บทที่ 2
วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

เค้าโครงเรื่อง

2.1 การดมสลบสัตว์และสารดมสลบ

2.1.1 การดมสลบสัตว์มีกระดูกสันหลัง

2.1.2 การดมสลบสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

2.2 การผ่าตัดอวัยวะและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ

2.2.1 สัตว์มีกระดูกสันหลัง

2.2.2 สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

2.3 ระเบียบวิธีทั่วไปที่ใช้ตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

2.3.1 การเฉือน

2.3.2 การสเมียร์

2.3.3 การฉีก

2.3.4 การเผาจุลภาค

2.3.5 การย้อมสีขณะมีชีวิต

2.3.6 ภาพรังสีในตัว

สาระสำคัญ

1. การดมสลบจำเป็นต้องทำก่อนการผ่าตัด เพื่อให้สัตว์หมดความรู้สึกไม่เจ็บปวด กล้ามเนื้อและอวัยวะคลายตัว สารดมสลบที่ใช้สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กและที่เป็นสัตว์ทดลองนิยมใช้ คลอโรฟอร์มหรืออีเทอร์ สำหรับสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเลือกใช้ตามความเหมาะสมของสัตว์แต่ละชนิด เช่น ไซยาไนด์สำหรับสัตว์ขาปล้องบนบก, แอลกอฮอล์ และสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต สำหรับสัตว์น้ำเป็นต้น
2. การผ่าตัดอวัยวะและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ต้องทำทันทีที่สัตว์สลบ ถ้าเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังและพวกสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการ ตรึงสัตว์ให้แน่นบนกระดานผ่าตัดผ่ากลางด้านล่างจากท้องขึ้นไปจนถึงทรวงอก ตัดอวัยวะที่ต้องการออกมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดเฉลี่ย 0.5 มิลลิเมตร ใส่ทันทีในสารละลายทำให้คงสภาพ ถ้าเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เมื่อสลบแล้วใส่ในสารละลายทำให้คงสภาพทั้งตัว หรือทำตามระเบียบวิธีอื่นขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์

3. ระเบียบวิธีทั่วไปเพื่อการตรวจเซลล์และเนื้อเยื่อ นิยมใช้การเฉือนเป็นหลักเพราะสามารถตรวจสอบเนื้อเยื่อได้เกือบทุกชนิด ระเบียบวิธีอื่นๆ เช่น การสเมียร์ นิยมใช้สำหรับการตรวจสอบเลือด การฉีกสำหรับกล้ามเนื้อ การเลือกใช้ระเบียบวิธีใดวิธีหนึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเนื้อเยื่อและวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบ

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถทำการดมสลบสัตว์ทั้งที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังได้
2. นักศึกษาสามารถทำการผ่าตัดอวัยวะสัตว์ ตลอดจนเนื้อเยื่อสัตว์รวมทั้งการเตรียมสัตว์ทั้งตัวเพื่อการทำให้คงสภาพในขั้นตอนต่อไปได้
3. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่า ระเบียบวิธีใดเหมาะสำหรับการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อชนิดใด
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 80 เปอร์เซนต์ในเวลาหนึ่งสัปดาห์

การผ่าตัดเพื่อนำตัวอย่างของอวัยวะไปใช้สำหรับการศึกษา หรือตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการเตรียมการอย่างถูกต้องและรอบคอบ เพื่อให้ตัวอย่างที่จะนำไปศึกษามีสภาพคงเดิม หรือใกล้เคียงกับสภาพเดิมมากที่สุด ก่อนการผ่าตัดต้องเลือกใช้สารดมสลบที่เหมาะสม และขนาดที่ใช้ก็ต้องให้สลบพอดี ไม่ถึงตาย มิฉะนั้นจะทำให้สภาพของตัวอย่างต่างไปจากเดิม เมื่อดมสลบแล้วต้องรีบผ่าตัด และตัดชิ้นส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อทันที แล้วใส่ลงในสารละลายทำให้คงสภาพ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้น การเลือกใช้ระเบียบวิธีใดเพื่อการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ ควรวางแผนไว้ล่วงหน้าก่อนการดมสลบและการผ่าตัด และควรตรวจสารเคมีเครื่องมือเครื่องใช้สำหรับแต่ละวิธีให้ถูกต้อง

2.1 การดมสลบสัตว์และสารดมสลบ

2.1.1 การดมสลบสัตว์มีกระดูกสันหลัง

สัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนบก และสัตว์ที่นิยมใช้เพื่อการศึกษา วิจัยและทางการแพทย์เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก เช่น หนู แฮมสเตอร์ หนูตะเภา ขนาดกลางได้แก่ กระต่าย แมว สุนัข ปัจจุบันไม่นิยมใช้ลิงและสัตว์ขนาดใหญ่อื่น เพื่อ

การศึกษาและวิจัย เพราะนอกจากขนาดใหญ่ ค่าใช้จ่ายสูงแล้ว ยังเป็นการไร้มนุษยธรรมด้วย

สารดมสลบที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์ สารเคมีทั้งสองชนิดนี้หาง่าย และเวลาพอสมควร ทำให้สัตว์สลบได้ดีและไม่ถึงขั้นตายทันที ถ้าได้รับมากเกินไป

เตรียมภาชนะแก้วมีฝาปิด รองพื้นด้วยสำลีหรือผ้าก๊อช ใส่สารดมสลบลงไป หย่อนสัตว์ที่ต้องการให้สลบลงไปในภาชนะแก้ว ปิดฝา สังเกตุสัตว์ ว่าเริ่มล้มคลายตัวลงนอน ให้รีบนำออกมาผูกหรือตรึงบนกระดานผ่าตัด ในกรณีที่สัตว์ฟื้น ให้ใช้สำลีชุบสารดมสลบใส่ลงในบีกเกอร์ขนาดเล็ก ครอบลงไปที่ส่วนหัว เมื่อเห็นว่าสลบแล้ว ดึงบีกเกอร์ออก ทำเช่นนี้ทุกครั้งที่มีการฟื้น

2.1.2 การดมสลบสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เพื่อการศึกษา ส่วนใหญ่เป็นพวกหนอนปรสิต เช่น พยาธิไส้เดือน ตืดวัว ตืดหมู และพยาธิใบไม้ในตับ พวกที่ไม่เป็นปรสิต เช่น ไส้เดือนดิน หอย สัตว์ขาปล้อง ฯลฯ

สารดมสลบที่เป็นแก๊ส เช่น ไซยาไนด์[1] เหมาะสำหรับสัตว์ขาปล้องที่อาศัยอยู่บนบก เตรียมขวดดมสลบโดยนำขวดแก้วเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร สูงประมาณ 20 เซนติเมตร ใช้ช้อนตักพอแทสเซียมไซยาไนด์ หรือโซเดียมไซยาไนด์หนึ่งช้อนชา ห่อด้วยผ้าก๊อชหนา 3-4 ชั้น วางลงก้นขวด คลุมทับด้วยสำลี หรือขี้เลื่อยละลายปูนพลาสเตอร์พอข้นหนืดเททับลงบนขี้เลื่อยหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดปากขวดด้วยฝาเกลียวให้แน่น เมื่อต้องการดมสลบสัตว์ขาปล้องหรือพวกแมลง เปิดฝาขวดใส่สัตว์ลงไปปิดฝาให้แน่น เมื่อสัตว์หยุดเคลื่อนไหว นำออกดำเนินการขั้นอื่นต่อไป

สารดมสลบอย่างอื่นที่ควรทราบคือ

แมกนีเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมซัลเฟต($MgCl_2$ หรือ $MgSO_4$) เหมาะสำหรับดมสลบสัตว์พวกดอกไม้ทะเล ปะการัง หนอนปล้อง เพรียงหัวหอม และทากเปลือย ห่อสารดมสลบด้วยผ้าก๊อชแขวนไว้ปริ่มน้ำที่มีสัตว์พวกนี้อยู่ หรือทำเป็นสารละลาย 33 เปอร์-

---

***1. สารประกอบไซยาไนด์ เป็นสารพิษร้ายแรง การเตรียมขวดดมสลบและฆ่าด้วยไซยาไนด์ ต้องใช้ความระมัดระวังไม่สูดดมเข้าไปหรือถูกต้องเนื้อเยื่ออ่อน เช่น นัยตา หรือบาดแผลถลอก ควรใส่ถุงมือหรือถ้าไม่มีควรรีบล้างมือทันทีหลังจากหยิบสัตว์ที่ดมสลบ

เซนต์ แล้วค่อยๆพ่นลงในน้ำที่มีสัตว์อยู่ เมื่อเห็นสัตว์หยุดเคลื่อนไหว จึงนำไปใส่ในสารละลายทำให้คงสภาพ

เมนทอล เหมาะสำหรับสัตว์พวกแมงกะพรุน ไบรโอซัว ไฮดรอยด์ และพยาธิใบไม้ พ่นลงในน้ำที่มีสัตว์เหล่านี้ตั้งไว้ทั้งคืน ถ้าจะให้ได้ผลดีควรผสมกับ คลอรัลไฮเดรต อัตราส่วนเมนทอล 45.0 กรัม ต่อ คลอรัลไฮเดรต 55.0 กรัม ผสมให้เข้ากันในโกร่งหยอดน้ำเล็กน้อย แล้วหยดลงในน้ำที่มีสัตว์ ตั้งค้างคืน คลอรัลไฮเดรตเพียงอย่างเดียว สามารถดมสลบพวกหนอนปล้อง หอย เพรียงหัวหอม ไบรโอซัวและเทอร์เบลลาเรียได้

อีเทอร์และแอลกอฮอล์ ใช้โดยการหยดลงในน้ำ หรือผ่านท่อที่ควบคุมการไหลได้จนความเข้มข้นของสารดมสลบมีประมาณ 10 เปอร์เซนต์ เหมาะสำหรับสัตว์น้ำทั่วไป และไส้เดือนดิน อาจใช้อีเทอร์ได้เช่นเดียวกับคลอโรฟอร์ม เพื่อใช้ดมสลบพวกแมลง

การทำให้ขาดออกซิเจน ต้มน้ำให้เดือดเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำให้หมด ใส่ขวดปิดฝาให้แน่นปล่อยไว้ให้เย็น จึงใส่สัตว์ลงไป เหมาะสำหรับหอยฝาเดี่ยว

ความเย็น นำสัตว์ที่ต้องการดมสลบ ใส่ในช่องแช่แข็งของตู้ทำความเย็น หรือใส่ในภาชนะ แล้วแช่ในน้ำแข็งผสมเกลือ หมั่นสังเกตุว่าสัตว์หดตัวนิ่ง นำออกมาพักไว้ในน้ำอุ่น แล้วจึงใส่สารละลายทำให้คงสภาพ

2.2 การผ่าตัดอวัยวะและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ

2.2.1 สัตว์มีกระดูกสันหลัง

นำสัตว์ที่ดมสลบแล้วมาหงายท้องขึ้น ผูกเท้าทั้งสี่ หรือใช้หมุดตรึงกับกระดานผ่าตัด ใช้คีมคีบ ดึงหนังและกล้ามเนื้อหน้าท้องขึ้น ตัดบริเวณสะดือ แล้วตัดขึ้นตามแนวยาวมาจนถึงทรวงอกระวังไม่ให้ถูกอวัยวะภายใน ใช้คีมคีบชนิดล๊อกหนีบหนังหน้าท้องให้แยกจากกัน ตัดอวัยวะภายในที่ต้องการออกมาทีละอวัยวะ แล้วตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร[1] ล้างตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อโดยจุ่ม 2-3 ครั้งในสาละลายสรีรน้ำเกลือ[2] แล้วใส่ทันทีลงในขวดสารละลายทำให้คงสภาพที่เตรียมไว้ ติดป้ายบอกชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่าง พร้อมทั้งวันที่ทำให้คงสภาพ การตัดเนื้อเยื่อของแต่ละอวัยวะ ควรทำด้วย

***1. ขึ้นอยู่กับขนาดของอวัยวะและวัตถุประสงค์ว่าต้องการตรวจส่วนใดมากน้อยเพียงใด ขนาดเปลี่ยนได้โดยต้องคำนึงถึงระเบียบวิธีการทำให้คงสภาพและขั้นตอนอื่นต่อไป

2. คือสารละลาย physiological saline เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ความรวดเร็ว และให้เสร็จครบทุกอวัยวะที่ต้องการก่อนที่สัตว์จะตาย ดังนั้นปอดและหัวใจควรทำทีหลัง อวัยวะที่มีขนาดเล็ก เช่นต่อมหมวกไต ใส่ลงในสารละลายทำให้คงสภาพโดยไม่ต้องทำให้เป็นชิ้นลูกบาศก์ สมองควรตัดหัวใส่ในสารละลายทำให้คงสภาพไว้ค้างคืน จึงนำมาตัดกะโหลกออก แล้วจึงตัดตัวอย่างส่วนต่างๆของสมองตามต้องการ

2.2.2 สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ถ้ามีขนาดเล็ก มักทำให้คงสภาพเพื่อการทำสไลด์ถาวรไว้ศึกษาและตรวจสอบทั้งตัว (wholemount) จึงไม่จำเป็นต้องผ่าตัด ถ้าลำตัวแบน เช่น ตืดหมู ตืดวัว พยาธิใบไม้ในตับ หลังจากสลบแล้ว นำมากดให้แบนบางด้วยสไลด์ รัดไว้ด้วยหนังยางก่อนนำไปใส่ในสารละลายทำให้คงสภาพ

สัตว์ขาปล้องขนาดเล็กเช่นไรน้ำ หรือสัตว์น้ำขนาดเล็กชนิดอื่น เช่น โรติเฟอร์ สามารถทำให้คงสภาพได้หลังจากการดมสลบ

สัตว์ขาปล้องที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมา เช่น แมลงสาบ นิยมศึกษาเฉพาะชิ้นส่วนที่สำคัญที่ช่วยในการจำแนกอนุกรมวิธาน เช่น รยางค์ปาก โดยใช้คีมคีบดึงรยางค์ออก นำมาต้มในสารละลาย 10 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อให้ส่วนที่แข็งเหนียวของโครงร่างแข็งละลายออกไป ก่อนที่จะนำมาทำให้คงสภาพ

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นที่มีขนาดใหญ่ อนุโลมใช้ระเบียบวิธีตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง

กิจกรรม 2.1

นำหนูขาวขนาดเล็กเพศผู้และเมียอย่างละสองตัว สองตัวแรก(ทั้งเพศผู้และเพศเมีย)ใส่ลงในขวดแก้วฝาปิดที่มีคลอโรฟอร์ม อีกสองตัวหลังใส่ลงในขวดฝาปิดที่มีอีเทอร์ บันทึกเวลาการดมสลบของสารดมสลบทั้งสองชนิด

กิจกรรม 2.2

นำแมลงสาบชนิดใดก็ได้ ใส่ลงในขวดฆ่าแมลงที่มีพอแทสเซียมไซยาไนด์ สังเกตุระยะเวลาที่แมลงสาบหยุดการเคลื่อนไหว

กิจกรรม 2.3

นำไส้เดือนดินมาใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป 300 มิลลิลิตร ห่อผลึกแมกนีเซียมซัลเฟตด้วยผ้าก๊อช ผูกห้อยให้ปริ่มน้ำพอดี ใช้แท่งแก้วกวนน้ำเป็นครั้งคราว สังเกตุว่าไส้เดือนดินหยุดเคลื่อนที่ในเวลาเท่าใด

กิจกรรม 2.4

นำหนูขาวที่ดมสลบแล้วในกิจกรรม 2.1 มาตรึงบนกระดานผ่าตัดเพศละหนึ่งตัว ผ่าตัดชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างของอวัยวะต่อไปนี้ ม้าม ตับ ไต ต่อมหมวกไต กระเพาะ-ปัสสาวะ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ อัณฑะ รังไข่ กระบังลม กล้ามเนื้อขาหน้าหรือขาหลัง หัวใจ และปอด ตามวิธีในข้อ 2.2.1

กิจกรรม 2.5

นำแมลงสาบจากกิจกรรม 2.2 มาวางบนถาดชี้ผึ้ง ตรึงให้ลอยู่กับที่ด้วยเข็มหมุด ใช้คีมคีบดึงรยางค์ปากทั้งหมด(ลาบรัม แมกซิลลา แมนดิเบิล)มาต้มในสารละลาย 10 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ บันทึกเวลาที่สีเหลืองน้ำตาลของโครงร่างแข็งหมดหรือเกือบหมด

2.3 ระเบียบวิธีทั่วไปที่ใช้เพื่อการตรวจสอบเซลล์และเนื้อเยื่อ

2.3.1 การเฉือน

การเฉือน(sectioning) เป็นระเบียบวิธีที่ใช้กันมากที่สุดและใช้ได้ทั่วไปสำหรับการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อใช้ศึกษาในมิญชวิทยา(histology) งานวิจัย ตลอดจนพยาธิวิทยา(pathology)เพื่อให้สามารถศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อได้ หลักการสำคัญคือ ต้องเฉือนเนื้อเยื่อตัวอย่างให้บางที่สุด ข้อดีของระเบียบวิธีการเฉือนคือ สามารถศึกษาเซลล์ชนิดต่างๆในเนื้อเยื่อตามสภาพที่มีอยู่จริง

เนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการศึกษานำมาฝังในสารที่ค้ำจุนให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่จะถูกเฉือนเป็นแผ่นบางได้ การเลือกใช้สารตัวกลางเพื่อการฝัง(embedding medium) ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและวิธีการย้อมสี ชี้ผึ้งพาราฟิน(paraffin wax)เป็นสารตัวกลางเพื่อการฝังที่นิยมใช้มากที่สุด และได้มีการพัฒนาเพื่อให้ได้ประโยชน์ในการใช้งานประจำและงานวิจัย สามารถตรวจสอบคุณสมบัติเด่นต่างๆได้จากบริษัทผู้ผลิต สารอื่นที่ใช้เป็นสารตัวกลางเพื่อการฝังคือ เซลลอยดิน(celloidin) ไนโตรเซลลูโลสความหนืดต่ำ(LVN) เอสเทอร์แวกซ์ เจลาติน(gelatin) เมตาคริเลท(metacrylate) และยางใส(resin)

2.3.2 สเมียร์

การสเมียร์(smear) ทำได้หลายวิธี เช่น ตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างแล้วกดผิวหน้าที่ตัดลงบนสไลด์ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและเซลล์บางส่วนจะติดอยู่บนสไลด์ หรือทำโดยใช้ห่วงลวดจุ่มตัวอย่างที่เป็นของเหลวแล้วละเลงลงบนสไลด์ หรือตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อมาให้บาง

กดให้แผ่กระจายด้วยสไลด์สองแผ่น หรือการทำแผ่นบางของเม็ดเลือด เมื่อเตรียมได้แล้ว นำมาทำให้คงสภาพ ย้อมสี แล้วเมาท์เป็นสไลด์ถาวร วิธีนี้สามารถศึกษารายละเอียดของเซลล์ได้ดีกว่าดูขณะยังมีชีวิต ข้อเสียคือ ไม่สามารถประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่อทุกชนิด เหมาะสำหรับประเภทเลือดและน้ำเหลือง

2.3.3 การฉีก

การฉีก (dissociation) คือการนำเนื้อเยื่อมาวางบนกระจกนาฬิกา หยดนอร์แมลเซไลน์ลงไป ฉีกเนื้อเยื่อด้วยเข็ม นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์(อาจย้ายเนื้อเยื่อไปวางบนสไลด์ก่อนก็ได้) อาจหยดสีลงไปเพื่อช่วยให้เห็นเซลล์ และเซลล์ออร์-แกเนลล์ง่ายขึ้น ข้อดีคือ สามารถเห็นลักษณะของเซลล์ในสภาพที่มีชีวิตอยู่ ข้อเสียคือ เซลล์ถูกแยกออกมาจากสภาพแวดล้อมเดิม ทำให้ลักษณะทางกายวิภาคถูกเปลี่ยนไปเพราะการฉีก

2.3.4 การเผาจุลภาค

การเผาจุลภาค(microincineration) ใช้ในกรณีที่ต้องการทราบว่ามีแร่ธาตุชนิดใด อยู่ในที่แห่งใดของเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อมาทำให้คงสภาพด้วยแอลกอฮอล์ แล้วเฉือนให้บางเป็นแผ่นทีละสองแผ่น แผ่นหนึ่งนำไปเผาในเตาเผาพิเศษเรียกว่า muffle furnace อีกแผ่นหนึ่งนำไปย้อมสีตามระเบียบวิธีปกติที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ แล้วนำเถ้าของแผ่นที่ถูกเผามาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทัศน์แสงโพลาไรส์แล้วไปเปรียบเทียบกับแผ่นที่ย้อมสี ทำให้ทราบว่ามีแร่ธาตุอยู่ที่ส่วนใดของเนื้อเยื่อ บางครั้งอาจสามารถบอกชนิดของแร่ธาตุที่พบได้

การเผาจุลภาคเป็นเทคนิคที่ต้องการความชำนาญสูง จึงจะสามารถอ่านผลการปฏิบัติได้ ประโยชน์ใช้สอยอยู่ในวงจำกัด จึงไม่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2.3.5 การย้อมสีขณะมีชีวิต

การย้อมสีขณะมีชีวิต (vital staining) ใช้ในกรณีที่ต้องการศึกษาแกรนุลบางชนิดเมื่อเซลล์ยังมีชีวิตอยู่ โดยมีหลักการที่ว่าเซลล์บางชนิดสามารถกินอนุภาคเล็กของสีเข้าไปได้ นำเซลล์มาฉีกตามระเบียบวิธีข้อ 2.3.3 แล้วย้อมด้วยสารละลายสารย้อมสีอย่างง่าย (supravitam staining) ระเบียบวิธีนี้เหมาะสำหรับย้อมสีเรทิคิวโลไซท์ (reticulocyte)เพื่อใช้ศึกษาในโลหิตวิทยา (haematology) อีกระเบียบวิธีหนึ่งคือ ฉีดสีย้อมเข้าไปในเนื้อเยื่อ (intra vitam staining) การย้อมสีขณะมีชีวิตเหมาะสำหรับการสาธิตปลายประสาทในเนื้อเยื่อ และอาจใช้สาธิตไมโทคอนเดรีย และนิวทรัลเรดแวคิวโอลได้

2.3.6 ภาพรังสีในตัว

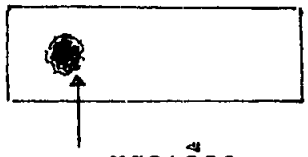
ภาพรังสีในตัว (autoradiography) ทำโดยฉีดสารกัมมันตภาพรังสีเข้าไปในอวัยวะ ทำให้คงสภาพ นำมาเฉือน แล้วนำแผ่นบางที่เฉือนได้มาแปะติดกับแผ่นฟิล์มโฟโต-กราฟิกอิมัลชัน (photographic emulsion) ซึ่งเมื่อนำฟิล์มไปเดเวลอปในสารที่ทำให้เกิดภาพจะปรากฏสีดำขึ้นตามตำแหน่งที่มีสารกัมมันตภาพรังสี แผ่นบางที่เฉือนได้อาจนำมาย้อมสีตามระเบียบวิธีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ภาพรังสีในตัวสามารถสาธิตตำแหน่งและความสัมพันธ์ของสารกัมมันตภาพรังสีในเซลล์ได้ ซึ่งสารในเซลล์ที่จับกับสารกัมมันต-ภาพรังสีได้ดี ได้แก่ กรดนิวคลีอิกและโปรตีน จึงเหมาะสำหรับใช้เพื่อการศึกษาโครโมโซม

กิจกรรม 2.6

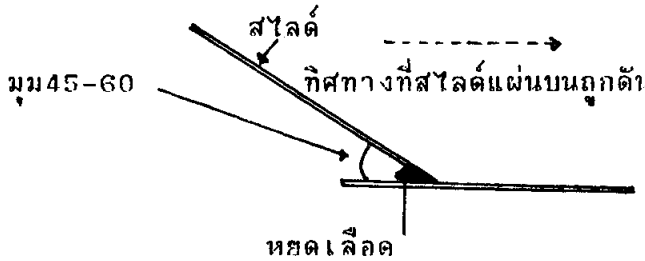
เตรียมสไลด์ไว้สองแผ่น ใช้สำลีชุบ 75 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ เช็ดปลายนิ้วและเข็มหมุด แทงเข็มหมุดลงที่ปลายนิ้ว บีบเลือดให้หยดลงบนปลายแผ่นสไลด์ นำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาแตะที่ขอบหยดเลือดโดยใช้ส่วนกว้างของแผ่นสไลด์แตะและทำมุม 45-60 องศากับสไลด์แผ่นที่มีหยดเลือด โดยมีหยดเลือดอยู่ในมุมแหลม ดันสไลด์แผ่นบนที่นำมาแตะหยดเลือดไปในทิศทางตรงข้ามกับหยดเลือดจนสุดปลายอีกด้านหนึ่งของสไลด์แผ่นล่าง จงสังเกตุการกระจายของเม็ดเลือดบนแผ่นสไลด์(รูป 2-1) ตั้งไว้ให้แห้งเพื่อทำให้คงสภาพในขั้นต่อไป

รูป 2-1 การสเมียร์เลือดบนแผ่นสไลด์ ก.หยดเลือดบนแผ่นสไลด์, ข.นำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งทำมุม 45-60 องศากับแผ่นแรก ดันสไลด์ไปในทิศทางตรงกันข้ามกับหยดเลือด ค.แผ่นสไลด์ที่ได้รับการสเมียร์แล้ว

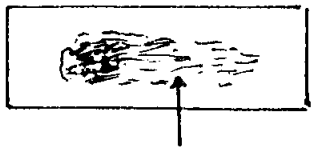
ก.ภาพมองจากด้านบน



ข.ภาพมองจากด้านข้าง



ค.ภาพมองจากด้านบน



สรุป

การเตรียมการเพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดของสัตว์ ต้องมีการวางแผนไว้ล่วงหน้ากล่าวคือ ต้องทราบว่าจะศึกษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อใดของสัตว์ ระเบียบวิธีใดจึงจะเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์นั้น เมื่อทราบแล้วจึงควรนำสัตว์มาดมสลบเพื่อมิให้ตายหรือเจ็บปวดก่อนผ่าตัด การผ่าตัดเก็บชิ้นส่วนของอวัยวะและเนื้อเยื่อ ต้องทำด้วยความรวดเร็ว เพื่อป้องกันการตายและเน่าเสีย

แบบฝึกหัดที่ 2

1. จงเปรียบเทียบการดมสลบสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง
   (ตอบ: ดูข้อ 2.1)
2. การผ่าตัดเพื่อเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างหนูขาวมีขั้นตอนและข้อพึงระวังอย่างไร
   (ตอบ: ดูข้อ 2.2.1)
3. ระเบียบวิธีทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจเซลล์และเนื้อเยื่อมีกี่ชนิด ชักตัวอย่างชนิดที่นิยมใช้ และประโยชน์ใช้สอยมา 2 ชนิด
   (ตอบ: ดูข้อ 2.3)
4. สารดมสลบที่นิยมใช้ดมสลบสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการคือ.....และ.....สารทั้งสองชนิดใช้ได้ทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและพวก.....
   (ตอบ: ดูข้อ 2.1.1 และ 2.1.2)
5. เมื่อสัตว์ถูกดมสลบฟื้นขึ้นมาควรใช้.....ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ดมสลบครั้งแรก ในกรณีที่ดมสลบอีกครั้งต้องระมัดระวัง.....ในการดมสลบมิฉะนั้นสัตว์ทดลองอาจถึงตายได้
   (ตอบ: ดูข้อ 2.1.1)
6. การผ่าตัดอวัยวะและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างควรเริ่มผ่าที่.....และจบลงที่.....เป็นอวัยวะสุดท้าย การเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างใส่ลงในสารละลายทำให้คงสภาพต้อง.....ที่ขวดด้วย
   (ตอบ: ดูข้อ 2.2.1)
7. สารที่มีคุณสมบัติดมสลบและฆ่า ซึ่งเหมาะสำหรับสัตว์พวกแมลงเท่านั้นคือสารใด

   1. แมกนีเซียมคลอไรด์
   2. คลอรัลไฮเดรต
   3. ไซยาไนด์
   4. คลอโรฟอร์ม

8. ในกรณีที่ไม่มีสารดมสลบในห้องปฏิบัติการ ถ้าต้องการดมสลบพยาธิใบไม้ในตับ ควรเลือกใช้วิธีใด

1. ใส่ในน้ำไม่มีออกซิเจน
2. ใส่ในตู้เย็น
3. แช่ในน้ำแข็งผสมเกลือ
4. ถูกทุกข้อ

9. ข้อพึงระวังในขณะผ่าตัดเพื่อเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างคืออะไร

1. ระวังมิให้สัตว์ตายก่อนผ่าตัดเสร็จสิ้น
2. เนื้อเยื่อควรทำให้คงสภาพทันที
3. ระวังมิให้สัตว์ฟื้นขณะผ่าตัด
4. ถูกทุกข้อ

10. ระเบียบวิธีที่ประโยชน์ใช้สอยน้อยที่สุดและมักไม่ได้ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปคือ

1. การสเมียร์
2. การฉีก
3. การเผาจุลภาค
4. ภาพรังสีในตัว

(คำตอบ: ข้อ 7 ตอบ 3, ข้อ 8 ตอบ 4, ข้อ 9 ตอบ 4, ข้อ 10 ตอบ 3)