

ระเบียบวิธีพื้นฐานการย้อมสีเพื่อการทำสไลด์ถาวร

เค้าโครงเรื่อง

11.1 โຕะปฏิบัติการย้อมสีและอุปกรณั

11.1.1 โຕะปฏิบัติการย้อมสี

11.1.2 อุปกรณั

- (1) เครื่องแก้วและขวดฝาเกลียว
- (2) ถ้วยย้อมสี
- (3) กระจกปิดและอุปกรณัที่เกี่ยวข้อง
- (4) ภาตล้างสไลด์
- (5) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- (6) แผ่นโลหะความร้อนควบคุมอุณหภูมิ
- (7) กล้องจุลทรรศน์
- (8) ตู้อบแห้งควบคุมอุณหภูมิ
- (9) กล้องเก็บสไลด์

11.2 สารเคมี

11.2.1 สารเพื่อการร่นนิ่งอัฟ และร่นนิ่งดาวนั

11.2.2 สารช่วยสีติด

11.2.3 สีย้อมและสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสี

11.2.4 สารเมาทสไลด์

11.3 ขั้นตอนหลักของการทำสไลด์ถาวร

สารสำคัญ

1. การจัดหาอุปกรณัต่าง ๆ เช่น ถ้วยย้อมสี สีย้อม สารเมาทแทนทั และอุปกรณัอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสีและการเมาทสไลด์จำเป็นต้องมีความพร้อมก่อนการปฏิบัติ
2. การวางแผนจัดวางอุปกรณัต่าง ๆ เรียงลำดับตามขั้นตอนของการย้อมสีเพื่อการทำเป็นสไลด์ถาวร จะช่วยให้้ง่ายต่อการปฏิบัติยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบขั้นแล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกและจัดท้าวस्तอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสีและการเม้าท์สไลด์ได้
2. นักศึกษาสามารถจัดท้าวस्तอุปกรณ์และทำการเตรียมสารละลายพื้นฐานที่ใช้เพื่อการย้อมสีและการเม้าท์สไลด์ได้ โดยเฉพาะการเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันไว้เป็นสารละลายสต็อก
3. นักศึกษาสามารถจัดท้าวस्तอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการย้อมสีและการเม้าท์สไลด์เรียงลำดับตามขั้นตอนการปฏิบัติ
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ภายในหนึ่งวัน

ระเบียบวิธีทาง ไมโครเทคนิคเป็นระเบียบวิธีเพื่อการสาธิตส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อให้ปรากฏเด่นชัดในสไลด์ถาวร สามารถนำมาตรวจสอบศึกษาได้ตามเวลาที่ต้องการ การที่จะสู่จุดมุ่งหมายนี้ได้จำเป็นต้องใช้วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี ขั้นตอนปฏิบัติต่าง ๆ ตลอดจนความรู้ความชำนาญมาประกอบ จึงต้องมีการจัดการทุกสิ่งที่เกี่ยวข้องให้มีความคล่องตัวและแผนการใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการจัดตั้ง โต๊ะสำหรับตั้ง ไมโครโทมไว้ใกล้ประตูเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ และโต๊ะสำหรับใช้งานตามวัตถุประสงค์อื่น เรียงไปตามลำดับ ดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไป

11.1 โต๊ะปฏิบัติการย้อมสีและอุปกรณ์

11.1.1 โต๊ะปฏิบัติการย้อมสี

ควรตั้ง โต๊ะต่อถัดมาจาก โต๊ะที่ใช้วาง ไมโครโทม ขนาดกว้างตามมาตรฐาน โต๊ะทั่วไป คือ ประมาณ 2 ฟุต (60 เซนติเมตร) ความยาว 6-8 ฟุต (180-240 เซนติเมตร) ควรมีอ่างน้ำ ก๊อกน้ำดี ท่อน้ำทิ้ง ท่อน้ำล้น ชนิดสำเร็จรูปอยู่ ปลายด้านใดด้านหนึ่งของ โต๊ะหรือใกล้เคียง อ่างน้ำควรเป็นชนิดตันและกว้าง เพื่อจะได้วางภาตสำหรับล้างสไลด์ลงไปได้ และติดตั้งอุปกรณ์ยึดภาตล้างสไลด์ไว้ที่ขอบของอ่างน้ำด้วย ท่อแก๊สระบบฝังในอาคารมีวาล์วปิดเปิดได้ ควรติดตั้งไว้ด้วยเพื่อสามารถต่อใช้กับตะเกียงบุนเสน (Bunsen burner) ได้ ควรมีตะเกียงแอลกอฮอล์ไว้ใช้ด้วย

ที่ว่างใต้โต๊ะควรทำเป็นตู้เก็บสารเคมีหรือวัสดุอุปกรณ์อื่นที่มีน้ำหนักมาก ที่ว่างบนผนังเหนือโต๊ะควรทำเป็นชั้นเก็บอุปกรณ์หรือวัสดุน้ำหนักเบา การติดตั้งระบบไฟแสงสว่างควรให้ โต๊ะตั้งหันหลัง ให้นำต่างและเพิ่มหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่มีความสว่างมากพอไว้ด้วย

11.1.2 อุปกรณ์

(1) เครื่องแก้วและขวดฝาเกลียวควรมีไว้พอสมควร เช่น บีกเกอร์ ฟลาสค์ กระจกตวงควรมีความจุหลายขนาด กระจกสไลด์ล้างให้ปราศจากไขมัน ขวดแก้วปากกว้างมีไว้เพื่อใช้ใส่สารละลายสต็อก

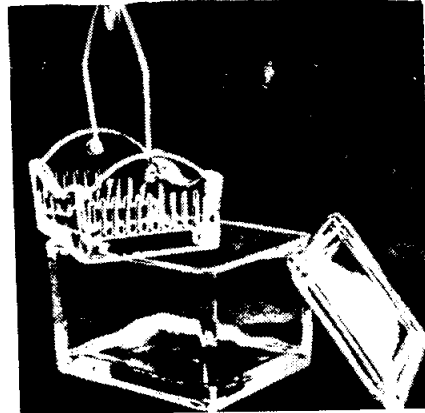
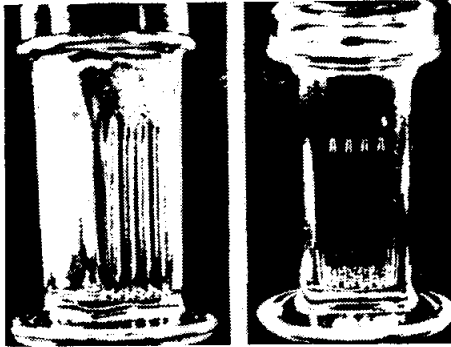
ปริมาณต่าง ๆ ตามต้องการ

(2) ถ้วยย้อมสี (staining jar or Coplin jar) มีทั้งชนิดที่ใส่สไลด์ในแนวตั้ง ขนาดบรรจุ 10 สไลด์ และชนิดที่ใส่สไลด์ได้ในแนวอนตะแคงหันหลังด้านที่ไม่มีเนื้อเยื่อชนกัน 20 สไลด์ สามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม (รูป 11-1) ปัจจุบันมีผู้ผลิตถ้วยย้อมสีสำหรับใส่สไลด์ในแนวตั้ง ทำด้วยสารพอลิเมอร์ ทำให้เบาสะดวกต่อการนำสเมียร์สไลด์ไปยังห้องปฏิบัติการอื่น หรือนำจากภาชนะมากลับมายังห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีถ้วยย้อมสีสำหรับใช้กับกระจกปิดในกรณีที่ทำสเมียร์บนกระจกปิดอีกด้วย

รูป 11-1 ถ้วยย้อมสีที่นิยมใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

ก. ชนิดใส่สไลด์แนวตั้ง

ข. ชนิดใส่สไลด์แนวอนตะแคง



(3) กระจกปิด ควรมีไว้ใช้หลายขนาดทั้งชนิดกลม สีเหลี่ยมและสี่เหลี่ยมผืนผ้า (ดูขนาดจากข้อ 10.3) ล้างกระจกปิดให้สะอาดปราศจากไขมันด้วยแอลกอฮอล์ อุปกรณ์ช่วยการเมาทส์สไลด์ เช่น เข็มผ้า ตัด ผ้าเช็ดกระจก กระจกขกรอง ควรมีให้พร้อม

(4) ถาดล้างสไลด์ (slide-washing tray) มีให้เลือกใช้ได้หลายชนิดหลายขนาด ขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน อาจดัดแปลงอุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นถาดมีความลึกพอที่เมื่อใส่น้ำให้ไหลผ่านแล้ว จะมีปริมาณซึ่งอยู่ในถาดมากพอท่วมสไลด์ จุดมุ่งหมายการใช้งานของถาดล้างสไลด์ คือ (ก) มีการเปลี่ยนน้ำอย่างรวดเร็ว แต่ไม่พองจนทำให้แผ่นบางของเนื้อเยื่อที่เมาทอยู่บนกระจกสไลด์ร่วนหลุด (ข) น้ำในถาดถูกแทนที่อย่างต่อเนื่อง โดยให้น้ำเข้าทางด้านล่างของถาดแล้วล้นออกทางขอบบนของถาด (ค) สันด้านล่างของถาดมีความสูงพอที่จะไม่ทำให้สไลด์เลื่อนหลุดจากที่

(5) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ นอกจากจะใช้งานเพื่อใช้ลอยแผ่นบางของเนื้อเยื่อที่เจียนด้วยไมโครโทมแล้ว ยังใช้ประโยชน์เพื่อใช้อุ่นเมาทที่มีเตี้ยที่เป็นของเหลวบางชนิด เช่น กลีเซอรินเยลลี่ เพื่อให้เหลวขึ้นจึงจะนำเอามาใช้เมาทส์สไลด์

(6) แผ่นโลหะความร้อนควบคุมอุณหภูมิ นอกจากจะใช้งานในขั้นตอนสุดท้ายของการเมาทแผ่นบางของเนื้อเยื่อลงบนกระจกสไลด์แล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในขั้นตอนสุดท้ายของการเมาทด้วยเมาทแทนที่แล้ว

ปิดด้วยกระจกปิด วางสไลด์ไว้บนแผ่นความร้อนควบคุมอุณหภูมิเป็นการช่วยเร่งให้เมทาเทนท์เซตตัวเร็วขึ้น เมื่อทำการเมทาต์สไลด์จนเสร็จแล้วจึงจะรวบรวมสไลด์ไปใส่ในตู้ต่อไป

(7) กล้องจุลทรรศน์ ควรมีทั้งชนิดธรรมดา (compound microscope) และชนิดช่วยการผ่าตัดแมลง (dissecting microscope) กล้องจุลทรรศน์มีไว้ตรวจสอบคุณภาพของสี และความบกพร่องในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำสไลด์ถาวร ซึ่งอาจมองดูด้วยตาเปล่าไม่เห็น

(8) ตู้อบแห้งควบคุมอุณหภูมิ มีไว้เพื่อใช้ในการหลอมละลายพาราฟินและขั้นตอนการซึมซาบด้วยพาราฟิน นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ด้านการอบสไลด์ถาวรที่เตรียมสำเร็จแล้วไว้แห้ง

(9) กล่องเก็บสไลด์ ควรมีหลายขนาด ขนาดเล็กบรรจุได้ 20 สไลด์ เหมาะสำหรับเก็บสไลด์สัตว์ที่จัดหมวดหมู่ไว้หรือชิ้นส่วนสัตว์แต่ละประเภท ขนาดใหญ่บรรจุได้ 100 สไลด์เหมาะสำหรับเก็บสไลด์ที่ล้างทำความสะอาดแล้วพร้อมเพื่อการนำมาใช้ หรือไว้ใช้เก็บสไลด์ของสัตว์ที่รวบรวมหมู่ใหญ่ในระดับสกุล วงศ์ ขึ้นไป การเก็บจัดแบ่งหมวดหมู่สไลด์สามารถทำได้ตามวัตถุประสงค์ของผู้ปฏิบัติ โดยการติดป้ายของชนิดและประเภทไว้ที่หน้ากล่อง

กิจกรรม 11.1

ให้นักศึกษานำเครื่องแก้วทุกชนิดรวมถึงถ้วยย้อมสี กระจกสไลด์และกระจกปิดด้วย ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาล้างทำความสะอาดแล้วอบให้แห้ง จัดวางเรียงเก็บแต่ละชนิดไว้ในตู้เพื่อป้องกันฝุ่น พร้อมทั้งติดป้ายบอกชนิดของเครื่องแก้วไว้ที่หน้าตู้ด้วย เพื่อสะดวกต่อการหา เมื่อต้องการใช้

ต่อไปศึกษาคู่มือการใช้เครื่องมือต่าง ๆ แล้วทดลองปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของเครื่องมือที่มีอยู่ในข้อ 11.1 ว่าทำงานได้ผลตามปกควบคุมอุณหภูมิหรือไม่ ถ้าขัดข้องควรส่งซ่อม

11.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เพื่อการย้อมสีและการเมทาต์สไลด์ถาวร มีดังนี้

11.2.1 สารเพื่อการรันนิ่งอัพและรันนิ่งดาวน์ (running up and running down reagent) คือสารที่ใช้สำหรับดึงหรือละลายตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อให้หมดออกไปจากเนื้อเยื่อแล้วเปลี่ยนเป็นสารที่ค่อย ๆ นำน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ เพื่อให้เนื้อเยื่ออยู่ในตัวกลางเดียวกันกับตัวกลางของสีย้อมซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นสารละลายอยู่ในน้ำ กระบวนการนี้เรียกว่ารันนิ่งดาวน์ และเมื่อเนื้อเยื่อถูกย้อมสีเรียบร้อยแล้วก็ใช้สารในกลุ่มเดียวกันดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อให้หมด จนถึงขั้นทำให้ใส เพื่อพร้อมต่อการเมทาต์สไลด์ต่อไป กระบวนการนี้เรียกว่า รันนิ่งอัพ สารที่ใช้โดยทั่วไปถ้าเป็นเนื้อเยื่อฝังในพาราฟิน คือ โซลีน และ เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจนถึงสมบูรณ์

11.2.2 สารช่วยลีดิต ควรมีไว้ใช้ในกรณีที่ต้องการย้อมสีเนื้อเยื่อโดยตรง ไม่สามารถทำได้และต้องย้อมโดยวิธีใช้สารช่วยลีดิต

11.2.3 สีย้อมและสารอื่นที่เกี่ยวข้อง สีย้อมชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้บ่อย เช่น ย้อมออกซิเจน อีโอซิน คาร์มัน ฟุกซิน ควรจำเป็นต้องซื้อหามาเก็บไว้เพื่อจะสามารถเตรียมเป็นสารละลายสต็อกได้ สีย้อมอื่นที่ใช้งานย้อมเฉพาะควรหาซื้อมาเก็บไว้ตามความเหมาะสม สารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสี เป็นต้นว่า สารประเภทกรด เบส บัฟเฟอร์ ออกซิโดเซอร์ วิดีวเซอร์ ควรจัดซื้อมาให้พร้อม เพื่อจะสามารถใช้ประกอบการเตรียมสีย้อม การบลูสีย้อม ตลอดจนการคัพเฟเรนซ์เอชันได้

11.2.4 สารเมทส์ไลด์ จัดการซื้อหาเมทิงมีเดียที่สามารถใช้งานประจำทั่วไปได้เช่น แคนาดา บัลซัม เพอร์เมท ส่วนสารเมทิงมีเดียชนิดอื่น หรือสารที่สามารถจะนำมาใช้ประกอบการเตรียมเมทิงมีเดียที่ใช้งานเฉพาะควรเลือกซื้อมาใช้ตามความเหมาะสม

กิจกรรม 11.2

ให้นักศึกษาจัดหาน้ำกลั่นมาเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยเลือกชนิดบรรจุขวด 5-10 ลิตร ควรมีท่อดูด (aspirator) เพื่อความสะดวกในการใช้ และควรหาขวดจุกหยด (drop bottle) ขนาดความจุ 60 มิลลิลิตร มาเก็บไว้จำนวนหนึ่ง แล้วบรรจุสารต่อไปนี้ลงไป (1) โซลีน (2) อะซีโตน (3) น้ำแอมโมเนีย (4) สารละลายลูกลอย (5) สีย้อมโทลูอิดีน บลู (6) สีย้อมแกรม (7) สีย้อมเจมซ่า (8) สีย้อมเมทิลีนบลู

11.3 ขั้นตอนหลักของการทำสไลด์ถาวร

ขั้นตอนหลักของการทำสไลด์ถาวรในที่นี้จะกล่าวถึงขั้นตอนหลักของการย้อมสีและการเมทส์ไลด์ของเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพาราฟิน และเจียนเป็นแผ่นบางเมทส์ติดอยู่บนกระจกสไลด์แล้ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่อที่ฝังในตัวกลางอื่น รวมทั้งประยุกต์ใช้สำหรับการทำสไลด์ถาวรของสัตว์ทั้งตัวได้ ขั้นตอนหลักที่สำคัญมีดังนี้

- (1) ดึงพาราฟินออกให้หมดด้วยโซลีน
- (2) ใส่น้ำเข้าไปในเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นจากมากมาหาน้อย (วันนิ่งดาวน)
- (3) การย้อมสี ซึ่งจะรวมถึงการใช้สารอื่นที่ประกอบการย้อมสีและทำให้คุณภาพของสไลต์ด้วย
- (4) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำไปหาสูง (วันนิ่งอัฟ)
- (5) การทำให้ใสในโซลีน
- (6) การเมทส์ไลด์ด้วยสารเมทาแทนซ์และกระจกปิด

ขั้นตอนหลักเหล่านี้มีรายละเอียดอยู่ในการย้อมสีสีมาทอกซิลิน-อีโอซิน ซึ่งเป็นงานประจำที่ใช้กันทั่วไป (บทที่ 12)

กิจกรรม 11.3

ให้นักศึกษาจัดหาและทำการเตรียมสารละลายต่อไปนี้เพื่อเก็บไว้ใช้ในกิจกรรมต่อไป คือ (1) โซลีน (2) เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (3) โซลีนผสมกับเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 50:50 (4) 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (5) 85 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (6) 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

สรุป

การจัดการและจัดวางเครื่องมือเครื่องใช้ที่เกี่ยวข้องกับการย้อมสีและการเม้าท์สไลด์ให้ถูกต้องตามขั้นตอนเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อความสะดวกรวดเร็วในการทำสไลด์ถาวร และเป็นการช่วยให้คุณภาพของสไลด์ดีขึ้นได้

แบบฝึกหัดที่ 11

- จงบอกขั้นตอนที่สำคัญของการทำสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อที่อยู่ในแผ่นบางของพาราฟิน
(ตอบ : ดู 11.3)
- ท่านจะสามารถเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์จากแอลกอฮอล์ที่มีขายอยู่ในตลาดความเข้มข้น 98.5 เปอร์เซ็นต์ ได้อย่างไร
(ตอบ : ต้องใช้คณิตศาสตร์ช่วยในการคำนวณว่าต้องใช้แอลกอฮอล์และน้ำอย่างละปริมาตรเท่าใด)
- จากความรู้วิชาเคมี และความรู้ที่ได้จากบทนี้ ๆ ของตำราเล่มนี้ ทำให้นักศึกษาทราบว่าสารพวก ลิพิด ละลายได้ใน จึงสามารถนำมาใช้ล้างคราบ ที่ติดอยู่บนกระจกสไลด์และกระจกปิดได้
- นักปฏิบัติวิชาไมโครเทคนิคที่ดีควรทราบ ต่าง ๆ ของกระบวนการในวิชานี้จนสามารถปฏิบัติและ..... ในการจัดการและจัดหาเครื่องมือเครื่องใช้ตลอดจน ที่จำเป็นและเหมาะสมมาใช้งานได้
(ตอบ : ต้องอ่านทั้งบทให้เข้าใจจึงจะสามารถเติมคำในช่องว่างได้)