

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมสารและการย้อมเซลล์

1. Harris' Haematoxylin and Eosin stain (H&E)

Solution

1. Harris haematoxylin solution

Hematoxylin crystal	5.0 gm.
Alcohol 100 %	50.0 ml.
Ammonium or potassium alum	100.0 gm.
Distilled water	1000.0 ml.
Mercuric oxide (red)	2.5 gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย hematoxylin crystal ในแอลกอฮอล์ และ alum ใน distilled water โดยใช้ความร้อน ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปต้ม
2. ยกสารละลายลงแล้วค่อยๆ เติม mercuric oxide อย่างช้าๆ
3. นำสารละลายไปต้มอีกครั้งจนกระทั่งสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม จากนั้นทิ้งสารละลายไว้ให้เย็น
4. เติม glacial acetic acid 2-4 ml. ต่อสารละลาย Harris' hematoxylin 100 ml. และควรกรองสารละลายก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2. Eosin solution

1% stock alcoholic eosin

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

ละลาย eosin Y ใน distilled water ให้เข้ากัน แล้วเติม 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

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95%, 80%, 70% และน้ำประปา ครั้งละ 2 นาที
3. ถ้า fixation ด้วย Zenker ให้ล้าง mercuric chloride crystal ด้วย iodine และ clear ด้วย sodium thiosulphate
4. ย้อมด้วย Harris' hematoxylin นาน 15 นาที
5. Differentiate ใน acid alcohol โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อขึ้นลงเร็วๆ ประมาณ 3-10 ครั้ง
6. ล้างด้วยน้ำประปา
7. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อใน ammonia water จนสไลด์เนื้อเยื่อเป็นสีฟ้า (ประมาณ 3-5 ครั้ง)
8. ล้างด้วย running tap water นาน 10-20 นาที
9. counterstain ด้วย working eosin solution นาน 15 วินาที – 2 นาที โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อขึ้นลง 3-4 ครั้งก่อนแช่ในสารละลาย
10. Dehydrate ด้วย alcohol 95% และ 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
12. Mount ด้วย permount หรือ Histoclad

ผลการย้อม

Nuclei

ติดสีฟ้า

Cytoplasm

ติดสีชมพูถึงแดง

2. 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

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

3. Alcian blue solution pH 2.5

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

ปรับให้สารละลายมี pH 2.5 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 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
8. ล้างใน running water 10 นาที
9. Dehydrate ด้วย 95% 100% และ alcohol ครั้งละ 2 นาที
10. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที

ผลการย้อม

Polysaccharide และ mucosubstance	ติดสีแดงหรือม่วงแดงเข้ม
Hyaluonic acid	ติดสีน้ำเงิน

3. Gomori' s one step trichrome method

Solution

1. Bouin' s solution

Saturated aqueous picric acid solution	750.0 ml.
37%-40% formalin	250.0 ml.
Glacial acetic acid	50.0 ml.

2. Trichrome stain

Chromotop 2R	0.6 gm.
Light green, SF yellowish	0.3 gm.
Glacial acetic acid	1.0 ml.
Phosphotungstic acid	0.8 gm.
Distilled water	100.0 ml.

ใช้ Aniline Blue แทน Light green ได้ถ้าต้องการให้ collagen ย้อมติดสีฟ้า

ขั้นตอนการย้อม

1. Deparaffinize และ hydrate
2. แอสไลด์เนื้อเยื่อใน Bouin' s solution ในตู้อบอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย running tap water จนกระทั่งสไลด์เนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง
4. ย้อมด้วย Weigert' s iron hematoxylin หรือ Gomori' s chromium hematoxylin solution นาน 10 นาที
5. ล้างด้วยน้ำประปา
6. ย้อมด้วย Trichrome stain นาน 15-20 นาที
7. แอสไลด์ใน 0.5% glacial acetic water นาน 2 นาที ถ้าสไลด์เนื้อเยื่อดำเกินไป นำสไลด์เนื้อเยื่อ differentiation ใน 1% glacial acetic water โดยเติม phosphotungstic acid 0.7 gm.
8. Rinse ใน distilled water
9. Dehydrate ใน 95% และ 100% alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
10. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. Mount ด้วย Permount หรือ histoclad

ผลการย้อม

Muscle fiber	ติดสีแดง
Collagen	ติดสีเขียว (ติดสีฟ้าถ้าใช้ aniline blue)
Nuclei	ติดสีฟ้าถึงสีดำ

4. 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 fuchin	1.0 gm.
Distilled water	200.0 ml.
Normal hydrochloric acid	20.0 ml.
Sodium bisulfite anhydrous	

หรือ sodium metabisulfite 1.0 gm.

3. 0.5% periodic acid solution

periodic acid	0.5 gm.
Distilled water	100.0 ml.

4. 0.2% light green solution

Stock	
Light green, SF yellowish	0.2 gm.
Distilled water	100.0 ml.
Glacial acetic acid	0.2 ml.
Working	
Light green (stock)	10.0 ml.
Distilled water	50.0 ml.

5. Harris' hematoxylin solution

Hematoxylin crystal	5.0 gm.
Alcohol 100 %	50.0 ml.
Ammonium or potassium alum	100.0 gm.
Distilled water	1000.0 ml.
Mercuric oxide (red)	2.5 gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย hematoxylin crystal ในแอลกอฮอล์ และ alum ใน distilled water โดยใช้ความร้อน ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปต้ม
2. ยกสารละลายลงแล้วค่อยๆ เติม mercuric oxide อย่างช้าๆ
3. นำสารละลายไปต้มอีกครั้งจนกระทั่งสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม จากนั้นทิ้งสารละลายไว้ให้เย็น

4. เติม glacial acetic acid 2-4 ml. ต้อสารละลาย Harris' hematoxylin 100 ml.

และควรกรองสารละลายก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

ขั้นตอนการย้อม

1. Deparaffinize และ hydrate
2. Oxidize ใน periodic acid solution นาน 5 นาที
3. Rinse ใน distilled water
4. Coleman' s Feulgen หรือ Schiff reagent นาน 15 นาที
5. ล้างใน running water นาน 10 นาที จนสไลด์เนื้อเยื่อเป็นสีชมพู
6. แช่สไลด์ใน Harris' hematoxylin นาน 6 นาที
7. ล้างใน running water
8. differentiate ใน 1% acid alcohol โดยจุ่มสไลด์ขึ้นลงเร็วๆ 3-10 ครั้ง
9. ล้างใน running water
10. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อใน ammonia water จนสไลด์เนื้อเยื่อเป็นสีฟ้า
11. ล้างใน running water นาน 10 นาที
12. dehydrate ใน alcohol 95% และ 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
13. clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
14. Mount ด้วย permount หรือ histoclad

ผลการย้อม

Nuclei	ติดสีฟ้า
Fungi	ติดสีแดง
Background	ติดสีเขียวอ่อน
Glycogen, mucin	ติดสีชมพูถึงสีม่วงแดง

5. การย้อมสีด้วยเทคนิค Lectin histochemistry

ขั้นตอนการย้อม

16. นำสไลด์ที่ย้อมมาละลายฟาร่าฟีนออก โดยใช้ Xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
17. นำสไลด์มาผ่าน alcohol 95% 80% และ 70% ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
18. นำสไลด์แช่ใน 37% H_2O_2 นาน 20-30 นาที
19. นำสไลด์แช่ใน PBS buffer (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
20. เช็ดสไลด์รอบๆ ขึ้นเนื้อให้แห้งแล้วใช้ paraplast วรรณรอบขึ้นเนื้อเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำยาไหลออกนอกชิ้นเนื้อ
21. หยด lectin ตามความเข้มข้นที่เลือกไว้ให้ท่วมเนื้อเยื่อ วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น จากนั้นทิ้งสไลด์ไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
22. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4) 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที
23. เช็ดรอบๆ สไลด์เนื้อเยื่อให้แห้ง หยด Avidin-Biotin Complex (ABC) ลงบนเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นวางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-1.30 ชั่วโมง
24. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4)
25. หยด DAB ลงบนสไลด์เนื้อเยื่อนาน 1 นาที
26. ล้างสไลด์ด้วย PBS buffer (pH 7.4)
27. ย้อมทับด้วย Harris' Hematoxylin นานประมาณ 1-2 นาที หรือจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อขึ้นลงประมาณ 6-10 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
28. Dehydrate ด้วย 95% และ 100% alcohol อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาทีตามลำดับ
29. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
30. Mount ด้วย permount

การเตรียมน้ำยาต่างๆ ที่ใช้ในการย้อม

1. Lectin

Dolichos biflorus (DBA)

เตรียม DBA lectin ที่ความเข้มข้นต่างกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

- รังไข่

PBS	25 ml.
DBA	1 g.

- ท่อน้ำไข่
 - PBS 50 ml.
 - DBA 1 g.
- มดลูก
 - PBS 100 ml.
 - DBA 1 g.

Maclura pomifera (MPA)

เตรียม MPA lectin ที่ความเข้มข้นต่างกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

- รังไข่
 - PBS 50 ml.
 - MPA 1 g.
- ท่อน้ำไข่
 - PBS 100 ml.
 - MPA 1 g.
- มดลูก
 - PBS 100 ml.
 - MPA 1 g.

Peanut Lectin (PNA)

เตรียม PNA lectin ที่ความเข้มข้นต่างกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

- รังไข่
 - PBS 25 ml.
 - PNA 1 g.
- ท่อน้ำไข่
 - PBS 50 ml.
 - PNA 1 g.

- มดลูก

PBS	25 ml.
PNA	1 g.

Pisum sativum (PSA)

เตรียม PSA lectin ที่ความเข้มข้นเดียวกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

PBS	100 ml.
PSA	1 g.

Ulex europaeus-I (UEA-I)

เตรียม UEA-I lectin ที่ความเข้มข้นต่างกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

- รังไข่

PBS	25 ml.
UEA-I	1 g.

- ท่อนำไข่

PBS	100 ml.
UEA-I	1 g.

- มดลูก

PBS	25 ml.
UEA-I	1 g.

Wheat germ (WGA)

เตรียม WGA lectin ที่ความเข้มข้นต่างกันสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดดังนี้

- รังไข่

PBS	50 ml.
WGA	1 g.

- ท่อนำไข่

PBS	100 ml.
WGA	1 g.

- มดลูก

PBS	100 ml.
WGA	1 g.

2. DAB

ละลาย DAB 1 เม็ดใน PBS buffer (pH 7.4) 20 ml. จากนั้นแบ่งใส่ vial หลอดละ 1 ml. เก็บเป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Working DAB

37% H_2O_2	37 μl .
DAB	1 amp.

3. PBS buffer

Sodium chloride	8.0 g.
Potassium chloride	0.2 g.
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.15 g.
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.2 g.
Distilled water	1000 ml.

ก่อนนำสารละลายไปใช้ต้องปรับ pH ให้ได้ 7.4

4. Avidine-Biotin Complex (ABC)

Reagent A (μl .): reagent B (μl .): PBS (μl .)

20 : 20 : 1000

ควรเตรียมสารละลายก่อนนำไปใช้ประมาณ 30 นาที แล้วแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4° C หรือเก็บไว้ในตู้เย็น

5. 0.37% H_2O_2

37% H_2O_2	37 μl .
PBS	100 ml.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ

นางสาวอมรพันธุ์ สารรัตน์

วัน เดือน ปีเกิด

3 มกราคม 2520

ประวัติการศึกษา

- สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรเทียบเท่าชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย ศูนย์การศึกษานอกโรงเรียน จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2537
- สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิชาเอกกายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2540