

เอกสารอ้างอิง

- กมลทิพย์ (รัตนไพโรจน์) บรรวณ. จุลทรพรรณอิเล็กทรอนิกส์. ขอนแก่น: ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2548.
- เกรียงศักดิ์ พูนสุข. สารพิษจากเชื้อรา. การควบคุมป้องกัน. ใน เปล่งศรี อินคินันท์ (บรรณาธิการ). สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2548.
- กณารัตน์ หรินทรานนท์, อัจฉริยา ไสละสูตร, อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, อนงค์ บิณฑวิหค, จิโรจ ศศิปรียจันทร์. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและการขับออกทางอุจจาระของ อะฟลาทอกซิน บี 1 ภายหลังให้ลูกไก่กระทงกินครั้งเดียว. เวชสารสัตวแพทย์ 2543; 30(2): 36-47.
- กมลกริช พิมพ์ภักดี. อะฟลาทอกซิน. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
- กมลกริช พิมพ์ภักดี, บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล, สุวิทย์ อุปสัย, จริรัตน์ เอี่ยมสะอาด. การศึกษาการใช้สาร ดูดซับพิษจากเชื้อรา (อะฟลาทอกซิน) ในอาหารสัตว์ปีกเพื่อเพิ่มผลผลิตและปรับปรุง คุณภาพซาก. ขอนแก่น: คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547.
- ชนกันต์ จิตมนัส. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์ 2545; 24(4): 739-747.
- พินิจมพร เจริญวัย. การศึกษาประสิทธิภาพการใช้สารกลุ่มไฮเดรตโซเดียมแคลเซียมอลูมิโนซิลิเกตชนิดต่าง ต่อการลดพิษจากอะฟลาทอกซินในสุกรหย่านมและเปิดเนื้อ. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2542.
- ณรงค์ จึงสมานญาติ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ : หลักการของกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านและส่องกราด. นครปฐม: สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน; 2536.
- ดวงจันทร์ สุประเสริฐ, วนิตา ยุธยาติ. สารพิษอฟลาท็อกซินเอ็ม 1 ที่ปนเปื้อนในนมโค และนมถั่วเหลือง. วารสารสัตวแพทย์ 2545; 12(2): 2.

- นริศรา ปาลินทร. ผลกระทบของอะฟลาทอกซินและสารดูดซับสารพิษต่อการทำงานของ
เซลล์จับกินในปลาชนิด. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
การประมง]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2550.
- ประสงค์ คุณานุวัฒน์. สารพิษอะฟลาทอกซิน. วารสารโรคมะเร็ง 2523; 6(1): 41-49.
- ปาริยา อุดมกุศลศรี, ประพฤษ ตั้งมั่นคง, ศิริรักษ์ จันทกร, สุรพงษ์ อาทิตย์วงศ์, วิชญ
บุญญาวิวัฒน์, นกสร กู้สุจริต. การศึกษาระดับการตกค้างของอะฟลาทอกซินบี-1 ในเนื้อ
และตับ และผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลาอุก (*Clarias batrachus*) หลังการได้รับ
เป็นเวลานาน [เอกสารอัดสำเนา]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2551.
- เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. สภาพการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร 2543; 28(4):
173-181.
- ไมตรี สุทธิจิตต์, วิบูลย์ รัตนานนท์, อุดมภักดิ์ ขาลสุวรรณ, นภาพร โออริยกุล, ทรงพรรณ
หวังใจสุข. การศึกษาหาวิธีทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารที่ตรวจพบ. เชียงใหม่:
ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; [ม.ป.ป.].
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์. สัมมนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกเรื่องการค้า
ปลานิลในกระชัง สัตว์เศรษฐกิจปี 2000. [ม.ป.ท.: ม.ป.พ.]; 2543.
- ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์, พันธุ์ศักดิ์ ชัยบุตร. การเลี้ยงปลานิล [เอกสารอัดสำเนา]. กรุงเทพฯ:
กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2543.
- เขาวมาลัย คำเจริญ, เขิดชัย รัตนเศรษฐากุล, สาโรช คำเจริญ. ผลของอะฟลาทอกซินต่อ
ความเสี่ยงของสุขภาพและการผลิตสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐาน
ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม; 2543.
- เขาวมาลัย คำเจริญ และคณะ. ความปลอดภัยของอาหารสัตว์ที่ผลิตจากถั่วลิสงและข้าวโพดใน
ระบบควบคุมการเกิดสารอะฟลาทอกซิน. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2542.
- เวकिन นพนิตย์. จุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์. กรุงเทพฯ: อักษรเจริญทัศน์; 2524.
- _____. ปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์แบบทรานสมิชชันสำหรับนักวิทยาศาสตร์ชีวภาพ.
กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2528.
- ศักดิ์ชัย ชูโชติ. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พรินต์ติ้งเฮาส์; 2536.
- ศุภลักษณ์ โรมนรัตนพันธ์. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.

- ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. การเลี้ยงปลาน้ำจืดในกระชัง: ผลตอบแทนสูงแต่พึ่งระวังปัจจัยเสี่ยง [ออนไลน์] 2550 [อ้างเมื่อ 22 มีนาคม 2550]. จาก <http://www.positioningmag.com/pmnews.aspx?id=5778>.
- ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2547. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 2549; (4): 9-27.
- โสมทัต วงศ์สว่าง. การกจัดระบบภูมิคุ้มกันโดยสารพิษจากเชื้อรา. ใน เปล่งศรี อิงคนินันท์ (บรรณาธิการ). สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2540. (134-138).
- อนงค์ บิณทวิหก. สารพิษอะฟลา: ความสัมพันธ์ระหว่างการเป็นพิษและมะเร็งในตับ. ใน เปล่งศรี อิงคนินันท์ (บรรณาธิการ). สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2540. (119-133).
- อภิษฐา ช่างสุพรรณ. อะฟลาทอกซิน (AFLATOXIN) ในผลิตผลทางการเกษตร. [ม.ป.ท.: ม.ป.พ.]; 2548.
- อรนุช เลิศทรงวุฒิกุล, อุทัย คันทโ, สุกัญญา จิตตพรพงษ์. การใช้สารซีโอไลท์ธรรมชาติแหล่งประเทศไทยเพื่อดูดซับอะฟลาทอกซินในอาหารสุกรรุ่น-ขุน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. กรุงเทพฯ: สาขาวิชาสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.
- อรประพันธ์ พุ่มอินทร์. ผลของการใช้สารประกอบอะลูมิเนียมซิลิเกตต่อการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในสุกรระยะเจริญเติบโต. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวบาล]. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2536.
- อรอุษา อุสันโน. ผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์]. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2546.
- อรอุษา อุสันโน และคณะ. ผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. วารสารสงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์ 27(ฉบับพิเศษ 1): 187-189.
- อินทรา กระหม่อมทอง. เชื้อราที่สร้างสารพิษ. ใน เปล่งศรี อิงคนินันท์ (บรรณาธิการ). สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. กรุงเทพฯ: คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2540. (61-82).

- อุดม เรืองนพคุณ. การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลาชนิด. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ:อักษรสยาม
การพิมพ์; 2550.
- Abollino O, M Aceto, M Malandrino, C Sarzanini, E Mentasti. Adsorption of heavy metals on
Na-montmorillonite, Effect of pH and organic substances. **Water Res** 2003; 37:
1619-1627.
- Abulkalam M Shamsuddin, Curtis C Harris and Mary J Hinzman. **Localization of aflatoxin
B₁-nucleic acid adducts in mitochondria and nuclei.** U.S.A.Oxford University Press;
1987.
- Beaver RW, Wilson DM, James MA, Haydon KD. Distribution of of aflatoxins in tissue of
growing pigs fed an aflatoxin-contaminated with a high affinity aluminosilicate sorbent.
Vet Human Toxicol. 1990; 32(1): 16-18.
- Chavez-Sanchez M, C Martinez Palacios, CA Osorio, I Moreno. Pathological effect of feeding
young (*Oreochromis niloticus*) diet supplemented with differect level of Aflatoxin B₁.
Aquaculture. 1994;127(1): 49-60.
- Chung TK. **Use of Aluminosilicate in Animal Diet.** Archer Daniels Midland Technical Data.
Haw Par Center, Singapore; 1994.
- Diaz DE, WM Hagler, BA Hopkin and LW Whitlow. Aflatoxin binder I: In vitro binding assay
for Aflatoxin B₁ by several potential sequestering agents. **Mycopathologia** 2003;
156: 223-226.
- Diekman MA and ML Green. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock.
Journal of Animal Science 1992; 70: 1615-1627.
- El-Banna HM, Teleb MM, Hadi, FM Fakhry. Performance and tissue residue of tilapias fed
dietary aflatoxin. **Vet Med J.** 1992; 40: 17-23.
- Ellis WO, Smith JP, Simpson BK. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on
organism, detection, and method of control. **Cri. Rev. Food sci. Nutri.** 1991; 30(3):
403-439.
- Ellis RW, M Clement, A Tibbetts and A Winfree. Reduction of a bioavailability of 20 ug/kg
aflatoxin in trout fish containing clay. **Aquaculture** 2000; 183: 179-188.
- Eren E, B Afsin, Y Onal. Removal of lead ions by acid activated and manganese oxide-
coated bentonite. **Journal of Hazardous Materials.** 2009; 161: 677-685.

- Ferguson HW. **Systemic Pathology of Fish**. U.S.A.: ISU Press; 1989.
- Friedman MA, M Bailey and GCV Tuyle. Inhibition of mitochondria DNA synthesis by Aflatoxin B1 and dimethyl nitrosamine. **Reach Communication in Chemical Pathology and Phamacology 1978**; 21: 281.
- Gayatri M. **Chronic aflatoxicosis in Fish an dits Relevance to Human Health**. India: Central Instutute of Freshwater Aquaculture; 1978.
- Harvey RB, Kubena L F, Phillips TD, Huff WE. Preventive of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to Diets of growing barrows. **Am J Vet Res. 1989**; 50(3): 416-420.
- Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Phillips TD. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. **Avian Dis. 1993**; 37: 67-73.
- Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Corrier DE, Phillips TD. Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing barrows from aflatoxicosis. **J Vet Diagn Invest. 1994**; 6(1): 88-92.
- Hendricks JD, Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In: DL Eaton, JD Groopman (Edi.). **Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance**. San Diego: Academic Press; 1994. (103–136).
- Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM. Subchronic toxicity of aflatoxin B1 to Channel catfish. **J Aqua. Anim Health. 1990**; 2: 248–254.
- Jones JM. **Methods of Aflatoxin Analysis**. UK.: Tropical Products Intitute; 1972.
- Kesavannair P, Evans DL, Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor- α in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. **Molecular Immunology 2006**; 43: 279–291.
- Kierszenbaum AL. **Histology and cell biology : an introduction to pathology**. New York: Mosby; 2002.
- Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Poultry Sci. 1990**; 69(5): 727-735.
- Lindermann MD, Blodgett DJ, Kornegay ET, Schurig GG. Potential Ameliorators of Aflatoxicosis in Weanling/growing Swine. **J Anim Sci. 1993**; 71(1):171-178.

- Luckham PF, S Rossi. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions, *Advan. Colloid Interf. Sci* **1999**; 82: 43-92.
- Magnoli AP et al. Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin. *Applied Clay Science* **2008**; 40: 63–71.
- Mair GC, JS Subcay, DOF Skibinskin, TA Abella and JA Beardmere. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production on all mail Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fishery and Aquatic Science* **1997**; **54**(2): 396-404.
- Miazzo R, Peralta F, Magnoli C, Salvano M, Ferrero S, Chiacchiera, SM, Rosa CA, Dalcero A. Sodium bentonite from south Argentina on the bioavailability of aflatoxin and fumonisina in broilers chickens. *Poultry Sci.* **2005**; 84: 1–8.
- New MB. Feed and feeding of fish and shimp. **Aquaculture development and coordination program ADC/REP/87/26**. Room, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nation; 1987.
- Ostrowski-Meissner HT, LeaMaster BR, Duerr EO, Walsh WA. Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B₁. *Aquaculture* **1995**; 131: 155-164.
- Pasha TN, Farooq MU, khattak FM, Jabbar MA, Khan AD. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **2007**; 132: 103-110.
- Phillips TD, Sarr AB, Grant PG. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Natural Toxins* **1995**; **3**(1): 204-213.
- Phillips TD. Dietary clay in chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci.* **1999**; **52**(1): 118-126.
- Pimpukdee K, Tengjaroenkul B, Angkittitakul S, and Iamsaart J. Investigation of commercial adsorbents for the adsorption of aflatoxin B₁. *KKU. Res. J.* **2002**; **7**(2): 45-54.
- Roger AE and PM Newberne. The effect of aflatoxin B₁ and dimethylsulfoxides on thymidine H³ uptake and mitosis in rat liver. *Cancer Research* **1967**; **27**: 855.
- Rosa CAR, Miazzo RD, Carvalho QEC, Dalcero AM, Chiacchiera SM, Magnoli C, Basaldella E, Kikot A. Efficacy of synthetic zeolites to reduce toxicity of aflatoxin B₁ in broyler chicks. *Poultry. Sci.* **2000**; **79**: 1–6.



- RuizPerez A, PaaschMartinez L, AdamedePaasch P, RosilesMartinez R. Hepatic neoplasia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. **Veterinaria** 1984; 15: 255-261.
- Sahoo PK, AK Mukherjee, AK Jain, A Mukherjee. Histopathological. **Asian Fishery science**. New York: Mosby; 2003.
- Samuel, A.A., K.A. Olanike., B.A. Olufemi., U.J. Abdulkadir. Ultrastructural study of the phagocytic activities of splenic macrophages in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Biotechnology** 2006;5 (22), 2350-2353.
- Sangjan P, Tengjaroenkul B. Development of Aminopeptidase and Non-specific Esterases in the intestine of Tilapia Strain *Jitrarhada*. **KKU Vet J.** 2004; 14(1): 81-86.
- Santurio, J.M., C. A. Mallmann, A.P. Rosa, G. Appel, A. Heer, S. Dageford, M. Bottcher. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of boiler chickens intoxicated with aflatoxin. **British Poultry Science** 1999; 40: 115-119.
- Schell, T. C., Lindemann, M.D., Kornegay, E.T. and Blodgett, D.J. 1993. Effect of Feeding Aflatoxin-Contaminated Diets With and Without Clay to Weanling and Growing Pigs on Performance, Liver Function, and Mineral Metabolism. **J. Anim. Sci.** 71, 1209-1218.
- Shank, R.C. & G.N. Wogan. Distribution and Excretion C14 label aflatoxin B1 in rat. **Federation Proceedings** 1965;24, 627.
- Smith, J.W., P.B. Halminton. Aflatoxicosis in the broiler chicken. **Poultry Science** 49;1980. 207-215.
- Smith, J. E., and Ross, J. E. The toxigenic Aspergilli. In J. E. Smith, R. S. Handerson (Eds.). **Mycotoxins and Animal Food.**, Boca Raton, FL; CRC Press;1991.
- Tengjaroenkul B, Pimpukdee K, Tengjaroenkul U. **Efficacy of yeast cell wall on detoxification of aflatoxin in diet of Tilapia fish, *Oreochromis sp.*** Bangkok: The international Symposium on Mycotoxinology in Bangkok; 2006.
- Tuan PA, DC Little and GC Mair. Genotype effects on comparative growth performance of all male Tilapia *Oreochromis niloticus*(L). **Aquaculture** 1998; 159: 293-302.
- Tuan AN, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia. **Aquaculture** 2002; 212(1-4): 311-319.

Uopasai, S. The effect of Monosodium L-Glutamate on the hypothalamic nuclei in adult rats.

KKU. Vet. J. 2000; 10(1-2): 23-34.

Uopasai, S. Effect of salt on the salt gland of muscovy duck. **KKU. Vet. J. 2006; 16(2): 17-26.**

Var I, B kabak, Z Erginkaya. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. **Food Control 2008; 19: 592-598.**

Veldman A. Effect of sorbentia on carry-over of Aflatoxin from cow feed to milk.

Milchwissenschaft 1992; 47: 777-780.

Wilson DM, GA Payne. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: Eaton, D.L., Groop, J.D. (Eds). **toxicology of aflatoxin: Human Health, Veterinary and Agriculture significance.** San diago: Academic press; 1994.

Wunder W, Korn H. Aflatoxin cancer (hepatoma) in the liver of the rainbow trout

(*Salmo irideus*). **Zool Beitr 1982; 28: 99-109.**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการดองเนื้อเยื่อ

10% neutral buffer formalin

- 40% Formalin	100	ml
- Sodium phosphate monobasic	4	g
- Sodium phosphate dibasic	6.5	g
- Distilled water	900	ml

Karnovsky's fixative

- 0.2 M phosphate buffer	50	ml
- 10 % paraformaldehyde	20	ml
- 25 % glutaraldehyde	10	ml

จะได้น้ำยาดอง 100 ml ซึ่งประกอบด้วย 2% paraformaldehyde และ 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4

Karnovsky's laxative, Sodium Cacodylate

Solutio A

Paraformaldehyde	2	g
Distilled Water	20	ml
ปรับ pH ด้วย NaOH 1-3 หยด		

Solution B

50% glutaraldehyde	5	ml
Distilled Water	5	ml ได้ 25% glutaraldehyde 10 ml

Solution C

0.2 M Sodium Cacodylate	50	ml	} Buffer
0.2 M HCl	2.7	m	
Sucrose	1.5	g	

A=20 ml /B=10 ml./C=50 ml; ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ 100 ml แล้วเติม 25 mg

CaCl₂ anhydrous

* 2.5%glutaraldehyde / 2.0 % paraformaldehyde ใน Cacodylate Buffer

Cacodylate 0.2 M pH. 7.2 – 7.3

- Sodium cacedylate	42.8	g
- 1 N HCl	6.9	ml

- D.W. เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 ml
เตรียม [0.1 M โดยเติมน้ำ D.W. เท่าจำนวน 1.2 M ที่ใช้]

2. Osmium tetroxide (OsO₄)

วิธีเตรียม stock OsO₄ solution

สารละลายของ OsO₄ จะใช้หลังจากที่ดองตัวอย่างด้วย aldehyde ชนิดใดแล้วก็ตามเป็น
น้ำยาที่จำเป็นสำหรับเตรียมตัวอย่างด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

OsO₄ มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน ราคาแพงมาก บรรจุในหลอด (vial) ขนาด 0.5
กรัม หรือ 1.0 กรัม การเตรียมสารละลาย OsO₄ จะต้องเตรียมในบริเวณที่มีระบบการถ่ายเทอากาศที่
ดีที่สุด หรือในตู้ดูดควัน (Fume hood) เพราะไอของ OsO₄ ทำลายเยื่อปอดทางเดินหายใจ สำหรับ
เครื่องแก้วที่จะใช้ในการเตรียมจะต้องสะอาดปราศจากสารเคมีตกค้างและจัดเตรียมไว้เพื่อการนี้
โดยเฉพาะ

- การเตรียม 4% OsO₄ aqueous solution (stock)

ล้างหลอดบรรจุ OsO₄ ให้สะอาดเช็ดให้แห้งแล้วห่อหลอดที่บรรจุ OsO₄ นี้ด้วยกระดาษเช็ด
เลนส์ ทูบให้หลอดที่ถูกห่อแตกแล้วจึงถ่ายลงในขวดแก้วสีชา

ถ้าใช้ OsO₄ 1 กรัม จะต้องเติมน้ำให้ได้ 25 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ให้ค้างคืนในตู้ดูดควันจนได้
สารละลายสีเหลืองอ่อน (สีฟางข้าว) กรองบรรจุลงในขวดใหม่ ปิดจุกด้วยพาราฟินแล้วเก็บไว้ในที่
ปลอดภัยควรมีอุปกรณ์ดูดควัน (เวลาใช้จะต้องเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สังเกตสีของน้ำยาถ้า
สีเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือสีเทาดำแสดงว่าน้ำยาเสื่อมสภาพต้องเตรียมใหม่)

- การเตรียม 1% osmium tetroxide ใน phosphate buffer pH 7.2

Pipette 4% OsO₄ (stock) มา 1 ส่วน เติมน้ำ phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน

3. การเตรียม 0.1 M phosphate buffer

-เตรียม 0.2 M dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄ · H₂O) ----สารละลาย A

-เตรียม 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄ · H₂O) -----สารละลาย B

สารละลาย A	สารละลาย B
ชั่ง Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O 35.61 g	ชั่ง NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 27.60 g
or Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 53.65 g	or NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 31.21 g
or Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 71.61 g	ละลายน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 ml
หรือชั่ง Na ₂ HPO ₄ anhydrous 28.39 g	
ละลายน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 ml	

เตรียมสารละลาย buffer ให้ได้ 0.1 M phosphate buffer โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B และน้ำกลั่น ตามสัดส่วนดังนี้ เพื่อให้ได้ pH ตามต้องการ จะได้ buffer มีปริมาตร 100 ml.

pH ที่ต้องการ	สารละลาย A (ml)	สารละลาย B (ml)	Distilled water (ml)
7.0	30.5	19.5	50
7.2	36.0	14.0	50
7.4	40.5	9.5	50
7.6	43.5	6.5	50
7.8	45.75	4.25	50

- ถ้าเติมน้ำกลั่นความเข้มข้นจะเท่ากับ 0.1 M
- ถ้าไม่เติมน้ำกลั่นจะได้ความเข้มข้น 0.2 M

4. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อ (staining)

Harris' s Heamatoxylin

Heamatoxylin	5	g
Absolute alcohol	50	ml
Aluminium Ammonium Sulfate (Ammonium alum)	100	g
Mercuric oxide	2.5	g
Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม

ละลายสี Heamatoxylin ใน Absolute alcohol โดยใช้ความร้อนช่วย (ทำบน hot plate) และละลาย Ammonium alum ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อนช่วยเช่นกัน ยกออกจากความร้อน แล้วจึงผสมสารละลาย 2 อย่างเข้าด้วยกัน แล้วรีบนำไปต้มต่อให้เดือด (จำกัดเวลาในการต้ม ประมาณ 1 นาที) ระหว่างนี้ต้องคนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลา ยกออกจากความร้อนแล้วค่อยๆ เติม Mercuric oxide 2.5 g ยกกลับไปให้ความร้อนใหม่ เคี่ยวให้เดือดปุดๆ คอยคนด้วยแท่งแก้วเรื่อยๆ จนกระทั่ง Mercuric oxide ที่ลอยเป็นฝ้าอยู่ผิวหน้าละลายเข้ากันดีกับสารละลาย จะเห็นว่ามีสีม่วงเข้ม ยกออกจากความร้อนแล้วรีบแช่น้ำให้เย็น เมื่อสีเย็นสามารถใช้ได้ทันที ให้เติมกรดแอสซิติค เข้มข้น 2-4 ml ต่อ 100 ml ของสารละลาย

Eosin**1% stock alcoholic eosin (Luna, 1968)**

- | | | |
|--|----|----|
| - Eosin y, water soluble | 1 | g |
| - Distilled water | 20 | ml |
| ละลาย Eosin y ในน้ำจนเข้ากันดีแล้วเติม | | |
| - 95% Ethyl alcohol | 80 | ml |

Working solution

- | | | |
|----------------------------|---|------|
| - 1% stock alcoholic eosin | 1 | ส่วน |
| - 80% Ethyl alcohol | 3 | ส่วน |

ก่อนใช้ให้เติม กรดแอซติกเข้มข้น 1-1.5 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตรของสี

5. การย้อมตัวอย่างประเภทเนื้อเยื่อแผ่นบาง (thin section)**Uranyl acetate**

- | | | |
|------------------|----|----|
| - Uranyl acetate | 5 | g |
| - 50% ethanol | 95 | ml |

ชั่ง Uranyl acetate เติลงใน 50% ethanol คนหรือใช้เครื่องละลายสารในที่มืด อย่างน้อย 2 ชั่วโมงหรือ 1 คืนกรองและเก็บในขวดสีชาที่ห่อหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เก็บไว้ในตู้เย็นและใช้ที่อุณหภูมิห้อง

Lead citrate

- | | | |
|---|------|------|
| - Lead citrate | 0.25 | g |
| - น้ำกลั่นที่ต้มเดือดและไล่อากาศออกแล้ว (และเย็นแล้ว) | 50 | ml |
| - Sodium hydroxide | 1 | เม็ด |

สีย้อม thin section**Uranyl acetate [UA]**

1. ชั่ง UA 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น (distilled water) 10 cc D.W.
2. ผสมแล้วปั่น 10 นาที
3. ทิ้งให้เย็น
4. ใช้ pipette ดูเฉพาะของเหลวออกเก็บไว้ในขวดสีชา
5. ก่อนใช้ดู UA ในข้อ 4 มา 1 หยด ผสมลงใน 100% ethanol 1 หยด

Lead Citrate [L.C.] pH=12

1. เติม L.C 0.25 g ลงในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดไล่อากาศออกแล้ว (และเย็นแล้ว) 50 ml
2. เติม Sodium hydroxide 1 เม็ด ลงไป
3. ละลาย 1 x 2 (คนจนละลายหมด)

6. การเตรียมพลาสติกอาราไดต์ 502 ตามสูตรของ Luft (1961)

- เรซิน อาราไดต์ 502
- สารที่ช่วยทำให้พลาสติกแข็งขึ้น DDSA 46 ml
- ตัวเร่งให้พลาสติกแข็ง DMP—30 44 หยด

ใช้ไม้คนให้เข้ากัน เมื่อผสมเสร็จแล้วเก็บส่วนที่เหลือในหลอดฉีดยาและปิดด้วย parafilm ไม่ให้อากาศเข้า เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
กระบวนการทำสไลด์ โดยกรรมวิธีพาราฟิน

1. การเก็บตัวอย่าง (specimen collecting)

การเก็บตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากเพราะเนื้อเยื่อสัตว์ที่เก็บจากสัตว์ที่ทำให้สลบหรือเพิ่งตายตัดแต่งเป็นรูปลูกบาศก์ หน้าตัดเรียบ ขนาดไม่หนาหรือใหญ่เกินไป ไม่ควรหนาเกิน 0.5 เซนติเมตร ล้างเนื้อเยื่อที่มีเลือดและน้ำเหลืองปนด้วยน้ำเกลือ (normal saline) หรือ 0.9% NaCl โดยเตรียมจาก NaCl จำนวน 9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 ซีซี

2. การคอนเนื้อเยื่อปลานิด (fixation)

นำเนื้อเยื่อที่เก็บอย่างถูกวิธี ตัดแต่งสวยงามตามต้องการแล้วมาแช่ในสารละลายคอนเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ให้มีสภาพใกล้เคียงขณะที่มีชีวิตมากที่สุด ทั้งนี้ต้องเลือกใช้น้ำยาคอนให้ถูกต้อง เหมาะสม และใช้ปริมาณที่เพียงพอ โดยให้น้ำยาคอนท่วมเนื้อเยื่อแช่เก็บไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น

3. การล้างสารละลายออกจากเนื้อเยื่อ (washing)

นำชิ้นเนื้อที่คอนด้วย 10% neutral buffer formalin ใส่กลับใส่เนื้อเยื่อพร้อมเขียนรายละเอียด (label) แล้วใส่ในบีกเกอร์นำไปวางไว้ใต้ก๊อกน้ำ ให้เปิดน้ำประปาไหลผ่าน (running water) ควรล้างนาน 30 นาที - 1 ชั่วโมง

4. การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)

ในการขจัดน้ำออกจากเซลล์นั้นต้องดึงออกทีละน้อยเพื่อไม่ให้เซลล์เสียรูปร่างมากเกินไป สารเคมีที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) คือ ethanol โดยเริ่มจาก ethanol ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาสูง ความแตกต่างของความเข้มข้นไม่ควรเกิน 15-20% เช่น 70% ethanol, 80% ethanol, 95% ethanol และ absolute ethanol ตามลำดับ

5. การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization)

เป็นการล้างแอลกอฮอล์ออกจากเนื้อเยื่อและทำให้เนื้อเยื่อมีลักษณะใส โดยการแทนที่ด้วย xylene ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางนำพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ เปลี่ยนใหม่ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าดึงน้ำออกอย่างสมบูรณ์

6. การแทรกซึมเนื้อเยื่อด้วยสารตัวกลาง (infiltration)

เป็นการทำให้พาราฟินที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อและเซลล์ เพื่อเป็นการเสริมโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อให้แข็งเท่าเทียมกัน และสม่ำเสมอโดยตลอด สารเคมีที่ใช้คือ paraffin wax ต่อมามีการพัฒนาโดยเติมพลาสติกเข้าไปในพาราฟิน เรียกว่า พาราพลาสติก (paraplast) ที่มีจุดหลอมเหลว ที่ 56-60 °C

7. การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

เป็นการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินเหลว วิธีการฝังทำได้โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน (dispenser) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่ร้อนซึ่งมีที่ทำให้พาราฟินหลอมเหลวและสำหรับวางในการเตรียมตัวอย่าง อีกส่วนทำความเย็นเพื่อทำให้พาราฟินแข็งตัว การฝังหยอดพาราฟินเหลวใส่กระทงโลหะ (mould) ใส่เนื้อเยื่อลงไป จัดให้เนื้อเยื่ออยู่ตรงกลางกระทงโลหะให้เอาด้านผิวหน้าตัดเรียบหรือด้านที่ต้องการตัดไว้ด้านล่าง แล้วนำไปวางในพื้นที่ที่ทำความเย็น วางกรอบพลาสติก (embedding ring) บนกระทงโลหะพอดีกันดีแล้ว เติมพาราฟินเหลวให้ท่วมตัวอย่าง แล้วทำให้พาราฟินรอบๆ เนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลง โดยวางบนส่วนทำความเย็นหรือถาดน้ำแข็งทิ้งไว้ให้แข็ง แล้วแกะออกจากกระทงโลหะ นำไปแช่ในตู้เย็นให้บล็อกลึกเย็นก่อนแล้วตัดด้วยเครื่องมือโครโทมต่อไป

8. การตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องมือโครโทม (rotary microtome)

เป็นการตัดเนื้อเยื่อที่อยู่ในแท่งพาราฟินแข็ง (paraffin block) ให้บาง 4-5 ด้วยเครื่องมือโครโทม โดยให้ด้านบนและด้านล่างขนานกัน เพื่อการเกิดแถบ (ribbon) ของ section

9. การติดเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์ (mounting)

สารเคมีที่ใช้ในการติดเนื้อเยื่อกับแผ่นสไลด์ (mounting) คือ ใส gelatin ประมาณ 0.5 % ในน้ำกลั่นในอ่างน้ำอุ่น (water bath) สำหรับลอย section หรือในการลอยเทคนิคที่ช่วยให้สไลด์ยึดไม่ย่นคือลอย section ใน 30% ethanol บนแผ่นแก้วหรือพลาสติกข้างนอกก่อนแล้วนำไปลอยในอ่างน้ำ ใช้สไลด์ตัด section ให้ติดตรงกลางสไลด์แก้ว เขียนชื่อเนื้อเยื่อที่ขอบฟ้าของสไลด์ด้วยดินสอ แผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อติดอยู่ต้องทำให้แห้งสนิทอุ่นสไลด์ (slide warmer) ตลอดทั้งคืนหรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิ 56-66 °C อย่างน้อย 30 นาที

10. การย้อมสีเนื้อเยื่อ (staining)

เพื่อให้เห็นความแตกต่างของโครงสร้างของเนื้อเยื่อและองค์ประกอบของเซลล์
เพื่อความปลอดภัยขั้นตอนการย้อมสีควรทำในตู้ดูดควัน (hood)

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนและการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automatic tissue processing)



Step	สารละลาย	เวลาที่ใช้ (ชั่วโมง)	ขบวนการ
1	70% Ethanol	1	Dehydration
2	80% Ethanol	1	Dehydration
3	95% Ethanol I	1	Dehydration
4	95% Ethanol II	1	Dehydration
5	95% Ethanol III	1	Dehydration
6	Absolute ethanol I	1	Dehydration
7	Absolute ethanol II	2	Dehydration
8	Absolute ethanol III หรือ Acetone	2	Dehydration
9	Xylene I	1	Clearing
10	xylene II	1	Clearing
11	Melted paraffin I (56-60 °C)	3	Infiltration
12	Melted paraffin II	3	Infiltration

หมายเหตุ เวลาที่ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม

ภาคผนวก ง
วิธีการเตรียมบล็อกพลาสติก

Tissue Processing

1. Fixative : 2% Glutaraldehyde, 2% Paraformaldehyde หรือ Karnovsky's fixative fix overnight เก็บในตู้เย็น
2. Wash : ล้างละลาย Buffered solution 15 min/set, 4 set
3. Postfix : โดยใช้ Osmium tetroxide (OsO₄) 1-2 hrs.
4. Wash : โดยใช้ Buffer solution 15 min/set, 2set ถ้างจน ไม่มีตะกอนของ OsO₄ ถึงใช้ได้
5. Dehydration : โดยใช้ instillation
 - a. Ethyl alcohol 30% 10 min
 - b. Ethyl alcohol 50% 10 min
 - c. Ethyl alcohol 70% 10 min
 - d. Ethyl alcohol 80% 10 min
 - e. Ethyl alcohol 90% 10 min
 - f. Ethyl alcohol 95% 3 ครั้ง ๆ ละ 10 min
 - g. absolute alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 10 min
 - h. propylene 10 min
 - i. Embedding 1 part + propylene 3 part 1 hr
 - j. Embedding 1 part + propylene 3 part 1 hr
 - k. Embedding 3 part + propylene 3 part 1 hr
 - l. Pure embedding Overnight
 - m. Embedding 48 hrs

- fixative : ถ้ายังไม่ process ต่อ ให้เปลี่ยน fixative ทุก ๆ 4 สัปดาห์
- Wash : ให้ใช้ Buffered solution ดีกว่าสำหรับ Karnovsky's fixative
- เวลา dehydrate ต้อง dehydrate ทั้งขวดรวมฝาด้วย เพราะจะมีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝาทำให้ tissue ยังมีน้ำอยู่
- ถ้าไม่เข้าเครื่องอัดความดันจะมีฟองอากาศเกาะตาม tissue

ภาคผนวก จ
วิธีการเตรียมใบมีดแก้ว

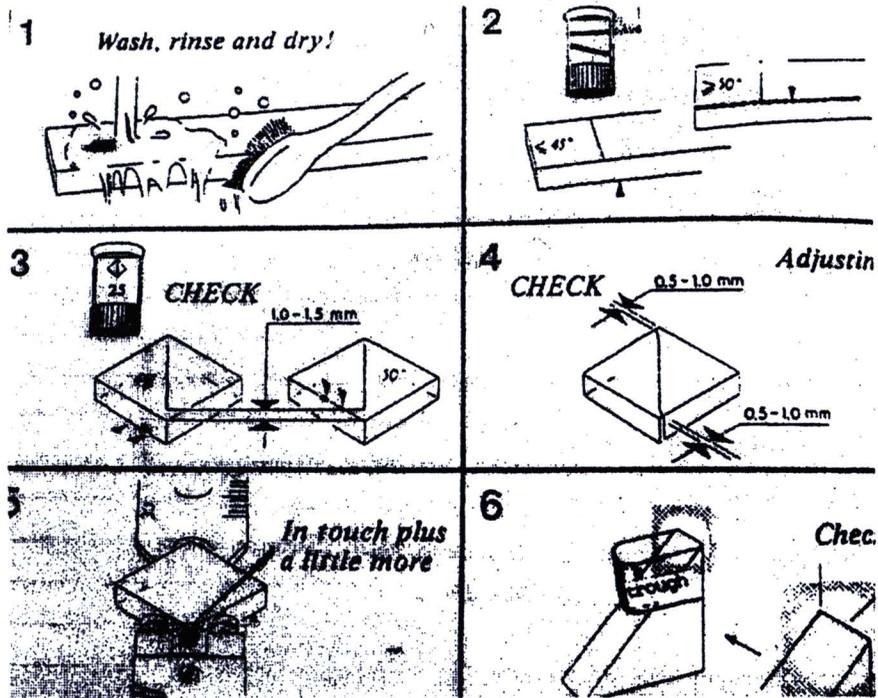
มีดสำหรับตัดตัวอย่าง (ultramicrotome's knives)

มีดแก้วหรือมีดกระจก (glass knife) ทำจากแผ่นแก้ว มีขนาด ความหนา 3 มิลลิเมตร (1/4 นิ้ว) กว้าง 2.5 เซนติเมตร (1 นิ้ว) แท่งแผ่นแก้วขนาดดังกล่าว มีจำหน่ายโดยบริษัทที่ผลิตอุปกรณ์ทำมีดแก้ว (glass knife maker) มีดแก้วเป็นวัสดุสิ้นเปลืองก็จริงอยู่แต่จัดว่าประหยัดเศรษฐกิจได้ในระยะสั้น หรือในกรณีที่หน่วยงานที่ปฏิบัติการด้าน TEM ขาดทุนทรัพย์สำหรับซื้อมีดเพชร

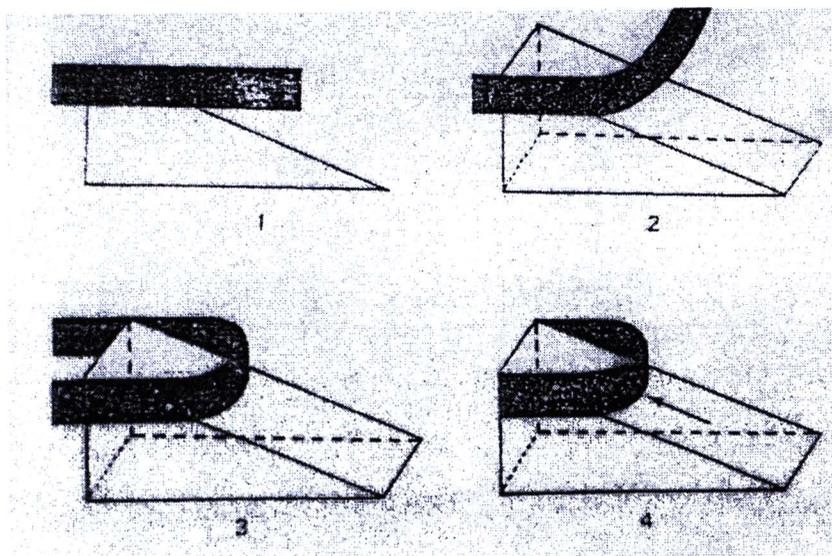
แผ่นแท่งแก้วที่นำมาทำมีดเป็นแท่งยาวประมาณ 40-45 เซนติเมตร จากแผ่นแท่งแก้ว (glass strip) นี้สามารถนำมาตัดทำเป็นมีดแก้วที่มีลักษณะสามเหลี่ยม มีใบมีดอยู่ด้านหนึ่งอันเกิดจากการทำแผ่นแก้วให้แตกออกจากกันโดยการตัดและอัดแรงซึ่งใช้อุปกรณ์พิเศษที่เรียกว่า glass knife maker ฉะนั้นวิธีการทำมีดแก้วจึงเป็นสิ่งที่ง่ายขาย และอธิบายไว้ชัดเจนในหนังสือคู่มือประกอบอุปกรณ์โดยบริษัทผู้ผลิต

ข้อควรปฏิบัติสำหรับการทำมีดแก้ว คือ การทำความสะอาดของแผ่นแท่งแก้ว ก่อนที่จะนำมาตัดเป็นมีด โดยการล้างด้วยผงซักฟอก เพื่อชำระล้างไขมัน และสิ่งสกปรกให้หมดจดเสียก่อนเมื่อตัดเป็นมีดแล้ว ก็รีบทำช่องสำหรับใส่น้ำ (through หรือ boat) เทปดำ หรือทึบแสงแล้วรีบนำไปใช้ และอีกวิธีหนึ่งคือติด Boat สำเร็จโดยใช้น้ำยาทาเล็บใสไม่มีสีทาที่ขอบของ boat แล้วนำไปติดกับ

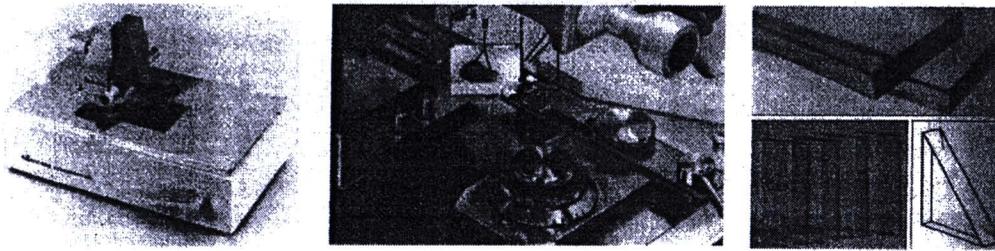
มีดแก้วที่มีลักษณะสามเหลี่ยมทาน้ำยาทาเล็บใสให้รอบ ๆ แล้วรอให้แห้งก่อนนำไปใช้ ข้อเสียเปรียบของการใช้มีดแก้ว คือ ต้องรีบทำรีบใช้ มิฉะนั้นจะสึกกร่อนด้วยการ oxidation ของ silicon ภายในเนื้อกระจก ฉะนั้น เพื่อที่จะให้ได้ผลดี ควรเตรียมมีดแก้วใหม่ทุกครั้งที่มีการทำ section ข้อดีของมีดแก้วอันหนึ่ง คือ สามารถเปลี่ยนแก้โดยไม่ต้องเสียเวลาในการทำแล้วทิ้งไปเมื่อเสื่อมสภาพ หรือไม่คมพอ



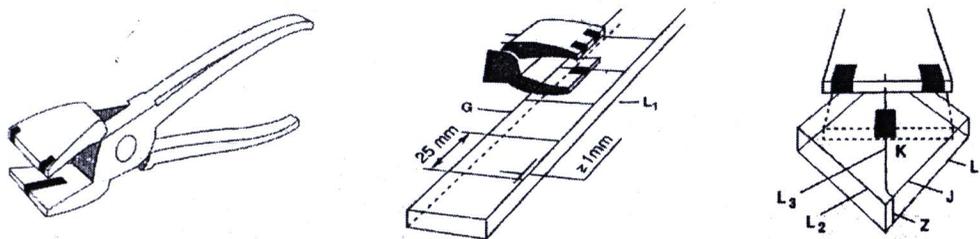
ภาพที่ 20 ขั้นตอนการเตรียมมิดแก้วเพื่อใช้ในการตัด block



ภาพที่ 21 ใช้เทคนิคใช้พันสายไฟมาทำเป็น ช่องบรรจุน้ำ



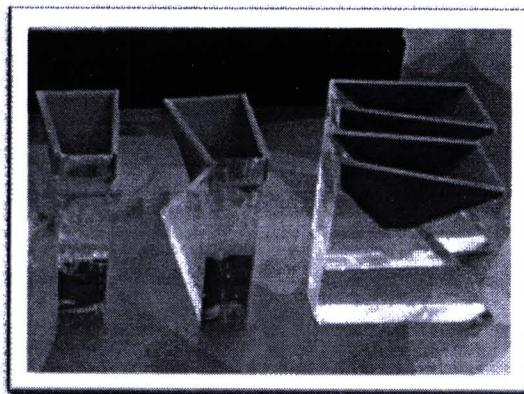
ภาพที่ 22 เครื่องทำใบมีดแก้วกำลังหักแท่งแก้วสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้เป็นมีดรูปสามเหลี่ยม (Bozzola and Russell, 1992 อ้าง โดยศุภลักษณ์, 2545)



ภาพที่ 23 แสดงการใช้คีมหักแท่งแก้วให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสและทำใบมีดแก้วให้เป็นมีดรูปสามเหลี่ยม (Bozzola and Russell, 1992 อ้าง โดยศุภลักษณ์, 2545)



ภาพที่ 24 โบทและใบมีดแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ติดกับโบทเรียบร้อยแล้ว (Bozzola and Russell, 1992 อ้าง โดยศุภลักษณ์, 2545)



ภาพที่ 25 ใบมีดแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ติดกับโบทเรียบร้อยแล้ว



ภาคผนวก ฉ

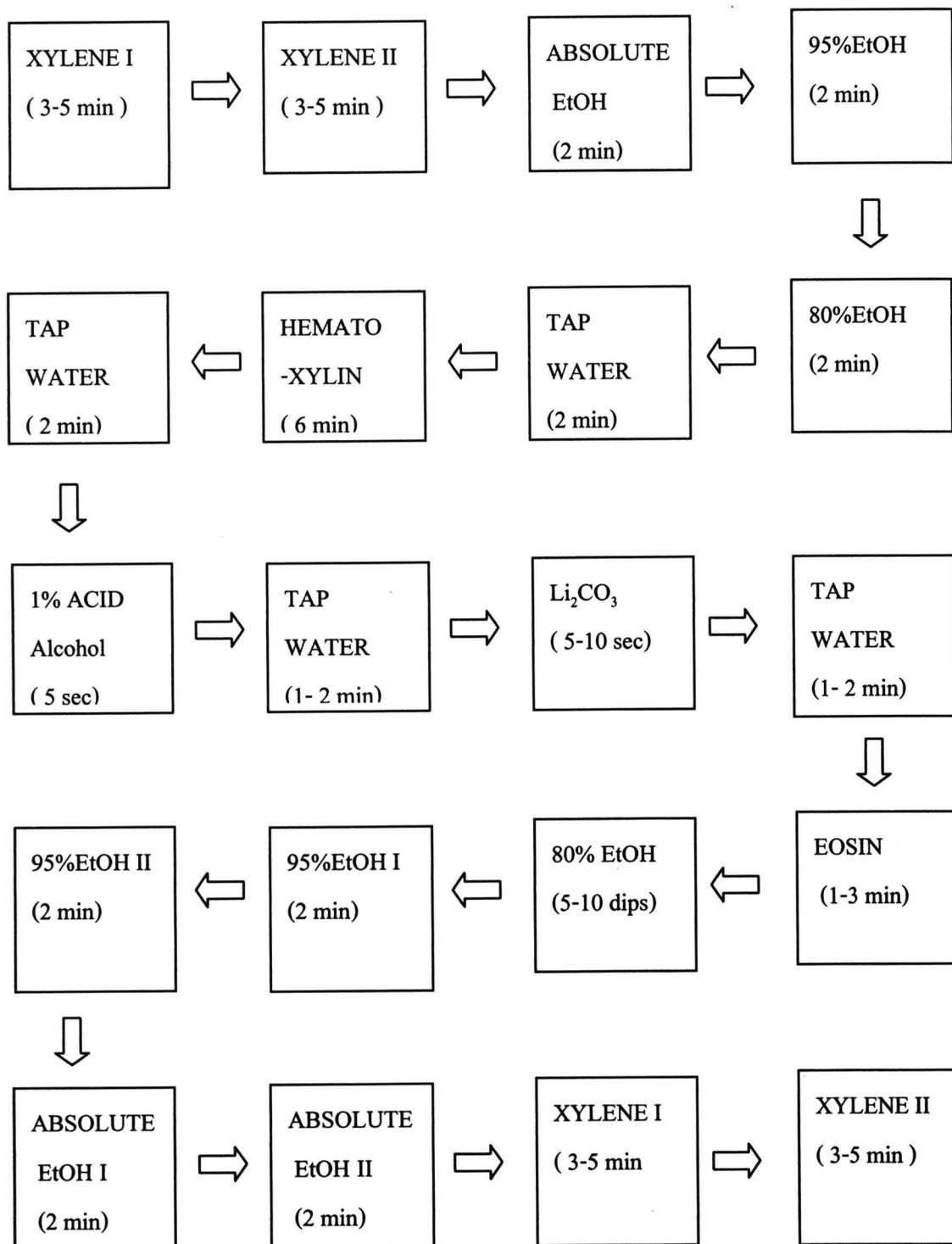
วิธีการย้อมสี Heamatoxylin & Eosin

1. Deparaffinnization section ใน Xylene 2 ครั้งๆ 2 นาที
2. Hydration ค้างน้ำเข้าเซลล์และล้าง Xylene โดยจุ่มใน Absolute alcohol, 95% ethanol 80% ethanol และน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาตามลำดับ อย่างละ 1 ครั้งๆ ละ 2 นาที
3. ย้อมด้วยสี Haematoxylin 6 นาที
4. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลาๆ นาน 2 นาที จะทำให้สีติดดีขึ้น
5. ล้างสีส่วนเกิน (Differentiae) ด้วย 1% acid alcohol โดยจุ่มขึ้นลงอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง ถ้าเนื้อเยื่อติดสีไม่เข้ม จุ่ม 1 ครั้ง สังเกตว่า เนื้อเยื่อจากสีม่วงเข้มออกดำเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อนออกแดงๆ
6. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลา นาน 2 นาที
7. ทำสไลด์ให้เป็นกลางโดยจุ่มใน Saturated Lithium Carbonate จะเห็นว่าเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงินมากยิ่งขึ้น
8. ล้างด้วยน้ำประปาไหลตลอดเวลา นาน 2 นาที
9. ย้อมสีซ้ำด้วย Eosin (Working Solution) นาน 2-5 นาที จะติดสีแดงหรือชมพูเข้ม
10. Dehydration โดยจุ่มขึ้นลงใน 70% Ethanol นาน 30 วินาที - 1 นาที ถ้านานกว่านี้จะทำให้สีซีดจางเพราะ 70% Ethanol จะล้างสี Eosin ออก ผ่านไป 95% Ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที ผ่านไป Absolute Ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. ให้น้ำเยื่อใส ด้วย Xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
12. Mount สไลด์ด้วย permount

ผลการติดสีของเนื้อเยื่อ

Nuclei	ติดสีม่วง-สีน้ำเงินเข้ม
Cytoplasm	ติดสีชมพู
Connective tissue	ติดสีชมพู-แดง
เม็ดเลือดแดง	ติดสีแดงส้ม

ภาคผนวก ข
แผนภูมิแสดงขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H&E)



ภาคผนวก ข
วิธีย่อมติ Ultra thin

1. ตัด parafilm ให้มีขนาดเล็กพอเหมาะวางลงบน petridish
2. หยดสี uranyl acetate ลงบนแผ่น parafilm
3. ใช้ forcep หยิบกริดวางคลำบนหยดสี
4. ปิดฝา petridish นำเข้าอบในตู้อบ (60 °C) ใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที
5. นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น โดยจุ่มลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นจำนวน 3 บีกเกอร์ ๆ ละ 10 จุ่ม
6. ซับกริดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง
7. หยดสี lead citrate ลงบน parafilm (petridish ต้องมีเกล็ดของ NaOH วางอยู่รอบๆ)
8. คลำกริดลงบนหยดสี
9. ปิดฝา petridish ใช้เวลาย้อมประมาณ 30 นาที
10. ล้างด้วยสารละลาย NaOH โดยการจุ่ม 10 จุ่ม และล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3
ในบีกเกอร์ ๆ ละ 10 จุ่ม
11. ซับกริดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง

ภาคผนวก ฅ

Flow chart สำหรับการเตรียมตัวอย่างทางด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

