

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารและการย้อมเซลล์

1. Routine Mayer's Hematoxylin and Eosin stain (H&E)

สารละลาย

1. Mayer's hematoxylin solution

Ammonium หรือ Potassium alum	50.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.
Hematoxylin crystals	1.0	gm.
Sodium iodate	0.2	gm.
Citric acid	1.0	gm.
Chloral hydrate	50.0	gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย ammonium หรือ potassium alum ใน distilled water ด้วย magnetic stirrer โดยไม่ใช้ความร้อน
2. ใส่ hematoxylin crystals ลงไป ละลายให้เข้ากันแล้วเติม sodium iodate, citric acid และ chloral hydrate ลงไป คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันจะได้สารละลายสีม่วงแดง

2. Eosin solution

1% stock alcoholic eosin

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

ละลาย Eosin Y ใน distilled water ให้เข้ากันแล้วเติม 95% alcohol

Working eosin solution

Eosin stock solution	1 ส่วน
80% alcohol	3 ส่วน

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

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffine ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95%, 80%, 70% และน้ำประปาครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. ย้อมด้วย Mayer's hematoxylin นาน 15 นาที
4. ล้างใน running tap water นาน 20 นาที
5. Counter stain ด้วย working eosin solution นาน 15 วินาที – 2 นาที โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อขึ้นลง ก่อนแช่ในสารละลาย
6. Dehydration ด้วย alcohol 95%, 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
7. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
8. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Nuclei	- ติดสีฟ้า
Cytoplasm	- ติดสีชมพูถึงแดง

2. Gomori's Chromium Hematoxylin Phloxine stain

(Chrome – Alum Hematoxylin stain)

สารละลาย

1. Bouin's Fluid

Picric acid , saturated aqueous solution	75	cc.
40% formalin	25	cc.
Glacial acetic acid	5	cc.

2. Potassium permanganate solution

Potassium permanganate	0.3	gm.
Distilled water	100.0	cc.
Sulfuric acid	0.3	cc.

3. 5% Sodium bisulfite solution

Sodium disulfite	5	gm.
Distilled water	100	cc.

4. Chromium Hematoxylin solution

1% Hematoxylin (aqueous solution)	50	cc.
3% Chromium alum (aqueous solution)	50	cc.

*เติม 5% potassium dichromate 2 ซีซี และ 2.5% sulfuric acid 2 ซีซี ในสารละลาย chromium hematoxylin 100 cc. ผสมสารละลายให้เข้ากันทิ้งไว้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง กรองก่อนนำมาใช้ สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานเท่าที่แผ่นฟิล์มที่ฉาบอยู่บนผิวของสารละลายยังคงอยู่

5. 0.5% Phloxine B solution

Phloxine B	0.5	gm.
Distilled water	100	cc.

6. 5% Phosphotungstic acid solution

Phosphotungstic acid	5	gm.
Distilled water	100	cc.

7. 1% acid alcohol solution

70% alcohol	100	ml.
HCL, concentrated	1	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffine ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95%, 80%, 70% และน้ำประปาครั้งละ 2 นาที
3. แช่ใน Bouin's fluid 12 ถึง 24 ชั่วโมง
4. ล้างใน running tap water เพื่อเอาสีของ picric acid ออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ
5. แช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย Potassium permanganate นาน 1 นาที
6. จุ่มสไลด์ขึ้นลงในสารละลาย Sodium bisulfite จนสไลด์เนื้อเยื่อไม่มีสี
7. ล้างใน running tap water
8. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสารละลาย chromium hematoxylin นาน 10-15 นาที (ตรวจสอบโดยดูสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป จะเห็น beta cells ติดสีน้ำเงินเข้ม)
9. Differentiate ใน สารละลาย 1% acid alcohol นาน 1 นาที
10. ล้างใน running tap water จนกระทั่ง section เป็นสีฟ้าใส (ประมาณ 10 นาที)
11. แช่ในสารละลาย 0.5 % phloxine B นาน 5 นาที
12. ล้างใน distilled water
13. แช่ในสารละลาย phosphotungstic acid นาน 1 นาที
14. ล้างใน running tap water นาน 5 นาที
15. Differentiate ใน 95% alcohol นาน 1 นาที ถ้า section แดงเกินไป ให้ล้างใน 80% alcohol นาน 15-20 วินาที
16. Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
17. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง นานครั้งละ 2 นาที
18. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Alpha cell	- ติดสีแดง
Beta cell	- ติดสีน้ำเงิน
Delta cell	- ติดสีชมพูถึง แดง แยกจาก alpha cell ไม่ชัดเจน

3. Grimelius technique

สารละลาย

1. Acetate buffer pH 5.6

0.1 M. Sodium acetate	9	ml.
-----------------------	---	-----

0.1 M. Acetic acid		
--------------------	--	--

*หยด 0.1 M. Acetic acid ใน 0.1 M. Sodium acetate จนกระทั่ง pH 5.6

2. Silver solution (make fresh)

Acetate buffer pH 5.6	10	ml.
-----------------------	----	-----

Distilled water	87	ml.
-----------------	----	-----

1% (aq.) silver nitrate	3	ml.
-------------------------	---	-----

3. Reducing solution (make fresh)

Distilled water	100	ml.
-----------------	-----	-----

Hydroquinone	1	gm.
--------------	---	-----

Sodium sulphite	5	gm.
-----------------	---	-----

4. 5% sodium thiosulphate

Sodium thiosulphate	5	gm.
---------------------	---	-----

Distilled water	100	ml.
-----------------	-----	-----

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffine ออก โดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย 95%, 80%, 70% และน้ำประปา ครั้งละ 2 นาที
3. ล้างใน distilled water
4. ย้อมในสารละลาย silver ในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
5. ล้างใน distilled water โดยจุ่มขึ้นลงหลายๆ ครั้ง
6. แช่ใน reducing solution ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ควรทำให้สารละลายอุ่นก่อนแช่)
7. ล้างใน distilled water
8. ถ้า section สีไม่เข้มพอ แช่ในสารละลาย silver อีก 10 นาที และทำซ้ำตามขั้นตอน 5, 6, 7
9. แช่ในสารละลาย 5% sodium thiosulphate นาน 2 นาที
10. ล้างในน้ำประปา

11. Dehydration ด้วย alcohol 95%, 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
12. Clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
13. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Argyrophil granules

- ติดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ

Other tissue components

- ติดสีเหลืองจาง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว จิตรา ผลมี

วัน เดือน ปีเกิด 24 มกราคม 2515

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ที่โรงเรียนเซนต์ปอลคอนแวนต์ จังหวัดชลบุรี
เมื่อปีการศึกษา 2530

สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนชลราษฎรอำรุง จังหวัดชลบุรี
เมื่อปีการศึกษา 2533

สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรพยาบาลศาสตร์ ที่วิทยาลัยพยาบาลบรมราชชนนี
จังหวัดชลบุรี เมื่อปีการศึกษา 2537