



ภาคผนวก

มหาวิทาลัยพระพรหม

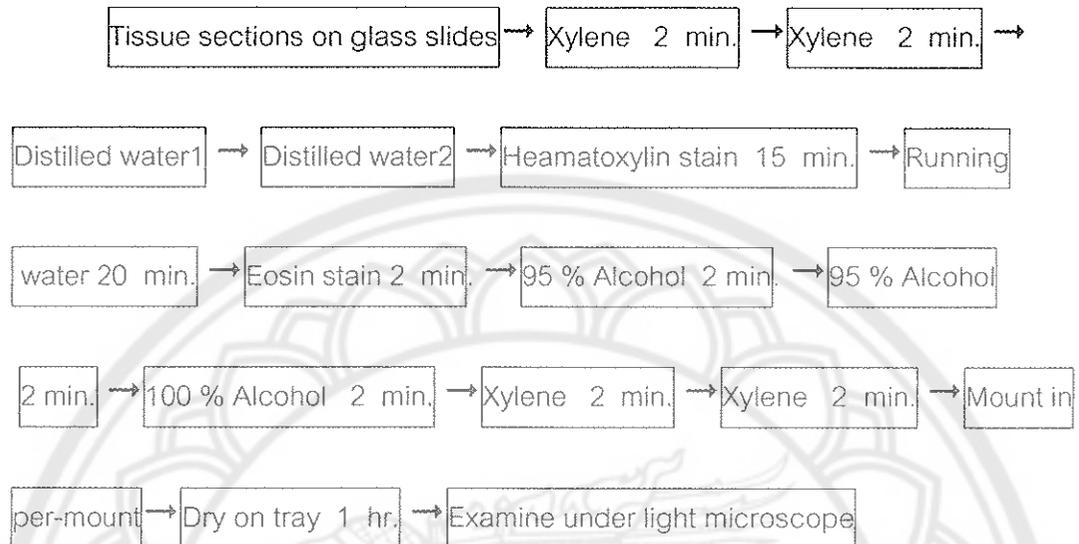
วิธีการตัดชิ้นเนื้อและย้อมสี

1. Tissue Processing system

วางชิ้นเนื้อที่ตัดเรียบร้อยแล้วใน cassettes และทำการล้างดังนี้



2. Tissue staining



การศึกษา Immunohistochemistry ด้วย slides paraffin

1. De-wax ใน

xylene 10 min → xylene 5 → min → 99 % → 95 % alc. 70 % alc.

แช่ใน slides ใน methanol 240 ml. + 30 % H₂O₂ 4 ml → 10 → min ล้าง

slides ในน้ำก๊อก (เปิดน้ำไหล)

2. ต้ม slides ใน Citrate buffer ก่อนย้อม ในหม้อที่มีความดัน จับเวลา 1 → min แช่ใน น้ำก๊อก

3. ย้อม slides ตามขั้นตอนปกติ

หมายเหตุ **antibody บางตัวไม่ต้องต้ม ทำตามข้อ 1 แล้วข้ามไปย้อม slides ได้เลย**

ขั้นตอนการย้อม slides Paraffin section

1. นำออกจาก น้ำก๊อก ล้างใน TBS 1 ครั้ง

2. แช่สไลด์ใน TBS เพื่อเตรียมย้อม

3. เตรียม antibody, blocking, 2, 3

4. หยด blocking serum 100 ul ลงบนสไลด์ → incubate 10 → นาที เสิ้งสไลด์ เพื่อทิ้ง blocking

5. หยด antibody 100 ul ให้ตรงตามสไลด์ ส่วน negative ให้ใช้ TBS หยดแทน ปิดฝา → incubate 30-60 นาที

6. ล้างสไลด์ใน TBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที (เปลี่ยน TBS ทุกครั้ง)

7. หยด 2° 100 → ul ปิด → ฝา incubate 30 นาที

8. ล้างสไลด์ใน TBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที (เปลี่ยน TBS ทุกครั้ง)

9. หยด 3° 100 → ul → ปิดฝา incubate 30 นาที

10. ล้างสไลด์ใน TBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที (เปลี่ยน TBS ทุกครั้ง)

11. หยดสี DAB หรือ สีอื่น ๆ ตามต้องการ ให้ท่วม ปิดฝา → → incubate

ล้างสไลด์ในน้ำไหล (หลังจากล้างน้ำแล้วถ้าจะย้อม double stain ก็เริ่มขั้นตอนที่ 4 ใหม่)

12. รุ่มสไลด์ใน Hematoxylin ~ 30 วินาที → ล้างสไลด์ในน้ำไหล

13. รุ่มสไลด์ใน Scott solution ~ 5 → วินาที ล้างสไลด์ในน้ำไหล

14. dehydrated ใน 70 % alc. → 95 % → alc. → 95% alc. →

99 % alc. → 99 % → alc. xylene xylene **(ระวังหยดน้ำ)**

15. ปิด cover slip ด้วย DPX

16. รอให้สไลด์แห้ง → ดูใต้กล้อง

การเตรียมสารเคมี

1. 10x Phosphate buffered saline

ใช้ 80 g of NaCl, 2 g of KCl, 11.5 g of Na_2HPO_4 , 2 g of KH_2PO_4 , ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. 4% Formaldehyde

Formaldehyde 20 กรัม ละลายใน phosphate buffered saline และปรับปริมาตร 500 มิลลิลิตร การเตรียมต้องให้ water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3. 0.5 M Sucrose in phosphate buffered saline

Sucrose 171.15 กรัม ละลายใน phosphate buffered saline และปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียมน้ำยาเจือจาง (dilute) sperm

NaCl	0.91	g
1% formalin	1	ml
Trypan blue	1	ml

ละลายส่วนผสมต่าง ๆ ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.