

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารและการย้อมเซลล์

1. Routine Harris Hematoxylin and Eosin stain (H&E)

solution :

1. Harris' hematoxylin

Hematoxylin crystal	5.0	gm.
Alcohol 70%	50.0	ml.
Ammonium or potassium alum	100.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
Mercuric oxiden (red)	2.5	gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย hematoxyli crystals ใน alcohol
2. ละลาย alum ใน distilled water โดยใช้ความร้อน
3. ผสมสารละลายที่ได้จากข้อ 1. และข้อ 2. เข้าด้วยกันหลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปต้มให้เดือดให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ (โดยใช้เวลาไม่น้อยกว่า 1 นาที่ พร้อมทั้งใช้ magnetic stirrer ด้วย)
4. หยุดให้ความร้อนแล้วค่อยๆเติม mercuric oxide ซ้ำๆ
5. ให้ความร้อนจนเดือด จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม
6. หยุดให้ความร้อนทันที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็น
7. เติม glacial acetic acid ประมาณ 2-4 ml. ต่อสารละลาย 100 ml.
8. ควรกรองก่อนนำสารละลายมาใช้

2. Eosin solution

1% stock alcoholic eosin

Eosin Y, water soluble	1.0	gm.
Distilled water	20.0	ml.
95% alcohol	80.0	ml.

ละลาย eosin ใน distilled water ให้เข้ากันแล้วเติม 95% alcohol

Working eosin solution

Eosin stock solution	1	ส่วน
80% alcohol	3	ส่วน

เติม glacial acetic acid 0.5 ml. ต่อ working solution 100 ml. ก่อนนำไปใช้

3. Acid alcohol

70% alcohol	1,000.0	ml.
Hydrochloric acid, concentrated	10.0	ml.

4. Ammonia water

Tap water	1,000.0	ml.
Ammonium hydroxide, 28%	2-3	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย 95%, 80%, 70% alcohol และน้ำประปา ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. ย้อมด้วย Harris' hematoxylin นาน 15 นาที
4. Rinse ใน running tap water
5. Rinse ใน acid alcohol ประมาณ 10 ครั้ง
6. ล้างใน running tap water
7. Rinse ใน ammonia water จนกระทั่ง section เปลี่ยนเป็นสีฟ้า (ประมาณ 3-5 ครั้ง)
8. ล้างใน running tap water นาน 10-20 นาที
9. ย้อมด้วย working eosin นาน 15 วินาที – 2 นาที
10. Dehydration ด้วย 95% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที, 100% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
11. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
12. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Nuclei

ติดสีฟ้า

Cytoplasm

ติดสีชมพูถึงแดง

2. Gomori's one step trichrome method

Solution :1. Bouin's solution

Picric acid, saturated aqueous solution	750.0	ml.
37-40% formalin	250.0	ml.
Glacial acetic acid	50.0	ml.

2. Trichrome stain

Chromotrope 2R	0.6	gm.
Aniline blue	0.3	gm.
Glacial acetic acid	1.0	ml.
Phosphotungstic acid	0.8	gm.
Distilled water	100.0	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย 95%, 80%, 70% alcohol และน้ำประปา ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. Incubate ด้วย Bouin's solution ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 1 ชั่วโมง
4. ล้างด้วยน้ำประปาค้นกระทั่งสีเหลืองหายไป
5. แช่ใน Weigert's iron hematoxylin นาน 10 นาที
6. ล้างด้วยน้ำประปา
7. ย้อมด้วย Trichrome stain นาน 15-20 นาที
8. แช่ใน 0.5% glacial acetic water นาน 2 นาที
9. Dehydration ด้วย 95% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที, 100% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
10. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

11. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Muscle fiber

ติดสีแดง

Collagen

ติดสีฟ้า

Nuclei

ติดสีน้ำเงินถึงดำ

3. McManus' method for glycogen (PAS)

Solution :1. Normal hydrochloric acid solution

Hydrochloric acid, sp.gr. 1.19 83.5 ml.

Distilled water 916.5 ml.

2. Schiff reagent solution

Basic fuchsin 1.0 gm.

Distilled water 200.0 ml.

Normal hydrochloric acid 20.0 ml.

Sodium bisulfite anhydrous

หรือ sodium metabisulfite 1.0 gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย basic fuchsin ในน้ำกลั่นที่ร้อน แล้วนำไปต้มจนเดือด
2. ยกกลงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง
3. เติมนormal hydrochloric acid แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติมนsodium bisulfite anhydrous หรือ sodium metabisulfite
5. เก็บไว้ในที่มืดประมาณ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองฟาง แล้วเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น

การทดสอบ Schiff reagent solution

นำสารละลาย Schiff reagent ไปหยดใน 37-40% formaldehyde 10 ml. ถ้าสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงแดงทันที แสดงว่าสารละลายนี้ใช้ได้

2. 0.5% periodic acid solution

Periodic acid	0.5	gm.
Distilled water	100.0	ml.

3. Harris' hematoxylin

Hematoxylin crystal	5.0	gm.
Alcohol 70%	50.0	ml.
Ammonium or potassium alum	100.0	gm.
Distilled water	1,000.0	ml.
Mercuric oxiden (red)	2.5	gm.

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย 95%, 80%, 70% alcohol และน้ำประปา ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. Rinse ในน้ำกลั่น
4. Schiff reagent นาน 15 นาที
5. ล้างน้ำ 10 นาที จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีสีชมพู
6. แช่ใน Harris' hematoxylin นาน 6 นาที
7. ล้างใน running tap water
8. Rinse ใน 1% HCL (acid alcohol) ประมาณ 3-10 ครั้ง
9. ล้างใน running tap water
10. Rinse ใน ammonia water จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีสีฟ้า
11. ล้างใน running tap water นาน 10 นาที
12. Dehydration ด้วย 95% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที, 100% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
13. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
14. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Glycogen, mucin, reticulin, fibrin หรือ thrombi, colloid droplets, hyalin of arterio sclerosis, hyalin deposits in glomeruli, basement membrane, colloid ของ pituitary stalk และ thyroid in filtration จะมี positive reaction คือ ติดสีชมพูถึงม่วงแดง

Nuclei

ติดสีฟ้า

Fungi

ติดสีแดง

4. Alcian Blue- Periodic Acid Schiff reagent method (AB-PAS)Solution :1. 1% Periodic acid solution

Periodic acid	1.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.

2. Schiff reagent solution

Basic fuchsin	1.0	gm.
Distilled water	200.0	ml.
Normal hydrochloric acid	20.0	ml.
Sodium bisulfite anhydrous		
หรือ sodium metabisulfite	1.0	gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

6. ละลาย basic fuchsin ในน้ำกลั่นที่ร้อน แล้วนำไปต้มจนเดือด
7. ยกกลงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง
8. เติม normal hydrochloric acid แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
9. เติม sodium bisulfite anhydrous หรือ sodium metabisulfite
10. เก็บไว้ในที่มืดประมาณ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองฟาง แล้วเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น

การทดสอบ Schiff reagent solution

นำสารละลาย Schiff reagent ไปหยดใน 37-40% formaldehyde 10 ml. ถ้าสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงแดงทันที แสดงว่าสารละลายนี้ใช้ได้

3. Alcian blue solution pH 2.5

Alcian blue , 8GX	1.0	gm
3% Glacial acetic acid	100.0	ml.

ปรับให้สารละลายมี pH.5 แล้วกรอง

4. 0.5% Sodium metabisulfite solution

Sodium metabisulfite	0.5	gm.
Distilled water	100.0	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. Deparaffinize และ hydrate
2. Alcian blue solution 30 นาที
3. ล้างด้วยน้ำนาน 5 นาที
4. oxidize ด้วย 1% periodic acid solution 10 นาที
5. ล้างใน running water 5 นาที
6. Schiff reagent นาน 10 นาที
7. Rinse ด้วย sodium metabisulfite solution 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที
8. ล้างใน running water 10 นาที
9. Dehydrate ด้วย 95% 100% alcohol
10. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Polysaccharide และ mucosubstance	ติดสีแดงหรือม่วงแดง
	เข้ม
Hyaluronic acid	ติดสีน้ำเงิน

5. การย้อมสีด้วยเทคนิค Lectin histochemistry

Solution :

1. Lectin

Dolichos biflorus (DBA)

PBS	50	ml.
-----	----	-----

DBA	1	g.
-----	---	----

Maclura pomifera (MPA)

PBS	100	ml.
-----	-----	-----

MPA	1	g.
-----	---	----

Arachis hypogea (PNA)

PBS	25	ml.
-----	----	-----

PSA	1	g.
-----	---	----

Pisum sativum (PSA)

PBS	50	ml.
-----	----	-----

PSA	1	g.
-----	---	----

Ulex europaeus (UEA-I)

PBS	50	ml.
-----	----	-----

UEA-I	1	g.
-------	---	----

Tritigum vulgare (WGA)

PBS	400	ml.
-----	-----	-----

WGA	1	g.
-----	---	----

2. Avidine-Biotin Complex

Reagent A (μ l.) : reagent B (μ l.) : PBS (μ l.)

20 : 20 : 100

3. 0.37% H_2O_2

37% H_2O_2	37	μ l.
--------------	----	----------

PBS	100	ml.
-----	-----	-----

4. DAB (stock)

- ละลาย DAB 1 เม็ด ใน PBS (pH 7.4) 20 ml.

DAB (working solution)

37% H ₂ O ₂	37	μl.
D A B		1
	amp.	

- สารละลาย DAB + H₂O₂ ควรเตรียมใหม่ ไม่ควรเกิน ½ ชม. ควรเตรียม DAB เป็น stock solution ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น

5. PBS (pH 7.4)

- Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	1.15	g.
- Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.2	g.
- Potassium chloride	0.2	g.
- Sodium chloride	8.0	g.
- Distilled water	1,000	ml.

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ก่อนนำมาใช้

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95%, 80%, 70% และน้ำกลั่น ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. แช่ใน 0.37 H₂O₂ 30 นาที
4. ล้างใน PBS (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
5. เช็ดสไลด์เนื้อเยื่อให้แห้ง ใช้ paraplast ชีตวางรอบชิ้นเนื้อ เพื่อป้องกันไม่ให้สารเคมีไหลออกนอกชิ้นเนื้อ
6. หยด lectin จนท่วมเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นวางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น (Humidity chamber) ที่งัดสไลด์ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°C
7. ล้าง lectin ด้วย PBS (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
8. เช็ดสไลด์รอบๆเนื้อเยื่อให้แห้ง หยด avidin - biotin complex (ABC) ลงบนสไลด์ หลังจากนั้นวางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น (Humidity chamber) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

9. ล้างสไลด์ด้วย PBS (pH 7.4)
10. หยด DAB ลงบนสไลด์นาน 1 นาที
11. ล้างสไลด์ด้วย PBS (pH 7.4)
12. ย้อมทับด้วย Harris' Hematoxylin โดย rinse 6-10 ครั้ง
13. ล้างด้วยน้ำกลั่น
14. Dehydrate ด้วย 95% 100% alcohol
15. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้ว Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

เซลล์ที่มีอนุพันธ์ของน้ำตาล (กลุ่ม galactosyl, manosyl, fucosyl และ glucosyl) ป็นองค์ประกอบ ติดสีน้ำตาล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ และสกุล

กมลทิพย์ ราศรี

วัน เดือน ปี เกิด

8 กรกฎาคม 2519

ประวัติการศึกษา

- สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสุราษฎร์พิทยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ปีการศึกษา 2534
- สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี ปีการศึกษา 2537
- สำเร็จการศึกษาปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541