

บทที่ 14

การย้อมสีชิ้นส่วนของเลือดและไขกระดูก

เค้าโครงเรื่อง

14.4 การย้อมสีชิ้นส่วนของเลือด

14.1.1 เลือดที่ทำเป็นสเมียร์บาง

14.1.2 เลือดที่ทำเป็นสเมียร์หนา

14.1.3 ชิ้นส่วนของเลือด ปรสิต และเมแทบอลิท์ของเลือด

14.2 การย้อมสีไขกระดูก

สาระสำคัญ

1. เลือดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีลักษณะพิเศษ คือ เป็นของเหลว ส่วนประกอบหลักคือ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ส่วนที่เป็นของเหลวคือ พลาสมา มีสารอาหาร สารภูมิคุ้มกัน และแร่ธาตุละลายอยู่ ปรสิต และเมแทบอลิท์ของเลือดที่เกิดจากปรสิตอาจอยู่ในส่วนของเม็ดเลือด หรือพลาสมาก็ได้ การเตรียมสไลด์นิยมนำมาสเมียร์หนา และบาง แล้วจึงนำมาย้อมสีด้วยสีย้อมที่อยู่ในประเภทโรมาโนว์สกีสเตน เช่น สีย้อมไทร์ และสีย้อมเจมชา
2. ไขกระดูกเป็นเนื้อเยื่อที่สร้างเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ อยู่ภายในกระดูก จึงสามารถนำมาสาคัดพร้อมกับเนื้อเยื่อกระดูกได้ ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกระดูก โดยตัดส่วนที่มีไขกระดูกติดมาด้วย การย้อมสีไขกระดูกใช้สีในกลุ่มเดียวกันกับการย้อมสีเลือด และอาจใช้วิธีอื่นอีก เช่นสีย้อมแมกซิมา'ส อีโอซิน-แคร์วเร

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกชนิดของสีย้อมที่ใช้จำเพาะการย้อมสีเลือด และไขกระดูกได้
2. นักศึกษาสามารถทำการเตรียมสารละลายสีย้อมบางชนิด เช่น สีย้อมไทร์ สีย้อมเจมชา เพื่อเก็บไว้ใช้ในห้องปฏิบัติการได้
3. นักศึกษาสามารถปฏิบัติการย้อมสีตัวอย่างเลือด และไขกระดูก ที่ทำไว้ในกิจกรรมช่วงแรก แล้วนำมาใช้ในกิจกรรมของบทนี้ได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามท้ายบทได้เกินกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลาหนึ่งสัปดาห์

เลือดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นมาจากฮีโมโพอิติกเซลล์ (hemopoitic cell) ของไขกระดูก ซึ่งมีเซลล์อยู่สองชนิด คือ (1) ไมอีลอยด์ คือเซลล์ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล และเกล็ดเลือด (2) ลิมโฟติกเซลล์ ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูล อีกส่วนประกอบหนึ่งคือน้ำเลือด มีสารอาหารต่าง ๆ สารภูมิคุ้มกัน และสารต้านและช่วยการแข็งตัวของเลือด เมื่อมีปรสิตหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กแปลกปลอมเข้าไปในเลือด ทั้งที่เข้าไปในเซลล์เม็ดเลือดหรืออยู่ในน้ำเลือด เช่น เชื้อไขมาเลเรีย ทริพาโนโซม จะทำให้เกิดเมแทบอลิซึมต่าง ๆ อยู่ในเลือด สามารถสาธิตได้ด้วยการย้อมสีประเภทโรมาโนวสกี โดยทั่วไปการย้อมสีเลือดมักทำสเมียร์เลือดบนสไลด์ ซึ่งทำได้ทั้งแบบสเมียร์บางและสเมียร์หนา แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ

14.1 การย้อมสีชิ้นส่วนของเลือด

14.1.1 เลือดที่ทำเป็นสเมียร์บาง นำมาย้อมสีได้หลายวิธี คือ

(1) สีย้อมไวก์ (Wright's stain) สำหรับสัตว์เลือดอุ่น และคน

(ดูวิธีเตรียมในข้อ (3))

ระเบียบวิธี :

1. ใช้ดินสอขีดเขียนแนวกรอบบริเวณที่จะย้อมสี โดยทั่วไปควรมีพื้นที่เท่ากับกระดาษกปิดขนาด 22x40 มิลลิเมตร
2. หยดสีย้อมไวก์ลงบนบริเวณที่จะย้อม 10-12 หยด ใช้เวลาย้อม 1-2 นาที
3. หยดสารละลายบัพเฟออร์ หรือโคลูเอนท์ลงไปในปริมาณที่เท่ากัน 2-4 นาที
4. จุ่มล้างในน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง อาจมีตะกอนสะสม แต่หลีกเลี่ยงได้โดยใช้ปิเปตฉีดน้ำล้างสีย้อมออก หรือนำสไลด์ที่ยังมีสีย้อมท่วมอยู่ข้างบนลงไปล้างในน้ำอย่างเทสีย้อมทั้งก่อนนำไปล้าง
5. ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง 2 ชั้น อย่างกดหรือถู
6. ตั้งไว้ให้แห้งสนิท ก่อนนำไปเมทที่เป็นสไลด์ถาวร

ระเบียบวิธีดัดแปลง :

1. นำสเมียร์บางไปทำให้คงสภาพด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ 1-2 นาที
2. ทำสีไวก์ให้เจือจาง ด้วยสารละลายบัพเฟออร์หนึ่งเท่าตัว แล้วจึงหยดลงไปบนบริเวณที่จะย้อม 10 หยด การทำให้เจือจางต้องทำแล้วไว้ทันที
3. ใช้เวลาในการย้อม 4 นาที

4. จุ่มล้าง ปล่อยให้แห้งตามวิธีมาตรฐานข้างต้น

ผลที่ได้รับ :

เม็ดเลือดแดง - สีชมพู

นิวเคลียส(ของเม็ดเลือดขาว) - สีน้ำเงินเข้มหรือสีม่วง

เบโซฟิลิกแกรนูล - สีม่วงเข้ม

อีโอซิโนฟิลิกแกรนูล - สีแดงจนถึงสีส้มแดง โดยใช้ทอพลาซิมติดสีฟ้า

นิวโตรฟิลิกแกรนูล - สีน้ำตาลแดงจนถึงสีไลแลก ใช้ทอพลาซิมติดสีชมพูชัด

แกรนูลของโมโนไซต์ - สีแอมซีวเร (สีน้ำเงินสดสะท้อนแสง)

แกรนูลของลิมโฟไซต์ - สีค่อนข้างแดง ใช้ทอพลาซิมติดสีฟ้า

เกล็ดเลือด - สีม่วงแดงจนถึงสีม่วง

ข้อสังเกต :

การเกิดตะกอน ทำให้ยุ่งยากในการนับเม็ดสีบางของเลือดที่ติดเชื่อมมาเลย
ทำให้แยกไม่ออกว่าเป็นการติดสีสารที่เกิดจากโรคหรือไม่ สาเหตุของการ
ตกตะกอนมีหลายอย่าง คือ ก. ล้างสีย้อมในขั้นตอนที่ 4 ไม่ดี ข. สีย้อมที่ไม่ได้
ทำให้เจือจางระเหยออกไปเพราะเมทิลแอลกอฮอล์ระเหยได้เร็ว วิธีแก้ไข
คือ ควรหาอุปกรณ์มาครอบไม่ให้มีการระเหยเร็ว โดยเฉพาะในวันที่มีอากาศ
ร้อน และควรเติมสีย้อมลงไปอีก เมื่อสังเกตว่าสีย้อมมีปริมาณลดลง แล้วลด
เวลาการย้อมสีลงมา การล้างสีออก ถ้าล้างนานจะทำให้สีถูกล้างออกไปจาก
เม็ดเลือดขาว ดังนั้น ล้างโดยการจุ่ม 1-2 ครั้งก็เพียงพอ ถ้าสีย้อมติดเม็ด
เลือดขาวมากเกินไปพอดี จึงควรล้างสีย้อมออกให้นานขึ้น ถ้าการย้อมสีติดมาก
เกินไปพอดีจนเม็ดเลือดแดงติดสีแดงเข้ม เม็ดเลือดขาวสีจางหรือสีย้อมตกตะกอน
นำสไลด์มาแก้ไขโดย หยดสีย้อมโรทลงไปในจุ่มสไลด์นาน 15-30 นาที
แล้วจึงล้างด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้ง

(2) สีย้อมไรท์สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลังเลือดเย็น

ระเบียบวิธี :

1. หยดสีย้อมไรท์ให้ท่วมบริเวณที่จะย้อม 2 นาที
2. เติมไซเตรทบัฟเฟอร์¹ pH 6.7 ลงไป ปริมาณเท่ากับสีย้อม 3 นาที

*** 1. ดูการเตรียมบัฟเฟอร์ในภาคผนวกที่ 5

3. จุ่มล้างในน้ำกลั่น ชั้บ แล้วปล่อยให้แห้ง

(3) สีย้อมไรท์สำหรับเลือดนก

สารละลาย :

สีย้อมไรท์ :

ผงสีย้อมไรท์	3.3 กรัม
เมทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	500.0 มิลลิลิตร

สารละลายที่ได้จะแรงกว่าสารละลายที่ใช้ย้อมสัตว์เลือดอุ่นและคน

สารละลายฟอร์มาลิน :

39 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลดีไฮด์	0.25 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคาร์บอเนต หรือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก

ระเบียบวิธี :

1. หยดสีย้อมไรท์ลงบนสเมียร์ที่แห้งแล้วให้ท่วมบริเวณที่จะย้อม 8 นาที
2. ค่อย ๆ หยดสารละลายฟอร์มาลินลงไป ระวังมิให้ล้นออกจากสไลด์
3. สังเกตการเกิดฝ้าสะท้อนแสงของโลหะที่ปกคลุมอยู่บนผิวของสีย้อม แล้วจึงเทสีย้อมทิ้ง แล้วหยดให้ท่วมใหม่ด้วยน้ำกลั่นที่ปรับ pH ไว้ที่ 6.8
4. เทน้ำทิ้ง ชั้บให้แห้งพอหมาด
5. ดีฟเฟอเรนเชียล ในสารละลายผสมอีเทอร์-เมทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (1:1) ด้วยการจุ่มสไลด์แล้วยกขึ้น ทำซ้ำประมาณ 6-10 ครั้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่ายังติดสีน้ำเงินเข้มอยู่หรือไม่
6. ทำให้ใส แล้วเม้าท์ทำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

- เม็ดเลือดแดง - สีเหลืองจนถึงสีชมพู โคโรมาตินสีม่วง
- ทรมโทไซท์ - สีน้ำเงินปนเทา โคโรมาตินสีม่วง
- ลิมโฟไซท์ - แกรนูลสีน้ำเงิน โคโรมาตินสีแดงปนม่วง
- โมโนไซท์ - ไซโทพลาซึมสีน้ำเงินอ่อน โคโรมาตินสีม่วง
- เฮเทโรฟิล - แกรนูลเป็นแท่งกลมติดสีเหลืองจนถึงสีแดงปนน้ำตาล โคโรมาติน สีม่วงอ่อน

อีโอซีโนฟิล - คล้ายกับเฮเทโรฟิล

เบโซฟิล - แกรนูลสีม่วงเข้ม

14.1.2 เลือดที่ทำเป็นสเมียร์หนา การทำสเมียร์หนา (Chick smear) ก็เพื่อให้มีความหนาแน่นของส่วนประกอบที่เป็นเซลล์และวัตถุในพลาสมาที่จำกัด เพื่อเป็นการสะดวกสำหรับตรวจหาปรสิต และเมแทบอลิทของปรสิต ซึ่งตรวจพบได้ยากจากการทำเป็นสเมียร์บาง การทำสเมียร์หนาทำโดยหยดเลือดลงบนสไลด์ 1-2 หยด แล้วใช้เข็มจุ่มลงไป คนเป็นวงกลมให้เลือดค่อย ๆ แผลออกไปจนได้รัศมีประมาณ 5-8 มิลลิเมตร ปล่องยไว้ให้แห้งในแนวราบ (ถ้าเลือดหนาเกินไป เมื่อแห้งแล้วจะร้อนหลุด) การย้อมสีสเมียร์หนา ให้สังเกตการติดสีของเม็ดเลือดขาวเป็นหลัก เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงบางส่วนจะแตก แล้วถูกล้างออกไประหว่างการย้อมสี สีย้อมที่ใช้มีให้เลือกได้ดังนี้ คือ

(1) วิธีของฟิลด์

สารละลาย :

สารละลาย A :

เมทิลีนบลู (C.I.52015)	0.8	กรัม
แอซีวเร A (C.I.52005)	0.5	กรัม
ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต, แอนไฮดรัส	5.0	กรัม
โทโมเนบสิก พอแทสเซียมฟอสเฟต	6.25	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B :

อีโอซิน Y (C.I.45380)	1.0	กรัม
ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต, แอนไฮดรัส	5.0	กรัม
โทโมเนบสิก พอแทสเซียมฟอสเฟต	6.25	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ละลายเกลือฟอสเฟตในน้ำก่อนจึงละลายสีย้อม (การละลายแอซีวเรต้องบดในครกกับสารละลายฟอสเฟตเล็กน้อย) เมื่อละลายหมดตั้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงกรองเก็บไว้เป็นสารละลายสต็อก

ระเบียบวิธี :

1. จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย A 1 วินาที
2. จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2-3 วินาที สังเกตว่าไม่มีสีย้อมหลุดออกมาจากสเมียร์
3. จุ่มลงในสารละลาย B 1 วินาที ทำด้วยความระมัดระวัง เพราะสาร-

ละลาย B จะทำให้เม็ดเลือดขาวที่ติดสีเมทิลีนบลู-แอสซีวเรออยู่แล้วสีจางลง และยังทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ถ้าโมทอลบินหลุดออกจากเซลล์

4. จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง
5. ตั้งสไลด์ให้อยู่ในแนวเอียง แล้วปล่อยให้แห้ง
6. เมทาทำเป็นสไลด์ถาวร

ผลที่ได้รับ :

บริเวณกลางสเมียร์มีเม็ดเลือดซ้อนทับกันมาก อาจตรวจสอบยาก แต่บริเวณรอบนอกซึ่งมีโมทอลบินจะหลุดออกไปจะติดสีน้ำเงินจาง ซึ่งตรวจสอบได้ง่าย

เม็ดเลือดขาว: ไฮโทพลาสซึม - สีน้ำเงินจาง สิ่งเกตุรายละเอียดยาก

นิวเคลียส - สีน้ำเงินเข้ม เห็นรายละเอียด

อีโอซิโนฟิลิกแกรนูล - ขนาดใหญ่สีแดงสด เห็นรายละเอียด

นิวโตรฟิลิกแกรนูล - สีชมพูปนม่วงจาง ขนาดเล็กเห็นไม่ชัด

เบโซฟิลิกแกรนูล - สีน้ำเงินเข้ม มีรอยพาดทับสีแดง

เกล็ดเลือด - สีม่วงอ่อน หรือสีดอกกลาแวนเดอร์ (คล้ายสีดอกผักบุ้งทะเล)

ปรสิต: ไฮโทพลาสซึม - สีน้ำเงิน

โครมาติน - สีแดงปนม่วง หรือสีแดงทับทิม

สารสี - แกรนูลสีเหลืองที่มีความเข้มต่างกันยอมไม่ติดสี

(2) วิธีของวิลคอก (Wilcox)

สารละลาย :

สารละลายไรท์-เจมซา (Wright-Giemsa)

ผงเจมซา 2.0 กรัม

กลีเซอรอล 100.0 มิลลิลิตร

อุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่ 55-60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง คนเป็นครั้ง

คราว เพื่อป้องกันความชื้นเข้าไปในฟลาสค์ด้วยการปิดหุ้มด้วยแผ่น

อะลูมิเนียมฟอยล์ เมื่อละลายแล้ว เติมสารละลายสี้อมไรท์เก่าเก็บ

(2.0 กรัม/1000 มิลลิลิตร เมทิลแอลกอฮอล์) ลงไป 100.0

มิลลิลิตร ตั้งไว้ค้างคืน แล้วจึงเติมสารละลายสี้อมไรท์

(ข้อ 14.1.1(3)) 800.0 มิลลิลิตร กรองเก็บไว้เป็นสารละลาย

สี้อม

สารละลายไรท์-เจมชา ที่จะใช้จริง :

สารละลายสต็อกของไรท์-เจมชา	1 ส่วน
น้ำกลั่นที่เป็นกลาง หรือบัฟเฟอร์	9 ส่วน

สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 :

สารละลาย A :

ไตรเบสิก โซเดียมฟอสเฟต, แอนไฮดริส	9.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

สารละลาย B :

โมโนเบสิก โพแทสเซียมฟอสเฟต	9.7 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้จริง :

สารละลาย A	61.1 มิลลิลิตร
สารละลาย B	38.9 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

วิธีสั้น :

1. ย้อมสีสเมียร์ 10 นาที ด้วยสีย้อมไรท์-เจมชา ที่จะใช้จริง
2. ไล่สีย้อมออกด้วยน้ำธรรมดาให้ไหลเข้าไปที่วามบริเวณที่ถูกย้อม เพื่อมิให้ตะกอนที่มีอยู่หลุดออกไป
3. นำสไลด์มาแช่ในน้ำกลั่นที่เป็นกลาง 1 นาที
4. จับตั้งในแนวเอียง ปล่อยให้แห้งแล้วจึงเม้าท์

วิธียาว (จะให้สีสวยกว่า) :

1. ย้อมสีสเมียร์ด้วยการทำสารละลายสต็อกไรท์-เจมชาให้เจือจางด้วยน้ำที่เป็นกลาง (1:50) ใช้เวลาย้อมสี 45 นาที
2. ทำเช่นเดียวกับวิธีสั้น ทำขั้นตอนที่ 2 และ 3 ใช้เวลานานกว่า คือ 3-5 นาที
3. จับตั้งในแนวเอียง ปล่อยให้แห้ง แล้วจึงเม้าท์

ข้อสังเกต :

การสเมียร์เลือดลงบนกระจกสไลด์ สามารถทำได้ทั้งแบบสเมียร์บางและสเมียร์หนาในสไลด์เดียวกัน แต่ต้องระวังเวลาทำให้คงสภาพส่วนสเมียร์บาง

ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ มีให้แอลกอฮอล์สัมผัสกับส่วนใดส่วนหนึ่งของสเมียร์หนา แล้วทำการย้อมด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งจะทำให้สเมียร์หนาติดสีเข้มกว่าปกติ แต่สเมียร์บางจะติดสีพอดี

14.1.3 ชั้นส่วนของเลือด ปรสิต และเมแทบอลิท์ของเลือด เมื่อมีปรสิตอยู่ในเลือด จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นทั้งเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ซึ่งจะมีจำนวนชนิด เปลี่ยนไปจากปกติ นอกจากนี้ยังมีเมแทบอลิท์ของเลือดซึ่งเกิดจากการทำลายของปรสิต ปนอยู่ในส่วนประกอบของเลือดด้วยเช่น สารสี และชิฟเนอร์สกีปปลิง (Schuffner's stippling) ในการนี้ของการติดเชื้อโรคมมาเลเรีย สีย้อมที่ใช้เป็นสีย้อม คือ

(1) สีย้อมเจมชา ดัดแปลงโดย วอลบาค (Wolback's modification)

การทำให้คงสภาพ : ใช้สารทำให้คงสภาพคุณภาพดีได้ทุกชนิด

สารละลาย :

แอซิดแอลกอฮอล์ :

70 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	100.0	มิลลิลิตร
กรดแอซิดิกเข้มข้น	0.5-1.0	มิลลิลิตร

สารละลายสต็อกของเจมชา

ผงสีย้อมเจมชา	1.0	กรัม
เมทิลแอลกอฮอล์ (เป็นกลาง ปราศจากอะซีโตน)	66.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	66.0	มิลลิลิตร

ผสมผงสีย้อมเจมชาและกลีเซอรอลลงในฟลาสค์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในตุ้ม 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเมทิลแอลกอฮอล์ ถ่ายใส่ขวดปิดจุกให้แน่น เก็บไว้ใช้เป็นสารละลายสต็อก

สารละลายเจมชาที่จะใช้จริง :

สารละลายสต็อกของเจมชา	2.5	มิลลิลิตร
เมทิลแอลกอฮอล์	3.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สารละลายสต็อกของโรซิน (Rosin stock solution or colophonium)

ไคร์วูดโรซิน	10.0	กรัม
แอลกอฮอล์สัมบูรณ์	100.0	มิลลิลิตร

สารละลายโรซินที่จะใช้จริง :

สารละลายสต็อกของโรซิน	5.0	มิลลิลิตร
95 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์	40.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ตั้งพาราฟินออก รันนิ่งดาว์จนถึงน้ำ ตั้ง $HgCl_2$ ลอก
2. แช่ในแอซิดแอลกอฮอล์ 5 นาที (ถ้าเป็นเนื้อเยื่อที่ผูกติดแคลเซียมออกด้วยกรดไม้จำเป็นต้องทำขั้นตอนนี้)
3. ล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที
4. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
5. ย้อมสีในสารละลายเจมชาที่จะใช้จริง และเฟ็งเตรียมใหม่ 1 ชั่วโมง
6. เปลี่ยนมาใส่ในสารละลายเจมชาที่จะใช้จริงอีกถ้วยหนึ่ง แช่ไว้ตลอดคืน
7. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
8. ดิฟเฟเรนเชียลในโรซินแอลกอฮอล์ ตรวจสอบการล้างสีออกด้วยกล้องจุลทัศน์
9. จุ่มล้างใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์
10. ตั้งน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์สมบูรณ์ 2 ครั้ง ทำให้ใสแล้วเมาก็

ผลที่ได้รับ :

นิวเคลียส - สีม่วงอมแดง

ส่วนประกอบอื่นของเนื้อเยื่อ - ติดสีเดียวกับสีย้อมของไรท์

อินคลูชันบอดี - สีนํ้าเงินจนถึงสีนํ้าเงินปนม่วง

ข้อสังเกต :

การใช้ความร้อนจะช่วยให้สีย้อมเจมชาติดสียิ่งขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 80-85 องศาเซลเซียส โดยให้ความร้อนโดยตรงที่สไลด์เป็นเวลา 10 นาที หรืออาจอุ่นสีย้อมเจมชาให้ได้อุณหภูมิดังกล่าว แล้วจึงเทลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ 10 นาที เช่นเดียวกัน ความร้อนช่วยให้สีย้อมเจมชาละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงช่วยให้การย้อมสีเร็วขึ้นด้วย

(2) เจนเนอร์-เจมซา สำหรับมาลาเรีย (Jenner-Giemsa for malaria)

สารละลาย :

สารละลายเจนเนอร์ :

สีย้อมเจนเนอร์	0.2	กรัม
เมทิลแอลกอฮอล์ (เป็นกลาง ปราศจากอะซีโตน)	100.0	มิลลิลิตร

สารละลายสติกของเจมซา :

ผงสีย้อมเจมซา	3.8	กรัม
เมทิลแอลกอฮอล์ (เป็นกลาง ปราศจากอะซีโตน)	75.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	25.0	มิลลิลิตร

ผสมผงสีย้อมเจมซากับกลีเซอรอลในพลาสติก ยูนีที่ 60 องศาเซลเซียส ในตู้อบ 2 ชั่วโมง เติมเมทิลแอลกอฮอล์ เปลี่ยนใส่ขวดปิดฝาให้แน่น

สารละลายสีย้อมเจมซาที่จะใช้จริง :

สารละลายสติกของสีย้อมเจมซา	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

หรือใช้สีย้อม 1.0 มิลลิลิตร และน้ำ 10.0 มิลลิลิตร เพื่อทำให้ท่วมสไลด์

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก แล้วรีนิงดาว์นจนถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์
2. ก. แผ่นบางของเนื้อเยื่อ-ผสมสารละลายเจนเนอร์ และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วหยดให้ท่วมสไลด์ หรือย้อมสีโดยใส่สไลด์ลงในถ้วยย้อมสี 4 นาที
- ข. สเมียร์-ทำเช่นเดียวกับ ก. ใช้เวลา 1 นาที
3. เทสีย้อมเจนเนอร์ทิ้ง ไม่ต้องจุ่มล้าง
4. ย้อมด้วยสีย้อมเจมซา เจือจางที่ทำเป็นสารละลายที่จะใช้จริง โดยการเทให้ท่วมสไลด์ หรือแช่ลงในถ้วยย้อมสีที่มีสีย้อมอยู่ก็ได้ ใช้เวลา 15-20 นาที
5. จุ่มล้างสีย้อมในน้ำกลั่น แล้วดีฟเฟเรนซีเอทต่อในน้ำกลั่น ถ้าติดสีน้ำเงินมากไปทำให้สีอีโอซินเด่นชัดด้วยการดีฟเฟเรนซีเอทใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแควซิกในน้ำ
6. ดึงน้ำออกด้วยอะซีโตน และโซลิน ห้ามใช้นแอลกอฮอล์ เพราะจะละลายสีออกมา

สัดส่วนของอะซีโตน และไซลีนที่ใช้ตั้งน้ำออก เป็นดังนี้

อะซีโตน 95 ส่วน : ไซลีน 5 ส่วน

อะซีโตน 70 ส่วน : ไซลีน 30 ส่วน

อะซีโตน 50 ส่วน : ไซลีน 50 ส่วน

อะซีโตน 30 ส่วน : ไซลีน 70 ส่วน

อะซีโตน 5 ส่วน : ไซลีน 95 ส่วน

7. ทำให้อะซีโตนในไซลีน แล้วจึงเม้าท์

ผลที่ได้รับ :

โครมาตินของปรสิต - สีแดงหรือสีแดงปนม่วง

ไซโทพลาสซึมของปรสิต - สีน้ำเงิน (ส่วนประกอบอื่นติดสีเช่นเดียวกับสีย้อมไรท์)

สวารสี - สีน้ำตาลปนเหลืองจนถึงสีดำ

ซีฟเนอร์สกีปปลิง - สีแดง

ข้อสังเกต :

เป็นวิธีย้อมสีเลือดที่ทำให้สีได้สวยงาม และใช้ย้อมสีปรสิตของเลือดได้ดี นอกจากนั้นสีเจมชายังใช้ย้อมเลือดสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นสัตว์เลือดอุ่น และเลือดนกได้ดีเช่นเดียวกับสีย้อมไรท์

กิจกรรม 14.1

ให้นักศึกษาเตรียมสีย้อมเจมชา-เจมชา ตามวิธีเตรียมในข้อ 14.1.3(2) แล้วนำสไลด์ของเลือดที่ทำสเมียร์บางไว้ในกิจกรรมตอนต้นๆ มาทำการย้อมสีด้วยสีย้อมเจมชา-เจมชา ตามระเบียบวิธีในข้อ 14.1.3(2) สังเกตผลที่ได้รับว่าควรมีสวารสี และซีฟเนอร์-สกีปปลิง หรือไม่

14.2 การย้อมสีไขกระดูก

ไขกระดูกพบได้ในโพรงของกระดูกที่เป็นท่อน โดยเฉพาะกระดูกแขนขา การนำกระดูกก่อนมาตัดเป็นชิ้นให้ผ่านส่วนที่มีไขกระดูกติดอยู่ แล้วนำมาทำให้คงสภาพ เป็นการเตรียมเนื้อเยื่อตัวอย่างไขกระดูกพร้อมกันไปในตัว กระดูกเมื่อทำการดัดแปลงเชื่อมออกแล้ว อาจทำให้บางส่วนของไขกระดูกหลุดออกไปบ้าง โดยเฉพาะส่วนที่เป็นฮีโมโพลิติกเซลล์ อย่างไรก็ตาม การเลือกแผ่นบางของเนื้อเยื่อส่วนที่ลึกเข้าไปจากผิวหน้าของตัวอย่าง

เนื้อเยื่อ ก็สามารถใช้เป็นแผ่นบางของเนื้อเยื่อตัวอย่าง เพื่อใช้สาธิตไขกระดูกได้ถ้าต้องการเฉพาะไขกระดูกมาสาธิต ก็สามารทำได้โดยการทำไบออปปี้ แล้วนำมาสเมียร์ (ดูข้อสังเกต 4) การย้อมสีไขกระดูก อาจใช้สีย้อมสำหรับงานประจำ คือ ซีมาทอกซิซิน-อีโอซิน หรือ สีย้อมสำหรับเลือด คือ ไรท์ และเจมซา ก็ได้ ในที่นี้จะกล่าวถึงสีย้อมแมกซีมาว'ส อีโอซิน-แอซัวร์ (Maximow's eosin-azure stain) ดังต่อไปนี้

การทำให้คงสภาพ : ควรใช้ เซนเกอร์-นิวทริล ฟอ์มาลิน 30 นาที การทำฟอ์มาลินให้เป็นกลาง ควรเติมลิเทียม หรือแมกนีเซียมคาร์บอเนต ลงไป 2 กรัม ในฟอ์มาลิน 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นคาร์บอเนตที่มากเกินพอได้จากสารที่ละลายไม่หมด เมื่อทำให้คงสภาพแล้ว จึงนำมาล้างในน้ำไหล 1-24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการฝังในมีเดีย (ดูข้อสังเกต 1)

สารละลาย :

สารละลาย A :

อีโอซิน Y C.I. 45380 (หรืออีโอซิน B C.I. 45400)

0.1 กรัม

ไรท์'ส บัฟเฟอร์¹

100.0 มิลลิลิตร

แอซัวร์ II

0.1 กรัม

สารละลาย B:

ไรท์'ส บัฟเฟอร์

100.0 มิลลิลิตร

สารละลายที่ใช้จริง :

ไรท์'ส บัฟเฟอร์

2.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น

40.0 มิลลิลิตร

สารละลาย A

8.0 มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันดีแล้วค่อยเติม

สารละลาย B

4.0 มิลลิลิตร

ควรเตรียมสารละลายก่อนใช้ เพราะถ้าเตรียมไว้นานเกิน 3-4 สัปดาห์คุณภาพของการย้อมสีจะเสื่อมลง สารละลายที่จะใช้จริงควรมีสีม่วงเข้ม และไม่ควรถกตะกอน หลังจากเตรียมเสร็จภายในเวลาหนึ่งชั่วโมง ถ้าเกิดตะกอนขึ้นเมื่อนำมาใช้ย้อมสี แสดงว่า การเตรียมสีมีข้อบกพร่อง เช่น เติมสารละลาย B ลงเร็วเกินไป หรือคนไม่แรง

*** 1. ดูวิธีการ เตรียมบัฟเฟอร์ในภาคผนวกที่ 5

และไม่เข้ากันดี ถ้าสีอีโอซินไม่สดใส แสดงว่าสารละลายเก่าไปควรเตรียมใหม่
เมื่อเตรียมสารละลาย A และ B แล้วควรวัดขนาดเก็บไว้ในตู้เย็น

ระเบียบวิธี :

1. ตึงพาราฟินออก แล้วรินน้ำจนถึงน้ำ ตึง $HgCl_2$ ออก ถ้าเนื้อเยื่อ
ได้รับการทำให้คงสภาพในสารละลายทำให้คงสภาพที่ปราศจากฟอส-
เฟอรัสไดโครเมต นำสไลด์มาแช่ใน 2.5-3 เปอร์เซ็นต์ ฟอสเฟอรัส-
ไดโครเมตในน้ำ แช่ไว้ตลอดคืน แล้วจึงนำมาล้างในน้ำไหล 15 นาที
2. ย้อมสีด้วยเมเยอร์ฮีมาทอกซิลิน (ดูข้อ 12.1.4) 30-45 นาที
หรือนานกว่า
3. ล้างในน้ำไหล 5-10 นาที
4. ล้างในน้ำกลั่น 5 นาที หรือนานกว่า
5. ย้อมสีด้วยสารละลายที่จะใช้จริงของอีโอซิน-แอซีวเร แช่ไว้ทั้งคืน
6. ดิฟเฟอเรนชิเอทใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ตรวจสอบการติดสี
ออกด้วยกล้องจุลทรรศน์
7. ตึงน้ำออก ด้วยแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ทำให้ใสแล้วเมาท ถ้าเมาททำเป็น
สไลด์ถาวรแล้วสีเกิดเปลี่ยนแปลงไม่เห็นความเข้ม-จาง แสดงว่าดิฟเฟ-
เรนชิเอทได้ไม่สมบูรณ์ นำสไลด์มาแช่ในไซลีน เอากระจกปิดออก
ล้างเมาทจนทำให้หมดด้วยไซลีน ทำย้อนกลับลงมา จนถึงขั้นตอนที่ 6
ควรทำด้วยความรวดเร็ว แล้วตรวจสอบผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพราะการ
ทำเช่นนี้จะทำให้สีถูกล้างออกอย่างรวดเร็ว เมื่อได้สีออกมาสวยงามแล้ว
จึงตึงน้ำออก ทำกลับขึ้นไปจนถึงเมาทอีกครั้ง

ผลที่ได้รับ :

- นิวเคลียส - สีนํ้าเงินปนม่วงเข้ม
- เม็ดเลือดแดง - สีม่วงอ่อน
- อีโอซินฟิลิกแกรนูล - สีแดงสด
- ไซโทพลาซึม - สีนํ้าเงินจาง

ข้อสังเกต :

1. ควรใช้เวลาทำให้คงสภาพ 30 นาที อาจทำให้เซลล์บริเวณกลางของชิ้น
เนื้อเยื่อได้รับการทำให้คงสภาพไม่ดีเท่าเซลล์บริเวณขอบนอก แต่การใช้
เวลานานเกินกว่า 30 นาที อาจก่อให้เกิดมีแกรนูลขึ้นในไซโทพลาซึมของ

- เม็ดเลือดแดง และอีวาทราบลัสก์ที่มีอีโอซินในฟิลิกแกรนูลขึ้นได้ ถ้าใช้เวลา 30 นาที ไม่เพียงพอสำหรับการทำให้คงสภาพของไซกระดุก โดยเฉพาะเมื่อติดอยู่ในที่นกระดุก ควรนำเนื้อเยื่อตัวอย่างไปแช่ในสารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์พอสแทสเชื่อมไฮโดรเมตในน้ำ แช่ไว้ตลอดคืน อาจทำได้อีกวิธีหนึ่ง คือ ใช้ของหนักทบกระดุกหลอด เพื่อให้สารละลายทำให้คงสภาพเข้าไปถึงไซกระดุกได้ทั่ว
2. ถ้าสามารถทำได้ ควรฝังเนื้อเยื่อในเมตาครีเลท (methacrylate) โดยเฉพาะเมื่อต้องการเงื่อนไขบางอย่างให้ได้ 1-3 ไมครอน เมตาครีเลททำให้เนื้อเยื่อหดตัวน้อย และช่วยให้เห็นรายละเอียดของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้ดี
3. อาจดัดแปลงสารละลายที่ใช้จริงของอีโอซิน-แอนซีวเร ได้ดังนี้
- | | | |
|----------------------|-----------------|----------------|
| แอนซีวเร A | 0.1 เปอร์เซ็นต์ | 4.0 มิลลิลิตร |
| อีโอซิน B | 0.1 เปอร์เซ็นต์ | 4.0 มิลลิลิตร |
| 0.2 M กรดแอซิดิก | | 1.25 มิลลิลิตร |
| 0.2 M โซเดียมแอซิเตท | | 0.75 มิลลิลิตร |
| อะซีโตน | | 5.0 มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | | 25.0 มิลลิลิตร |
- เตรียมสารละลายแล้วใช้ทันที แช่สไลด์สไลด์ไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาที่อะซีโตน 2 ครั้ง, อะซีโตน-โซลีน (1:1) และโซลีนตามลำดับ ปริมาณของกรดแอซิดิกและโซเดียมแอซิเตทที่ใช้ที่นี่ เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่ทำให้คงสภาพด้วย เซนเกอร์'ส ฟลูออโรแทนิน
4. การรวบรวมตัวอย่างไซกระดุก หรือการทำไบออพซีไซกระดุกควรทำโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเม็ดเลือด ใส่ลงในหลอดดูดไซกระดุก เช่น ผงเฮปาริน 0.5 กรัม หรือให้หลอดดูดเปียกด้วย d-potassium EDTA การทำสเมียร์อาจทำได้โดยการดูดไซกระดุกขึ้นมา แล้วหยดลงบนสไลด์ ทำแบบสเมียร์หนา เตรียมພັບกระดากกรองรหยาบตัดให้พอดีกับขอบกรวยขนาดเล็กใส่ลงไปในการวย ใช้พาราฟินเหลวหยดตามรอยພັບของกระดากกรองเพื่อมิให้กระดากคลายตัวออก เมื่อกระดากกรองอยู่ตัวแล้ว นำไซกระดุกส่วนที่เหลือจากสเมียร์ใส่ลงไปในการดากกรอง แล้วใช้ปิเปตต์ซีไลน์ล้างไซกระดุกให้ลงไปอยู่ก้นกรวยกระดากกรอง เซลล์ไซกระดุก

ที่แข็งตัวบางส่วนจะถูกล้างและหลุดจากกัน ลงไปอยู่กับกรวยกระดาษกรอง จนหมด จากนั้นจึงใช้คีมคีบกรวยกระดาษกรอง นำไปทำให้คงสภาพและขั้นตอนอื่นต่อไป โดยไม่ต้องแกะไขกระดูกออกจากกระดาษกรอง เมื่อถึงขั้นการทำให้ใส พาราฟินที่รอยพับจะถูกละลายออกหมด แต่กระดาษกรองยังคงสภาพพับอยู่ ถึงแม้ว่าจะคลายตัวออกบ้างแต่จะไม่ถึงกับทำให้ก้อนไขกระดูกหลุด จึงสามารถใช้คีมคีบ เปลี่ยนไปใส่ในมีเดียสำหรับการฝังได้ โดยการคว่ำกรวยกระดาษกรองลงบนพิมพ์ที่มีพาราฟินเหลวอยู่ให้ไขกระดูกหลุดลงไป จัดเรียงให้อยู่ในตำแหน่งตามต้องการได้

กิจกรรม 14.2

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายสีย้อมแมกนีมาว'ส อีโอซิน-แอซิว เรตามวิธีในข้อ 14.2 แล้วนำเนื้อเยื่อกระดูกที่ถูกดึงแคลเซียมออกแล้ว และได้รับการเจียนเป็นแผ่นบางแล้วจากกิจกรรม 7.1 มาทำการย้อมสีตามระเบียบวิธีในข้อ 14.2 ให้สังเกตว่า ไขกระดูกที่ติดอยู่กับกระดูกนั้น ให้สีตามที่ระบุไว้ในข้อ 14.2 หรือไม่ และสังเกตสีของส่วนที่เป็นกระดูกว่า ติดสีอะไร

สรุป

การย้อมสีเลือด และไขกระดูก เพื่อความจำเพาะสำหรับสัซิติเซลล์และส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ นิยมใช้สีประเภท โรมาโนว์สกีสเตน ที่ใช้สำหรับงานประจำ คือ สีย้อมไรท์ และสีย้อมเจมซา ซึ่งสามารถให้รายละเอียดต่าง ๆ ของเซลล์แต่ละชนิด และอันตรกิริยาได้ดีเด่นชัด

แบบฝึกหัดที่ 14

1. จงบอกชื่อของสีย้อม ที่นิยมใช้เป็นสีย้อมจำเพาะสำหรับเลือดและไขกระดูก มาตามที่กำหนด
 (ตอบ : อ่านให้จบหมดทั้งบทก่อนจึงตอบ)

2. เลือด และไขกระดูก ต่างไปจากเนื้อเยื่ออื่น การรวบรวมตัวอย่างจึงควรเตรียมการพิเศษอย่างไร จึงจะสามารถนำมาเป็นเนื้อเยื่อตัวอย่าง พร้อมสำหรับการทำให้คงสภาพได้

(ตอบ : อ่านให้จบหมดทั้งบทก่อนจึงตอบ)

3. การย้อมสีเลือดและไขกระดูก สีที่ใช้ย้อมไม่มี_____ เพราะทั้งเลือดและไขกระดูกมีส่วนประกอบหลักเป็น_____ ซึ่งติดสีได้ง่าย ส่วนที่เป็น_____ มีน้อย เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอื่น

(ตอบ : ใช้ความรู้จากบทที่ 1 และบทที่ 13 มาช่วยในการตอบด้วย)

4. ตามหลักการย้อมสีเลือดและไขกระดูก สีที่ใช้ย้อมทุกชนิดจะให้สีของนิวเคลียสเป็นสี_____ หรือ_____ สีของไซโทพลาซึม เป็นสี_____ สีของอินคลูชันบอดี หรือเมแทบอลไลท์ควรเป็นสี_____

(ตอบ : อ่านผลที่ได้รับของทุกชนิดของสีย้อม แล้วจึงประมวลนำมาตอบ)