วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2568
Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

การศึกษาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเซลล์ไลน์สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ด้วยการใช้เฮกซาเมทิลไดซิลาเซน

The Study of Cell Line Preparation Techniques for Scanning Electron Microscope Using Hexamethyldisilazane (HMDS)

วาสินี ธรรมสถิต[1*] ณัฐพร มานะประดิษฐ์[1] และ พิศาล สุขวิสูตร[2]
Wasinee Thamsathit[1*] Nuttaporn Manapradit[1] and Pisan Sukwisute[2]

บทคัดย่อ

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง มีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ที่ให้บริการปลูกเซลล์ไลน์บนชิ้นงานวัสดุต่าง ๆ และมีผู้ใช้บริการจำนวนมากที่มีความต้องการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไลน์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเซลล์ไลน์ปกติจากไตลิง (Vero) และเซลล์ไลน์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มมนุษย์ (KB) โดยการทำแห้งตัวอย่างด้วยการแช่ตัวอย่างเซลล์ไลน์ในสารเฮกซาเมทิลไดซิลาเซน (HMDS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 100 ที่เวลา 3, 5 และ 10 นาที เปรียบเทียบกับเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (CPD) นับจำนวนเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะสมบูรณ์ มีลักษณะแบนเพียงเล็กน้อย

ผลการทดสอบพบว่า การแช่ตัวอย่างเซลล์ไลน์ในสาร HMDS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 เป็นระยะเวลา 3 นาที เป็นสภาวะที่ดีที่สุด โดยเซลล์ไลน์ Vero และ KB มีลักษณะทางกายภาพที่สมบูรณ์ร้อยละ 84.73 และ 92.45 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเครื่อง CPD พบว่า เซลล์ไลน์ Vero และ KB มีลักษณะทางกายภาพที่สมบูรณ์ร้อยละ 85.23 และ 92.38 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จึงสรุปได้ว่าการทำแห้งตัวอย่างด้วยสาร HMDS มีคุณภาพเทียบเท่ากับการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD และจากวิธีการนี้ยืนยันได้ว่าสามารถเตรียมตัวอย่างเซลล์ไลน์ Vero และ KB สำหรับการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดได้

คำสำคัญ: การทำแห้ง; เซลล์ไลน์; กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด; เฮกซาเมทิลไดซิลาเซน

---

[1] ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 10520

[2] ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร, 10520

[1] Scientific Instruments Centre, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

[2] Department of Physics, School of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

*Corresponding author: wasinee.th@kmitl.ac.th

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

Abstract

Scientific Instruments Centre, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang have a laboratory for culturing animal cells. This laboratory provides services for cultivating cell lines on various materials, and many users need to study the physical characteristics of cell lines using scanning electron microscopy. Therefore, a study was conducted on preparing the African green monkey kidney fibroblast (Vero) and Human oral cavity carcinoma cell lines (KB). The samples were dried using 50, 70, and 100% concentrations of hexamethyldisilazane (HMDS) at 3, 5, and 10 minutes. Count the number of individual and aggregated cells that appeared well-shaped with minimal occurrence of flattened cells.

The results found that 100% concentration of HMDS at 3 minutes was the best condition for drying step. Vero and KB cell lines had 84.73 and 92.45% intact physical characteristics, respectively. Compared with Critical Point Drying (CPD) method, the best physical characterization of Vero and KB cell lines has 85.23 and 92.38%, respectively, which was not significantly different at the 95% confidence level.

This concludes that drying step of HMDS has equal quality to CPD. The method also proved useful for drying Vero and KB cell lines for SEM imaging.

Keywords: Drying; Cell line; Scanning Electron Microscope; Hexamethyldisilazane

หลักการและเหตุผล

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นหน่วยให้บริการวิเคราะห์และทดสอบด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ขั้นสูง มีห้องปฏิบัติการทางด้านกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพให้บริการ จึงทำให้สามารถรับบริการตัวอย่างที่หลากหลายและครอบคลุมในหลาย ๆ ด้าน เพื่อให้บริการแก่ นักวิจัย นักศึกษา คณาจารย์ หน่วยงานภายในสถาบันฯ และหน่วยงานภายนอกสถาบันฯ ทั้งภาครัฐและเอกชน ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้รับความนิยมจากผู้ใช้บริการเป็นจำนวนมาก ทำให้มีตัวอย่างที่ถูกส่งมาทดสอบที่หลากหลาย เช่น ตัวอย่างที่เป็นโลหะ เซรามิค ยาง พลาสติก และผ้า เป็นต้น ซึ่งล้วนเป็นตัวอย่างทางกายภาพทั้งสิ้น แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ต้องทำงานภายใต้สภาวะสุญญากาศ หากมีตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ที่ต้องการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะไม่สามารถทดสอบได้ เพราะจะทำให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สูญเสียความชื้นจนผิดรูปร่างไปจากเดิม และเนื่องจากทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ที่ให้บริการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และปลูกเซลล์ลงบนวัสดุต่าง ๆ ผู้ใช้บริการหลายรายมีความต้องการถ่ายภาพเซลล์ไลน์ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งที่ปลูกลงบนชิ้นงานที่เป็นวัสดุ เพื่อศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์แต่ละชนิด แต่ทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ไม่สามารถเตรียมตัวอย่างให้ได้ เพราะขาดเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical Point Dryer : CPD) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความจำเป็นอย่างมากใน

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

ขั้นตอนการทำแห้งตัวอย่างทางชีวภาพ เพราะจะทำให้โครงสร้างตัวอย่างแห้ง โดยคงรูปร่างตัวอย่างให้เหมือนตอนที่ยังมีความชื้นอยู่มากที่สุด ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงหรือเสียสภาพ (Bianca et al., 2015) หลังจากขั้นตอนการดองตัวอย่าง (Fixation) และการแทนที่น้ำ (Dehydrate) แล้ว แต่ในปัจจุบันทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ยังไม่มีเครื่องมือนี้ให้บริการ เนื่องจากมีราคาสูงและกระบวนการทำแห้งใช้เวลานาน ด้วยเหตุผลนี้ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาเทคนิคอื่นเข้ามาทดแทนการใช้เครื่องมือดังกล่าว เพื่อรองรับกลุ่มผู้ใช้บริการที่ต้องการถ่ายภาพตัวอย่างทางชีวภาพ และกลุ่มลูกค้าที่ต้องการถ่ายภาพเซลล์ไลน์บนวัสดุตัวอย่างได้แบบ One stop service และยังเป็นการขยายฐานลูกค้าได้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

สารเฮกซาเมทิลไดซิลาเซน (Hexamethyl-disilazane: HMDS) มีการนำมาใช้ในการทำแห้งตัวอย่างทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย ทดแทนการใช้ CPD ดังงานวิจัยของ Nikara et al. (2020) มีการใช้สาร HMDS ในการทำแห้งตัวอย่างเนื้อเยื่อมันฝรั่ง หลังขั้นตอนการดองตัวอย่างใน 2.5% Glutaraldehyde เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำแห้งโดยการนำเนื้อเยื่อมาแช่เอทานอลผสมกับ HMDS ในอัตราส่วนที่ดีที่สุด คือ 3:1 และ 1:1 ทิ้งไว้ข้ามคืน แทนการใช้เครื่อง CPD นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Braet et al. (1997), Ali et al. (2021), Hazrin-Chong and Manefield (2012), Jusman et al. (2014) และ Lee and Chow (2012) ที่มีการใช้สาร HMDS แทนการใช้ CPD ในตัวอย่างที่เป็นเซลล์สัตว์เช่นเดียวกัน

งานวิจัยนี้จึงทำการเปรียบเทียบการทำแห้งตัวอย่าง โดยการแช่ตัวอย่างในสาร HMDS เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุด ที่ไม่ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพไป เปรียบเทียบกับการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD โดยจะทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ปกติ 1 ชนิด คือ เซลล์ไลน์ปกติจากไตลิง (African green monkey kidney fibroblast: Vero) และเซลล์ไลน์มะเร็ง 1 ชนิด คือ เซลล์ไลน์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มมนุษย์ (Human oral cavity carcinoma: KB) ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยดังกล่าว จะเป็นการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพด้วยการใช้สาร HMDS ทดแทนการใช้เครื่อง CPD ได้ ซึ่งจะทำให้ทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สามารถเปิดรับบริการวิเคราะห์ตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยสาร HMDS ได้ในอนาคต และเป็นแนวทางในการพัฒนาปรับปรุงเทคนิคดังกล่าวเพื่อใช้กับตัวอย่างทางชีวภาพประเภทอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

เพื่อพัฒนาการทำแห้งตัวอย่างเซลล์ไลน์ปกติจากไตลิง (Vero) และเซลล์ไลน์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มมนุษย์ (KB) ที่แช่ตัวอย่างในสารเฮกซาเมทิลไดซิลาเซนที่ระยะเวลาและระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วเปรียบเทียบกับเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต

วิธีการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ (Cell culture) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Boyd และคณะ, 2021 เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ปกติจากไตลิง (Vero) และเซลล์ไลน์มะเร็งเยื่อบุช่องปากและกระพุ้งแก้มมนุษย์ (KB) ปลูกเซลล์ไลน์จำนวน $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนสไลด์แก้วที่มีอาหารเพาะเลี้ยงชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มเซลล์ไลน์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมตัวอย่างเซลล์ไลน์สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- การดองตัวอย่าง (Fixation) เพื่อคงสภาพเซลล์เนื้อเยื่อ ไม่ให้เกิดการสลายตัว โดยนำสไลด์แก้วที่เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์แช่ลงใน 5% Glutaraldehyde

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

ผสม 0.2 M Phosphate buffer pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 ครั้งละ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง

- การแทนที่น้ำ (Dehydrate) ทำการแทนที่น้ำในเซลล์เนื้อเยื่อเพื่อดึงน้ำออกด้วยสารละลายเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างไปแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูงสุด เริ่มจากความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70, 90 จนถึง 100 หรือ Absolute ใช้ระยะเวลาในการแช่ความเข้มข้นละ 10 นาที

- การทำแห้ง (Drying) ทำการทดสอบหาสภาวะในทำแห้งด้วยการแช่สไลด์แก้วใน HMDS ที่ระดับความเข้มข้นสาร 3 ระดับ ได้แก่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 100 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน 3 ช่วงเวลา ได้แก่ 3 นาที 5 นาที และ 10 นาที จากนั้นนำสไลด์แก้วตัวอย่างที่ได้ใส่ในโถดูดความชื้น เป็นระยะเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือตัวอย่างที่เตรียมแล้วทำแห้งด้วยเครื่อง CPD โดยการแทนที่สารละลายด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวจำนวน 16 ครั้ง ครั้งละ 120 วินาที (ส่งทำแห้งที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- การติดและเคลือบผิวตัวอย่าง (Mounting and Coating) นำตัวอย่างบนสไลด์แก้วที่แห้งสนิทแล้วมาติดลงบนแท่นวางตัวอย่างชนิดอะลูมิเนียม (Al Stub) แล้วเคลือบด้วยทองคำ โดยใช้เครื่องเคลือบทอง (Au Sputter Coater)

3. การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นำตัวอย่างเซลล์ไลน์มาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Quanta250, FEI) โดยใช้ชุดตรวจวัดสัญญาณอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary electrons detector : SED) ในการถ่ายภาพดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ทั้งรูปร่างและพื้นผิว เพื่อศึกษาสภาวะที่ดีที่สุดในการทำแห้งตัวอย่างด้วยสาร HMDS โดยมีเกณฑ์การพิจารณาคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่มีรูปร่างสมบูรณ์ คือ เซลล์ไม่แตก หรือผิวเซลล์ไม่มีรูพรุน ไม่มีเซลล์แห้งผิดรูปร่าง โดยรูปร่างเซลล์ต้องเป็นไปตามลักษณะของภาพที่ถ่ายได้จากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ คือ ทั้งเซลล์ไลน์ Vero และเซลล์ไลน์ KB เป็นเซลล์ชนิดเยื่อบุผิว (Epithelial) มีรูปร่างหลายมุม (Polygonal) เรียงตัวเกาะกับพื้นผิว จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ไลน์ที่มีรูปร่างสมบูรณ์ในแต่ละสภาวะ เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD เป็นชุดควบคุม

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ 2 x 3 x 3 Factorial analysis in RCBD โดยปัจจัยแรก คือ ชนิดของเซลล์ ปัจจัยที่สอง คือ ความเข้มข้นของสารเฮกซาเมทิล-ไดซิลาเซน และปัจจัยที่สาม คือ ระยะเวลาในการแช่สารเฮกซาเมทิลไดซิลาเซน ทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการพัฒนาวิธีการทำแห้งตัวอย่างเซลล์ไลน์ Vero และเซลล์ไลน์ KB ด้วยการแช่ตัวอย่างใน HMDS ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50, 70 และ 100 ที่ระยะเวลา 3 นาที 5 นาที และ 10 นาที ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์คงสภาพเดิม จะมีลักษณะนูน เป็นสามมิติชัดเจน พื้นผิวเซลล์มีโปรตีนยึดเกาะเป็นแขนงหรือเส้นใยเล็ก ๆ แต่เซลล์ไลน์ที่ไม่สมบูรณ์ คือ เสียสภาพไปจากเดิม จะมีรูปร่างแบนราบ ไม่นูน พื้นผิวเรียบเห็นโปรตีนยึดเกาะหรือเส้นใยเพียงเล็กน้อย จากนั้นนับจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ตัวอย่างที่เตรียมแล้วทำแห้งด้วยเครื่อง CPD

จากภาพเซลล์ไลน์ Vero ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลังผ่านการทำแห้งด้วยสาร HMDS ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน ดังรูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าสภาวะการทำแห้งเซลล์ไลน์ Vero ด้วยสาร HMDS ที่ระยะเวลา 3 นาที ระดับความ

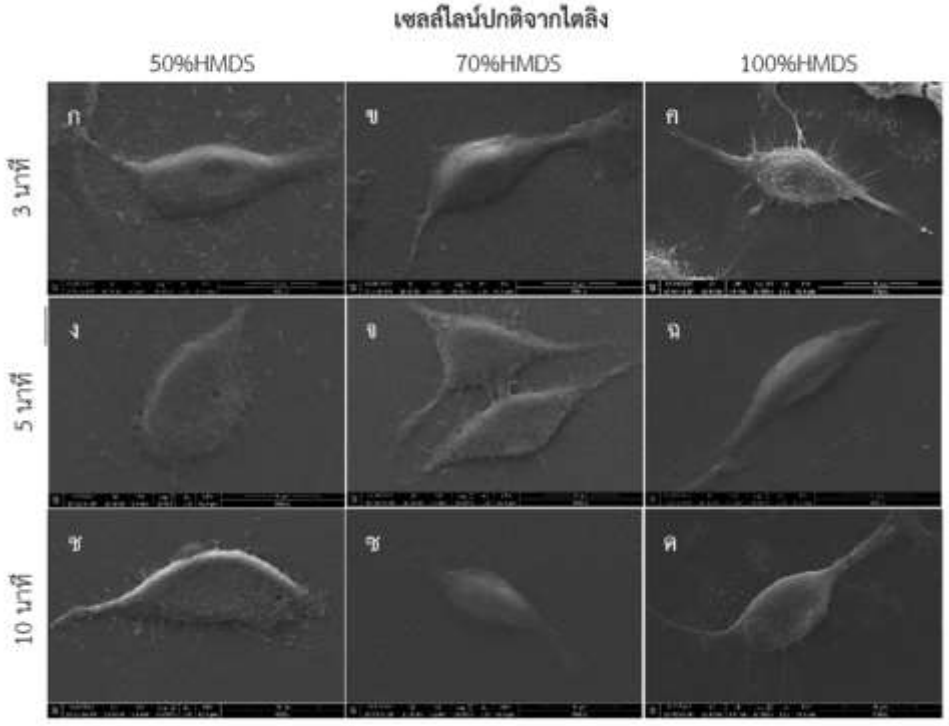
Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

เข้มข้นร้อยละ 100 คงความสมบูรณ์ของเซลล์ได้มากที่สุด คือ เซลล์ไม่แห้งแบน ยังคงความนูน และพื้นผิวมีเส้นใยยึดเกาะชัดเจน เมื่อเทียบกับสภาวะอื่น ๆ ที่เซลล์มีลักษณะแห้งแบน เสียรูปร่างเดิมไป บางสภาวะไม่เห็นเส้นใยยึดเกาะเซลล์มีลักษณะพื้นผิวเรียบ หรือมีรูพรุนเกิดขึ้น มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์สูงที่สุดร้อยละ 84.73 ไม่แตกต่างกับการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์ร้อยละ 85.23 ดังที่แสดงในตารางที่ 1

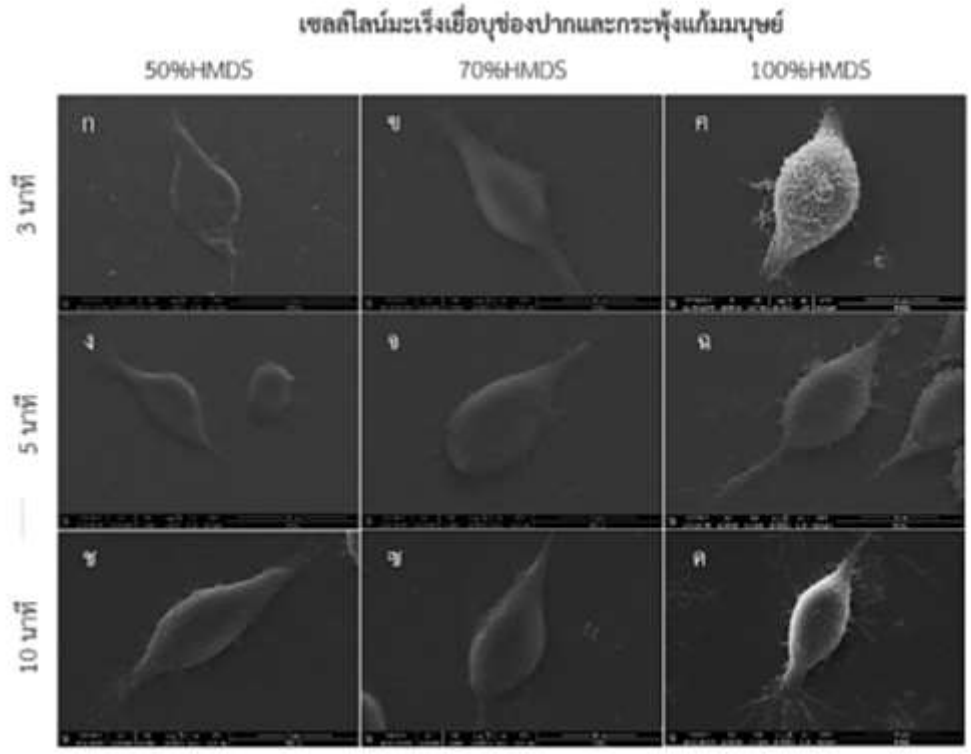
ผลการทดลองสภาวะการทำแห้งเซลล์ไลน์ KB ด้วย HMDS มีลักษณะเดียวกันกับเซลล์ไลน์ Vero คือ เซลล์ที่สมบูรณ์ไม่เสียรูปร่างจะนูน ไม่แบนราบ และมีเส้นใยโปรตีนยึดเกาะที่ผิวเซลล์ ดังรูปที่ 2 สภาวะที่ดีที่สุดที่ระยะเวลา 3 นาที ระดับความเข้มข้นร้อยละ 100 เช่นเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 92.45 ดีเทียบเท่ากับการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ที่สมบูรณ์ร้อยละ 92.38 ดังตารางที่ 1

ผลการทดลองของทั้งสองเซลล์เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือทั้งเซลล์ Vero และ KB มีสภาวะการทำแห้งที่ดีที่สุดเหมือนกันที่ระยะเวลา 3 นาที ระดับความเข้มข้นร้อยละ 100 เมื่อนำภาพเซลล์ไลน์ที่ทำแห้งด้วย HMDS มาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือเซลล์ไลน์ที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD ดังรูปที่ 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เซลล์ยังคงรูปร่างกลมนูนและมีเส้นใยโปรตีนบนผิวเซลล์เหมือนกัน ดังนั้นเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดนี้ สามารถใช้วิธีการทำแห้งด้วย HMDS แทนการใช้เครื่อง CPD ได้ คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Braet et al. (1997) ที่ใช้การทำแห้งตัวอย่างเซลล์ตับหนูด้วยสาร HMDS โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ตัวอย่าง 3 นาที หรือแม้แต่ในงานวิจัยของ Lee and Chow (2012) ได้ทำการเตรียมตัวอย่างเซลล์ไลน์บนโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds) โดยใช้ 2.5% Glutaraldehyde ในการดองเซลล์ แล้วดึงน้ำออกด้วยเอทานอล จากนั้นทำให้แห้งด้วยการแช่ในสาร HMDS ใช้ระยะเวลาในการแช่นาน 3 นาที เช่นเดียวกัน นอกจากนี้งานวิจัยของ Hazrin-Chong and Manefield (2012) ได้ทำแห้งตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียโดยการแช่ตัวอย่างในสาร HMDS ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 50% และ 100% โดยใช้เวลา 10 นาที ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ แล้วทำแห้งด้วย HMDS ทำให้เซลล์ไลน์คงรูปร่างเดิมไว้ได้ ไม่เสียรูปร่างหรือแห้งเหี่ยว สามารถใช้ทดแทนการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD ได้ เหมือนกับ Ali et al. (2021) ได้ทำแห้งตัวอย่างเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยแช่ตัวอย่าง HMDS เป็นเวลา 15 นาที แทนการใช้เครื่อง CPD ซึ่งสามารถใช้ทดแทนกันได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย มีราคาถูก และใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างสั้นกว่าการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD สอดคล้องกับงานของ Jusman et al. (2014) ที่ใช้การทำแห้งตัวอย่างด้วย HMDS ในการเตรียมตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกในการพัฒนาเทคนิคการตรวจติดตามด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับ FE-SEM/EDX โดยใช้ระยะเวลาในการแช่ตัวอย่าง 10 นาที เปรียบเทียบกับการทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่อง CPD พบว่า การทำแห้งโดยการใช้ HMDS เป็นเทคนิคที่ดีกว่าในการเตรียมเซลล์ปากมดลูกสำหรับการวิเคราะห์ FE-SEM/EDX โดยปลอดภัยกว่า รวดเร็วกว่า และคุ้มค่ากว่า

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.



รูปที่ 1 เปรียบเทียบเซลล์ไลน์ Vero จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลังผ่านการทำแห้งด้วย HMDS ในสภาวะต่าง ๆ



รูปที่ 2 เปรียบเทียบเซลล์ไลน์ KB จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หลังผ่านการทำแห้งด้วย HMDS ในสภาวะต่าง ๆ

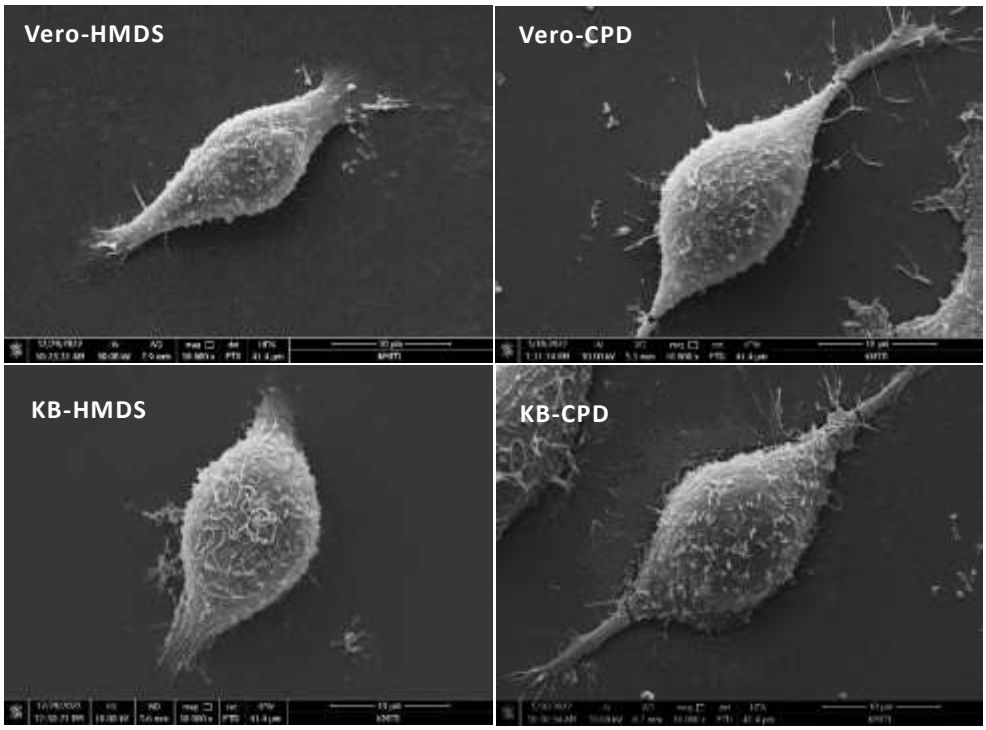
Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ Vero และ KB ที่มีลักษณะสมบูรณ์หลังการทำแห้งด้วย HMDS ที่สภาวะต่าง ๆ

วิธีการทำแห้ง	สภาวะการทำแห้ง ระยะเวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	Vero (ร้อยละ ± SD)	KB (ร้อยละ ± SD)
HMDS	3	50	6.12±5.03^{f}	2.51±3.45^{de}
		70	26.70±10.47^{de}	10.55±6.79^{cd}
		100	84.73±8.04^{a}	92.45±4.37^{a}
	5	50	6.98±3.38^{f}	0.31±0.70^{e}
		70	5.65±5.49^{f}	1.82±4.07^{de}
		100	40.00±8.52^{bc}	5.95±4.00^{cde}
	10	50	17.78±3.45^{ef}	4.57±2.36^{cde}
		70	30.17±13.69^{cd}	21.67±12.63^{b}
		100	50.17±12.43^{b}	13.40±13.42^{bd}
CPD			85.23±9.13^{a}	92.38±5.82^{a}

*ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไลน์ ได้จากการสุ่มนับจำนวนบนสไลด์แก้ว 5 ตำแหน่ง พื้นที่เฉลี่ยประมาณ 0.01 ตารางเซนติเมตร

**ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3 เปรียบเทียบเซลล์ไลน์ Vero และเซลล์ไลน์ KB ผ่านการทำแห้งด้วย HMDS เป็นระยะเวลา 3 นาที ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 100 (ซ้าย) กับการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (ขวา)

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

การสรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า วิธีการทำแห้งตัวอย่างเซลล์ไลน์ Vero และเซลล์ไลน์ KB ด้วย HMDS ที่ระยะเวลาและระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อลักษณะรูปร่างความสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์แตกต่างกันออกไป แต่เซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดซึ่งเป็นตัวแทนของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ การแช่ตัวอย่างเซลล์ไลน์ในสาร HMDS ที่ระยะเวลา 3 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 100 เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการคงรูปร่างของเซลล์ไลน์ให้มีรูปร่างคงเดิม ไม่เสียสภาพ แห้งเหี่ยวไป โดยเซลล์ไลน์ Vero มีความสมบูรณ์ของเซลล์สูงสุด ร้อยละ 84.73 และเซลล์ไลน์ KB มีความสมบูรณ์ของเซลล์อยู่ที่สูงสุด ร้อยละ 92.45 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ไลน์ที่ทำแห้งด้วยเครื่อง CPD พบว่า เซลล์ไลน์ Vero มีความสมบูรณ์ของเซลล์ร้อยละ 85.23 และเซลล์ไลน์ KB มีความสมบูรณ์ของเซลล์ ร้อยละ 92.38 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าทั้งเซลล์ไลน์ Vero และเซลล์ไลน์ KB สามารถทำแห้งด้วยวิธีการแช่ในสาร HMDS แทนการทำแห้งด้วยเครื่อง CPD ที่มีราคาแพง ขั้นตอนยุ่งยาก และใช้ระยะเวลานานประมาณ 1-3 ชั่วโมง ซึ่งการทำแห้งด้วยสาร HMDS ใช้เวลาเพียง 3-5 นาทีเท่านั้น ซึ่งช่วยลดระยะเวลาการทำงานให้น้อยลงอีกด้วย

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

สาร HMDS เป็นสารที่ระเหยง่าย ติดไฟง่าย เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เมื่อมีการการสูดดมหรือสัมผัสผิวหนัง ดังนั้นควรใช้งานอย่างระมัดระวัง สวมถุงมือป้องกันและใช้งานภายใต้ตู้ดูดไอระเหยสารเคมีทุกครั้ง ในส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ดังนั้นควรศึกษาวิธีการทำแห้งตัวอย่างเซลล์ไลน์ชนิดอื่นๆกับสาร HMDS เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเซลล์ไลน์แต่ละชนิด โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในมนุษย์ (Human colon adenocarcinoma: HT29) เซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (Human breast adenocarcinoma: MCF-7) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู (Murine leukemia: P-388) เซลล์มะเร็งปากมดลูกในมนุษย์ (Human cervical adenocarcinoma: HeLa) เซลล์มะเร็งตับในมนุษย์ (Human hepatocarcinoma: HepG-2) เซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของหนู (Mouse subcutaneous connective tissue: L929) และเซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของมนุษย์ (Human keratinocyte immortal cells: HaCat) ซึ่งเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง มีให้บริการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อรองรับต่อความต้องการของผู้ใช้บริการในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนวิจัยเพื่อพัฒนางานประจำ ประจำปี 2565 เลขที่สัญญา KREF196501

เอกสารอ้างอิง

Ali, R., El-Boubbou, K. & Boudjelal, M. (2021). An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*, *8*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101521

Bianca, P. S., Fernanda, N., Camila, P. F., Ricardo, M. S., Adriana, F. S., Flavio, F. D., Neftali, L. V. C. (2015). Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy.

Received: June 27, 2023, Revised: February 7, 2024, Accepted: May 8, 2024
http://doi.org/10.14456/jmu.

Microscopy Research and Technique, 78(7), 553-561. https://doi.org/10.1002/jemt.22508

Breat, F., Zanger, R. & Wisse, E. (1997). Drying cells for SEM, AFM and TEM by Hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *Journal of Microscopy*, *168*(1), 84-87.

Hazrin-Chong, N. H., & Manefield, M. (2012). Corrigendum to An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal. *Journal of Microbiological Methods*, *90*(2), 96-99. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.014

Jusman, Y., Ng, S. C., & Osman, N. A. A., (2014). Investigation of CPD and HMDS Sample Preparation Techniques for Cervical Cells in Developing Computer-Aided Screening System Based on FE-SEM/EDX. *The Scientific World Journal, 13*(1), 124-135.

Lee, J., T., Y. & Chow, K. L. (2012). SEM Sample Preparation for Cells on 3D Scaffolds by Freeze-Drying and HMDS. *Wiley Online Library*, *34*(1), 12-25. https://doi.org/10.1002/sca.20271

Nikara, S., Ahmadi, E. & Nia, A., A. (2020). Effects of different preparation techniques on the microstructural features of biological materials for scanning electron microscopy. *Journal of Agriculture and Food Research*, *2*, 361-368.