

## บทที่ 12

### สีย้อมที่ใช้ประจำ

#### เค้าโครงเรื่อง

- 12.1 ย้อมทอกลิน
  - 12.1.1 เตลาฟิลต์'ส ย้อมทอกลิน
  - 12.1.2 เออร์ลิช'ส ย้อมทอกลิน
  - 12.1.3 แอริส'ส ย้อมทอกลิน
  - 12.1.4 เมเยอร์'ส ย้อมทอกลิน
  - 12.1.5 ไฮเตนเฮน'ส ไอออน ย้อมทอกลิน
- 12.2 อีโอซิน และสีย้อมทับชนิดอื่น
  - 12.2.1 อีโอซินในแอลกอฮอล์
  - 12.2.2 อีโอซินในน้ำ
  - 12.2.3 สารละลายอีโอซิน-ฟอสฟีน บี
  - 12.2.4 อีโอซิน : วิธีตะกอน
  - 12.2.5 อีโอซิน-ออเรนจ์จี
  - 12.2.6 สีย้อมทับชนิดอื่น
- 12.3 วิธีการย้อมสีแอริส ย้อมทอกลิน-อีโอซิน

#### สาระสำคัญ

1. ย้อมทอกลินที่ผลิตจากโรงงานไม่มีคุณสมบัติของการเป็นสีย้อม ต้องนำมาบ่ม (ripened) หรือ ออกซิไดส์ก่อนจึงจะใช้เป็นสีย้อมได้ ซึ่งมีหลายวิธี สารที่ใช้ ออกซิไดส์ ได้แก่ เมอร์คิวริกออกไซด์ โซเดียมไฮโอเดต และพอสเซียมเพอร์แมงกาเนต
2. อีโอซินเป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุมาก ใช้เป็นสีย้อมทับ (counter stain) เพื่อเพิ่มความเด่นชัดการสัทธิเนื้อเยื่อ สามารถเตรียมได้หลายวิธี และเลือกใช้ตามความเหมาะสม นอกจากนี้ยังมีสีย้อมทับอื่น เช่น แอซิดฟูกซิน
3. วิธีการย้อมสีโดยแอริส ย้อมทอกลินและอีโอซิน เป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำในห้องปฏิบัติการทางไมโครเทคนิค สามารถใช้สัทธิเนื้อเยื่อได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นพวกที่มีลินินมาก

## วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถทำการเตรียมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) ชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นสารละลายสต็อก (stock solution) เก็บไว้ใช้
2. นักศึกษาสามารถทำการเตรียมอีโอซิน (eosin) ชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นสารละลายสต็อกเก็บไว้ใช้ได้
3. นักศึกษาสามารถปฏิบัติการย้อมสีเนื้อเยื่อโดยวิธีแฮร์ริส'ส ฮีมาทอกซิลิน-อีโอซินได้

ฮีมาทอกซิลินที่ผลิตจากโรงงาน ไม่มีคุณสมบัติของการเป็นสีย้อม จำเป็นต้องนำมาบ่ม หรือออกซิไดส์เสียก่อน ซึ่งอาจใช้แสงหรืออากาศโดยตั้งสารละลายไว้เป็นเวลานานหลายเดือนจึงจะนำมาใช้ได้ อาจช่วยเร่งปฏิกิริยาโดยเติมสารออกซิไดซิงลงไป เช่น เมอร์คิวริกออกไซด์ โซเดียมไฮโอเตต และพอสเฟอริคแอซิด จะได้ผลเร็วกว่าใช้แสงหรืออากาศในห้อง การออกซิเดชันเป็นการไล่ไฮโดรเจนออกไปสองอะตอม ฮีมาทอกซิลินจะเปลี่ยนจากสูตร  $C_{16}H_{14}O_6$  มาเป็น  $C_{16}H_{12}O_6$  ฮีมาทอกซิลินทำหน้าที่เป็นสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อที่มีประจุลบ เพื่อให้การย้อมสีสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงมีการย้อมทับด้วยสีย้อมสำหรับเนื้อเยื่อมีประจุบวก เช่น สีอีโอซิน นักปฏิบัติการจึงนิยมเลือกใช้ฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน เป็นสีย้อมสำหรับงานประจำทั่วไป

### 12.1 ฮีมาทอกซิลิน<sup>1</sup>

#### 12.1.1 เดลาฟีลด์'ส ฮีมาทอกซิลิน (Delafield's hematoxylin)

ฮีมาทอกซิลิน	40 กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	25.0 มิลลิลิตร
แอมโมเนียมอะลูมิเนียมตัวในน้ำ	400.0 มิลลิลิตร
(NH <sub>4</sub> Al(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O 1 ส่วน : น้ำ 11 ส่วน)	

ละลายฮีมาทอกซิลินในแอลกอฮอล์แล้วเติมลงในสารละลายแอมโมเนียมอะลูมิเนียม ปิดจุกฟลาสค์ด้วยสำลี ตั้งให้ถูกแสง 3-5 วัน กรองแล้วเติมด้วยกลีเซอรินและเมทิลแอลกอฮอล์อย่างละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกฟลาสค์สำลีตั้งเดิม ตั้งไว้ให้ถูกแสงอย่างน้อย 6 สัปดาห์ สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นปี ถ้ามีจุกปิด

---

\*\*\*1. ฮีมาทอกซิลินที่ได้จากการเตรียมตามสูตรต่าง ๆ มีอายุการใช้งานมากน้อยต่างกัน เพื่อให้การย้อมสีได้ผลดีที่สุด ควรตรวจสอบสีย้อมที่นำไปใช้งานก่อน โดยนำสีย้อมที่ต้องการจะนำไปหยดลงในน้ำประปา 2-3 หยด ถ้าได้สีม่วงบนน้ำเงินทันที แสดงว่าสีย้อมนั้นยังใช้ได้ผลดี ถ้าสีเปลี่ยนช้ำ คือยังคงเป็นสีค่อนข้างแดงหรือน้ำตาล แสดงว่าเสื่อมคุณภาพ ไม่ควรนำมาใช้

ถ้าต้องการบ่มให้เร็วขึ้น เติมอากาศด้วยเครื่องพ่นอากาศลงไป 4 ชั่วโมง สามารถใช้สีย้อมได้เร็วกว่าที่ตั้งไว้ให้ถูกออกซิไดส์โดยอากาศตามปกติ และยังสามารถนำไปเจือจางลงครึ่งหนึ่งก่อนนำไปใช้ย้อมสี

#### 12.1.2 เออร์ลิช'ส ยีมาทอกซิลิน (Ehrlich's hematoxylin)

ยีมาทอกซิลิน	2.0 กรัม
แอมโมเนียมอะลัม $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.0 กรัม
แอลกอฮอล์ (เมทิลหรือเอทิล)	100.0 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	100.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

ละลายยีมาทอกซิลินในแอลกอฮอล์ และละลายแอมโมเนียมอะลัมในน้ำ นำมาผสมกันและจึงเติมกลีเซอรอล ปิดจุกฟลาสค์หรือขวดด้วยสำลี ตั้งบ่มไว้ 6-8 สัปดาห์ ถ้าต้องการใช้ทันทีเติมด้วยโซเดียมไฮโอเดต 0.24 กรัม ถ้าเติมด้วยกรดแอซิดิกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานนับปี

#### 12.1.3 แฮร์ริส'ส ยีมาทอกซิลิน (Harris's hematoxylin)

ยีมาทอกซิลิน	1.0 กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์	10.0 มิลลิลิตร
พอแทสเซียมหรือแอมโมเนียมอะลัม	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	200.0 มิลลิลิตร
เมอร์คิวริก ออกไซด์	0.5 กรัม

ละลายยีมาทอกซิลินในแอลกอฮอล์ ที่อยู่ในฟลาสค์ ละลายพอแทสเซียมหรือแอมโมเนียมอะลัมในน้ำต้ม แล้วเติมสารละลาย ยีมาทอกซิลินลงไป ต้มต่อไปแล้วค่อย ๆ เติมเมอร์คิวริกออกไซด์ ทำให้น้ำเย็น โดยนำฟลาสค์มาแช่ในน้ำเย็นแล้วเติมน้ำแข็งเพื่อให้เย็นเร็วขึ้น เติมกรดแอซิดิกเข้มข้นลงไป 2-3 หยด เพื่อกันมิให้มีแสงสะท้อนของโลหะ และยังช่วยทำให้นิวเคลียสสดีไลซ์ขึ้นเมื่อนำไปเป็นสีย้อม ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานเกินกว่า 2 เดือน

#### 12.1.4 เมเยอร์'ส ยีมาทอกซิลิน (Mayer's hematoxylin)

ยีมาทอกซิลิน	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0 มิลลิลิตร
โซเดียมไฮโอเดต	0.2 กรัม
พอแทสเซียมอะลัม $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	50.0 กรัม
กรดไซทริก	1.0 กรัม

## คลอรัลไฮเดรต

50.0 กรัม

ละลายอีมาทอกซิลินในน้ำ ค่อย ๆ อุ่นน้ำขึ้นแล้วเติมโซเดียมไฮโอเตตและพอสเซียมอะลัมตามลำดับ ต้มจนละลายหมด แล้วจึงเติมกรดไซทริกและคลอรัลไฮเดรต ปิดจุกพลาสติกด้วยสำลี ตังบ่มไว้ 6-8 สัปดาห์ ถ้าต้องการใช้แล้วสามารถนำไปใช้ได้ภายใน 2 สัปดาห์

## 12.1.5 ไฮเดนเฮิน'ส ไอออน อีมาทอกซิลิน (Heidenhain's iron hematoxylin)

## สารละลาย A

เฟอร์ริกอะลัม ( $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 4.0 กรัม

น้ำกลั่น 100.0 กรัม

ละลายแล้วใส่ขวดเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อป้องกันมิให้ตกตะกอนติดข้างขวด

## สารละลาย B

อีมาทอกซิลิน 10.0 กรัม

95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ 100.0 มิลลิลิตร

ละลายแล้วนำขวดมาตั้งไว้จนได้สีเหลืองน้ำตาล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 4-5 เดือน ใช้เป็นสารละลายสตัดก เมื่อจะใช้นำมา 4-5 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางในน้ำ 100 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายลิเทียมคาร์บอเนตอมั้วในน้ำลงไป 3 หยด ซึ่งทำให้สีสดขึ้น ใช้เป็นสีย้อมได้

วิธีใช้ (1) ต้องไม่ผสมสารละลาย A และ B มิฉะนั้นจะเสียใช้ไม่ได้

(2) สารละลาย A ทำหน้าที่เป็นสารช่วยสีติด ต้องใช้ก่อน แล้วจึงมาใช้สารละลาย B เป็นสีย้อม

## กิจกรรม 12.1

ทำการเตรียมสารละลายสีย้อม แฮร์ริส'ส อีมาทอกซิลิน ตามวิธีในข้อ 12.1.3 แล้วเก็บไว้เป็นสารละลายสตัดกเพื่อไว้ใช้เป็นสีย้อม

## กิจกรรม 12.2

ทำการเตรียมสารละลายไฮเดนเฮิน'ส ไอออน อีมาทอกซิลิน ตามวิธีในข้อ 12.1.5 เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น และทำสารละลาย B เป็นสารละลายสตัดกเพื่อไว้ใช้เป็นสีย้อม

## 12.2 อีโอซินและสีย้อมกับชนิดอื่น

## 12.2.1 อีโอซินในแอลกอฮอล์ (alcoholic eosin)

อีโอซิน Y (C.I. 45380)

1.0 กรัม

น้ำกลั่น	20.0 มิลลิลิตร
ละลายอีโอซิน Y ในน้ำอุ่นเพื่อให้ละลายได้ง่าย ปล่อยให้เย็น	
95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	80.0 มิลลิลิตร
เก็บไว้เป็นสารละลายสต็อก	
เมื่อต้องการใช้	
สารละลายสต็อกอีโอซิน	25.0 มิลลิลิตร
80 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	75.0 มิลลิลิตร

กรองก่อนใช้ ถ้าเติมกรดแอซิดิกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลายอีโอซินที่จะใช้ 100 มิลลิลิตร จะทำให้การข่มเนื้อเยื่อติดสีแดงเข้มข้น

#### 12.2.2 อีโอซินในน้ำ (aqueous eosin)

อีโอซิน Y (C.I. 45380)	5.0 กรัม
น้ำ (น้ำกลั่นหรือน้ำประปา)	100.0 มิลลิลิตร
ถ้าน้ำประปาเป็นด่างเล็กน้อยจะให้สีสวยขึ้น อย่างไรก็ตามควรเติมผลึกไทมอล (thymol) เล็กน้อย หรือหยดฟอร์มาลินลงไป 2-3 หยด เพื่อป้องกันเชื้อรา เก็บไว้เป็นสารละลายสต็อก	
เมื่อต้องการใช้	

ผสมสารละลายสต็อก 1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน

#### 12.2.3 สารละลายอีโอซิน - โฟลซีน บี (eosin-phloxine B)

A อีโอซิน Y (C.I.45380)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร
B โฟลซีน B (C.I.45410)	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร
เมื่อต้องการใช้	
สารละลายสต็อกอีโอซิน (A)	100.0 มิลลิลิตร
สารละลายสต็อกโฟลซีน (B)	10.0 มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	780.0 มิลลิลิตร
กรดแอซิดิกเข้มข้น	4.0 มิลลิลิตร

ปรับสัดส่วนของสารละลายที่จะใช้มากขึ้นน้อยตามต้องการ ถ้าใช้งานมากควรเปลี่ยนหลังจากใช้ติดต่อกันแล้ว 7 วัน หรือเร็วกว่านั้น

#### 12.2.4 อีโอซิน : วิธีตกตะกอน (eosin : precipitated method)

อีโอซิน Y (C.I. 45380)	5.0 กรัม
------------------------	----------

น้ำกลั่น

1,000.0 มิลลิลิตร

ละลายโดยอุ่นเล็กน้อย ปล่อยให้เย็น ค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8.0 มิลลิลิตร ลงไปที่ละหยด ตั้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ตกตะกอน รินน้ำใสข้างบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 6 ครั้ง แต่ละครั้งใช้น้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อต้องการใช้ นำตะกอนทั้งหมดมาละลายใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ 800 มิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 30-60 วินาที สีของเนื้อเยื่อจะสว่างกว่าใช้อิโอสินตามข้อ 12.2.2

#### 12.2.5 อีโอสิน-ออเรนจ์จี (eosin-orange G)

1 เปอร์เซ็นต์ อีโอสิน Y (C.I.45380) ใน 95 เปอร์เซ็นต์

เอทิลแอลกอฮอล์ 10.0 มิลลิลิตร

สารละลายอิมัตัวของออเรนจ์จีใน 95 เปอร์เซ็นต์

เอทิลแอลกอฮอล์ (ประมาณ 0.5 กรัม/100 มิลลิลิตร) 5.0 มิลลิลิตร

95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ 45.0 มิลลิลิตร

#### 12.2.6 สียอมรับชนิดอื่น (other acceptable counter stains)

- (1) แอซิดฟุกซิน (acid fuchsin C.I.43685) 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ ถ้าเป็นกรดเล็กน้อยยอมสติดัดขึ้น ถ้าติดสีมากเกินไปล้างด้วยน้ำประปา
- (2) ออเรนจ์จี (orange G C.I.16230) อิมัตัวใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิล-แอลกอฮอล์
- (3) บอร์โดซ์เรด (bordeaux red, C.I.16180) 1 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ
- (4) ไบบริช สการ์เลท (beibrich scarlet, C.I.26905) 1 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ เป็นสียอมรับที่ตีมากชนิดหนึ่ง
- (5) คองโกเรด (congo red, C.I.22120) 0.5 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ
- (6) ไลท์กรีน เอส เอฟ (light green SF, yellowish. C.I.42095) 0.2-0.3 เปอร์เซ็นต์ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์
- (7) แอนิลิน บลู ดับบลิวเอส (anilin blue W.S., C.I.42780) 2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ เหมาะสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
- (8) ฟาสท์กรีน เอนพีเอฟ (fast green FCF, C.I.42053) ให้ผลเช่นเดียวกับสีไลท์กรีนและแอนิลินบลู
- (9) วูลกรีน (wool green, C.I.44090) 0.5 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ
- (10) แซฟฟรอน (saffron C.I.75100) 2 เปอร์เซ็นต์ในเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์

กิจกรรม 12.3

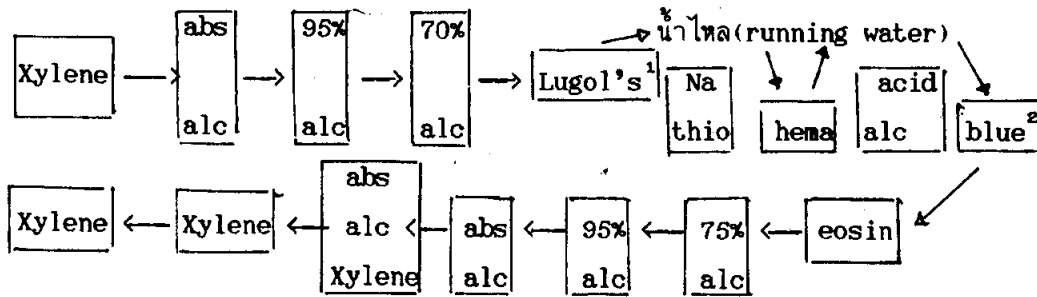
เตรียมสารละลายอีโอซินในแอลกอฮอล์ตามวิธีในข้อ 12.2.1 เก็บไว้เป็นสารละลายสต็อก เพื่อใช้ย้อมสีในกิจกรรมต่อไป

12.3 วิธีการย้อมสีแฮริสียีมาทอกซิลิน-อีโอซิน

สารทำให้คงสภาพ : เลือกใช้ได้ทุกชนิดตามข้อแนะนำ ยกเว้นชนิดที่ประกอบด้วยออสเมียมเททรอกไซด์

ควรจัดเรียงถ้วยย้อม (staining jar) ดังรูป 12-1

รูป 12-1 การจัดเรียงถ้วยย้อมสีพร้อมทั้งสารละลายที่เกี่ยวข้อง ในระเบียบวิธีการย้อมสี ยีมาทอกซิลินอีโอซิน ด้วยไซลีนอาจเพิ่มเป็น 2 ถ้วย ถ้ามีจำนวนสไลด์มาก และด้วยแอลกอฮอล์-ไซลีน ก็เช่นเดียวกัน



สารละลายที่ต้องใช้ :

- 1) แฮริสียีมาทอกซิลิน
- 2) สารละลายสำหรับตีฟเฟเรนซิเอท (differentiate) อาจใช้ 1 เปอร์เซ็นต์แอซิดแอลกอฮอล์ (1 มิลลิลิตรกรดไฮโดรคลอริก ใน 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร)
- 3) สารบลูอิง (bluing agent) ถ้าน้ำประปาไม่เป็นด่างควรใช้สารบลูอิง มีให้เลือกใช้ได้หลายชนิด คือ

\*\*\*1. ถ้าไม่ได้ใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ในสารทำให้คงสภาพ ไม่ต้องใช้สารละลายลูกบอล และโซเดียมไทโอซัลเฟต

2. การบลูอิง (bluing) เป็นการทำให้สีย้อมสีมาทอกซิลินเป็นสีฟ้าหรือน้ำเงินชัดเจน มีสารเคมีหลายชนิด เช่น แอมโมเนีย สารละลายสก็อต

- (1) 1 เปอร์เซ็นต์เทียมคาร์บอนेट (สารละลายอิมตัว)
- (2) 2 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนีย (น้ำแอมโมเนีย)
- (3) สารละลายสก๊อต (Scott's solution)

โซเดียมไบคาร์บอนेट	7.0 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	40.0 กรัม
น้ำประปา	2,000.0 มิลลิลิตร

เติมฟอร์มาลินให้มีปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายสต็อกเพื่อป้องกันเชื้อรา

#### 4) สารละลายอีโอซิน ชนิดโตก็ได้

##### วิธีการ

นำสไลด์ที่จะย้อมสีมารันนิ่งดาวน์ (running down) คือให้เนื้อเยื่อจากสภาพอยู่ในตัวกลางเปลี่ยนมาอยู่ในสภาพที่มีน้ำก่อนจึงจะย้อมสีได้ ระวังมิให้สไลด์แห้ง ไม่ว่าในขั้นตอนใด นำสไลด์มาใส่ในกระเช้าใส่สไลด์ซึ่งมีช่องว่างพอดีจะวางสไลด์ได้ในแนวตะแคงข้าง แล้วใส่ลงใน

ด้วยย้อมสีที่มีขนาดพอดีกับกระเช้าสไลด์ ยกกระเช้าสไลด์เปลี่ยนไปใส่ในด้วยย้อมสีที่มีสารละลายต่าง ๆ ตามรูป 2-1 รายละเอียดดังนี้

1. โซลิน 2-3 นาที อาจนานกว่าได้เล็กน้อย อาจเปลี่ยน 2 ครั้งถ้าจำเป็น
  2. แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2-3 นาที
  3. 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 2-3 นาที
  4. 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 2-3 นาที
- ถ้าไม่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์ในสารทำให้คงสภาพ ให้ข้ามขั้นตอนที่ 5-7
5. สารละลายลูกอล 3 นาที
  6. น้ำไหล 3 นาที
  7. 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไทโอซัลเฟต 3 นาที
  8. น้ำไหล 3-5 นาที
  9. แอริสมีมาทอกซิลิน ตรวจสอบทุก 1 นาที ถ้าเป็นสีใหม่จะย้อมติดได้เร็ว  
ถ้ายังไม่เข้มกลับไปแช่ไว้อีก ใช้เวลาประมาณ 2-5 นาที
  10. น้ำไหล 3-5 นาที
  11. แอซิดแอลกอฮอล์ 5-30 วินาที ดิฟเฟเรนเชียลเพื่อ  
ให้สีของไซโทพลาซึมจางลงและสีนิวเคลียสเข้มขึ้น
  12. น้ำไหล 5-30 วินาที
  13. บลูอิง (ด้วยสารชนิดใดชนิดหนึ่งในข้อ 12.3-3) 5 นาที



14. น้ำไหล 5 นาที
15. อีโอซิน (ชนิดใดชนิดหนึ่งถ้าจะให้ดีควรเป็นชนิดที่อยู่ในแอลกอฮอล์ 1-2 นาที  
ขั้นตอนต่อไปเป็นการวิ่งอัพ (running up) คือการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้ว
- ขั้นตอนที่ 16 และ 17 เป็นขั้นตอนที่ควบคุมสีของอีโอซิน ถ้าแช่ไว้นานสีจะจางลง
16. 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ จุ่ม 1-2 ครั้ง
17. 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ จุ่ม 2-3 ครั้ง
18. แอลกอฮอล์สีมบูร์น 2-3 นาที เปลี่ยน 2 ครั้ง
19. แอลกอฮอล์สีมบูร์น: ไซลีน (1:1) 2-3 นาที
20. ไซลีน 2-3 นาที อาจทำ 2 ครั้ง
21. ใส่น้ำสำหรับเม้าท์ ฟิงเงอให้สไลด์เปียก ไซลีนอยู่ตลอดเวลา ระหว่างการหยด  
สารสำหรับเม้าท์ลงไป แล้วปิดด้วยกระจกปิด (cover slip)

ผลที่ได้

- นิวเคลียส - ติดสีน้ำเงินหรือน้ำเงินดำ
- ไซโทพลาสซึม - ติดสีย้อมทับคือชมพูหรือแดงขึ้นกับสีของสีย้อมทับ
- เม็ดเลือดแดง - ติดสีส้มหรือชมพู
- เนื้อเยื่อส่วนที่เหลือ - ติดสีแดงหรือชมพู

ข้อสังเกต

1. ควรแช่สไลด์ไว้ในสารละลายแต่ละชนิดถ้าสารละลายนั้นมีแอลกอฮอล์ต่ำกว่า 80 หรือ 90 เปอร์เซ็นต์ ไม่ควรแช่นานกว่ากำหนดที่แนะนำ
2. อาจใช้แอลกอฮอล์ชนิดอื่น เช่น ไอโซโพรพิลแทนเอทิลได้ แต่จะใช้ทำเป็นตัวทำละลายไม่ได้
3. การแช่สไลด์ไว้ในฮีมาทอกซิลีนประมาณ 3-5 นาทีนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อที่ต้องการย้อม ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่ผ่านการทำให้คงสภาพด้วยเมอร์คิวริกคลอไรด์ หรือ ผ่านการดึงแคลเซียมออก จะต้องใช้เวลานานขึ้น
4. ปัญหาที่เกิดขึ้น เมื่อย้อมสีติดไม่ดีหรือสีไม่สวย อาจเนื่องมาจากการทำให้คงสภาพไม่สมบูรณ์ การแช่ชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างไว้ในสารละลายแอลกอฮอล์ หรือไอโอดีนนานเกินไป ข้อบกพร่องในการเตรียมสไลด์ตัวกลางเพื่อการฝัง ตลอดจนความไม่รอบคอบของการหยิบจับ (handle) สไลด์ในการเตรียมการย้อมสี การแก้ไขข้อบกพร่องเหล่านี้ทำได้เพียงกรณีเดียวคือ ข้อบกพร่องจากการดึงพาราฟินออกจากสไลด์แล้วแทนที่ด้วยน้ำก่อนการย้อมสี นั่นคือการทำย้อนกลับไปหา ไซลีนแล้ววิ่งน้ำลงมาใหม่

5. บางครั้งมีจำนวนสไลด์มาก และทำให้เกิดการปนเปื้อน เช่น มีสไลด์ 20-40 อันที่จะต้องนำมาย้อมสีพร้อมกัน ควรทำขั้นตอนที่ 1 - ไซลีน 2 ครั้ง และขั้นตอนที่ 20 - ไซลีน 3 ครั้ง การนำสไลด์ขึ้นจากถ้วยย้อมสี ควรใช้คีมคีบขึ้นมาที่ละแผ่น และปลายด้านล่างของสไลด์กับขอบถ้วยย้อมสีเพื่อให้สะอาด ไซลีน วางหงายด้านที่มีเนื้อเยื่อขึ้นด้านล่างวางทับลงบนกระดาษกรอง หรือผ้าฝ้ายสีขาว ระวังมิให้สไลด์แห้ง รีบหยดสารสีเมาทันทีแล้วรีบเมาทปิดด้วยกระจกปิด
6. สีของฮีมาทอกซิลินจะค่อนข้างชมพู จึงจำเป็นต้องบลูอิงเสียก่อน ถ้าใช้สารบลูอิงพวกแอมโมเนีย เมื่อล้างด้วยน้ำไหลควรให้แน่ใจว่าล้างจนหมด เพราะแอมโมเนียยับยั้งการติดสีอีโอซิน
7. ถ้าใช้อีโอซินในแอลกอฮอล์เป็นสีย้อมทับ โดยวิธีตกตะกอน ควรใช้เวลาย้อมสีให้เร็วขึ้นคือ 13-30 วินาที และควรจุ่มสไลด์ใน 80 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ก่อนการย้อมสีด้วยอีโอซิน
8. ถ้าใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์ และสารทำให้คงสภาพ หรือทำการตั้งแคลเซียมออกจากเนื้อเยื่อ การย้อมสีด้วยอีโอซินควรให้เร็วขึ้นกว่าการย้อมตามปกติ

#### กิจกรรม 12.4

นำถ้วยย้อมสีมาตั้งเรียงกันเป็นแถวยาวบนโต๊ะปฏิบัติการ พร้อมทั้งใส่สารเคมีและสีย้อมลงไปเรียงตามลำดับเริ่มต้นจากไซลีน (ตามรูป 12-1) ยกเว้นลูกบอล และไซเตียมไทโอซัลเฟต ติดป้ายบอกชื่อสารละลายแต่ละชนิดลงบนข้างถ้วยด้านหน้าให้ถูกต้อง เพื่อจะได้มองเห็นได้ชัด ควรใส่สารละลายลงไปประมาณ 3 ส่วน 4 ของความจุของถ้วย เพื่อที่เมื่อแซกระเข้าใส่สไลด์ลงไป สารละลายท่วมสไลด์แต่ไม่ถึงกับล้นออกมาจากถ้วย ปิดฝาถ้วยทุกใบ นำกระจกสไลด์ที่แปะเนื้อเยื่อที่เจือ เป็นแผ่นบางแล้วของกล้ามเนื้อขา ล้างสี และกล้ามเนื้อหัวใจมาเรียงใส่ตะแกรงลงในกระเช้าใส่สไลด์ ดำเนินการย้อมสีฮีมาทอกซิลิน-อีโอซินตามวิธีในข้อ 12.3

#### สรุป

การย้อมสีให้ได้ผลดีต้องมีการเตรียมการที่ดี เริ่มตั้งแต่การทำให้คงสภาพ มิฉะนั้นจะแก้ไขยาก สีย้อมมิให้เลือกตามความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อและวัตถุประสงค์ของการสาธิตและเพื่อให้การย้อมสีเนื้อเยื่อเด่นชัดเห็นส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อได้ดีต้องเลือกสีที่มีคุณสมบัติเป็น เบสิกและแอซิกมาย้อม ซึ่งเป็นการย้อมทับ สีย้อมที่ใช้กันในงานประจำคือ วิธีย้อมสีฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน

## แบบฝึกหัดที่ 12

1. จงบอกชื่อสีย้อมที่นิยมใช้กันประจำในห้องเรียนปฏิบัติการมาสองชนิด พร้อมทั้งอธิบายคุณสมบัติเด่นของสีย้อมทั้งสองชนิดด้วย  
(ตอบ : อ่านลักษณะเด่นของสีย้อมในข้อ 12.1 และ 12.2 โดยละเอียด)
2. การบ่มคืออะไร อธิบายพร้อมทั้งชักตัวอย่าง  
(ตอบ : อ่านข้อ 12.1.1)
3. สารละลายเฟอร์ริกอะลูมิเนียมซึ่งเตรียมไว้เป็นสารละลายสต็อก A ตามวิธีของการเตรียมสีย้อมชนิด..... ทำหน้าที่เป็น ..... ส่วนสารละลายสต็อก B ทำหน้าที่เป็นสีย้อมชนิด.....  
(ตอบ : อ่านข้อ 12.1.5)
4. น้ำประปาที่มี pH เป็น..... สามารถเปลี่ยนสีชมพูของฮีมาทอกซิลินให้เป็นสีน้ำเงินปนดำได้โดยเฉพาะส่วน.....ของเซลล์ วิธีการนี้เรียกว่า.....  
(ตอบ : อ่านข้อ 12.3 เรื่องสารละลายที่ใช้)
5. สารละลายที่ใช้เพื่อติฟเฟรนซิเอทเนื้อเยื่อที่ย้อมติดสีมากเกินไปคือสารใด
  1. แอซิดฟลูจีน
  2. แอซิดแอลกอฮอล์
  3. แอซิดิก แอซิด
  4. สารละลายกรดทุกชนิด
6. เมื่อเตรียมสารละลายสต็อกเพื่อเก็บไว้ใช้มีข้อแนะนำให้เติมสารป้องกันเชื้อราลงไปด้วยที่นิยมใช้คือสารใด
  1. ฟอร์มาลิน
  2. ไทมอล
  3. กลิเซอรีน
  4. ถูกทุกข้อ
7. ถ้าใช้เมอร์คิวริกคลอไรด์เป็นสารทำให้คงสภาพ เมื่อนำเนื้อเยื่อมาย้อมสีฮีมาทอกซิลิน ควรปฏิบัติอย่างไร
  1. ตึงเมอร์คิวริกคลอไรด์ออกให้หมดด้วยสารละลายลูกอลและโซเดียมไทโอซัลเฟต
  2. ต้มล้างโซเดียมไทโอซัลเฟตออกให้หมดโดยใช้เวลานานกว่าปกติ
  3. เวลาในการย้อมสีฮีมาทอกซิลินควรนานกว่าที่ใช้กับเนื้อเยื่อชนิดอื่น
  4. ถูกทุกขั้นตอน
8. ข้อพึงปฏิบัติเมื่อนำเนื้อเยื่อที่ติงแคลเซียมออกแล้ว มาย้อมตามวิธีแฮร์ริสฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน คือ
  1. ปฏิบัติตามขั้นตอนการย้อมสีเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อชนิดอื่นทุกประการ
  2. ควรแช่สไลด์ไว้ในฮีมาทอกซิลินให้เร็วกว่าปกติ

3. ควรแช่สไลด์ไว้ในอีโคโนให้ช้ากว่าปกติ
4. ควรปฏิบัติตามขั้นตอนการย้อมสีเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อชนิดอื่น แต่ในขั้นตอนย้อมทอกลีลา ควรใช้เวลานานขึ้นเล็กน้อย และในขั้นตอนอีโคโนควรให้เร็วขึ้น

(ตอบ : ข้อ 5 ตอบ 2, ข้อ 6 ตอบ 4, ข้อ 7 ตอบ 4, ข้อ 8 ตอบ 4)