

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

เครื่องแก้ว (glassware)

1. ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับใส่ตัวอย่างขนาด 5-10 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. บีกเกอร์ (beaker)
3. กระบอกตวง (cylinder)
4. ปิเปต (pipette)
5. ขวดแก้วสีน้ำตาลฝาเกลียว ขนาด 100, 500, 1000 มิลลิลิตร
6. ขวดแก้วใสฝาเกลียว ขนาด 100, 500 มิลลิลิตร
7. กรวย

อื่น ๆ

1. คีม (forcep)
2. Petri dish
3. ภาชนะสำหรับการย้อมสี (jar)
4. ไมโครโทม (rotary microtome) และใบมีด
5. สไลด์วอร์มเมอร์ (slide warmer)
6. เครื่องซั่งสารเคมี
7. เครื่องวัด pH
8. หม้อต้มน้ำ (water bath)
9. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (magnetic stirrer)
10. ตู้อบ (oven)
11. ที่ใส่สไลด์สำหรับย้อมสี (rack)
12. ตู้ดูดไอสารเคมี (hood)
13. แท่นยึดตัวอย่าง (metal stub)
14. flat mode หรือ beam capsule
15. ultramicrotome (REICHERT ULTRACUT)
16. knife maker (7800 B LKB)
17. glass strips
18. TEM (HITACHI H-600)
19. CPD (HITACHI HCP-2)
20. ion coater (EIKO IB-3)
21. SEM (HITACHI S -3200 N)
22. ถังบรรจุฟิล์มสำหรับล้าง (developing tank with loading device)

23. ถาดใส่น้ำยาสำหรับล้างฟิล์ม
24. ตู้อบฟิล์ม
25. เครื่องอัดขยายภาพพร้อมฐานยึดกระดาษ (enlarger with eabel)
26. นาฬิกาจับเวลา

เคมีภัณฑ์และวัสดุที่จำเป็น

1. 10% paraformaldehyde
2. 25% glutaraldehyde solution
3. NaOH (sodium hydroxide)
4. alcohol (30%, 50%, 70%, 80%, 95% และ 100%)
5. xylene
6. aluminum ammonium alum
7. mercuric oxide
8. M-Z mount
9. osmium tetroxide (OsO₄)
10. amyl acetate
11. gold
12. acetone
13. silver paint
14. propylene oxide
15. aradite 512
16. Dodecenyl succinic anhydride (DDSA)
17. Nadic methyl anhydride (NMA)
18. 2, 4, 6 tridimethylaminomethyl phenol (DMP 30)
19. uranyl acetate
20. lead citrate
21. methanol
22. toluidine blue
23. metale
24. sodium carbonate
25. potassium bromide
26. ammonium chloride
27. acetic acid

28. boric acid

วัตถุดิบเปลี่ยน

1. น้ำยาทาเล็บชนิดใส
2. น้ำยาล้างฟิล์ม อัดขยายภาพขาวดำ (photographic chemicals, developer, stop-bath, fixer)
3. ถุงมือยาง
4. ฟิล์มสำหรับถ่ายภาพสี
5. ฟิล์มสำหรับถ่ายสไลด์สี ขนาด 35 มิลลิเมตร
6. ฟิล์มสำหรับถ่ายภาพ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
7. กระดาษอัดรูป (photographic paper, grade F3, 4 และ 5)
8. *copper* grid ขนาด 200 mesh, 250 mesh และ 400 mesh
9. ใบมีด (razor blade, double-edged)
10. วัสดุสำนักงาน ได้แก่ แผ่น CD, letter press, สมุดบันทึก, กระดาษ, ถ่ายเอกสาร, หมึกพิมพ์งาน เป็นต้น
11. พาราฟิล์ม (parafilm)
12. กระดาษกรอง (filter paper)
13. กระดาษใบสำหรับขี้ (wax paper)
14. แผ่นอะลูมิเนียม (aluminum wrapping foil)
15. beem capsule หรือแคปซูลยา เบอร์ 00
16. *milipore filter* ขนาดเล็ก
17. หลอดฉีดยาพลาสติก (plastic syringe, 10-20 cc)
18. ขวดหรือหลอดตัวอย่างขนาดเล็กมีจุกหรือฝาเกลียว

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีต่างๆ

1. วิธีเตรียม modified Karnovsky's fixative

- distilled water	100 มิลลิลิตร
- 10% paraformaldehyde in water	20 มิลลิลิตร
- 0.1 M NaOH	10 มิลลิลิตร
- 25% glutaraldehyde in water	10 มิลลิลิตร
- 0.2 M phosphate buffer	50 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายข้างต้น แล้วปรับเปลี่ยน pH ด้วย NaOH

2. วิธีเตรียม 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2)

เตรียม 0.2 M sodiumphosphate monobasic solution

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	31.2 กรัม
---	-----------

นำ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มา 31.2 กรัมละลายใน distilled water 1 ลิตร

เตรียม 0.2 M sodiumphosphate dibasic solution

- $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61 กรัม
--	------------

จากนั้นนำ 0.2 M sodiumphosphate dibasic solution มา 72 มิลลิลิตรและนำ 0.2

M sodiumphosphate monobasic solution มา 28 มิลลิลิตร รวมกันจะได้ 0.2 M phosphate buffer

(pH 7.2) ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. วิธีเตรียม 0.1 M phosphate buffer

นำ 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) 100 มิลลิลิตร มาแล้วเติม distilled water 100 มิลลิลิตร จะได้ 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร

4. วิธีการเตรียม 1 M NaOH

นำ NaOH มา 40 กรัม ละลายใน distilled water 1 ลิตร

5. วิธีเตรียม 4% osmium tetroxide

นำ OsO_4 1 กรัม ทำให้เป็นสารละลาย ด้วย distilled water จนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร

6. วิธีเตรียม 5% uranyl acetate

นำ uranyl acetate 0.5 กรัมมาทำให้เป็นสารละลายด้วย distilled water 10 มิลลิลิตร เมื่อจะย้อมเจือจางด้วย absolute alcohol ในอัตราส่วน 1 หยด ต่อ 1 หยด

7. วิธีเตรียม Reynold's Lead citrate

- lead nitrate 1.33 กรัม
- sodium citrate 1.76 กรัม
- stain -water 30 มิลลิลิตร

ผสมทั้งสามอย่างเข้าด้วยกันใน flask เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 20 นาทีแล้วเติม 1 M NaOH 8.0 มิลลิลิตร และเติมน้ำลงไปอีกให้ครบ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองก่อนใช้

8. วิธีเตรียม toluidine blue

- toluidine blue 1 กรัม
- borax 1 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเก็บไว้ในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิด

9. วิธีเตรียมพลาสติก (resin)

สารเคมี

1. araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, WA) 30 กรัม
2. epon hardener DDSA (Ted Pella, CA) 25 กรัม
3. epon accelerator DMP-30 (Fluka AG, Switzerland) 42-44 กรัม

วิธีทำ

ชั่ง araldite 502 ได้ 30 กรัม ค่อย ๆ เท DDSA ลงไป คนให้เข้ากัน ค่อย ๆ เท อย่าให้เกิดฟองอากาศ ตูด DMP-30 42-44 หยด ด้วยกระบอกลอยหยดลงใน resin ที่ละลาย คนให้เข้ากัน resin จะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนและใสเป็นสีเหลืองเข้ม

10. วิธีเตรียมน้ำยาล้างอัดภาพขยาย (D-163)

- metal (Kodak, U.S.A.) 2.2 กรัม

- sodium sulphite	75 กรัม
- hydroquinone	17 กรัม
- sodium carbonate	65 กรัม
- potassium bromide	2.8 กรัม

ต้มน้ำ 600 มิลลิลิตรให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมสารเคมีทุกชนิด คนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อไปใช้จะต้องเจือจาง D-163 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน

11. วิธีเตรียมน้ำยาล้างฟิล์ม (D-19)

- metal (Kodak, U.S.A.)	9	กรัม
- sodium sulphite	90	กรัม
- hydroquinone	8	กรัม
- sodium carbonate	52.5	กรัม
- potassium bromide	6	กรัม

ต้มน้ำ 600 มิลลิลิตรให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมสารเคมีทุกชนิด คนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อนำไปใช้จะต้องเจือจาง D-19 1 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วน

12. วิธีเตรียมน้ำยาล้างฟิล์ม (D-76)

- metal (Kodak, U.S.A.)	2	กรัม
- sodium sulphite	100	กรัม
- hydroquinone	5	กรัม
- borax	2	กรัม

ต้มน้ำ 600 มิลลิลิตรให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมสารเคมีทุกชนิด คนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อไปใช้จะต้องเจือจาง D-76 1 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วน

13. วิธีเตรียมน้ำยาคงสภาพ (F-7)

- hypo (sodiumthiosulphate)	360	กรัม
- ammonium chloride	50	กรัม
- sodium sulphite	15	กรัม
- acetic acid	48	กรัม
- boric acid	7.5	กรัม

- potassium alum 15 กรัม

ต้มน้ำ 600 มิลลิลิตร ให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เติมสารเคมีทุกชนิดจนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้ต้องเจือจาง F-7 1 ส่วนต่อน้ำ 4 ส่วน

14. วิธีเตรียมน้ำยาหยุดภาพ

ละลาย 28% acetic acid 48 มิลลิลิตร ด้วย distilled water จนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
อื่น ๆ

1. การทำความสะอาด grid

สารที่ใช้ทำความสะอาด (1 % acetic acid) ประกอบด้วย

- concentrate acetic acid 5 มิลลิลิตร
- 50 % ethyl alcohol 95 มิลลิลิตร

วิธีทำความสะอาด grid ทำดังนี้

1. จุ่ม grid ลงใน 1 % acetic acid 15-30 วินาที
2. จุ่มล้างด้วยน้ำกลั่น

2. การย้อม thin section

วัสดุอุปกรณ์

1. ปากคีบปลายแหลม
2. กริดมี section
3. น้ำกลั่น-ต้ม-กรอง (boiled-millipore-filtered distilled water) หรือ stain-water
4. NaOH pellets
5. 5% uranyl acetate
6. lead citrate
7. กระดาษกรอง

วิธีย้อม

1. หยด 5% uranyl acetate บนแผ่น parafilm ซึ่งตรึงไว้กับที่ ใน petidish
2. วาง grid ด้านมี section ให้คว่ำลง ให้ grid ลอยอยู่บนผิว uranyl acetate ปิดด้วยกล่องทึบทิ้งไว้ 20-30 นาที
3. ล้าง grid ด้วย stain-water 2 ครั้ง ละครึ่ง 30 วินาที
4. หยด lead citrate ลงบนแผ่น parafilm ใหม่ แล้ววาง NaOH ชนิดเม็ดใกล้ หยด lead citrate
5. ย้อม grid ภายใน lead citrate 10 นาที โดยให้ด้านของ grid ที่ม Section พงายขึ้นปิดผาบริเวณหยดของ lead citrate เพื่อป้องกันไม่ให้คาร์บอนไดออกไซด์เข้าไป
6. ล้าง grid ด้วย 0.02 M NaOH 2 ครั้ง ละครึ่ง 30 วินาที
8. ซับ grid ให้แห้งด้วยกระดาษกรอง
9. นำไปตรวจและศึกษาด้วยกล้อง TEM

3. การล้างฟิล์ม SEM และ TEM

น้ำยาที่ใช้ในการล้างฟิล์ม

- Developer D-76
- F-7: Fixer
- stop bath (1% acetic acid)
- wetting agent (photoflo)

อุปกรณ์

- ถังบรรจุฟิล์มสำหรับล้าง
- ถาดใส่น้ำยาสำหรับล้างฟิล์ม
- ตู้อบฟิล์ม

วิธีทำ

1. ถอดฟิล์มที่ถ่ายรูปนำไปบรรจุลงในถังบรรจุฟิล์มเพื่อล้างในห้องมืด
2. เทน้ำยา Developer ลงในถังบรรจุฟิล์ม เขย่าทุก 10-15 วินาทีให้น้ำยาทั่วถึงแผ่นฟิล์มเป็นเวลา 10-15 นาที
3. เทน้ำยา Developer ทั้ง แล้วเติมน้ำยา stop bath เขย่าทุก 10-15 วินาที เป็นเวลา 1-2 นาที
4. เทน้ำยา stop bath ทั้ง แล้วเติมน้ำยา fixer เขย่าทุก 10-15 วินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทน้ำยาเก็บไว้
5. ล้างในน้ำที่ไหลเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อขจัด fixer ออก ถอดฟิล์มออกจากถังบรรจุฟิล์มแล้วนำไปจุ่มลงใน photoflo
6. นำไปผึ่งในตู้อบฟิล์ม เพื่อให้ฟิล์มแห้งจะได้เป็นฟิล์มเนกาทีฟ (film negative)

4. การล้างฟิล์ม TEM

น้ำยาที่ใช้ในการล้างฟิล์ม

- Developer D-19
- F-7: fixer
- stop bath (1% acetic acid)
- wetting agent (photoflo)

อุปกรณ์

- ถาดสำหรับใส่น้ำยาล้างฟิล์ม

วิธีทำ โดยทำภายในห้องมืด

1. จุ่มฟิล์มลงใน Developer D-19 ประมาณ 1 นาที
2. จุ่มฟิล์มลงใน stop bath ประมาณ 3-5 นาที
3. จุ่มฟิล์มลงใน fixer ประมาณ 20 นาที เช้าทุก 10-15 วินาที
4. ล้างในน้ำที่ไหลตลอด 30-40 นาที
5. จุ่มลงใน photoflo solution working (1: 200) 1-2 นาที
6. ผึ่งให้แห้งในตู้อบฟิล์ม

5. การอัด-ขยายภาพ

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องอัดขยายภาพ (enlarger) พร้อมฐานยึดกระดาษ (easel)
2. นาฬิกาจับเวลา
3. กระดาษอัดภาพ (photographic paper)
4. น้ำยา Developer D-163
5. น้ำยา stop bath
6. น้ำยา fixer
7. น้ำยา photoflo
8. ถาดใส่น้ำยา ทั้ง 3 ชนิด

วิธีทำ

1. นำ negative film ใส่ในแผ่นยึดฟิล์ม วางในช่องระหว่างดวงไฟและเลนส์ขยายภาพให้ด้านมันของฟิล์มอยู่ด้านบน
2. เปิดไฟในเครื่องขยาย เปิดหน้ากล้องให้กว้างที่สุด
3. ปรับความคมชัดและปรับขนาดของภาพ ปรับหน้ากล้องและตั้งเวลาตามความเหมาะสมของฟิล์ม เลื่อนแผ่นกรองแสงมาบังไว้
4. ใส่กระดาษอัดรูปให้ด้านมันอยู่ด้านบน ในฐานยึดกระดาษ
5. เปิดสวิตช์เครื่องขยายให้ภาพปรากฏบนกระดาษตามเวลาที่ตั้งไว้เลื่อนแผ่นกรองแสงออก
6. นำกระดาษอัดรูปใส่ในถาดที่มีน้ำยา Developer D-163 เช้าไปมา 1-2 นาที จนมองเห็นภาพคมชัด
7. นำมาจุ่มลงใน stop bath เป็นเวลา 10 วินาที
8. จุ่มลงใน fixer 20 นาที เช้าทุก 10-15 วินาที
9. นำมาล้างในน้ำที่ไหลตลอดประมาณ 15-20 นาที

10. จุ่มลงใน photoflo ประมาณ 1-2 นาที
11. นำกระดาษที่ได้ไปฝังให้แห้ง

6. การทำมิดแก้ว

วัสดุอุปกรณ์

1. แท่งแก้ว (glass strips)
2. เครื่องทำมิดแก้ว (glass-knife maker, LKB)
3. กระดาษขาว
4. น้ำยาทาเล็บ

วิธีทำ

1. ล้างแผ่นแท่งแก้วด้วยน้ำยาซักฟอกอย่างอ่อน
2. ล้างน้ำแล้วทำให้แห้ง
3. ตัดแท่งแก้ว ด้วยเครื่องทำมิดแก้ว เพื่อให้ได้มิดแก้วรูปสามเหลี่ยม
4. เลือกมิดแก้วซึ่งเป็นรูปสามเหลี่ยม
5. ติดเทปบนด้านหลังของมิดแก้วเพื่อทำเป็นภาชนะสำหรับรองรับน้ำ (boat)
6. อุดหรือเชื่อมขอบเทปด้านล่างกับมิดแก้วด้วยน้ำยาทาเล็บทิ้งไว้ให้แห้ง
7. นำไปตัดทันที