

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Bombyx mori

Taxonomy

Phylum	:	arthropoda
Class	:	Insecta
Division	:	Endopterygota
order	:	Lepidoptera
Super-family	:	Bombycoidea
Family	:	Bombycidae
Genus	:	Bombyx
Species	:	mori

ภาคผนวก ข

น้ำยาดองตัวอย่าง (fixative)

น้ำยาดองตัวอย่างฟอร์มาลิน

1. 10% Neutral buffered formalin (NBF)

formalin (conc.)	100	ml
sodium phosphate, monobasic ($\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4	g
sodium phosphate, dibasic (Na_2HPO_4)	6.5	g
distilled water	900	ml

2. Zinc formalin (unbuffered)

formalin (conc.)	100	ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1	g
distilled water	900	ml

3. Bouin's solution

saturated picric acid (21 g/ 1 liter) in water	750	ml
formalin (conc.)	250	ml
glacial acetic acid	50	ml

น้ำยาดองตัวอย่างอัลกอฮอล์ (Alcohol)

1. Carnoy's solution

acetic acid	10	ml
Absolute alcohol	60	ml
Chloroform	30	ml

2. Metancarn's solution

Absolute methyl alcohol	60	ml
-------------------------	----	----

Chloroform	30	ml
------------	----	----

Glacial acetic acid	10	ml
---------------------	----	----

3. Zinc alcohol

$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1	g
--	---	---

Absolute methyl alcohol	60	g
-------------------------	----	---

Chloroform	30	ml
------------	----	----

Glacial acetic acid	10	ml
---------------------	----	----

ภาคผนวก ค

เทคนิคการย้อมสี

วิธีการย้อมด้วย Hematoxylin-Eosin

การเตรียม Harris's Hematoxylin

Hematoxylin crystals	5 g
Ethyl alcohol, 100%	50 ml
Ammonium or Potassium alum	100 ml
Distilled water	1000 ml
Mercuric oxide	2.5 g

วิธีเตรียม: ละลาย hematoxylin crystals ใน alcohol ส่วน alum ให้ละลายในน้ำกลั่นที่กำลังต้มเกือบเดือด หลังจาก alum ละลายจนหมดให้เร่งความร้อนขึ้นพร้อมกับเท Hematoxylin solution ลงไปให้เดือดเร็วที่สุดพร้อมกับ stir ไปด้วย หลังจากนั้นยกออกจาก hot plate แล้วเท mercuric oxide ลงไปที่ตะกอนจนหมด แล้วนำไปต้มต่อจนสารละลายมีสีม่วง จึงนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็น จนสีเย็นก็นำไปใช้ได้

การเตรียม 1% stock Alcoholic Eosin

Eosin Y, water soluble	1 g
distilled water	20 ml
Alcohol, 80%	80 ml

วิธีเตรียม : ละลาย Eosin Y ในน้ำกลั่นแล้วเติมแอลกอฮอล์ลงไป

Eosin stock solution	1 part
Alcohol, 80 %	3 part

Harris's hematoxylin & eosin stain

สารเคมีที่ต้องใช้

1. Harris's hematoxylin

2. Acid alcohol:

70 % Alcohol	1000 ml
Hydrochloric acid (conc)	10 ml

3. Saturated lithium carbonate

lithium carbonate	1 g
Distilled water	1000 ml

วิธีย้อม

1. deparaffinize ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที และ hydrate โดยผ่าน 100%, 95%, 70% ethyl alcohol 2 ครั้ง ๆละ 2 นาที และล้างน้ำประปา
2. ย้อมใน Harris's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างสไลด์ในน้ำประปาที่ไหลประมาณ 5 นาทีเพื่อเอาสีส่วนเกินออก
4. differentiate ใน acid alcohol 3-5 จุ่ม (เช็คว่าการติดสีนิวเคลียส) แล้วล้างในน้ำประปาที่ไหลเพื่อหยุดปฏิกิริยา 5 นาที
5. blue สไลด์ใน lithium carbonate ประมาณ 20 วินาที
6. ล้างในน้ำประปาที่ไหล 10-15 นาที เพื่อให้น้ำยาด่างๆ หหมดไป
7. ย้อมใน eosin solution นาที เขย่า rack ใส่สไลด์บ้อยๆ
8. dehydrate ใน 70%, 95%, 100% ethyl alcohol 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
9. clear ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
10. mount ด้วย permount

วิธีการย้อมด้วย Methyl green และ Pyronin y

การเตรียม Methyl green-Pyronin y solution

สารเคมี :	Methyl green	0.5 g
	Pyronin y (pure dye)	0.05 g
	Distilled water	100 ml
	Chloroform	

วิธีทำ:

1. ละลาย methyl green ลงในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 70° C
2. เมื่อละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง
3. แยกสารละลายโดยใช้ chloroform ครั้งละ 20-30 ml นำสารทั้ง 2 ชนิดใส่ลงใน separating funnel เขย่าแรงๆ ประมาณ 20 นาที เทส่วนที่เป็น chloroform ออกแล้วเติม chloroform ใหม่ลงไป ทำเช่นเดิมจนสีของ chloroform ใส
4. ใส่ pyronin y ลงในสารละลาย เขย่าให้เข้ากัน

5. เก็บสารละลายในภาชนะเก็บมีฝาปิด นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 12-15° C

หมายเหตุ : สีที่ผสมนี้ไม่ต้องกรองก่อนใช้และสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ควรใช้หลังจากเตรียมเสร็จใหม่ๆ ไม่ควรเก็บนานเกิน 2 สัปดาห์เพราะสีจางลง

วิธีการย้อม

1. deparaffinize ใน xylene ครึ่งๆ ละ 3 นาทีและ hydrate โดยผ่าน 100%, 95%, 70% ครึ่งๆ ละ 2 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่น
2. ย้อมใน methyl green-pyronon y's solution เป็นเวลา 5 นาที
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วซับด้วยกระดาษกรองจนเกือบแห้ง ระวังอย่าให้ถูก section
4. จุ่มลงใน acetone ประมาณ 6-10 ครั้ง
5. clear ใน xylene 2 ครึ่งๆ ละ - นาที
6. mount ด้วย permount

การย้อมโดยใช้ methyl green-pyronin y เป็นวิธีย้อมเพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง DNA กับ RNA เมื่อนำ section ลงย้อมสารละลายสี แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จุ่มลงใน acetone น้ำกลั่นจะช่วยล้าง methyl green ที่เหลือให้ออก ส่วน acetone จะเป็นตัวนำ pyronin y ที่เกินออกไป section ที่ผ่านการย้อมแล้วจะให้ผลดังนี้

nucieoli	:	rose
cytoplasm	:	dark rose
chromatin	:	blue green

วิธีดังกล่าวคัดแปลงจาก taft (1951) ; Kurnick (1952) ; clark (1973)

ภาคผนวก ๔

สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์มและล้างรูป

1. น้ำยาล้างฟิล์ม (D-19)

Metale (Kodak,U.S.A)	9	กรัม
Sodium sulphite	90	กรัม
Hydroquinone	8	กรัม
Sodium carbonate	8	กรัม
Potassium bromide	5	กรัม

ค้มน้ำ 600 มิลลิลิตร จนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติมสารเคมีทุกชนิดจนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้ให้เจือจาง D-19 1 ส่วนค่อน้ำ 3 ส่วน

2. น้ำยาล้างฟิล์ม (D-76)

Metale (Kodak,U.S.A)	2	กรัม
Sodium sulphite	100	กรัม
Hydroquinone	5	กรัม
Borax (Kodax,U.S.A)	2	กรัม

ค้มน้ำ 600 มิลลิลิตร จนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติมสารเคมีทุกชนิดจนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้ให้เจือจาง D-76 1 ส่วนค่อน้ำ 1 ส่วน

3. น้ำยาล้างกระดาษอัดขยาย (D-163)

Metale (Kodak,U.S.A)	2.2	กรัม
Sodium sulphite	75	กรัม
Hydroquinone	17	กรัม
Sodium carbonate	65	กรัม
Potassium bromide	2.8	กรัม

ค้มน้ำ 600 มิลลิลิตร จนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เติมสารเคมีทุกชนิดจนจนสารเคมีละลายหมด เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้ให้เจือจาง D-163 1 ส่วนค่อน้ำ 3 ส่วน

4. น้ำยาคงสภาพ (F-7)

Hypo (Sodiumthiosulphate)	360	กรัม
Ammonium chloride	50	กรัม
Sodium sulphite	15	กรัม
Acetic acid 28%	48	กรัม
Boric acid	7.5	กรัม
Potassium alum	15	กรัม

ค้มน้้า 600 มิลลิลิตร จนนมีอุณหภูมิตั้ง 60 องศาเซลเซียส ค้่อยๆ เติมนสารเคมีทุกชนิดจนจน
สารเคมีละลายหมด เติมน้้าจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้ให้เจือจาง F-7 1 ส่วนค้่น้้า 4
ส่วน

5. น้ำยาหยุดสภาพ

ละลาย acetic acid 28% 48 มิลลิลิตร ค้่น้้าจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

การล้างฟิล์ม TEM และการอัดขยายภาพ

1. การล้างฟิล์ม TEM

น้ำยาที่ใช้ในการล้างฟิล์มมีดังนี้

Developer D-19

F-7 : fixer

Stop-bath (1% acetic acid)

Wetting agent (photoflo)

วิธีการล้างฟิล์ม ทำในห้องมืดดังนี้

1. จุ่มลงใน developer D-19 ประมาณ 1 นาที
2. จุ่มลงใน stop-bath ประมาณ 10 วินาที
3. จุ่มลงใน fixer ประมาณ 10 วินาที เช้าทุก 10-15 วินาที
4. ล้างในน้ำที่ไหลตลอดเวลา ประมาณ 10-15 วินาที
5. จุ่มลงใน photoflo working solution (1: 200) 1-2 นาที
6. ผึ่งให้แห้งแล้วจึงนำมาอัดขยายภาพต่อไป

2. การอัด-ขยายภาพ

น้ำยาที่ใช้มีดังนี้

Developer D-163

Stop-bath (1% acetic acid)

F-7 : fixer

Photoflo

วิธีการอัด-ขยาย มีดังนี้

1. เลือกฟิล์มที่อัด ใส่ใน frame (เปิดไฟนีออนได้ แล้วปิด แล้วเปิดไฟนรภัย)
2. เปิด fogus ปรับสภาพให้คมชัดจัดภาพให้ตรงกับ frame แล้วเลื่อนแผ่นกรองแสงมาบังไว้
3. นำกระดาษอัดรูปมาวางและจัดให้เข้าที่ ตั้งเวลาตามความเหมาะสมของฟิล์ม
4. นำกระดาษอัดรูปใส่ในถาดที่มีน้ำยา developer D-163 เช้าไปมาประมาณ 1-2 นาที จนมองเห็นภาพคมชัด
5. นำจุ่มลงใน stop-bath ประมาณ 10 วินาที
6. นำจุ่มลงใน fixer ประมาณ 15 นาที

5. นำจุ่มลงใน stop-bath ประมาณ 10 วินาที
6. นำจุ่มลงใน fixer ประมาณ 15 นาที
7. นำจุ่มลงในน้ำที่ไหลตลอดเวลา ประมาณ 15-20 วินาที
8. นำมาจุ่มใน photoflo ประมาณ 1-2 นาที
9. นำกระดาษอัดรูปที่ได้นำไปล้างให้แห้ง