

บทที่ 16

การย้อมสีเซลล์พิเศษ ส่วนประกอบของเซลล์ และผลผลิตของเซลล์

เค้าโครงเรื่อง

16.1 การย้อมสีเซลล์พิเศษ

16.1.1 การย้อมสีสเปอโรมาโตซัว

16.1.2 การย้อมสีเซลล์เยื่อปิวข้างแก้ม เพื่อแสดงเซกซ์โครมาติน

16.2 การย้อมสีส่วนประกอบของเซลล์

16.2.1 การย้อมสีโครมาฟิน

16.2.2 การย้อมสีไมโทคอนเดรีย

16.3 การย้อมสีผลผลิตของเซลล์

16.3.1 การย้อมสีแคลเซียม

16.3.2 การย้อมสีกรดยูริก

สาระสำคัญ

1. เซลล์พิเศษ คือ เซลล์ที่มีรูปร่างหน้าที่ และส่วนประกอบ ต่างจากเซลล์อื่นในอวัยวะเดียวกัน การย้อมสีจึงต้องเลือกสีที่เหมาะสมในการติดสีส่วนประกอบที่ต่างไปนั้น เช่น การย้อมสีเซกซ์โครมาติน ตามวิธีของการ์ด ซึ่งเซกซ์โครมาตินติดสีแดง ส่วนนิวเคลียสโครมาตินซึ่งอยู่บริเวณใกล้เคียงติดสีน้ำเงิน
2. การย้อมสีส่วนประกอบของเซลล์ มีหลักการเช่นเดียวกับการย้อมสีเซลล์พิเศษ เช่น ถ้าย้อมสีไมโทคอนเดรียด้วยไฮเดนเสนไอออนซีมาทอกซิลิน จะไม่ติดสีต่างไปจากส่วนประกอบอื่น จึงต้องเลือกใช้สีย้อมจำเพาะ เช่น สีย้อมของอัลท์มานน์ แอนิลิน แอซิด-ฟุกซิน ซึ่งไมโทคอนเดรียติดสีแดง ต่างไปจากสีไซโทพลาซึมซึ่งเป็นสีเหลือง
3. การย้อมสีผลผลิตของเซลล์ใช้หลักการเช่นเดียวกับการย้อมสีเซลล์พิเศษ ผลผลิตของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นอสัณฐาน จึงต้องหาสารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับผลผลิตของเซลล์แล้วติดสีได้ชัด หรือตกตะกอนแล้วหักเหแสงสองทาง เพื่อจะได้เห็นชัดเจน เช่น การย้อมสีแคลเซียมโดยการแทนที่ด้วยซิลเวอร์ตามวิธีของ ฟอนคอสซา

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่า ระเบียบวิธีใดเหมาะสมต่อการย้อมสีเซลล์พิเศษ ส่วนประกอบของเซลล์ ตลอดจนผลผลิตของเซลล์
2. นักศึกษาสามารถบอกกลไกการทำงานของวิธีการย้อมสีจำเพาะ ของเซลล์พิเศษบางชนิด ส่วนประกอบของเซลล์บางชนิด และผลผลิตของเซลล์บางชนิด โดยเฉพาะการมีกรดยูริกอยู่ที่อวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง
3. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในหนึ่งสัปดาห์

เซลล์พิเศษ หมายถึง เซลล์ที่มีรูปร่างส่วนประกอบของเซลล์ ตลอดจนหน้าที่ซึ่งมีความเฉพาะต่างไปจากกลุ่มเซลล์ภายในอวัยวะหรือระบบเดียวกัน เช่น สเปอร์มาโตไซด์ ต่างจากเซลล์ชนิดอื่นภายในอวัยวะ ส่วนหัวประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก คือ สารพันธุกรรม ส่วนหางมีไมโทครีทิวบลและไมโทคอนเดรียอยู่ส่วนกลาง การย้อมสีจึงขึ้นอยู่ที่วัตถุประสงค์ว่าจะเน้นสารใดส่วนประกอบใดของเซลล์ เพื่อให้เห็นความแตกต่างในการติดสีจากเซลล์ชนิดอื่น ส่วนประกอบของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ออร์แกเนลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีความสำคัญ สามารถสาธิตได้ด้วยสีย้อมสำหรับงานประจำ แต่เพื่อความเด่นชัดก็สามารถนำมาใช้สีย้อมจำเพาะ เพื่อให้เห็นรายละเอียดมากขึ้นได้ เช่น ไมโทคอนเดรีย สำหรับผลผลิตของเซลล์นั้นอาจละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับไซโทพลาซึม จึงยากต่อการนำมาสาธิตโดยสีย้อมธรรมดาได้ จำเป็นต้องใช้สีย้อมจำเพาะ สำหรับในบทนี้จะยกตัวอย่างการย้อมสีเซลล์ เซลล์ออร์แกเนลล์ และผลผลิตของเซลล์บางชนิดเท่านั้น

16.1 การย้อมสีเซลล์พิเศษ

16.1.1 การย้อมสีสเปอร์มาโตไซด์ วิธีของเบิร์ก (Berg's method) นำสารละลายคาร์บอฟูคซิน ของพัทท์ (Putt's carbol-fuchsin's method) มาดัดแปลงทำให้ย้อมสีติดสเปอร์มาโตไซด์ได้เข้ม เมื่อใช้ร่วมกับสารละลายที่ทำหน้าที่ดีฟเฟเรนซีเอทอย่างอ่อน เช่น กรดแอสซิติค

การทำให้คงสภาพ : 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายนิวทรัลฟอร์มาลินในน้ำ

สารละลาย :

พื้ท์ คาร์บอล-ฟุกชิน :

นิวฟุกชิน (C.I. 42520)	1.0	กรัม
ฟีนอล	5.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	84.0	มิลลิลิตร

กรองก่อนใช้

ลิเทียมคาร์บอเนตอิ่มตัวในน้ำ (1 เปอร์เซ็นต์) :

5 เปอร์เซ็นต์ กรดแอซิดิกเข้มข้น-แอลกอฮอล์ :

กรดแอซิดิกเข้มข้น	5.0	มิลลิลิตร
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	95.0	มิลลิลิตร

0.5 เปอร์เซ็นต์ เมทิลีนบลู :

เมทิลีนบลู (C.I. 52015)	1.0	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์	200.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก วันหนึ่งดาวจนถึงน้ำ
2. ย้อมสีในสารละลายพื้ท์ คาร์บอล-ฟุกชิน 3 นาที
3. เปลี่ยนสไลด์มาแช่ในสารละลายลิเทียมคาร์บอเนตอิ่มตัว 3 นาที
4. ดิฟเฟอเรนเชียล ใน 5 เปอร์เซ็นต์ แอซิดิก-แอลกอฮอล์ 5 นาที
ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
5. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที
6. ย้อมสีด้วยเมทิลีนบลู 30-60 วินาที
7. รุ่มล้างอย่างรวดเร็วในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้ง
8. ทำให้ใสในไซลีน แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

- สเปอ์มาโตซัว - สีแดงสด
- เม็ดเลือดแดง - สีชมพูจาง
- โครงสร้างอื่น - สีน้เงินจนถึงสีม่วง

16.1.2 การย้อมสีเซลล์เยื่อปิวท้างแก้มเพื่อแสดงเชกซ์โครมาติน เชกซ์โครมาติน หรือบาร์บอดี (Barr body) พบในนิวเคลียสของเซลล์ในสตรี ไม่พบในบุรุษ ทำโดยวิธีชุด

เซลล์จากข้างแก้ม ใช้วันที่สะอาดชุดหนึ่งภายในข้างแก้ม แล้วมาละเลงลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด ออรัปละลายให้สไลด์แห้ง รับประทานทำให้คงสภาพทันที แล้วย้อมสีด้วยวิธีของการ์ด (Guard's method)

การทำให้คงสภาพ : 95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์-อีเทอร์ (1:1) 15 นาที

สารละลาย :

ไบบริช สคาเลท :

ไบบริช สคาเลท (C.I.26905)	1.0	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.3	กรัม
กรดแอซีติกเข้มข้น	5.0	มิลลิลิตร
50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	95.0	มิลลิลิตร

แฮริส ฮีมาทอกซิลิน :

50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ :

แฟสท์กรีน :

แฟสท์กรีน FCF (C.I.42053)	0.5	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.3	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.3	กรัม
กรดแอซีติกเข้มข้น	5.0	มิลลิลิตร
50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	95.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. เปลี่ยนสไลด์ที่มีสเมียร์ จากสารทำให้คงสภาพมาใส่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 2 นาที
2. ย้อมสีด้วย แฮริส ฮีมาทอกซิลิน 15 วินาที
3. ย้อมสีด้วย ไบบริช สคาเลท 2 นาที
4. 50 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 5 นาที
5. ย้อมสีด้วย แฟสท์กรีน 24 ชั่วโมง
6. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเม้าท์

ผลที่ได้รับ :

เชกซ์โครมาติน (บารรี บอดี) - สีแดง

นิวเคลียสโครมาติน - สีน้ำเงิน

ไซโทพลาซึม - สีเขียว

กิจกรรม 16.1

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายสีย้อม และสารละลายอื่นที่เกี่ยวข้องตามวิธีการย้อมสีสเปอร์มาโตซัวของเบิร์ก ในข้อ 16.1.1 แล้วนำเนื้อเยื่อตัวอย่างอิมตะของหนูที่เงื่อนไขเป็นแผ่นบางไว้แล้ว มาทำการย้อมสีตามวิธีของเบิร์กในข้อ 16.1.1 ตรวจสอบผลที่ได้ว่าตรงตามที่ระบุไว้ในระเบียบวิธีหรือไม่

16.2 การย้อมสีส่วนประกอบของเซลล์

16.2.1 การย้อมสีโครมาฟฟิน โครมาฟฟิน (chromaffin) เป็นวัตถุที่มีลักษณะเป็นแกรนูลสีน้ำตาลเข้ม พบในเมดัลลาเซลล์ของต่อมหมวกไต อาจพบได้ในเซลล์เนื้อเยื่อบางชนิด เชื่อกันว่ามีแอดรีนาลิน และ/หรือ นอร์แอดรีนาลินบรรจุอยู่ ต่อมหมวกไตสร้างตัวเองได้เร็วกว่าอวัยวะอื่น จึงต้องรีบทำให้คงสภาพทันที ในกรณีที่สัตว์ตายแล้วต้องไม่เกินกว่า 2 ชั่วโมง

โครมาฟฟินละลายในแอลกอฮอล์ จึงต้องเลี่ยงการใช้แอลกอฮอล์เป็นสารทำให้คงสภาพ ฟอร์มาลิน หรือ ฟอร์มาลินตามด้วยเกลือไดโครเมต ก็ไม่ใช่สารทำให้คงสภาพที่ดีสำหรับต่อมแอดรีนัล จึงควรเลือกสารทำให้คงสภาพที่มีเมอร์คิวริกคลอไรด์และกรดแอสซิติก เช่น แซมปี ฟลูอิด มิลเลอร์ ฟลูอิด หรือ เรอโกด์ ฟลูอิด

ถ้าใช้สารคงสภาพที่ดี โครมาฟฟินแกรนูลสามารถสกัดได้ด้วยสีย้อมเจมซา วิธีของชมอร์ล (Schmorl's method), วิธี P.A.S และวิธีของไวเชิล (Weisel's method)

เนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน สามารถนำมาย้อมสีเพื่อสกัดโครมาฟฟินได้ ถึงแม้ว่าโครมาฟฟินจะละลายในพาราฟินเหลวบ้างก็ตาม ถ้าสามารถทำได้ควรใช้แผ่นบางจากการเจียนเนื้อเยื่อแช่แข็ง

วิธีของไวเชิล

การทำให้คงสภาพ : ใช้มิลเลอร์ ฟลูอิด, แซมปี ฟลูอิด หรือ เรอโกด์ ฟลูอิด หรือ แช่แข็ง

สารละลาย :

สารละลาย 1 เปอร์เซนต์ โทลูอิดีนบลู (C.I.52040) ในน้ำ

สารละลาย 1 เปอร์เซนต์ ซาฟรานิน โอ (C.I.50240) ในน้ำ

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก รันนิงดาวน์จนถึงน้ำ
2. ย้อมสีในสารละลาย 1 เปอร์เซนต์ โทลูอิดีนบลูในน้ำ 20 นาที

3. ล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที
4. ย้อมสีในสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ซาฟรานิน โด 20 นาที
5. จุ่มล้างในน้ำ
6. ดีฟเฟอเรนซีเอท ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ จนแผ่นบางของเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงิน
7. ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

นิวเคลียส - สีแดง

โครมาพินแกรนูล - สีเขียว

เซลล์ชนิดอื่น - สีน้ำเงิน

16.2.2 การย้อมสีไมโทคอนเดรีย ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญ เพราะทำหน้าที่ช่วยสร้างสารพลังงานให้แก่เซลล์ มีกรรมชาติเป็นลิโปโปรตีน และย่อยสลายตัวเองได้เร็วที่สุด การทำให้คงสภาพอย่างรวดเร็วจึงจะสามารถสาธิตได้ สารที่ทำให้คงสภาพที่เหมาะสม คือ เฮลลี่ ฟลูอิด หรือ เรอโกด์ ฟลูอิด

หลังจากทำให้คงสภาพแล้ว อาจสาธิตได้โดยวิธีไฮเดนเฮน ไอออนฮีมาทอกซิลิน วิธีกรอดฟอสโฟทังสติกฮีมาทอกซิลิน และโดยวิธีอัลท์มานน์ แอนิลินแอซิดฟุกซิน (Altmann's aniline acid fuchsin method) ดังต่อไปนี้

การทำให้คงสภาพ : เฮลลี่ ฟลูอิด หรือ เรอโกด์ ฟลูอิด 24-48 ชั่วโมง แล้วแช่ต่อในสารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ พอแทสเซียมไดโครเมตในน้ำ เป็นเวลา 4-7 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายนี้ทุกวัน ล้างด้วยน้ำไหลตลอดคืน

สารละลาย :

อัลท์มานน์ แอนิลินแอซิดฟุกซิน :

แอนิลิน	1.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.0 มิลลิลิตร
แอซิดฟุกซิน (C.I. 42685)	4.0 กรัม

เขย่าแอนิลินและน้ำกลั่น 2-3 นาที ตั้งไว้แล้วทำอีกตลอด 24 ชั่วโมง กรองเติมแอซิดฟุกซินลงในสารละลายที่กรองได้ เขย่าเป็นครั้งคราวหลายชั่วโมง จนกว่าจะละลายหมด สารละลายนี้เตรียมแล้วต้องใช้ทันที

สารละลายกรดฟิสิก A :

กรดฟิสิกอิ่มตัวในแอลกอฮอล์	10.0	มิลลิลิตร
20 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	40.0	มิลลิลิตร

สารละลายกรดฟิสิก B :

กรดฟิสิกอิ่มตัวในแอลกอฮอล์	10.0	มิลลิลิตร
20 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์	70.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก เปลี่ยนมาเข้าในแอลกอฮอล์อิ่มตัว แล้วเช็ดด้านล่างของสไลด์และบริเวณรอบ ๆ แผ่นบางของเนื้อเยื่อ ต้องทำด้วยความรวดเร็ว มิให้สไลด์แห้ง
2. วางสไลด์ลงบนรางแท่งแก้วคู่ หงายส่วนที่มีแผ่นบางของเนื้อเยื่อขึ้น แล้วหยดสีย้อม อัลท์มานลงให้ท่วม ใช้ไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ลนใต้สไลด์ล่างไปมาจนสีย้อมเริ่มเป็นไอ
3. เคาไฟออก ปล่อยให้สไลด์เย็นลง ประมาณ 5-8 นาที
4. จุ่มล้างในน้ำกลั่น หรือใช้น้ำกลั่นใส่ปิเปตฉีดล้างสีย้อมออก
5. ดิฟเฟอเรนเชียลด้วยสารละลายกรดฟิสิก A 1 นาที
6. เปลี่ยนมาดิฟเฟอเรนเชียลด้วยสารละลายกรดฟิสิก B 1 นาที
7. ดึงน้ำออกอย่างรวดเร็วด้วยแอลกอฮอล์อิ่มตัว เปลี่ยน 2 ครั้ง โดยวิธีจุ่ม แล้วยกขึ้น
8. ทำให้ใสด้วยไซลีน แล้วเมาท

ผลที่ได้รับ :

นิวเคลียส	-	สีเหลือง
นิวคลีโอลัส	-	สีแดง
ไมโทคอนเดรีย	-	สีแดง
ไซโทพลาซึม	-	สีเหลือง
เม็ดเลือดแดง	-	สีแดง

ข้อสังเกต :

ถ้าเนื้อเยื่อได้รับการดิฟเฟอเรนเชียลมากเกินไปจนสีหลุดเกือบหมด ทำการย้อมสีกลับคืนไม่ได้ ต้องทำโดยใช้น้ำเนื้อเยื่อใหม่ที่ถึงไม่ได้ย้อมสี

กิจกรรม 16.2

ให้นักศึกษาปฏิบัติการเตรียมสารละลายสีย้อมที่จะใช้ย้อมไมโทคอนเดรีย ตามวิธีของ อัลท์มานน์ ในข้อ 16.2.2 นำเนื้อเยื่อตับที่เนียนบางเมาทิ้งไว้บนสไลด์แล้วจากกิจกรรมตอนต้น (กิจกรรม 7.1) มาทำการย้อมเพื่อสาคิตไมโทคอนเดรีย ตามระเบียบวิธีในข้อ 16.2.2 ตรวจสอบผลที่ได้รับว่า ถูกต้องตามที่ระบุไว้ในตำราหรือไม่

16.3 การย้อมสีผลผลิตของเซลล์

16.3.1 การย้อมสีแคลเซียม แคลเซียมปกติเป็นส่วนประกอบของกระดูกและฟัน แต่บางครั้ง แคลเซียมไปสะสมอยู่ในอวัยวะอื่นที่ไม่ควรจะอยู่ เช่น ตับ ทำให้เกิดนิ่วตกที่ตับ โดยทั่วไปอาจย้อมสีแคลเซียมได้ด้วยสีอะลัมสีมาทอกซิลินให้สีน้ำเงินเข้ม แต่มีสีย้อมจำเพาะเพื่อให้ได้เอกลักษณ์ของแคลเซียม ซึ่งอาจอยู่ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมออกซาเลต และแคลเซียมฟอสเฟต

วิธีแสดงเอกลักษณ์ของเกลือแคลเซียม แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ (1) แทนที่ด้วยโลหะ เช่น วิธีของฟอนคอสซา (VonKossa methods) และ (2) ปฏิกริยาตาย-เลค (dye-lake reaction) เช่น วิธีเอลิซาเวรินเรดเอส และเพอร์พิวริน (alizarin red S and pur-purin method)

(1) วิธีฟอนคอสซา

การทำให้คงสภาพ: ใช้ 10 เปอร์เซ็นต์นิวทริลฟอร์มาลิน หรือ แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ สารละลาย :

1.5 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรทในน้ำ (1.5 กรัม/น้ำ 100 มิลลิลิตร)

5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไทโอซัลเฟต (5 กรัม/น้ำ 100 มิลลิลิตร)

1 เปอร์เซ็นต์ นิวทริลเรด (C.I. 50040) ในน้ำ (1 กรัม/น้ำ 100 มิลลิลิตร)

ระเบียบวิธี :

1. ตึงพาราฟินออก วันนิงดาวนจ์จนถึงน้ำ
2. ย้อมสีด้วยสารละลาย 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรท ตั้งไว้ให้ถูกแสงแดด หรือใช้แสงจากหลอดไฟส่อง 30 นาที
3. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
4. แช่ใน โซเดียมไทโอซัลเฟต 3-5 นาที
5. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
6. ย้อมสีด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ นิวทริลเรด 5 นาที

- 7. รุ่มล้างในน้ำกลั่น
- 8. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท

ผลที่ได้รับ :

- นิวเคลียส - สีแดง
- เกลือแคลเซียม - สีดำ
- พื้น(background)ของเนื้อเยื่อ - สีชมพูจาง

ข้อสังเกต :

วิธีฟอนคอสดา สาคิตแคลเซียมออกซาเลต โดยใช้ซิลเวอร์เข้าไปแทนที่แคลเซียม เมื่อซิลเวอร์ในเตรททอรีด้วยแสงแดด ในกรณีของแคลเซียมคาร์บอเนต ปฏิกริยาต้องใช้นานกว่า

(2) วิธีเอลิซาวิน เรด เอส

การทำให้คงสภาพ : ไข่ 10 เเปอร์เซ็นต์ฟอร์มอลีน หรือแอลกอฮอล์สี่มบรณ

สารละลาย :

สารละลายสี่มบเอลิซาวิน :

เอลิซาวิน เรด เอส (C.I.58005)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ของสารละลายสี่มบให้อยู่ระหว่าง 4.1-4.3 โดยการหยดน้ำแอมโมเนียเข้มข้นทีละหยด ให้แก่แก้วคนโดยไม่ต้องยกก็เล็ก-โทรดของเครื่องพีเอชมิเตอร์ออก สี่มบจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มของไข่โดยสิ้น และเสถียรอยู่ได้ถึง 12 เดือน

อะซีโตน :

สารละลายผสมอะซีโตน-ไซลีน :

อะซีโตน	20.0	มิลลิลิตร
ไซลีน	20.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก รันนิ่งดาว์จนถึงน้ำ
2. ย้อมสีในสารละลายเอลิซาวิน เรดเอส 30 วินาที จนถึง 5 นาที นำสไลด์ขึ้นมาตรวจสอบทุกๆ 30 วินาทีด้วยกล้องจุลทัศน์ จนเห็นว่า แคลเซียมที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อติดสีส้มแดง และมีความเข้มพอดี จึงจะใช้ได้
3. เอียงสไลด์ให้สีไหลออกทั้งหมด

4. ทึบด้วยกระดาษกรอง ด้วยความระมัดระวัง
5. จุ่มสไลด์ลงในอะซีโตน 20 วินาที แล้วยกขึ้น
6. จุ่มสไลด์ลงในสารละลายผสม อะซีโตน-ไซลีน 20 วินาที แล้วยกขึ้น
7. ทำให้ใสด้วยไซลีน แล้วเมาท

ผลที่ได้รับ :

บริเวณที่มีการสะสมของเกลือแคลเซียม - ถูกปกคลุมด้วยตะกอนสีส้มแดงที่มีการหักเหสองแนว

ข้อสังเกต :

วิธีนี้ค่า pH ที่ถูกต้องมีบทบาทต่อการให้ผลบวกของเกลือแคลเซียมในเนื้อเยื่อ ถ้าใช้สีเพอร์ฟิวริน เมื่อเก็บสไลด์ไว้นานสีจะจางลง วิธีเอลิซาเวธ เรด แอส ไม่สามารถใช้ได้กับการสะสมแคลเซียมออกซาเลต ต้องใช้ วิธีฟอนคอสซา

16.3.2 การย้อมสีกรดยูริก ผลึกของกรดยูริก (uric acid) ที่พบอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะข้อ จะอยู่ในรูปของโซเดียมยูเรต ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคข้ออักเสบ (gout)

ยูเรต ละลายน้ำได้ และละลายในสารละลายแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์อิ่มตัว หรือน้ำแอมโมเนียเข้มข้น ยูเรตเป็นสารที่มีการหักเหสองแนว

เนื่องจากยูเรตละลายน้ำได้ เนื้อเยื่อต้องนำมาทำให้คงสภาพด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์หรือแอลกอฮอล์อิ่มตัว แล้วจึงนำมาย้อมสีด้วยวิธีของ เดอกาแลนทา (De Galantha's method)

การทำให้คงสภาพ : ใช้ 95 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ หรือ แอลกอฮอล์อิ่มตัว
สารละลาย :

สารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรท :

สารละลายเดเวลออิง :

3 เปอร์เซ็นต์ เจลาติน (ย่นให้ละลาย)	10.0 มิลลิลิตร
20 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรท	3.0 มิลลิลิตร
2 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรควิโนน	2.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. แผ่นบางของเนื้อเยื่อ ควรเลือกชนิดที่หนาประมาณ 8 ไมครอน ดึงพาราฟินออก วันหนึ่งคาวน้ำจนถึงน้ำ

2. แขนในสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ซิลเวอร์ไนเตรท ตั้งให้ถูกแสงแดด 1-4 ชั่วโมง หรือตั้งไว้ใต้แสงจากหลอดไฟฟ้า 100 วัตต์ ตรวจสอบการติดสีโดยกล้องจุลทรรศน์ว่า สีของยูเรตเป็นสีทึบหลายสัด
3. แขนในสารละลายเตวอลบิง จนยูเรตเปลี่ยนเป็นสีดำ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือสีน้ำตาล
4. ล้างในน้ำอุ่น เพื่อให้หมดคราบของเวลาติน
5. ตังน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท

ผลที่ได้รับ :

ผลึกกรดยูริก - สีดำ

พันเนื้อเยื่อ (เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน) - สีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล

กิจกรรม 16.3

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายที่จะใช้ย้อมสีกรดยูริก ตามวิธีเตรียมในข้อ 16.3.2 แล้วนำแผ่นบางของเนื้อเยื่อจากไต ซึ่งทำไว้ในกิจกรรมตอนต้น (กิจกรรม 7.1) มาทำการย้อมสีกรดยูริก ตามวิธีของ เดอ กาลแลนทาในข้อ 16.3.2 ให้สังเกตว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของไตติดสีอะไร บริเวณกลอเมอรูลัสติดสีอะไร และผลการย้อมสีครั้งนี้สามารถสัทธิกรดยูริกได้หรือไม่

สรุป

การย้อมสีจำเพาะสำหรับเซลล์พิเศษ ส่วนประกอบของเซลล์ ตลอดจนผลผลิตของเซลล์ ต้องเข้าใจธรรมชาติของสิ่งที่ต้องการย้อมสีว่า มีส่วนประกอบทางเคมีเป็นสารชนิดใด แล้วเลือกสีย้อมที่มีปฏิกิริยาจำเพาะกับสารนั้นมาใช้ เช่น ซิลเวอร์ไนเตรทสามารถเข้าแทนที่แคลเซียมได้เมื่อถูกแสงแดด จึงใช้สัทธิการสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อ

แบบฝึกหัดที่ 16

1. จงอธิบายความหมายของคำว่า เซลล์พิเศษ พร้อมทั้งชักตัวอย่าง
(ตอบ: ดูบทนำก่อนข้อ 16.1)
2. จงอธิบายหลักการสาธิตแคลเซียมในเนื้อเยื่อชนิดอื่นที่ไม่ใช่กระดูกและฟัน
(ตอบ: ดูข้อ 16.3.1)
3. การย้อมสีสเปออร์มาโตไซว ด้วยวิธีของเบิร์ก สารที่ทำหน้าที่เป็นสีย้อม คือ _____
และ _____ ลิเทียมคาร์บอเนตทำหน้าที่ _____ สารละลายกรด
แอสติก-แอลกอฮอล์ทำหน้าที่ดีฟเฟอเรนซ์เอชัน ดังนั้นพอถึงขั้นตอนนี้การย้อมสีจึงเป็น
แบบที่เรียกว่า _____ และเมื่อย้อมสีด้วยเมทิลีนบลู เรียกว่าเป็นการ _____
(ตอบ: ดูข้อ 16.1.1 และความรู้จากบทต้น ๆ มาประกอบ)
4. เซกซ์โครมาตินพบได้ในเพศหญิง ในเซลล์ _____ แต่ที่นำมาสาธิตได้ง่าย คือ
เซลล์ _____ การย้อมสีใช้วิธีของ _____
(ตอบ: ดูข้อ 16.1.2)
5. เมื่อนาสไลด์ถาวรของอวัยวะที่ได้รับการย้อมสีโดยวิธีของเบิร์ก มาตรวจสอบด้วยกล้อง
จุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ส่วนหัวของสเปออร์มาโตไซวติดสี _____
ส่วนกลางติดสี _____ และส่วนหางติดสี _____
(ตอบ: ดูข้อ 16.1.1 และ 16.2.2)
6. เมื่อนาสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อไตที่ได้รับการย้อมสีโดยวิธีของ เดอ กาแลนทา พบว่า
สีบนเนื้อเยื่อของไตติดสี _____ บริเวณท่อเมอรูลัสติดสี _____ บริเวณหลอดไตติดสี _____
แสดงว่า _____ อยู่ในเนื้อเยื่อตัวอย่าง
(ตอบ: ดูข้อ 16.3.2 แล้วต้องนำผลจากกิจกรรม 16.3 มาตอบด้วย)