre Syndrome (KSS) / CPEO ☐ Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) ☐ MELAS, MERRF, NARP Pharmacogenetics ☐ HLA-B*15:02 Screening (Carbamazepine) ☐ HLA-B*58:01 Screening (Allopurinol) Hereditary cancers ☐ MEN 2A, MEN 2B (RET) Mutation ☐ Von Hippel-Lindau Disease (VHL)	Others ☐ CADASIL (NOTCH 3) Mutation ☐ Crigler-Najjar Syndrome (UGT1A1) ☐ Deafness (CX26/GJB2) Mutation ☐ FGFR2 Mutation ☐ FGFR3 Mutation ☐ Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome ☐ Goldman-Favre Syndrome ☐ GNAS1 Mutation ☐ Hyperuricemia (HPR1) ☐ Marfan (FBN1) Mutation ☐ Pancreatitis (PRSS1) ☐ Pancreatitis (SPINK1) ☐ PCR for SRY gene Special testing (กรุณาติดต่อห้องปฏิบัติการทุกครั้งที่ก่อนส่งตรวจ) ☐ DNA extraction and preparation ☐ *NIPT (Non-invasive Prenatal testing) ☐ *Prenatal Chromosome microarray analysis ☐ Postnatal Chromosome microarray analysis ☐ *QF-PCR for Aneuploidy Screening (Chromosome 13,18,21)
ส่วนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการระบุข้อมูลผู้ป่วย ชื่อ-นามสกุล HN โรงพยาบาล ชนิดปริมาณจำนวนสิ่งส่งตรวจ..... สภาพตัวอย่าง ☐ ผ่าน ☐ ไม่ผ่าน วันที่รับตัวอย่าง/...../..... เวลา ผู้รับตัวอย่าง ตรวจสอบการทดสอบได้ที่ www.pathology.psu.ac.th/ โทร 074-451584 รหัส QR code		

คู่มือปฏิบัติงาน

118

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโรคพราเตอร์-วิลลีและแอนเจลแมน
ด้วยเทคนิคมิลเลชั่น-สเปคซิฟิฟซีอาร์ของยีน *SNRPN*

ภาคผนวก ก (ต่อ) ใบขอตรวจทางห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์ (หน้า 2)

แบบฟอร์มส่งตรวจ (Request Form) หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โทร 074-451-584, โทรสาร 074-212-908 วันที่ประกาศใช้ 3 มี.ค. 2564	SD-Fo-HG-SP-003 หน้า 2 จาก 2 หน้า
---	---

ข้าพเจ้า (นางสาว, นาง) นามสกุล.....

ได้อ่านและรับทราบ คำชี้แจงการแปลผลและข้อจำกัดในการตรวจดีเอ็นเอก่อนคลอด ดังนี้

1. เป็นการตรวจสารพันธุกรรม ที่เรียกว่า ดีเอ็นเอ ซึ่งได้รับมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง เป็นตัวกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของร่างกายคนเรา ส่งผลให้ลูกมีส่วนคล้ายพ่อและแม่จากกรรมพันธุ์ที่ได้รับ ดีเอ็นเออยู่ในร่างกายเกือบทุกส่วน ดังนั้น การตรวจก่อนคลอดจากน้ำคร่ำที่มีส่วนหลุดลอกจากเยื่อตัวต่าง ๆ ของร่างกายทารกในครรภ์ หรือชิ้นเนื้อรกได้
2. การตรวจดีเอ็นเอเป็นการตรวจบางส่วนของสายดีเอ็นเอที่เรียกว่า "ยีน" เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับโรคที่สงสัยเท่านั้น
3. การแปลผลการตรวจดีเอ็นเอ มีความแม่นยำมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรวจ ข้อจำกัดของการทดสอบ และความซับซ้อนของแต่ละโรค
4. ในบางกรณี อาจต้องมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากพอสำหรับการทดสอบ จึงอาจใช้เวลานานกว่าการตรวจดีเอ็นเอส่วนใหญ่
5. การตรวจในบางกรณี อาจไม่ได้ผลการตรวจ หรือมีผลที่ไม่ชัดเจน ในกรณีนี้ทางห้องปฏิบัติการจะแจ้งให้แพทย์ผู้ส่งตรวจรับทราบและให้ท่านและสามีตัดสินใจว่าต้องการเจาะน้ำคร่ำซ้ำหรือไม่
6. ในกรณีที่ผลการตรวจได้ผลปกติ **ไม่ได้** เป็นตัวบ่งบอกว่าทารกในครรภ์จะไม่มีปัญหาทางสุขภาพ เพราะอาจมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการพัฒนาการและเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ เช่น ยา การติดเชื้อ ความผิดปกติจากยีนในส่วนที่อยู่นอกเหนือการตรวจ ปัญหาระหว่างคลอด หรือหลังคลอด ซึ่งถือเป็นความเสี่ยงที่เทียบเท่าประชากรทั่วไป สามารถพบได้ในทุกการตั้งครรภ์
7. การตรวจทางห้องปฏิบัติการทุกแห่งมีโอกาสผิดพลาดได้ แม้จะมีการควบคุมคุณภาพอย่างดีที่สุด การเกิดความผิดพลาดจากสถิติทั่วไปของการตรวจก่อนคลอดในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน จะน้อยกว่า 1 ใน 1,000

ขอให้ท่านรับฟังคำชี้แจงการตรวจดีเอ็นเอเฉพาะโรคอีกครั้ง **ก่อนเซ็นใบยินยอมนี้** เพื่อทราบรายละเอียดในแต่ละโรค เพราะใบยินยอมนี้สำหรับความเข้าใจทั่วไปในการตรวจดีเอ็นเอก่อนคลอดเท่านั้น

หากมีข้อสงสัย กรุณาสอบถามเพิ่มเติมจากแพทย์หรือพยาบาลที่ให้บริการตรวจก่อนคลอด

ข้าพเจ้าเข้าใจและยอมรับ **คำชี้แจง** ข้างต้น

ลงชื่อ.....ผู้ขอรับการตรวจ
(.....)

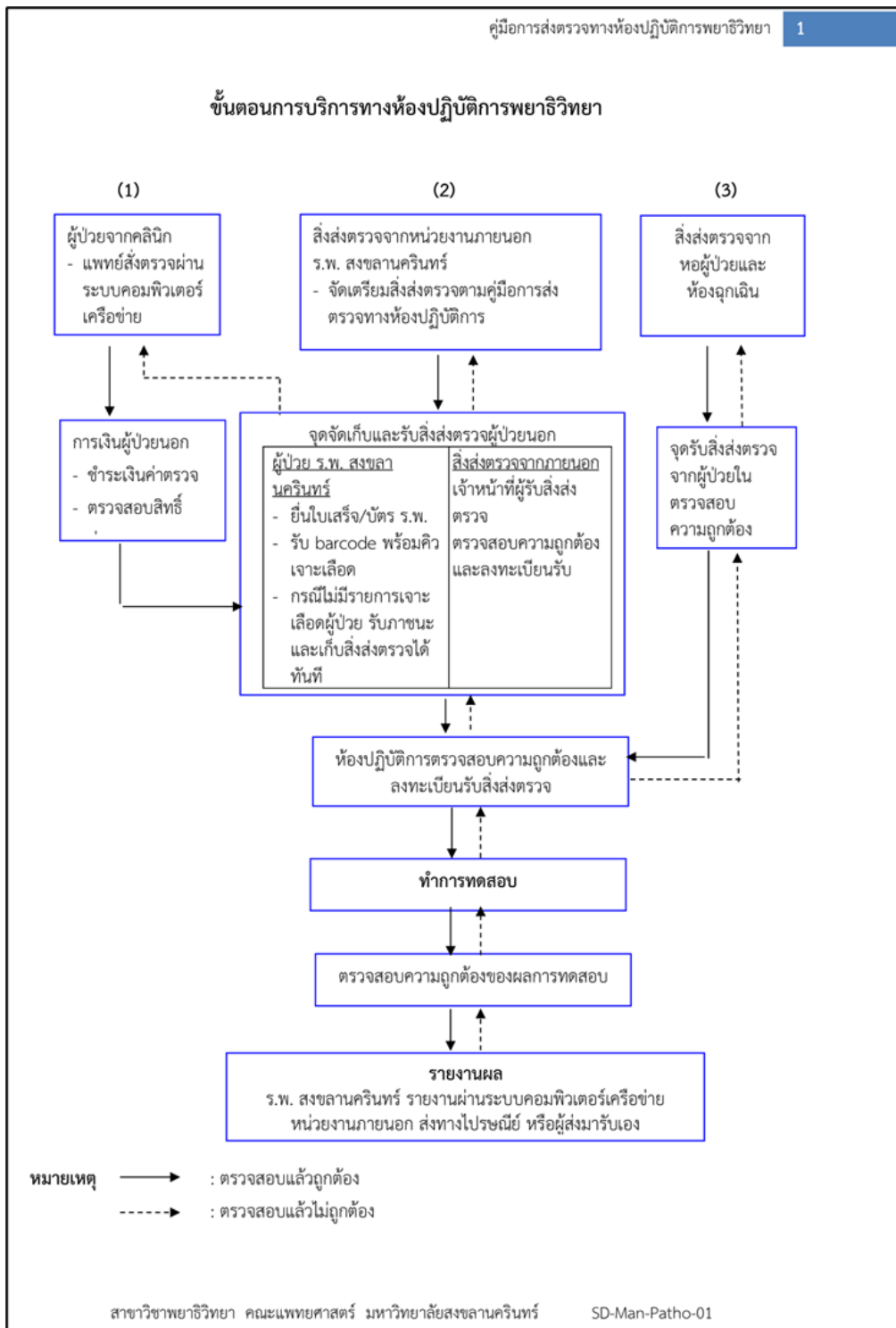
ลงชื่อ.....พยาน
(.....)

ลงชื่อ.....พยาน
(.....)

ลงชื่อ.....
(.....)

ผู้ให้ข้อมูลการตรวจเฉพาะโรค (ถ้ามี)
วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 25.....

ภาคผนวก ข ขั้นตอนการรับบริการทางห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา (คัดลอกจากคู่มือส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการพยาธิ สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปรับปรุงครั้งที่ 6 2564 หน้า 1)



ภาคผนวก ค สูตรและวิธีการเตรียมสารในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคพร่าเตอร์-วิลลี และแอนเจลแมนด้วยเทคนิคเมทิลเลชั่นสเปคซิปคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN*

1. สารละลาย 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสาร Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate (EDTA disodium salt, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, FW = 372.24) ปริมาณ 186.12 กรัม ใส่ในปิกเกอร์
 - เติมน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์ และนำมาวางบนเครื่องสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพื่อกวนให้สารละลาย
 - ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH (ใช้ประมาณ 20 กรัม) โดยสาร EDTA disodium salt จะละลายสมบูรณ์ เมื่อ pH เท่ากับ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ ปิกเกอร์ขนาด 1 ลิตร กระจกตวงขนาด 1 ลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 1 ลิตรเพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

2. สารละลาย 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสาร Tris base ($NH_2C(CH_2OH)_3$, FW = 121.14) ปริมาณ 121.14 กรัม ใส่ปิกเกอร์
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในปิกเกอร์ และนำมาวางบนเครื่องสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพื่อกวนให้สารละลาย
 - ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย concentrated HCl (ประมาณ 42 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ ปิกเกอร์ขนาด 1 ลิตร กระจกตวงขนาด 1 ลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 1 ลิตรเพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

3. สารละลาย TE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- สูตรการเตรียม
 - 1 M Tris-HCl, pH 8.0 10 มิลลิลิตร
 - 0.5 M EDTA, pH 8.0 2 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อ ลงในบีกเกอร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร
 - เติมสาร 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสาร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร กระบอกตวงขนาด 1 ลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 1 ลิตรเพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ตู้อุ่น (2-8 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน

4. สารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสาร NaCl (MW=58.44) ปริมาณ 58.44 กรัม ใส่บีกเกอร์
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และนำมาวางบนเครื่องสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพื่อ กวนให้สารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 200 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกตวง ขนาด 250 มิลลิลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

5. สารละลาย 1 M MgCl₂ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสาร Magnesium chloride hexahydrate (MgCl₂·6H₂O, MW 203.3) ปริมาณ 40.66 กรัม ใส่บีกเกอร์

- เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และนำมาวางบนเครื่องสลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพื่อ กวนให้สารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกตวง ขนาด 250 มิลลิลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

6. สารละลาย Lysis buffer ปริมาตร 400 ml

- สูตรการเตรียม
 - 5 M NaCl 11.2 มิลลิลิตร
 - 1 M Tris-HCl, pH 8.0 4.0 มิลลิลิตร
 - 1 M MgCl₂ 0.6 มิลลิลิตร
 - NP-40 0.4 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อ ลงในบีกเกอร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
 - เติมสาร 5 M NaCl ปริมาตร 11.2 มิลลิลิตร เติม 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร เติม 1 M MgCl₂ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และเติม NP-40 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 400 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: การกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.25 ไมครอน
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน

7. สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสาร Sodium dodecyl sulfate (SDS) (CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na, FW 288.38) ปริมาณ 10 กรัม ใส่บีกเกอร์

- เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อลงในบีกเกอร์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และนำมาวางบนเครื่องสสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพื่อกวนให้สารละลาย (ใช้เวลาประมาณ 20 นาที) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 100 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใน fume hood เพราะ SDS เป็นสารทำให้เกิดการระเหยเคือง)
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตรเพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น (ห้าม autoclave เพราะอาจทำให้ SDS เสื่อมสภาพ)
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

8. สารละลายสารเคมีฟีนอล (Phenol) : คลอโรฟอร์ม (Chloroform) : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamylalcohol) อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม

ควรเริ่มเตรียมสาร Chloroform : Isoamylalcohol อัตราส่วน 24:1 ใส่ขวดแยกไว้ก่อน จากนั้นแบ่งสาร Chloroform : Isoamylalcohol บางส่วนไปเตรียม Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol อัตราส่วน 25:24:1 แยกอีกขวดหนึ่ง ดังนี้

- เตรียม Chloroform: Isoamylalcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
 - จัดเตรียมขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ควรใช้ขวดสีชาทึบแสง หรือใช้ขวดดูแรนป้องกันแสงด้วยการหุ้มฟอยล์ (foil)
 - ตวง chloroform (CHCl_3 , MW 119.38) ปริมาตร 96 มิลลิลิตร
 - และตวง Isoamylalcohol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, MW 88.15) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ขวดทึบแสง จากนั้นปิดฝาให้แน่นและเขย่าสารผสมให้เข้ากัน
- เตรียม Phenol: chloroform: Isoamylalcohol อัตราส่วน 25:24:1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ควรเตรียมก่อนใช้งานอย่างน้อย 1 คืน (16-18 ชั่วโมง))
 - จัดเตรียมขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ควรใช้ขวดสีชาทึบแสง หรือใช้ขวดดูแรนป้องกันแสงด้วยการหุ้มฟอยล์ (foil)
 - ปิเปตฟีนอล (phenol) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ข้อควรระวัง ฟีนอลเป็นสารเคมีอันตรายที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นเหม็น ภายในขวดบรรจุสารฟีนอลจะมีลักษณะสารที่แยกเป็นสองส่วน ส่วนบนคือสารบัพเฟอร์ที่มีไว้เพื่อป้องกันการระเหยของฟีนอลซึ่งมีกลิ่นเหม็น และส่วนล่างคือสารฟีนอล ดังนั้นการปิเปตสารฟีนอลควรดูขอบบริเวณส่วนล่างขวดฟีนอล

- และดวงสารละลาย chloroform: Isoamylalcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดทึบแสง จากนั้นปิดฝาให้แน่นและเขย่าสารผสมให้เข้ากัน
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: กระบอกลวดแก้ว ปิดเปิดแก้ว และเก็บในขวดดูแรนที่ปลอดเชื้อและป้องกันแสงด้วยการหุ้มฟอยล์ (foil)
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน

9. สารละลาย 3 M Sodium Acetate pH 5.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่ง Sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MW 136.08) ปริมาณ 40.8 กรัม ใส่ในปิเกอร์
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ปลอดเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายด้วยเครื่องเครื่องสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และปรับ pH เป็น 5.2 ด้วย glacial acetic acid เมื่อปรับได้ pH 5.2 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อให้เป็น 100 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ ปิเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกลวดขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

10. สารละลาย 5 M Sodium bisulfite (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้งาน) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสารเคมี Sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, MW=190.1) 7.8 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
 - เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 5.0 ด้วย 5 M NaOH จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
 - นำสารละลายในหลอดทดลองมารินใส่ในขวด vacuum flask จากนั้นต่อสายยางจากปั๊มสุญญากาศเข้ากับขวด vacuum flask และปิดฝา vacuum flask ด้วยแผ่นพลาสติกแผ่นเรียบเนื้อแข็ง

- เปิดเครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ด้วยความแรงอย่างน้อย 500 millimeter of mercury เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ degas ออกจากสารละลาย Sodium metabisulfite ซึ่งช่วยลดการสลายตัวของสาร bisulfite ซึ่งจะสลายตัวง่ายด้วยก๊าซออกซิเจน
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร และขวด vacuum flask
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้งาน

11. สารละลาย 3 M NaOH ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสารเคมี Sodium hydroxide (NaOH, MW=40) 3.6 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง
 - และนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 30 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าเบาๆจนกว่าสารจะละลายหมด
- ข้อควรระวัง: หลอดทดลองจะเกิดความร้อนขณะเตรียมและควรสวมถุงมือกันสารเคมีขณะเตรียมสาร*
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

12. สารละลาย 20 mM Hydroquinone ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งและใช้ภาชนะที่บดแสงในการเตรียมเพื่อหลีกเลี่ยงแสงสว่าง)

- วิธีการเตรียม
 - ชั่งสารเคมี Hydroquinone (MW=110.1) 0.055 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง
 - นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้งาน

13. สารละลาย 10M Ammonium acetate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- วิธีการเตรียม

- ชั่ง Ammonium acetate ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ FW = 77.08) 38.54 กรัม
- เติมน้ำกลั่น/Deionized water ปลอดเชื้อ เพื่อปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: ภาชนะที่ปลอดเชื้อ ได้แก่ ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร กระบวยตวงขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตร และขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อจัดเก็บสาร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 1 ปี

14. สารละลายสต็อก 50X TAE buffer stock ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- สูตรการเตรียม 50X TAE
 - Tris base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, MW= 121.14) 242.14 กรัม
 - Glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
 - 0.5 M EDTA, pH 8.0 100 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - ชั่ง Tris base ปริมาณ 242.14 กรัมใส่ในปีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และเติมน้ำกลั่น/น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำปีกเกอร์มาวางบนเครื่อง magnetic stirrer เพื่อกวนให้สาร Tris base ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
 - เมื่อสาร Tris base ละลายสมบูรณ์ นำมาเติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม Glacial acetic acid ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใน fume hood) จากนั้นกวนต่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อ ให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: เตรียมด้วยปีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จัดเก็บในขวดพลาสติก
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน

15. การเตรียม working 1X TAE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ตวง Stock TAE buffer ความเข้มข้น 50X ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เทใส่กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร
 - เติมน้ำกลั่น/น้ำ RO ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: เตรียมด้วยปีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จัดเก็บในขวดพลาสติก

- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 2 เดือน

16. สารละลาย 10X TBE ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- สูตรการเตรียม
 - Tris base 109.03 กรัม
 - Boric acid 55.65 กรัม
 - 0.5 M EDTA, pH 8.0 40 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - นำ Tris base ปริมาณ 109.03 กรัม ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น/น้ำ Deionized water ปลอดเชื้อ ประมาณ 800 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ จากนั้นกวนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่อง magnetic stirrer
 - เติมสาร Boric acid ปริมาณ 55.65 กรัม และสาร 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นกวนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อ ให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม: เตรียมด้วยบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จัดเก็บในขวดพลาสติก
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน
-

17. สารละลาย Gel-loading dye (Bromophenol blue) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- สูตรการเตรียม
 - Bromophenol blue 0.25%
 - Glycerol in water 30%
- วิธีการเตรียม
 - ตวง Glycerol ปริมาตร 3 ml เติม Bromophenol blue ปริมาตร 25 มิลลิกรัม
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อ ให้เป็น 10 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม : หลอดทดลองพลาสติกขนาด 12 มิลลิลิตร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ใช้อุปกรณ์ภาชนะปราศเชื้อในการเตรียมและเทคนิคปลอดเชื้อ
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 2 ปี

18. สารละลาย Gel-loading dye (Xylene cyanol FF) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

- สูตรการเตรียม
 - Xylene cyanol FF 0.25%
 - Glycerol l in water 30%
- วิธีการเตรียม
 - ตวง Glycerol ปริมาตร 3 ml และเติม Xylene cyanol FF ปริมาณ 25 มิลลิกรัม
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดเชื้อ ให้เป็น 10 มิลลิลิตร
- ภาชนะที่ใช้เตรียม : หลอดทดลองพลาสติกขนาด 12 มิลลิลิตร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ใช้อุปกรณ์ภาชนะปราศเชื้อในการเตรียมและเทคนิคปลอดเชื้อ
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ตู้เย็น (2-8 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 2 ปี

19. สาร 100 bp DNA ladder ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- วิธีการเตรียม
 - ปิเปต Stock 100 bp DNA ladder (500 ng/ul) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
 - เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นตก
 - เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อายุการเก็บรักษา 6 เดือน
- ภาชนะที่ใช้เตรียม : หลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ใช้อุปกรณ์ภาชนะปราศเชื้อในการเตรียมและเทคนิคปลอดเชื้อ
- การเก็บ/อายุการเก็บรักษา: ตู้แช่แข็ง (-20±5 องศาเซลเซียส) อายุการเก็บ 6 เดือน

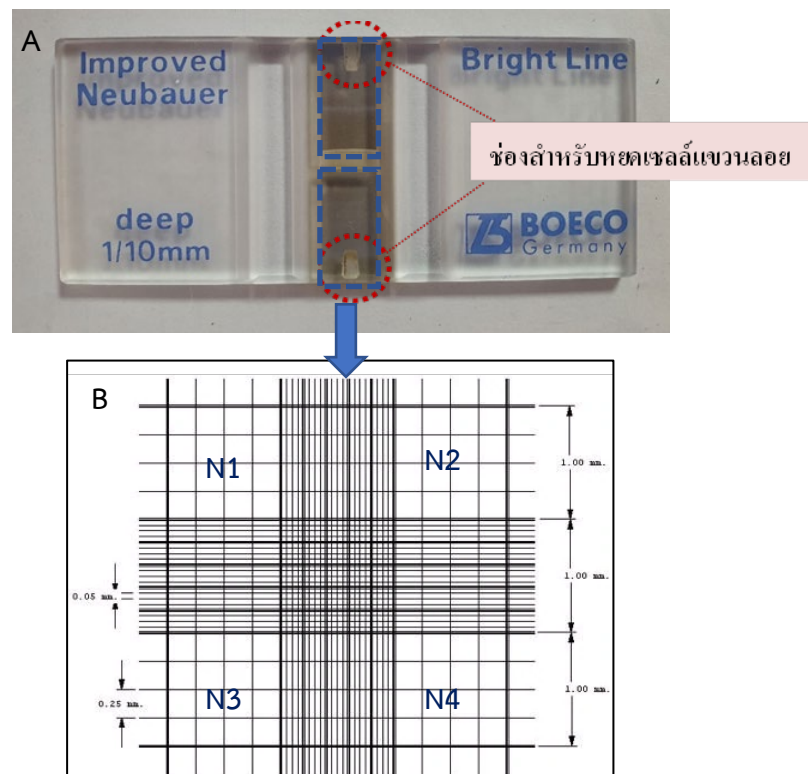
20. สารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ลิตร

- วิธีการเตรียม
 - เตรียมน้ำกรอง (reverse osmosis, RO) หรือน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร ลงในภาชนะบรรจุที่มีฝาปิด
 - ปิเปต Stock ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปิดฝา
- ข้อควรระวัง: ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็งควรสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลขณะเตรียมได้แก่ เสื้อกาวน์ ถุงมือกันสารเคมี*
- ภาชนะที่ใช้เตรียม : กล่องพลาสติกทึบแสงมีฝาปิด
- การทำให้ปลอดเชื้อ: ไม่จำเป็น
- อายุการใช้งาน: อุณหภูมิห้อง (18-28 องศาเซลเซียส) ประมาณ 1 เดือน

ภาคผนวก ง วิธีการนับจำนวนเซลล์น้ำคร่ำด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)

การนับจำนวนเซลล์น้ำคร่ำด้วยสไลด์นับจำนวนเซลล์ที่เรียกว่าฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ทำเพื่อประเมินปริมาณเซลล์น้ำคร่ำทั้งหมดซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการประเมินปริมาตรสาร Lysis buffer ที่เหมาะสมกับปริมาณเซลล์ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ มีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

1. นำตัวอย่างน้ำคร่ำที่แบ่งจากไซริงค์ ประมาณ 10-15 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและหยดลงบนสไลด์นับจำนวนเซลล์ hemocytometer จากนั้นนำสไลด์มานับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โดยสไลด์นับจำนวนเซลล์ประกอบด้วยช่องตารางใหญ่ 4 มุม (N1-N4) ภาพ 29 B แต่ละช่องใหญ่จะมีช่องตารางเล็กอีก 16 ช่อง โดยช่องเล็กๆ มีขนาด 0.25 มิลลิเมตร X 0.25 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อรวมกันด้านละ 4 ช่อง จะกลายเป็น 1 ช่องใหญ่ที่มีขนาด 1 มิลลิเมตร X 1 มิลลิเมตร และเมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) จะมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร (ภาพ 29A)



ภาพ 29 สไลด์นับจำนวนเซลล์ (ฮีโมไซโตมิเตอร์) (A) สไลด์นับจำนวนเซลล์ (B) แสดงช่องตารางนับเซลล์ของฮีโมไซโตมิเตอร์

2. การนับเซลล์จะนับเฉพาะเซลล์น้ำคร่ำที่ปรากฏในช่องตาราง N1 N2 N3 N4 (ภาพ 29B) และนำจำนวนเซลล์ทั้งสี่ช่องมาคำนวณตามสูตรดังนี้

a. การคำนวณปริมาตรพื้นที่นับเซลล์ ดังสมการ

$$\begin{aligned}\text{ปริมาตรพื้นที่นับเซลล์} &= 1 \text{ มิลลิเมตร (กว้าง)} \times 1 \text{ มิลลิเมตร (ยาว)} \times 0.1 \text{ มิลลิเมตร (ลึก)} \\ &= 1 \times 10^{-4} \text{ มิลลิลิตร (เท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)}\end{aligned}$$

b. การคำนวณปริมาณเซลล์เฉลี่ย (N1 N2 N3 N4)

ตัวอย่างเช่น ถ้านับเซลล์น้ำคร่ำทั้ง 4 ช่องใหญ่ (N1-N4) ได้ 10, 7, 8 และ 11 สามารถคำนวณเป็นเซลล์เฉลี่ย ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{จำนวนเซลล์เฉลี่ย} &= \frac{10+7+8+11}{4} \\ &= 9 \text{ เซลล์}\end{aligned}$$

c. การคำนวณปริมาณเซลล์น้ำคร่ำต่อมิลลิลิตร ดังสมการ

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \text{จำนวนเซลล์เฉลี่ย} \times \text{ตัวแปร} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

โดยตัวแปรมีค่าเท่ากับ 1×10^4 (ได้มาจากการคำนวณปริมาตรพื้นที่ที่นับเซลล์ 1×10^{-4} มิลลิลิตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร) และค่าการเจือจาง เท่ากับ 1

$$\begin{aligned}\text{ในกรณีนี้มีจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} &= 9 \times (1 \times 10^4) \times 1 \\ &= 9 \times 10^4 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร}\end{aligned}$$

d. การคำนวณปริมาณเซลล์น้ำคร่ำทั้งหมด

ตัวอย่างเช่น ถ้ามีตัวอย่างน้ำคร่ำทั้งหมด 10 มิลลิลิตร สามารถคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} &= (\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร}) \times \text{ปริมาตรน้ำคร่ำทั้งหมด (มิลลิลิตร)} \\ &= (9 \times 10^4) \times 10 \\ &= 9 \times 10^5 \text{ เซลล์}\end{aligned}$$

ภาคผนวก จ สรุปข้อไม่สอดคล้องหน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ปีงบประมาณ 2563-2564

หัวข้อ	รายละเอียด	จำนวนครั้ง (ปี 2563-2564)	ร้อยละ
1.เครื่องมือ	-ไม่ผ่านการสอบเทียบ	6+1 = 7	9.1
2.ขั้นตอนก่อนการ ทดสอบ (pre- examination processes)	-การติดฉลากชื่อข้างหลอดกับชื่อระบุในการ patch barcode ไม่ตรงกัน -ส่งสิ่งส่งตรวจผิดหน่วย -เจาะเลือดไม่ครบทุกการทดสอบ -เจาะเลือดใส่หลอดกันเลือดแข็งผิดชนิด	18+9 = 27	35.1
3. ขั้นตอนทดสอบ (examination processes)	-เกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย, รา, ยีสต์ในการ เพาะเลี้ยงเซลล์	22+10 = 32	41.5
4.ขั้นตอนหลังการ ทดสอบ (post- examination processes)	-ส่งผลผิดโรงพยาบาล -การสะกดชื่อนามสกุลผู้ป่วยผิด	8+3 = 11	14.3

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางรวบรวมโดยคุณพรธิภา นิษานนท์

ประวัติผู้เขียน

ข้อมูลด้านคุณสมบัติ:

ชื่อ : นางสาวอรภาวรรณ ปลั่งอ่อน (Oradawan Plong-on)
 ตำแหน่ง : นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์
 วุฒิการศึกษา: วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

คุณวุฒิ/วุฒิปัตร	สาขา	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ	สถานศึกษา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	ชีววิทยาโมเลกุลและ ชีวสารสนเทศ	2553	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2543	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประวัติการทำงาน:

วัน เดือน ปี	ตำแหน่ง	สังกัด
มี.ค.44-ธ.ค.44	นักวิทยาศาสตร์ 3 (ลูกจ้างโครงการ)	ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ (หน่วยพิษวิทยา)
ม.ค.45- เม.ย.50	ผู้ช่วยผู้จัดการฝ่ายผลิต	โรงงานซูริมิ บริษัทแปซิฟิกแปรรูปสัตว์น้ำ จำกัด
1 ต.ค. 53	ผู้ช่วยวิจัย 4	หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
1 เม.ย. 54	เจ้าหน้าที่วิจัย ปฏิบัติการ	หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
1 เม.ย. 55- จนถึงปัจจุบัน	นักวิชาการวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ปฏิบัติการ	หน่วยมนุษยพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

หน้าที่ที่รับผิดชอบปัจจุบัน:

- งานด้าน Molecular Genetics เช่น สกัดดีเอ็นเอ, bisulfite conversion, เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส, Multiplex PCR, งานsequencing analysis, งาน Fragment Analysis, southern blot , direct dot blot hybridization real-time PCR และ MassArray analysis
- งานด้านวิชาการและประกันคุณภาพ

ความสามารถ ความชำนาญ เฉพาะตำแหน่งที่ครองอยู่ในปัจจุบัน .เช่น technique ด้าน Molecular Biology เช่น สกัดดีเอ็นเอ,bisulfite conversion, เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส , Multiplex PCR, Real-time PCR, PCR-RFLP, allele specific PCR, งาน sequencing, งาน Fragment Analysis, MLPA technique, southern blot , direct dot blot hybridization , MassArray anlysis งานออกแบบโพรบและไพรเมอร์ รวมถึงงานสืบค้นข้อมูลด้าน Bioinformatics

หน้าที่พิเศษ: (นอกเหนือจากงานประจำ หรือได้รับมอบหมายจากผู้บังคับบัญชา เช่น งาน QA, HA, อาชีวอนามัย, รับผิดชอบในการประเมินการทดสอบใหม่ๆ ฯลฯ)

- จัดทำระบบประกันคุณภาพ ISO 15189 ของหน่วยฯ (ส่วนของ Molecular genetic Lab)

ผลงานวิจัย:

- Mikhailov A, Fennell A, Plong-on O, Sripo T, Hansakunachai T, Roongpraiwan R, et al. Screening of NLGN3 and NLGN4X genes in Thai children with autism spectrum disorder. Psychiatric Genetics. 2014;24(1)
- Yangngam S, Plong-On O, Sripo T, Roongpraiwan R, Hansakunachai T, Wirojanan J, et al. Mutation screening of the neurexin 1 gene in thai patients with intellectual disability and autism spectrum disorder. Genetic testing and molecular biomarkers. 2014;18(7):510-5.
- Rujirabanjerd S, Plong-on O, Sripo T, Limprasert P. Subtelomeric aberrations in Thai patients with idiopathic mental retardation and autism detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. Asian Biomedicine. 2015;9(4):501-9.
- เป็นผู้ร่วมวิจัย และเผยแพร่ผลงานวิชาการแบบโปสเตอร์ เรื่อง Molecular genetic testing of fragile x syndrome: 14 years experience at Songklanagarind Hospital (2000-2013) ในงานประชุมวิชาการประจำปี 2557 คณะแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 30 Tracks and Trends in healthcare ตีพิมพ์ในหนังสือ หน้า 216
- Oradawan Plong-on, Pornsiri Sangmanee, Areerat Hnoonual and Chariyawan Charalsawadi. Duchenne and becker muscular dystrophy: A molecular

approach at Songklanagarind Hospital during 2007-2018. การประชุมวิชาการประจำปี 2562 คณะแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 35 (Healthcare Challenges in the disruptive era) 2019

- Wongpailboonwattana W, Plong-On O, Hnoonual A, Limprasert P. Significant associations between 5-hydroxytryptaminetransporter-linked promoter region polymorphisms of the serotonin transporter (solute carrier family 6 member 4) gene and Thai patients with autism spectrum disorder. Medicine. 2020;99(36):e21946.



การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

โรคพราเดอร์-วิลลี และแองเจิลแมน ด้วยเทคนิคเมทิลเลชัน-สเปคซิฟิคพีซีอาร์ของยีน *SNRPN*

Laboratory Diagnostics for Prader willi/Angelman syndrome
using Methylation Specific PCR for *SNRPN* gene