หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีการฆ่าสัตว์ทดลอง

ฆ่าโดยใช้เข็มทำลายประสาทตรงรอยต่อของสมองและไขสันหลัง (pith) แล้วใช้กรรไกรเปิดช่องท้อง ตัดเอาอวัยวะที่ต้องการ คือ หลอดอาหาร กระเพาะ และลำไส้เล็ก ออกมาวางใน petridish ที่มีน้ำเกลือ 0.85% ล้างเอาเมือก และเศษอาหารออกให้หมด ตัดแบ่งกระเพาะเป็นสามส่วน คือ ส่วนต้น ได้แก่ ฟอร์สตอมัช (Forestomach) ส่วนกลาง คือ ฟันดัส (Fundus) และส่วนปลายที่ติดกับลำไส้ คือ ไพลอรัส (Pylorus) ลำไส้เล็กก็ตัดแบ่งเป็นสามบริเวณ คือ ลำไส้เล็กส่วนต้นที่มีตับอ่อนติดอยู่ ได้แก่ ดูโอเดนัม (Duodenum) ส่วนกลาง ได้แก่ เจจูนัม (Jejunum) และส่วนปลาย ได้แก่ ไอเลียม (Ileum) นำเนื้อเยื่อทั้งหมดนี้ไปทำ paraffin section เพื่อศึกษาทางฮีสโตโลยี และฮีสโตเคมี ต่อไป

2. วิธีการทำ paraffin section เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อ และศึกษาสารเมือก

2.1 Fixative

ใช้ Bouin's fluid ซึ่งประกอบด้วย

Picric acid (สารละลายอิ่มตัว)	75	มิลลิลิตร
Formaldehyde 40%	25	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร

ผสมกัน

2.2 การทำสไลด์

นำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาแช่ในน้ำยาโบแองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างด้วย 70% เอธิลอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง จึงนำออกโดยแช่ใน 70% เอธิลอัลกอฮอล์ 24 ชั่วโมง, 90% เอธิลอัลกอฮอล์ 6 ชั่วโมง, 95% เอธิลอัลกอฮอล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 6 ชั่วโมง, บิวทิลอัลกอฮอล์ 1 ชั่วโมง ทำให้เนื้อเยื่อใสในไซลีน (xylene) 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นไซลีนรวมกับ wax (1:1) เอาเข้าตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 65 °ซ. ทิ้งไว้ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง, เปลี่ยนลง wax_1 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง, wax_2 1 ชั่วโมง และนำลงฝัง wax_3 ขั้นตอนตั้งแต่ไซลีนรวมกับ wax จนถึง wax_2 ทำให้เครื่อง vacuum pump ที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 °ซ. เพื่อให้ wax เข้าไปแทรกในเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น เมื่อ waxเข็งดีแล้วก็นำมาตัก section หนา 6 ไมครอน ติดบนสไลด์ด้วย diluted egg albumin (egg albumin 1 หยดต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในการติด section บนสไลด์นั้น เพื่อที่จะเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีของอนูแรนทั้ง 3 ชนิด จึงติด section ของเนื้อเยื่อส่วนเดียวกันของอนูแรนทั้ง 3 ชนิดไว้บนสไลด์แผ่นเดียวกัน และติดชนิดละ 2 section ติดต่อกันไป เพื่อจะสัมพันธ์ปฏิกิริยาทางฮีสโตเคมีต่างชนิดกันของเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงกัน

2.3 การศึกษาลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อ

ย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin

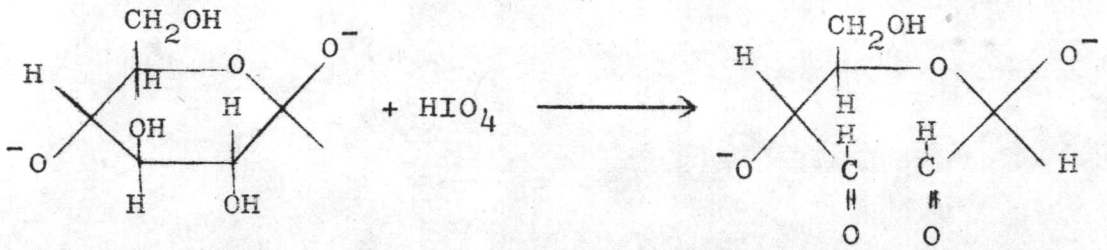
2.4 การศึกษาสารเมือกโดยวิธีการทางฮีสโตเคมี

2.4.1 Periodic acid Schiff (PAS) เพื่อศึกษาสารเมือกฤทธิ์เป็นกลาง (Culling, 1963)

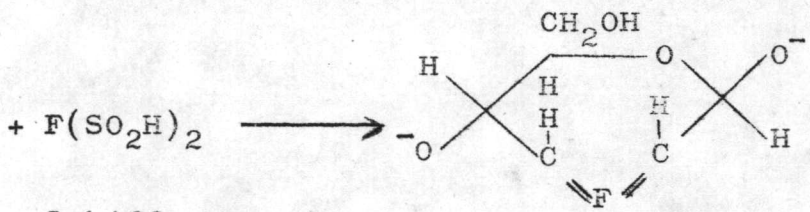
หลักการ

Periodic acid เป็นตัวออกซิไดซ์ จะทำลาย C-C bond ในโครงสร้างที่มี 1-2 glycol หรือ vic-glycol groups (CHOH-CHOH)

โดยจะเปลี่ยนเป็น dialdehydes (CHO-CHO). dialdehydes จะทำปฏิกิริยาต่อไปกับ Schiff reagent ให้ product ออกมาเป็นสีแดงทับทิม (magenta)



Dialdehyde



Schiff reagent

product สีแดงทับทิม

วิธีการ

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำ
- ออกซิไดซ์ใน 1% periodic acid 10 นาที ที่อุณหภูมิ 17 °ซ.
- ล้างน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที, ล้างน้ำกลั่น
- ลงใน Schiff reagent 20 นาที
- ผ่านโดยตรงสู่ sulphite rinse ครั้งที่ 1 1 นาที, ครั้งที่ 2 2 นาที, ครั้งที่ 3 2 นาที แล้วล้างน้ำประปา 10 นาที
- ดึงน้ำออก ด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ
- ทำให้ใสด้วยไซลีน, ปิดด้วยคานาดา บัลซัม

2.4.2 Diastase - PAS เพื่อศึกษาไกลโคเจน (Zugibe, 1970)

หลักการ

Malt diastase จะย่อยไกลโคเจนที่อยู่ใน section ออกทำให้บริเวณที่เป็นไกลโคเจน ให้ผลลบกับปฏิกิริยา PAS

วิธีการ

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำ
- ย่อยใน 0.1% diastase solution ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ล้างน้ำกลั่น
- ต่อด้วยขั้นตอนของการย้อม PAS

2.4.3 Alcian blue (AB) เพื่อศึกษาสารเมือกฤทธิ์เป็นกรด (Lison, 1954)

หลักการ

Alcian blue เป็น copper phthalocyanin ละลายในน้ำซึ่งเป็นสีที่มีประจุบวก จะจับกับประจุลบของ sulphate ester groups หรือ carboxyl groups ของสารเมือกฤทธิ์เป็นกรด ในสารละลายที่เป็นกรดทำให้เกิดสีฟ้าเขียวขึ้น

วิธีการ

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึงน้ำ
- ย้อมนิวเคลียสด้วย haematoxylin เป็นเวลา 15 นาที ล้างน้ำ
- ถ้าสีติดมากเกินไปล้างสีส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสมออกด้วย 0.5% ไฮโดรคลอริค แอสิด ในน้ำกลั่น

– ผ่าน section ลงในน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที ส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ให้ได้นิวเคลียสเป็นสีน้ำเงิน และไซโตพลาสมไม่มีสี, ล้างในน้ำกลั่น

– ย้อมด้วย 1% alcian blue ใน 3% acetic acid 10 นาที ล้างน้ำกลั่น

– ดึงน้ำออก ด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ

– ทำให้ใสด้วยไซลีน, ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

2.4.4 Acid hydrolysis เพื่อศึกษาเซียโลมิวซิน (Jone & Reid, 1973)

หลักการ

สารละลายกรดที่ร้อนจะทำลาย sialic acid group ที่มีอยู่ใน section ออกหมด ทำให้บริเวณที่เป็นเซียโลมิวซิน ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบเปรียบเทียบกับปฏิกิริยา alcian blue แต่บริเวณที่เป็นซัลโฟมิวซิน ซึ่งมี sulfate group อยู่จะยังคงทำปฏิกิริยากับ alcian blue ให้สีฟ้าเขียวเกิดขึ้น

วิธีการ

– นำ paraffin section ผ่านขั้นตอน ลงไปจนถึงน้ำ

– ลงแช่ใน 0.1 ซัลฟุริค แอสิด ที่อุ่นแล้ว และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, ล้างน้ำประปา

– ต่อด้วยขั้นตอนของการย้อม alcian blue

2.4.5 Aldehyde fuchsin (AF) เพื่อศึกษาซัลโฟมิวซิน (Culling, 1963)

หลักการ

สี aldehyde fuchsin ในสารละลายที่เป็นกรดอย่างแรง

จะทำปฏิกิริยากับ sulfate ester groups ที่มีใน section ทำให้บริเวณที่เป็นซัลโฟมิวซินมีสีม่วง (purple) เกิดขึ้น

วิธีการ

- นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนลงไปจนถึง 70% เอธิลอัลกอฮอล์
- ลง aldehyde fuchsin 10 นาที, ล้างด้วย 70% เอธิลอัลกอฮอล์
- ย้อมตัดสีด้วย 0.25% light green ใน 70% เอธิลอัลกอฮอล์ 10 วินาที, ล้างทันทีด้วย 70% เอธิลอัลกอฮอล์
- ดึงน้ำออกด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ
- ทำให้ใสโดยแช่ในไซลีน, ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

3. วิธีทำ paraffin section เพื่อศึกษาเอ็นไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตส และ เอ็นไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส

3.1 Fixative

ใช้ cold absolute acetone

3.2 การทำสไลด์

นำเนื้อเยื่อมาแช่ใน absolute acetone ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำยาใหม่สองครั้ง หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำยาเป็น absolute alcohol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น light petroleum 1 ชั่วโมง, light petroleum รวมกับ paraplast (1:1) $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง, $paraplast_1$ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง, $paraplast_2$ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง นำไปฝังใน $paraplast_3$ ขั้นตอนตั้งแต่ light petroleum รวมกับ paraphlast จนถึง $paraplast_2$ ทำในเครื่อง vacuum pump ที่มีอุณหภูมิ 60 °ซ. เพื่อให้ paraplast เข้าไปแทรกในเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น ส่วนขั้นตอนการฝังนั้นทำในตู้อบ

ที่มีอุณหภูมิ 64 °ซ. เมื่อ paraplast แข็งดีแล้ว นำมาตัด section หนา 8 ไมครอน ติดบนสไลด์ด้วย egg albumin การตัด section จะตัดเนื้อเยื่อส่วนเดียวกันของอนูแรนทั้ง 3 ชนิด ไว้บนสไลด์แผ่นเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ในอนูแรนทั้ง 3 ชนิด

3.3 การศึกษาเอ็นไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตสและอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส โดยวิธีการทางฮีสโตเคมี

3.3.1 วิธี Lead nitrate เพื่อศึกษา แอสิด ฟอสฟาเตส

(Pearse, 1968)

หลักการ

เมื่อ incubate section กับ Gomeri medium (pH 5.0) แอสิด ฟอสฟาเตส จะไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) sodium B-glycerophosphate ได้ free phosphale เกิดขึ้น ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ lead nitrate กลายเป็น lead phosphate และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อไปกับ ammonium sulphide ได้ lead sulphide เห็นเป็นตะกอนสีดำตรงตำแหน่งที่มีแอสิด ฟอสฟาเตส

วิธีการ

- เอา wax ออกโดยจุ่มใน light petroleum 2 – 3 นาที
- ลง absolute acetone, ผ่านลงน้ำกลั่น
- Incubate ใน Gomeri medium ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง, ล้างน้ำกลั่น
- จุ่มใน 1% yellow ammonium sulphide 1 นาที, ล้างน้ำกลั่น
- ย้อมตัดสีด้วย 1% eosin (ในน้ำกลั่น) 5 นาที

– ดึงน้ำออกด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ

– ทำให้ใสโดยแช่ในไซลีน, ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

สำหรับการย้อมควบคุม (control) แอสิด ฟอสฟาเตส มีวิธีการทำเหมือนกับข้างต้น แต่ใช้ buffer แทน sodium B-glycerophosphate

3.3.2 วิธี Calcium-Cobalt เพื่อศึกษาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส

(Pearse, 1968)

หลักการ

เมื่อ incubate section กับ incubating medium (pH 9.0) อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส จะไฮโดรไลซ์ sodium B-glycerophosphate โดยมี Mg^{++} เป็นตัวเร่ง (activator) ทำให้ได้ free phosphate เกิดขึ้น ซึ่งไม่อยู่ตัว free phosphate นี้จะถูกจับโดย Ca^{++} แล้ว ตกตะกอนเป็น calcium phosphate ซึ่งอยู่ตัว แต่ไม่แสดงสีให้เห็น ต้องทำปฏิกิริยาต่อไปกับเกลือ cobalt. Cobalt ion จะแลกเปลี่ยนกับ calcium ion กลายเป็น cobalt phosphate ซึ่งไม่มีสี และเมื่อทำปฏิกิริยากับ ammonium sulphide จะได้เป็น cobalt sulphide ซึ่งเป็นผลสุดท้าย เห็นเป็นตะกอนสีดำ หรือสีน้ำตาลดำตรงบริเวณที่มีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส

วิธีการ

– เอา wax ออกโดยจุ่มใน light petroleum 2 – 3 นาที

– ลง absolute acetone, ผ่านลงน้ำกลั่น

– Incubate ใน incubating medium ที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 45 นาที, ล้างน้ำกลั่น

– ลงใน 2% cobalt nitrate 3 – 5 นาที, ล้างน้ำกลั่น

– จุ่มใน 1% yellow ammonium sulphide 1 นาที ล้างน้ำกลั่น

– ดึงน้ำออกด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่าง ๆ

– ทำให้ใสด้วยไซลีน, ปิดสไลด์ด้วยคานาดา บัลซัม

สำหรับการย้อมควบคุมอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส มีวิธีการเหมือนกับข้างต้น แต่ใช้น้ำกลั่นแทน substrate.