

ตอนที่ 5

ระเบียบวิธีการย้อมสีจำเพาะ

บทที่ 13

การย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกล้ามเนื้อ

เค้าโครงเรื่อง

13.1 การย้อมสีมัลลอรี่

13.1.1 วิธีของแพนทิน

13.1.2 วิธีรวดเร็วหนึ่งขั้นตอน

13.2 การย้อมสีไตรโครม

13.2.1 สีย้อมสีย้อมแมสของไตรโครม

13.2.2 วิธีรวดเร็วของพอลแลก

13.3 การย้อมสีกระดูก

13.4 การย้อมสีกล้ามเนื้อ โดยวิธีของมิลลินแกนไตรโครม

สาระสำคัญ

1. การย้อมสีโดยวิธีของมัลลอรี่ มีจุดประสงค์ให้สีแต่ละชนิดติดสีส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างกัน เพื่อให้เห็นความแตกต่างของส่วนประกอบชัดเจน เช่นสีย้อมแอนิลินบลูเลือกติดคอลลาเจนได้ดี โดยมีสารเคมีอื่นมาช่วยแยกให้ส่วนใดส่วนหนึ่งติดสีชนิดใดชนิดหนึ่งดียิ่งขึ้นแต่ไม่ได้ทำงานแบบสารช่วยติด
2. การย้อมสีโดยวิธีไตรโครม ใช้สีย้อมมากกว่า 3 ชนิด โดยยึดหลักการทำงานอิสระของสีแต่ละชนิดว่าจะเลือกติดสีส่วนประกอบใดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเพื่อความแตกต่างของสีมากขึ้นจึงเพิ่มการใช้สารช่วยติดเสริมเข้ามาด้วย นอกจากนี้ยังมีการตีฟเฟอเรนซ์เอชันความเข้ม-จางของสีที่ย้อมติดแล้วให้สวยงามยิ่งขึ้น
3. การย้อมสีกระดูกที่ถูกดึงแคลเซียมออกแล้วทำได้ง่าย และเห็นส่วนประกอบได้ชัด เพราะส่วนประกอบหลักจะเหลืออยู่แต่ส่วนที่เป็นเส้นใยที่ค้ำจุนโครงสร้างของกระดูกไว้ ซึ่งอยู่ยากอยู่ที่การเมาทที่แผ่นบางของกระดูกลงบนสไลด์ ซึ่งแก้ไขได้โดยใช้สารย้อมติดช่วย

4. การย้อมสีกล้ามเนื้อทำได้ง่ายด้วยสีย้อมมิลลิแกนไตรโครม สามารถเห็นรายละเอียดของเซลล์กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอบอยู่ได้ชัด และเพื่อผลเลิศยิ่งขึ้น ควรเลือกสารทำให้คงสภาพเป็นชนิด เช่น เฟอร์ฟูลิค

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกกลไกการทำงานของสารที่ช่วยแยกให้ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมาเลือกติดสีชนิดใดชนิดหนึ่ง
2. นักศึกษาสามารถบอกชื่อสีย้อม ที่เหมาะสมสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป กระดูก และกล้ามเนื้อได้
3. นักศึกษาสามารถปฏิบัติการเตรียมสีย้อมชนิดต่างๆ และปฏิบัติการย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูกและกล้ามเนื้อได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในหนึ่งสัปดาห์

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีความหลากหลายทั้งส่วนประกอบ และหน้าที่ ดังได้กล่าวแล้วในข้อ 1.2.2 การเลือกสีย้อมมาใช้ย้อมเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จึงต้องเลือกสีที่สามารถย้อมติดสีส่วนประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแต่ละชนิดให้ได้หมด ซึ่งจำเป็นต้องใช้สีย้อมมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป แต่กล้ามเนื้อต่างจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทั้งส่วนประกอบ รูปร่าง และหน้าที่ กล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด มีส่วนประกอบหลักที่เหมือนกัน คือ เส้นใยที่อยู่ภายในเซลล์และที่หุ้มเซลล์รวมเป็นมัด อย่างไรก็ตามเส้นใยต่าง ๆ เป็นโครงสร้างระดับสูงของโปรตีน การเลือกสีย้อมสำหรับกล้ามเนื้อจึงไม่ยุ่งยากเท่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

13.1 การย้อมสีมัลลอรี่

การย้อมสีมัลลอรี่ (Mallory staining) มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า Mallory's triple connective tissue stain ได้มีการปรับปรุงดัดแปลงให้มีคุณภาพดีขึ้น โดยเฉพาะเกี่ยวกับการใช้กรดฟอสโฟโมลิบดีก และกรดฟอสโฟทังสติก กรดฟอสโฟโมลิบดีกเหมาะสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เพราะช่วยลดความชัดของนิวเคลียสและส่วน

อื่นทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเด่นชัด ด้วยการติดสีแอนิลินบลู เชื่อกันว่าคุณสมบัติในการย้อมติดสีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื่องมาจากการมีกรดอยู่ในเส้นใย และกรดฟอสโฟโพลีโมลิบดิกทำหน้าที่ "สีย้อมแอซิดไม่มีสี" ภายในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในคอลลาเจน กรดฟอสโฟโพลีโมลิบดิกทำหน้าที่เป็นตัวแยกสีออก สำหรับสีย้อมแอซิด เช่น แอซิดฟุกซิน คือแยกแอซิดฟุกซิน ออกจากคอลลาเจน ทำให้สีแอนิลินบลูย้อมคอลลาเจนได้จำเพาะ กรดฟอสโฟโพลีโมลิบดิกจึงไม่ควรเรียกว่า "สารช่วยติดสี" เพราะตัวกรดเองด้านการทำงานของสีย้อมแอนิลินบลูสังเกตได้จากการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยแอนิลินบลู จะติดสีได้ดีถ้าไม่มีกรดฟอสโฟโพลีโมลิบดิก แต่จะไม่มีผลการจำเพาะต่อส่วนประกอบใดของเนื้อเยื่อ ในกรณีของกรดฟอสโฟโพลีทั้งสติก เป็นที่สังเกตว่าส่วนประกอบบางอย่างของเนื้อเยื่อทำงานจำเพาะกับโลหะบางอย่าง เช่น คอลลาเจนจำเพาะกับโพลีดีนัม ไฟโบรเกลีย โมโอเกลีย นิวโรเกลีย และเส้นใยบุผิว จำเพาะกับทั้งสแตนอาจสรุปได้ว่า กรดฟอสโฟโพลีทั้งสติกเพิ่มความเข้มของการติดสีพลาสมา การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ อาจใช้แยกกันหรือพร้อมกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผลการย้อมสี

กรดออกซาลิกก็นำมาใช้ย้อมสีได้เช่นเดียวกัน เพราะช่วยให้การย้อมสีแอนิลินบลูติดเนื้อเยื่อได้เร็วและเข้ม เชื่อกันว่ากรดออกซาลิกทำงานโดยลด pH จึงช่วยให้การย้อมด้วยสีแอนิลินบลู และสีอื่น เช่น ออลเรนจ์ จี ติดดีขึ้น

การใช้สีย้อมผสมไม่ทำให้เกิดพอลิโครม หรือ เมแทโครม เนื่องจากสีแต่ละชนิดต่างก็ทำงานแบบออร์โทโครมด้วยความเข้มต่างกัน สีย้อมผสมของมัลลอรี่ คือ สีย้อมแอนิลิน (แอซิด) ย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป และกระดูกอ่อน สีย้อมออลเรนจ์ จี (แอซิดิก) ย้อมสีเม็ดเลือด และกล้ามเนื้อ สีย้อมแอซิดฟุกซิน (แอซิด) ย้อมสีส่วนประกอบที่เหลือของเนื้อเยื่อรวมทั้งนิวเคลียสด้วย โดยใช้ความเข้มของสีตั้งแต่ชมพูไปจนถึงแดง แต่ไม่ใช่การย้อมที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย้อมสีนิวเคลียสเพราะสีจะจางลงถ้าเก็บไว้นานเกินกว่าหนึ่งปี การดัดแปลงการย้อมสีมัลลอรี่ โดยใช้สีย้อมเบสิกฟุกซิน คาร์มัน หรือเอโซคาร์มัน ให้ผลการย้อมสีนิวเคลียสได้ดีกว่าการใช้สีแอซิดแบบเดิม และควรใช้เมื่อย้อมเนื้อเยื่อเสียก่อนด้วยสีย้อมสีมากอกบิลินจะทำให้นิวเคลียสติดสีสดใสยิ่งขึ้น

การย้อมสีในขั้นตอนสุดท้าย ควรล้างด้วยกรดแอซิดิก (0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 3-5 นาที หรือมากกว่า จะเป็นการช่วยให้เนื้อเยื่อโปร่งใสและติดสีทนนาน การย้อมสีมัลลอรี่ที่ใช้กรดฟอสโฟโพลีโมลิบดิกและที่ควรทราบมี 2 วิธี คือ

13.1.1 วิธีของแพนทิน (Pantlin method)

การทำให้คงสภาพ : สารใดก็ได้ ถ้าจะให้ผลดีควรเลือกชนิดที่มี HgCl_2 เป็นส่วนประกอบ

สารละลาย:

มีลลอร์ I:

แอซิดฟุกซิน (C.I. 42685)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

กรดฟอสโฟโมลิบดิก:

กรดฟอสโฟโมลิบดิก	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

มีลลอร์ II:

แอนิลีนบลู WS (C.I. 42780)	0.5	กรัม
ออเรนจ์ จี (C.I. 16230)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี:

- นำสไลด์ที่ติดแผ่นบางของเนื้อเยื่อมาตั้งพาราฟินออก แล้วรินนิงดาวันจนถึงน้ำ ดึง HgCl_2 ออกให้หมด ถ้าไม่มี HgCl_2 ในสารทำให้คงสภาพ ทำการช่วยให้สีติดโดยแช่ในสารละลายผสม HgCl_2 อิ่มตัวในน้ำกับ 5 เปอร์เซ็นต์กรดแอซิดิกเข้มข้นใช้เวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำดึง HgCl_2 ออกด้วยสารละลายลูกบอลและโซเดียมไทโอซัลเฟต ล้างด้วยน้ำ
- ย้อมด้วยสีมีลลอร์ I 15 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 วินาที หรือนานกว่า จนเห็นเป็นสีแดง
- แช่ในกรดฟอสโฟโมลิบดิก 1-5 นาที
- จุ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง
- ย้อมด้วยสีมีลลอร์ II 2 นาที
- จุ่มล้างด้วยน้ำกลั่น
- ดิฟเฟอเรนซ์เอทสีย้อม แอนิลีนบลูด้วย 90 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์
- ดึงน้ำออกด้วยการรินนิงอัฟ แล้วเมาท้เป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ:

นิวเคลียส - สีแดง

กล้ามเนื้อและส่วนประกอบบางอย่างของเซลล์ - สีแดงจนถึงสีส้ม

ระบบประสาท - สีดอกไลแลก

คอลลาเจน - สีน้ำเงินดำ

ไมวซิน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และสารโปรรงใส (hyaline substance) -

สีน้ำเงิน

ไคทิน - สีแดง

ไซโตแดง - สีเหลืองถึงสีส้ม

ไมอีลิน และเม็ดเลือดแดง - สีเหลืองและสีส้ม

เนื้อเยื่อที่มีเซลล์แน่น (ตับ) - สีชมพู นิวเคลียสสีแดง

เมทริกซ์ของกระดูก - สีแดง

ข้อสังเกต:

จากน้ำกลั่นในขั้นตอนที่ 7 สามารถนำสไลด์มาปรับสีได้ เพราะในขั้นตอนเหล่านี้มีน้ำผสมแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งจะช่วยให้การดิฟเฟอเรนเซียเทสแอนิลินบลูเมื่อสไลด์อยู่ในแอลกอฮอล์สีมบูรณ์ 2-3 นาที แอนิลินบลูควรจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงสกปรกมาเป็นสีน้ำเงินสดและสีแดง และถ้าล้างด้วยกรดแอซีติกภายหลังขั้นตอนที่ 7 จะช่วยให้เนื้อเยื่อโปรรงใสขึ้น เพื่อให้นิวเคลียสติดสีเห็นรายละเอียดดีขึ้น ควรย้อมด้วยสีอีมาทอกซิลินก่อนย้อมด้วยสีมัลลอรี่ I (ผลที่ได้ นิวเคลียส - สีน้ำเงิน) และอาจตัดแปลงสีมัลลอรี่ II ได้ดังนี้

A. แอนิลินบลู W.S (C.I.42780)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
B. ออเรนจ์ จี (C.I.16230)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
C. กรดฟอสโฟโมลิบดิก	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมสารละลาย A, B และ C แล้ว เก็บแต่ละชนิดใส่ขวดแยกกัน เพราะถ้ารวมกันแล้วตั้งไว้จะทำให้เสื่อมคุณภาพ นำมาผสมเมื่อจะใช้โดยมีสัดส่วนเท่ากัน สารละลายตัดแปลงนี้เหมาะสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการสอนวิชาไมโครเทคนิคด้วย เพราะใช้ย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้สะดวกรวดเร็ว

13.1.2 วิธีรวดเร็วหนึ่งขั้นตอน (rapid one-step method หรือ Mallory Heidenhain Stain)

การทำให้คงสภาพ : ใช้สารทำให้คงสภาพชนิดใดก็ได้ที่ให้ผลดีที่สุด

สารละลาย:

สารละลายสีย้อม:

น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร
----------	-------	-----------

ใช้น้ำกลั่นละลายสารต่อไปนี้ทีละสารเรียงตามลำดับ

กรดฟอสฟอริก	1.0	กรัม
-------------	-----	------

ออเรนจ์ จี (C.I. 16230)	2.0	กรัม
-------------------------	-----	------

แอนิลีนบลู WS (C.I. 42780)	1.0	กรัม
----------------------------	-----	------

แอทิลฟุกซิน (C.I. 42685)	3.0	กรัม
--------------------------	-----	------

สามารถเก็บสารละลายสีย้อมไว้ใช้ได้นานหลายเดือน

ระเบียบวิธี:

1. ดึงพาราฟินออก แล้วรินน้ำจนถึงน้ำ ถ้ามี $HgCl_2$ ต้องดึงออก
2. ย้อมสี 5 นาที
3. ล้างด้วยน้ำไหล 3-5 นาที
4. ดึงน้ำออกอย่างรวดเร็ว ทำให้ใส แล้วเมาททำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ:

คอลลาเจน - สีน้ำเงิน

เมทริกซ์ของกระดูกอ่อนและกระดูก - สีน้ำเงินที่มีความเข้ม-จางต่างกัน

นิวซิน แอมิโลยด์ และสารโปรรงใสอื่น - สีน้ำเงินที่มีความเข้ม-จางต่าง

กันนิวเคลียส ไซโทพลาสซึม ไมโทเกลีย ไซโทริลของนิวโรเกลีย แอกซิไซลิเน-

เดอร์ (ไซสันทัง) ไซปรีน - สีแดง

เม็ดเลือดแดง ไมอีลิน - สีเหลือง

อีแลสทิน - สีชมพูอ่อนหรือสีเหลือง

กิจกรรม 13.1

ให้นักศึกษาเตรียมสีย้อม มัลลอรี่-ไฮเดนเฮน ตามวิธีในข้อ 13.1.2 แล้วทดลองย้อมสีเนื้อเยื่อที่เจือเป็นแผ่นบางแล้วจากชั้นเนื้อเยื่อตัวอย่างหลอดลมบริเวณกล่องเสียง และกระดูกที่ดึงแคลเซียมออกแล้ว ซึ่งทำไว้ในกิจกรรมตอนแรกๆ (กิจกรรม 7.1)

13.2 การย้อมสีไตรโครม

การย้อมสีไตรโครม (Trichrome stain) ตั้งชื่อโดยแมสซอง (Masson) ถึงแม้ว่าจะใช้สีย้อมถึงสี่ชนิดด้วยกัน หลังจากนั้นมีการดัดแปลงเพื่อให้คุณภาพการย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันดีขึ้น ที่ควรรทราบมีสองวิธี คือ

13.2.1 สีย้อมแมสซองไตรโครม (Masson trichrome stain, modified)

การทำให้คงสภาพ : ให้สารทำให้คงสภาพชนิดใดก็ได้

สารละลาย:

ไกลอนอะลัม:

เฟอร์ริกแอมโมเนียมซัลเฟต	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

อีมาทอกซิลิน: (ดูการเตรียมในบทที่ 12)

แอซิดฟุกซิน:

แอซิดฟุกซิน (C.I.42685)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
กรดแอซิดิกเข้มข้น	1.0	มิลลิลิตร

ปองโซ เดอ ไชลิดีน (Ponceau de xyloidine):

ปองโซ เดอ ไชลิดีน (C.I.16150)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
กรดแอซิดิกเข้มข้น	1.0	มิลลิลิตร

อาจใช้ ปองโซ 2R, ในทาสีน เบลโล (nilazine yellow), ไบบริช สคาร์เลท (Biebrich scarlet), แอซิดฟุกซิน 3B, G และ 4G, บอร์โดซ์เรด (Bordeaux red), โครโมโทรป 2R, คริสอยดิน (chrysoidin), อีโอซิน Y, ออเรนจ์ จี และครอซีน (crocein) แทน ปองโซ เดอ ไชลิดีน ได้

แฟสท์กรีน:

แฟสท์กรีน FCF (C.I.42053)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
กรดแอซิดิกเข้มข้น	2.0	มิลลิลิตร

กรดฟอสโฟโมลิบดิก:

กรดฟอสโฟโมลิบดิก	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

น้ำกรด:

กรดแอซิดิกเข้มข้น	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี:

1. ทำเช่นเดียวกับระเบียบวิธีในขั้นตอนที่ 1 ของข้อ 13.1.1
2. แช่ในสารช่วยสีติด ไอออนอะลัม 30 นาที
3. ล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที
4. ย้อมสีด้วยสีมาทอกซีลีน (เดลาฟิลด์ หรือชนิดอื่น) 30 นาที
5. ล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที
6. ดิฟเฟอเรนเชียลด้วยสารละลายกรดฟิสิกัลอิมิตัวในน้ำ (เวลาขึ้นอยู่กับความ
ชำนาญ สิ่งเกิดที่ว่าสดใสจึงจะใช้ได้)
7. ล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที หรือนานกว่า
8. ย้อมสีด้วยแอซิดฟุกซิน 5 นาที
9. จุ่มล้างในน้ำกลั่นให้สีที่ติดเกินพอออกจนหมด ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
10. ย้อมสีด้วย ปองโซ เดอ ไชลิดีน 1-5 นาที
11. ล้างด้วยน้ำไหล ตรวจสอบการติดสีแอซิดฟุกซิน และปองโซ เดอ ไชลิดีน
ด้วยกล้องจุลทรรศน์
12. ดิฟเฟอเรนเชียลด้วยกรดฟอสฟอโมลิบดิก 5 นาที
13. ไม่ต้องล้าง นำไปย้อมสีด้วย แฟสท์กรีนทันที ใช้เวลา 2 นาที
14. ดิฟเฟอเรนเชียลสีแฟสท์กรีนด้วยน้ำกรดและแอลกอฮอล์
15. ดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ เปลี่ยน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที
16. ทำให้ใส แล้วเม้าท์ทำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

- นิวเคลียส - สีน้ำเงินเข้มจนถึงดำ
ไซโทพลาซึมและส่วนประกอบ - สีแดงเข้ม-จางต่างกัน และสีม่วงแดง
อ่อน (mauve)
กล้ามเนื้อ - สีแดง
คอลลาเจน มีวชิน - สีเขียว

ข้อสังเกต :

สีย้อมแมสของชนิดนี้ถือว่าดีที่สุดสำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เพราะ

สามารถให้สีแดงที่ได้ออกมา โดยใช้สีย้อมสองชนิด โดยทั่วไปควรร้อมสีด้วย แอซิดฟุกซันนานถึง 5 นาที แต่เวลาในการย้อมด้วยสี ปองโซ เดอ โซลิติง เปลี่ยนแปลงได้

13.2.2 วิธีรวดเร็วของพอลลาก (Pollack's rapid method)

การทำให้คงสภาพ : สารทำให้คงสภาพชนิดใดก็ได้ ถ้าใช้ฟอร์มัลดีไฮด์ควรปรับปรุงให้ดีขึ้นด้วยการแช่เนื้อเยื่อใน สารละลาย HgCl_2 อิ่มตัวในน้ำ 12 ชั่วโมง แล้วจึง HgCl_2 ออกด้วยวิธีมาตรฐาน คือ สารละลาย ลูกลอลและ โซเดียมไทโอซัลเฟต

สารละลาย :

สีมาทอกซิลิน : ชนิดใดก็ได้

สีย้อมไตรโครม :

แอซิดฟุกซัน (C.I. 42685)	0.5 กรัม
ปองโซ 2 R (C.I. 16150)	1.0 กรัม
ไลท์กรีน SF, สีเหลือง (C.I. 42095)	0.45 กรัม
ออเรนจ์ จี (C.I. 16230)	0.75 กรัม
กรดฟอสฟอรัสทั้งสี่	1.5 กรัม
กรดฟอสฟอโมลิบดิก	1.5 กรัม
กรดแอซติกเข้มข้น	3.0 มิลลิลิตร
50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	300.0 มิลลิลิตร

เติมกรดแอซติกลงในแอลกอฮอล์ แล้วแบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนที่หนึ่งใช้ละลายแอซิดฟุกซัน และปองโซ 2 R ส่วนที่ 2 ใช้ละลายไลท์กรีน ส่วนที่ 3 ใช้ละลายออเรนจ์ จี และกรดฟอสฟอรัสทั้งสี่ ส่วนที่ 4 ใช้ละลายกรดฟอสฟอโมลิบดิก ผสมทั้ง 4 ส่วน เก็บใส่ขวดไว้ใช้

น้ำกรด :

กรดแอซติกเข้มข้น	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก แล้วรินน้ำจนถึงน้ำ ดึง HgCl_2 ออก
2. ย้อมสีด้วย เมเยอร์สีมาทอกซิลิน 10 นาที (ถ้าใช้ไวเกอร์'ส ควรย้อมนาน 10-20 นาที)

3. ล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที
4. ย้อมด้วยสีไตรโครม 7 นาที
5. จุ่มล้างสีออกในน้ำกลั่น
6. ดิฟเฟอเรนซีเอทด้วยน้ำกรด 2-3 วินาที ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
7. จุ่ม 2-3 ครั้ง ใน 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์
8. ดึงน้ำออกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 2-3 วินาที
9. ดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์สีมบูรณ์ ทำให้ใส แล้วเมาททำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

นิวเคลียส - สีน้ำเงินเข้ม

กล้ามเนื้ออีแลสติน - สีแดง

ไซทอลิน - สีม่วง

คอลลาเจน , นิวซิน - สีเขียวแกมน้ำเงิน

สีไตรโครมสามารถนำไปใช้ย้อมกับสีเจมซ่า เพื่อย้อมสีมาสก์เซลล์ได้

กิจกรรม 13.2

ให้นักศึกษาเตรียมสีย้อมไตรโครมตามวิธีของพอลแลกในข้อ 13.2.2 แล้วใช้ย้อมเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณกล่องเสียง และกระดูก ตามวิธีในข้อ 13.2.2 เปรียบเทียบผลที่ได้รับเมื่อย้อมด้วยสีย้อมจากกิจกรรม 13.1

13.3 การย้อมสีกระดูก

กระดูกที่ถูกดึงแคลเซียมออกแล้ว เมื่อเจือปนบางทำเป็นแผ่นบางติดสไลด์แล้วสามารถนำมาย้อมสีได้ดังนี้

สารละลาย :

ไทโอนิน :

ไทโอนิน (C.I.5200) อิมตัวใน 50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์

10.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น

100.0 มิลลิลิตร

ถ้าสีเปลี่ยนควรมีน้ำแอมโมเนีย 1-2 หยด

คาร์บอน-ไซลอล :

ฟินอลเหลว (กรดคาร์บอลิก)	1 ส่วน
ไซลีน	3 ส่วน

ควรเก็บไว้ในขวดฝาจุกเพื่อป้องกันการระเหยของไซลีน

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก แล้วรีนิงควาน้ำจนถึงน้ำ ถ้าแผ่นบางของเนื้อเยื่อบาง
ส่วนหลุดจากกระจกสไลด์ ควรนำไปแช่ใน 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์
ไนโตรเซลลูโลสในสารละลายผสมสัปดาห์ที่เท่ากันของอีเทอร์และแอล-
กอฮอล์สัมบูรณ์ แช่ไว้ 1-2 นาที แล้วนำออกมาวางพอบแห้งหมาด
(ไม่ถึงขั้นแห้ง) แล้วจึงแช่ใน 70 หรือ 80 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์
ก่อนนำไปย้อมสี ถ้าไม่ได้ผล ควรลองใช้สารยึดติด วิธีซีบสไลด์¹
(subbed slide)
2. ย้อมสีด้วยสารละลายไทโอนีน 10 นาที
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 นาที โดยการเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้ง
4. แช่ในสารละลายอิมมัลชันตัวกรดฟิกริกในน้ำ 1 นาที
5. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
6. ดิฟเฟอเรนซ์เอทใน 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ใช้เวลาประมาณ
5-10 นาทีหรือนานกว่า สิ่งเกิดว่าไม่มีสีละลายออกมาอยู่ในแอลกอฮอล์
7. ดึงน้ำออกด้วย 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ เปลี่ยน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที
8. ดึงน้ำออกและทำให้ใสในสารละลายผสม คาร์บอน-ไซลอล 5 นาที
9. ทำให้ใสในไซลีน แล้วเมาททำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

ลา구나 และคานาลิคิวไล - สีน้ำเงินดำ
พื้นหลัง (background) - สีเหลือง

*** 1. ซีบสไลด์ เป็นสารยึดติด (adhesive) ชนิดหนึ่ง ใช้ในกรณีที่แผ่นบางของเนื้อ
เยื่อยึดติดกระจกสไลด์ยาก หรือต้องการเตรียมสไลด์ของของเหลว หรือของที่
แตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (ดูภาคผนวก 2.3)

ข้อสังเกต :

เนื่องจากแผ่นบางของพาราฟินที่มีกระดูกฝังอยู่มักหลุดจากกระจกสไลด์ได้ง่าย นักปฏิบัติบางคนจึงใช้ในไตรเซลลูโลสเป็นสารตัวกลางสำหรับฝังแทนพาราฟิน แต่เสียเวลาและทำเป็นแผ่นบางยากกว่า

กิจกรรม 13.3

ให้นักศึกษาเตรียมสีย้อมสำหรับย้อมสีกระดูก ตามวิธีในข้อ 13.3 แล้วทดลองใช้ย้อมสีแผ่นบางของเนื้อเยื่อกระดูก ตามวิธีในข้อ 13.3 เปรียบเทียบผลที่ได้รับของการย้อมสีโดยวิธีนี้ กับผลที่ได้รับจากการย้อมสีในกิจกรรม 13.1 และ 13.2

13.4 การย้อมสีกล้ามเนื้อโดยวิธีของมิลลิแกนไตรโครม

กล้ามเนื้อนอกจากจะย้อมด้วยสีที่ใช้ในงานประจำ คือ ฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน แล้วยังสามารถนำมาย้อมด้วยสีพิเศษ คือ สีย้อมมิลลิแกนไตรโครม (Milligan's Trichrome stain) ได้ผลดี เห็นรายละเอียดของเซลล์กล้ามเนื้อ ดังต่อไปนี้

การทำให้คงสภาพ: ควรใช้สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลินในนอร์แมลเซไลน์

สารละลาย :

สารช่วยสีติด :

สารละลาย A :

พอกแกสเทียมไตรโครเมต	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B :

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	10.0	มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	100.0	มิลลิลิตร

เวลาใช้น้ำสารละลาย A มา 3 ส่วน ผสมกับสารละลาย B 1 ส่วน

แอซิดฟุกซิน :

แอซิดฟุกซิน (C.I. 42685)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

กรดฟอสฟอโมลิบดิก :

กรดฟอสฟอโมลิบดิก	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

เวลาใช้นำมาใช้เพียง 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้ทำสารละลายออเรนจ์ จี
ออเรนจ์ จี :

ออเรนจ์ จี (C.I.16230) 2.0 กรัม

1 เปอร์เซ็นต์สารละลายกรดฟอสโฟโมลิบดิก 100.0 มิลลิลิตร

แฟสท์กรีน (อาจใช้แอนิลีนบลูแทนได้) :

สารละลายสต็อก :

แฟสท์กรีน FCF (C.I.42053) 1.0 กรัม

2 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสซิดิก (2 มิลลิลิตร/98 มิลลิลิตรน้ำกลั่น)

100.0 มิลลิลิตร

สารละลายที่ใช้ :

สารละลายสต็อกของแฟสท์กรีน 10.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 90.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก แล้วเปลี่ยนสไลด์มาแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์
2. ทำการช่วยให้สีติดในสารละลายพอสเฟอรัสเชื่อมไดโครเมต - กรดไฮโดรคลอริก 5-7 นาที
3. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
4. ย้อมสีด้วย แอสซิดฟุกซัน 5-8 นาที
5. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
6. ทำให้สีย้อม แอสซิดฟุกซันคงสภาพ ในสารละลายกรด ฟอสโฟโมลิบดิก 1-5 นาที
7. ย้อมสีด้วย ออเรนจ์ จี 5-10 นาที
8. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
9. แช่ในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสซิดิกในน้ำ (1 มิลลิลิตร/99 มิลลิลิตร) 2 นาที
10. ย้อมสีด้วย แฟสท์กรีน 5-10 นาที
11. แช่ใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแอสซิดิก 3 นาที
12. จุ่มล้างใน 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ แล้วจึงนำมาแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 5 นาที
13. จบการดึงน้ำออกด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

14. ทำให้ใสในโซลิน แล้วเมาททำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

นิวเคลียส และเซลล์กล้ามเนื้อ - สีม่วงแดง

คอลลาเจน - สีเขียว (ถ้าใช้สีย้อมแอนิลีนบลูจะได้สีน้ำเงิน)

เม็ดเลือดแดง - สีส้ม จนถึงสีส้มแดง

ข้อสังเกต :

สีย้อมชนิดนี้ ให้สีเข้มสวย เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบอยู่ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบติดสีเด่นชัด แต่ส่วนนิวเคลียสอาจไม่ชัดนัก อาจแก้ไขได้โดยใช้สารทำให้คงสภาพชนิด กอมอริ 1-2-3 (Gomori's 1-2-3 fixative) ถ้าย้อมสีด้วยไอออนฮีมาทอกซิลิน จะเห็นลายของเซลล์กล้ามเนื้อได้ชัด ถ้าล้างสีออกด้วยความระมัดระวังในสารละลายไอออนอะลัม แล้วล้างให้สะอาด (ประมาณ 3 นาที) ด้วยน้ำไหล ไม่ควรย้อมสีทับ สารทำให้คงสภาพเช่นเกอร์ก็้อได้ว่าเป็นสารละลายที่ดีที่สุดสำหรับการทำให้คงสภาพ และถนอมแขนงของเซลล์กล้ามเนื้อ จึงควรใช้ก่อนนำมาย้อมสี

กิจกรรม 13.4

ให้นักศึกษานำแผ่นบางของกล้ามเนื้อที่ทำการเจียนและเมาทกระจกสไลด์ไว้แล้ว ในกิจกรรม 7.1 มาทดลองย้อมสีตามวิธีการเตรียมสารละลายสี และวิธีย้อมในข้อ 13.4 เปรียบเทียบผลที่ได้รับ กับการย้อมสีด้วยฮีมาทอกซิลิน-อีโอซิน

สรุป

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีส่วนประกอบที่มีความหลากหลาย การย้อมสีจึงต้องมีความรู้ความเข้าใจเลือกใช้ให้ถูกต้อง เริ่มตั้งแต่การเลือกสารละลายที่เหมาะสมเพื่อการทำให้คงสภาพ แล้วจึงใช้สีย้อมมากกว่า 3 ชนิดขึ้นไปมาย้อมให้ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันติดสีต่างกัน เห็นความหลายหลากของส่วนประกอบได้ชัด ระเบียบวิธีที่นิยมสำหรับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป คือ แมสซง ไตรโครมสเตน การย้อมสีกล้ามเนื้อก็ยึดหลักการเช่นเดียวกัน และที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ระเบียบวิธีมิลลิแกน ไตรโครมสเตน

แบบฝึกหัดที่ 13

1. จงอธิบายการทำงานของกรดฟอสโฟโมลิบดิกที่มีอยู่ในสีย้อมสำหรับย้อมเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
(ตอบ: ดู 13.1)
2. กรด_____สามารถใช้แทนกรดฟอสโฟโมลิบดิกได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับสีย้อม_____และออเรนจ์ จี
(ตอบ: ดู 13.1)
3. กระจกเมื่อตั้งเอาแคลเซียมออกแล้วฝังในพาราฟิน เมื่อเจือนเป็นแผ่นบางเมื่อบนกระจกสไลด์ควรรีใช้_____ทาก่อนที่กระจกสไลด์ก่อนเมื่อบนกระจกสไลด์ที่ไม่ได้ทาและเริ่มร้อนออก แก้วได้ด้วยการแช่ในสารละลาย_____
(ตอบ: ดู 13.3)
4. การย้อมสีกล้ามเนื้อเพื่อให้เห็นรายละเอียดได้มากที่สุด ควรทำให้คงสภาพด้วยสารละลาย_____ก่อนนำมาย้อมสีด้วยวิธีมิลลิแกนไตรโครม เพราะจะช่วยให้_____ของกล้ามเนื้อได้รับการทำให้คงสภาพดี ย้อมสีติดได้ง่าย
(ตอบ: ดู 13.4)
5. สีย้อมที่ถือว่าดีที่สุดสำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไป คือสีชนิดใด
 1. มัลลอรี่-ไฮเดนเฮนสแตน
 2. แมสซงโตรโครมสแตน
 3. ไอออนฮีมาทอกซิลินสแตน
 4. ฮีมาทอกซิลิน-อีโอซินสแตน
6. แอนิลินบลูเลือกติดสีส่วนประกอบชนิดใดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
 1. เมทริกซ์
 2. เซลล์โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง
 3. คอลลาเจน
 4. ติดสีได้หมดแต่ความเข้ม-จางต่างกัน
7. แอซิดฟูกซันเลือกติดสีส่วนประกอบชนิดใดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ดีที่สุด
 1. นิวเคลียส
 2. เมทริกซ์
 3. คอลลาเจน
 4. กล้ามเนื้อและส่วนประกอบบางอย่างของเซลล์
8. ออเรนจ์ จี เลือกติดสีส่วนประกอบชนิดใดของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ดีที่สุด
 1. เซลล์โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง
 2. เมทริกซ์
 3. คอลลาเจน
 4. เส้นใยชนิดอื่น เช่น อีแลสติน

(คำตอบ : ข้อ 5 ตอบ 2, ข้อ 6 ตอบ 3, ข้อ 7 ตอบ 2, ข้อ 8 ตอบ 1)