บทที่ 5
การดึงน้ำออกและระเบียบวิธีของพาราฟิน

เค้าโครงเรื่อง

5.1 การดึงน้ำออก

5.2 การทำให้ใสและสารเคมีที่ใช้เพื่อการทำให้ใส

- 5.2.1 ไซลีน
- 5.2.2 โทลูอีน
- 5.2.3 เบนซีน
- 5.2.4 ซีดาร์วู้ดออยด์
- 5.2.5 คลอโรฟอร์ม
- 5.2.6 คาร์บอนเททราคลอไรด์

5.3 การชิมชาบ

5.4 การฝังเนื้อเยื่อในสารตัวกลาง

- 5.4.1 สารตัวกลาง
  - 5.4.1.1 ชี้ผึ้งพาราฟิน
  - 5.4.1.2 พาราพลาสท์
  - 5.4.1.3 ไบโอลอยด์
  - 5.4.1.4 เจลาติน
  - 5.4.1.5 ชี้ผึ้งละลายน้ำได้
- 5.4.2 การฝัง
  - 5.4.2.1 โอเรียนเทชัน
  - 5.4.2.2 พิมพ์ที่ใช้สำหรับการฝังเนื้อเยื่อ

สาระสำคัญ

1. การดึงน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อตัวอย่าง จำเป็นต้องทำก่อนการฝัง เพราะสารที่ใช้เพื่อการฝังสำหรับก้อนเหลี่ยมของเนื้อเยื่อตัวอย่างไม่สามารถเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำได้ จึงต้องดึงน้ำออกให้หมด สำหรับงานประจำใช้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำจนถึงความเข้มข้นสัมบูรณ์
2. การทำให้ใส หมายถึงการทำให้สารที่สามารถเข้ากันได้เป็นเนื้อเดียวกันกับสารตัว

กลางเพื่อการฝังเข้ามาแทนที่ สารที่ทำหน้าที่ทำให้ใส โดยทั่วไปนิยมใช้ไซลีน

3. การชึมซาบเป็นขั้นตอนที่ให้สารตัวกลางเพื่อการฝังค่อย ๆ ชึมซาบเข้ามาแทนที่สารที่ทำให้ใสจนแทนที่ได้หมดหรือเกือบหมด ถ้าใช้ไซลีนเพื่อการทำให้ใสก็นิยมใช้ขี้ผึ้งพาราฟินมาเป็นสารชึมซาบ
4. สารตัวกลางที่ใช้ฝังตัวอย่างต้องเป็นชนิดเดียวกันกับสารที่ใช้เพื่อการชึมซาบเพื่อความเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อขี้ผึ้งพาราฟินสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้อย่างทั่วถึงแล้ว เป็นการช่วยให้ขั้นตอนต่อไปคือการเฉือนแผ่นบางเนื้อเยื่อง่ายขึ้นและได้ผลดีขึ้น

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างได้
2. นักศึกษาสามารถปฏิบัติตามขั้นตอนการทำให้ใส การชึมซาบ ตลอดจนการฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างลงในขี้ผึ้งพาราฟินได้
3. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 80 เปอร์เซนต์ภายในหนึ่งสัปดาห์

เนื้อเยื่อตัวอย่างที่ผ่านการทำให้คงสภาพ หรือผ่านการดึงแคลเซียมออกแล้วส่วนใหญ่จะอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งไม่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกับสารตัวกลางเพื่อการฝัง (media for embedding) จึงจำเป็นต้องอาศัยสารเคมีเป็นคู่ที่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันมาเปลี่ยนให้แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่ออย่างเป็นขั้นตอน กล่าวคือ น้ำรวมเป็นเนื้อเดียวกับแอลกอฮอล์ได้ จึงทำการดึงน้ำออก (dehydration) แล้วแทนที่ด้วยแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์รวมเป็นเนื้อเดียวกับไซลีนได้ จึงดึงแอลกอฮอล์ออก แล้วแทนที่ด้วยไซลีน ซึ่งจะทำให้ใส (clearing) และไซลีนรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับขี้ผึ้งพาราฟิน (paraffin wax) ได้ จึงดึงไซลีนออก แล้วให้ขี้ผึ้งพาราฟินชึมซาบ (impregnate หรือ infiltrate) เข้าไปแทนที่ไซลีน เนื้อเยื่อตัวอย่างก็พร้อมที่จะถูกฝังอยู่ในขี้ผึ้งพาราฟิน ซึ่งเป็นตัวกลางเพื่อการฝังชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ประจำในห้องปฏิบัติการ

5.1 การดึงน้ำออก

การดึงน้ำออกหมายถึง การขจัดน้ำออกไปให้หมดจากเซลล์และเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมีหรือโดยวิธี ฟรีซ-ดรายอิง สารที่นิยมใช้ในงานประจำมีอยู่ 3 ชนิดคือ แอลกอฮอล์

อะซีโตน และไดออกเซน (dioxane หรือ diethylene dioxide) สารชนิดหลังนี้สามารถรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำและชี้ผึ้งพาราฟินได้จึงทำหน้าที่เป็นสารทำให้ใสพร้อมกันไปด้วย และไม่ทำให้เนื้อเยื่อหดตัวมากนัก แต่มีข้อเสียคือ ควันที่ระเหยออกมาเป็นพิษมาก และถ้าใช้ไดออกเซน เมื่อนำเนื้อเยื่อมาเฉือนเป็นแผ่นบางจะไม่ติดต่อกันเป็นแผ่นยาว

สารเคมีที่มีคุณสมบัติดูดน้ำได้เช่น แคลเซียมออกไซด์ หรือแอนไฮดรัสคอปเปอร์ซัลเฟต ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ แต่จะใช้กับสารที่ใช้ดึงน้ำออก ซึ่งเป็นการช่วยเร่งการดึงน้ำออกให้เร็วขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น แอนไฮดรัสคอปเปอร์ซัลเฟตยังใช้เป็นอินดิเคเตอร์ว่า สารที่ใช้ดูดน้ำนั้นมีน้ำถึงจุดอิ่มตัวแล้วหรือไม่ ถ้ามี คอปเปอร์ซัลเฟตจะเปลี่ยนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินสด

วิธีดึงน้ำออกที่ใช้ในงานประจำ ทำโดยนำเนื้อเยื่อมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก คือจาก 70 เปอร์เซนต์ขึ้นไปจนถึงสัมบูรณ์ (100 เปอร์เซนต์) เมื่อน้ำถูกดึงออกจนหมด ควรรีบดำเนินขั้นตอนต่อไปทันทีเพื่อป้องกันการหดและแข็งของเนื้อเยื่อ

สารที่ใช้เพื่อการดึงน้ำออก มีดังนี้

5.1.1 **อะซีโตน** เป็นสารที่ดึงน้ำออกได้เร็ว

5.1.2 **บิวทิล แอลกอฮอล์ (butyl alcohol)** ดึงน้ำออกมาได้ช้า แต่รวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกับพาราฟินได้ดีจึงไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนทำให้ใส

5.1.3 **ไดออกเซน** ไม่ใช้ในงานประจำ รวมเป็นเนื้อเดียวกับพาราฟินได้ดี จึงไม่ต้องมีการทำให้ใส แต่มีข้อเสียที่ควันมีพิษมาก

5.1.4 **เอทิลแอลกอฮอล์** ถือว่าดีที่สุดเพื่อการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อสำหรับงานประจำ

5.1.5 **เอทิลีนไกลคอล โมโนเอทิลอีเทอร์** ดึงน้ำออกได้เร็วและไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

5.1.6 **ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (iso-propyl alcohol)** ใช้แทนเอทานอลได้ แต่ไม่สามารถใช้กับวิธีเซลลอยดิน (celloidin technique)

5.1.7 **เตตราไฮโดรฟิวแรน (tetrahydrofuran)** ดึงน้ำออกได้เร็วโดยไม่ทำให้เนื้อเยื่อหด

กิจกรรม 5.1

นำเนื้อเยื่อตัวอย่างทุกชนิดที่ทำให้คงสภาพสมบูรณ์แล้วในกิจกรรม 3.1, 3.2, 3.3 และ 4.1 มาทำการดึงน้ำออก โดยครั้งแรกใส่ในขวดที่มี 70 เปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์

แล้วย้ายไปใส่ขวดที่มี 85 เปอร์เซนต์ 95 เปอร์เซนต์ และ 100 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ การดึงน้ำออกด้วยการแช่แอลกอฮอล์นี้ แต่ละขั้นตอนควรใช้เวลาประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ต้องดำเนินการเมื่อมีความพร้อมที่จะทำกิจกรรมที่ 5.2, 5.3 และ 5.4 ภายในวันเดียวกัน

5.2 การทำให้ใสและสารเคมีที่ใช้เพื่อการทำให้ใส

การทำให้ใส (clearing) มิได้มีความหมายตรงตามชื่อที่ตั้งไว้ แต่หมายถึงการแทนที่สารที่ทำหน้าที่ดึงน้ำออกด้วยสารที่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้กับสารที่ใช้เพื่อการฝังเนื้อเยื่อ สารที่ทำให้ใสบางชนิดมีคุณสมบัติทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างใสได้จริงตามชื่อ เช่น ไซลีน (xylene) อย่างไรก็ตามนักปฏิบัติการสามารถเลือกใช้สารได้หลายชนิดตามความเหมาะสมดังต่อไปนี้

5.2.1 ไซลีน

ไซลีนหรือไซลอล (xylol) สามารถทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตร ได้ภายในเวลา 1/20 - 1 ชั่วโมง

ข้อดี

ก. สามารถเข้าแทนที่แอลกอฮอล์ได้รวดเร็ว อาจเร็วที่สุดจึงใช้สำหรับงานประจำ

ข. ไม่ละลายเซลลอยดิน (celloidin) จึงสามารถใช้วิธีเซลลอยดินได้

ค. ไม่สกัดสีแอนิลีน (aniline dye) จึงสามารถใช้วิธีย้อมแอนิลีนได้

ง. สามารถดึงออกจากขี้ผึ้ง (wax) ได้ง่าย

ข้อเสีย

ก. ใช้ทำให้ใสกับแอลกอฮอล์สัมบูรณ์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ถ้าไม่สัมบูรณ์จะขุ่นใช้ไม่ได้

ข. ทำให้เนื้อเยื่อแข็งและกรอบถ้าใช้เวลาทำให้ใสนานกว่ากำหนด

ค. มีแนวโน้มเป็นกรดได้ง่ายถ้าใช้ภาชนะที่มีอากาศอยู่ในขวด จึงควรต้องใส่จนเกือบเต็มขวดแล้วปิดฝาให้แน่น

5.2.2 โทลูอีน

โทลูอีน (toluene) ทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตรได้ภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง

ข้อดี

ก. ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งหรือเปราะมากเท่ากับไซลีน อาจแช่ไว้ได้นานถึง 12 ชั่วโมงโดยไม่เสียหาย

ข. สามารถเข้าแทนที่ได้เร็ว จึงใช้ในงานประจำและงานเร่งด่วนได้

ข้อเสีย

ก. ใช้ทำให้ใสกับแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น

ข. มีแนวโน้มเป็นกรดในสภาวะเดียวกันกับที่เกิดขึ้นแก่ไซลีน

ค. ถ้าสูดควันนานหรือบ่อย อาจทำให้เป็นอันตรายต่อระบบหายใจ

5.2.3 เบนซีน

เบนซีน (benzene) ทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตรได้ภายในเวลา 1-3 ชั่วโมง

ข้อดี

ก. สามารถเข้าแทนที่ได้ปานกลาง (ไม่เร็วเท่าสองชนิดแรก)

ข. ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งหรือเปราะเท่าสองชนิดแรก

ค. เนื้อเยื่อหดตัวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ง. สามารถดึงออกจากชิ้นผึ้งได้ง่าย

ข้อเสีย

มีไอระเหยมาก

5.2.4 ซีดาร์วู้ดออยล์

ซีดาร์วู้ดออยล์ (cedarwood oil) คือน้ำมันสนชนิดหนึ่งสามารถทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตร ได้ภายในเวลา 2-3 วัน

ข้อดี

ก. สามารถทำใสกับ 95 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ได้

ข. รักษาสภาพของเนื้อเยื่อได้ดี ไม่ทำให้หด แข็ง หรือเปราะ จึงแช่ไว้ในน้ำมันสนได้ไม่จำกัดเวลา

ค. ไม่สกัดสีแอนิลีน

ง. สามารถทำให้ใสเนื้อเยื่อเฉือนบางที่ฝังในเซลลอยดินได้ในเวลา 5-6 วัน

ข้อเสีย

ก. ดึงออกจากชิ้นผึ้งยาก

ข. การทำให้ใสเกิดขึ้นช้า ไม่เหมาะสำหรับงานประจำ

ค. ราคาแพงจึงไม่เหมาะสำหรับงานประจำ

ข้อสังเกต

ก. ถ้าน้ำมันสนขุ่นเนื่องจากเก็บไว้นาน ทำให้ใสโดยการกรอง

ข. ถ้านำเนื้อเยื่อที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยสารแอซิติก-แอลกอฮอล์ มาทำให้ใสด้วยน้ำมัน

สนอาจเกิดผลึกขึ้นได้ ถึงแม้ว่าจะเพียงเล็กน้อยแต่มีผลกระทบต่อตัวอย่างทั้งหมด ผลึกที่เกิดขึ้นมีจุดหลอมเหลวประมาณ 33 องศาเซลเซียส วิธีแก้ไขคือนำน้ำมันสนไปให้ความร้อนที่ 200 องศาเซลเซียส

ค. เนื้อเยื่อจะลอยอยู่บนน้ำมันสน เมื่อการทำให้ใสดำเนินไปเนื้อเยื่อจะค่อย ๆ จมลง เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้งจึงควรเทแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ลงบนผิวบนของขวดที่ใส่น้ำมันสนและให้ท่วมเนื้อเยื่อ เมื่อเนื้อเยื่อจมลงไปแล้วจึงเปลี่ยนมาใส่ในขวดน้ำมันสนบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

5.2.5 คลอโรฟอร์ม

คลอโรฟอร์มสามารถทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตรได้ภายในเวลา 12-24 ชั่วโมง

ข้อดี

ก. ไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งหรือเปราะเหมือนไซลีนหรือโทลูอีน จึงเหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่ค่อนข้างเหนียวเช่น หนัง ไฟพรอยด์ (fibroid) และเนื้อเยื่อที่ถูกดึงแคลเซียมออกแล้ว

ข. เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อตัวอย่างชิ้นใหญ่

ข้อเสีย

ก. ตัดสินได้ยากว่าเนื้อเยื่อถึงขั้นใสแล้วหรือไม่

ข. เนื้อเยื่อมักลอยอยู่บนคลอโรฟอร์ม จึงต้องทำให้จมด้วยวิธีใดวิธีหนึ่ง ส่วนใหญ่ จะหุ้มด้วยผ้าก๊อซ

ค. ดึงออกจากขี้ผึ้งยาก จึงทำให้เนื้อเยื่อที่เฉือนเป็นแผ่นบางแล้วเสียหาย

5.2.6 คาร์บอนเตตราคลอไรด์

คาร์บอนเตตราคลอไรด์ (carbon tetrachloride) สามารถทำให้ใสเนื้อเยื่อก้อนสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 เซนติเมตร ได้ภายในเวลา 8-15 ชั่วโมง

ข้อดี

เช่นเดียวกับคลอโรฟอร์มแต่ราคาถูกกว่า

ข้อเสีย

ก. เป็นพิษมากในห้องที่อากาศถ่ายเทไม่สะดวก

ข. เช่นเดียวกับข้อเสียของคลอโรฟอร์ม

กิจกรรม 5.2.1

นำเนื้อเยื่อทุกชนิด (ยกเว้น หนังและกระดูก) ที่ผ่านการดึงน้ำออกแล้วในกิจกรรม 5.1 มาใส่ในขวดที่มีไซลีน ถ้าเห็นฟองรอบ ๆ เนื้อเยื่อและไซลีนรอบเนื้อเยื่อขึ้นบนขุ่น ให้รีบ

ดึงเนื้อเยื่อชิ้นนั้นกลับคืนไปดึงน้ำออกให้หมดในขวดที่มีแอลกอฮอล์สัมบูรณ์แล้วจึงนำกลับคืนมาทำให้ใสใหม่อีกครั้งหนึ่ง การทำให้ใสควรนั่งดูเนื้อเยื่อตัวอย่างแต่ละชิ้นแล้วหมุนขวดที่ใส่เนื้อเยื่อเป็นครั้งคราว ถ้าชิ้นใดใสให้รีบนำออกทันที เพื่อทำกิจกรรม 5.3 ต่อไป โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีจึงจะใส

กิจกรรม 5.2.2

นำเนื้อเยื่อหนังและกระดูกที่ผ่านการดึงน้ำออกหมดแล้วในกิจกรรมที่ 5.1 ใส่ในขวดที่มีคลอโรฟอร์มเพื่อการทำให้ใส ควรแช่ไว้ 24 ชั่วโมง จึงนำไปทำกิจกรรมที่ 5.3

5.3 การชึมซาบ

การชึมซาบเป็นการทำให้เนื้อเยื่ออิ่มตัวด้วยสารตัวกลางที่จะใช้เพื่อการฝัง สำหรับระเบียบวิธีการเฉือนพาราฟิน การชึมซาบหมายถึงการดึงสารทำให้ใสออกให้หมดซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ไซลีนหรือโทลูอีน แล้วค่อย ๆ แทนที่ด้วยพาราฟิน ซึ่งในทางการค้าอาจเติมสารอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพช่วยในการเฉือนเข้าไปได้ด้วย

วิธีการทำให้ชึมซาบคือ นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการทำให้ใสแล้วมาใส่ในขวดที่มีสารผสมระหว่างสารทำให้ใสและสารตัวกลางเพื่อการฝังอย่างละเท่า ๆ กัน ต่อไป เปลี่ยนสัดส่วนจาก 50:50 เป็น 20:80[1] และ 0:100 (มีสารตัวกลางอย่างเดียว) ตามลำดับ ถ้าใช้พาราฟินต้องทำในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับข้อแนะนำที่บ่งมากับชนิดของพาราฟิน[2] เวลาที่ใช้ในการทำให้ชึมซาบแต่ละขั้นตอนควรไม่น้อยกว่า 30 นาที

กิจกรรม 5.3.1

นำเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้ในกิจกรรม 5.2.1 มาใส่ในส่วนผสมระหว่างไซลีนและพาราฟิน สัดส่วน 50:50 ใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 30 นาที นำออกมาใส่ในพาราฟินอย่างเดียว สองครั้ง ๆ ละ 30 นาที (ต้องใส่ในตู้อบ) เนื้อเยื่อที่ได้รับการทำให้ชึมซาบในพาราฟินครั้งที่สองนี้พร้อมสำหรับการฝังในกิจกรรม 5.4

***1. สัดส่วนของสารทำให้ใส 20 : สารตัวกลางเพื่อการฝัง 80 อาจไม่ใช้แต่ทดแทนด้วยสารตัวกลางเพื่อการฝัง 100 เปอร์เซนต์ได้

2. ขี้ผึ้งพาราฟินมีจุดหลอมเหลวต่างกันเล็กน้อย ดูรายละเอียดในข้อ 5.4.1

กิจกรรม 5.3.2

นำหนังและกระดูกที่ผ่านการทำให้ใสในกิจกรรม 5.2.2 มาใส่ในส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและพาราฟิน อัตราส่วน 50:50 ตามด้วยพาราฟินอย่างเดียวสองครั้งทำเช่นเดียวกับกิจกรรม 5.3.1

5.4 การฝังเนื้อเยื่อในสารตัวกลาง

เมื่อเนื้อเยื่อผ่านการชิมชาบด้วยสารตัวกลางแล้วจึงนำมาฝังในสารตัวกลางต่อไป สารตัวกลางมีให้เลือกใช้หลายชนิดตามความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อ งานประจำหรืองานเร่งด่วน ที่ใช้กันทั่วไปมีดังนี้

5.4.1 สารตัวกลาง

5.4.1.1 ขี้ผึ้งพาราฟิน ในทางการค้ามีจุดหลอมเหลวจาก 45 ถึง 60 องศาเซลเซียส ถ้าจุดหลอมเหลวต่ำจะอ่อนกว่าจุดหลอมเหลวสูง นักปฏิบัติการในเขตภูมิอากาศอบอุ่นนิยมเลือกใช้ที่มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส หรืออาจผสมระหว่างสองชนิดจุดหลอมเหลว 55 องศาเซลเซียสกับชนิดจุดหลอมเหลว 60 องศาเซลเซียสอย่างละเท่า ๆ กัน ในประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนจึงควรใช้พาราฟินชนิดจุดหลอมเหลวสูงและควรแน่ใจว่าของที่ใช้ในขั้นตอนชิมชาบและขั้นตอนการฝังมีคุณภาพดีไม่มีน้ำมัน ฝุ่น หยดน้ำเล็ก ๆ หรือวัสดุแปลกปลอมอื่น ควรกรองพาราฟินก่อนใช้ พาราฟินเหลวกรองได้โดยใช้กระดาษกรองธรรมดาในตู้อบที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย (ประมาณ 2 องศาเซลเซียส)

ในห้องปฏิบัติการธรรมดา นำเนื้อเยื่อมาทำให้ชิมชาบโดยไม่ใช้เครื่องมือ แต่ในห้องปฏิบัติการทันสมัยใช้เครื่องมืออัตโนมัติตลอด เริ่มตั้งแต่การชิมชาบถึงขั้นการฝัง ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดคือ ชนิดอัตโนมัติธรรมดา และชนิดสูญญากาศ

ในระหว่างการฝังโดยวิธีธรรมดา ควรเปลี่ยนขี้ผึ้งพาราฟินอย่างน้อย 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่ใช้เพื่อการทำให้ใสหมดไปจากเนื้อเยื่อ แล้วปล่อยให้เนื้อเยื่อแช่อยู่ในพาราฟินครั้งที่ 4 ประมาณ 3 ชั่วโมงจึงนำไปทำการฝัง

5.4.1.2 พาราพลาสท์ (paraplast) เป็นของผสมระหว่างพาราฟินบริสุทธิ์และพลาสติกพอลีเมอร์หลายชนิด ซึ่งให้ผลดีในด้านความยืดหยุ่นของสารพลาสติก คุณสมบัติทั่วไปคล้ายขี้ผึ้งพาราฟิน นักปฏิบัติการทั่วไปมักใช้ขี้ผึ้งพาราฟินผสมกับพาราพลาสท์ ทำให้ได้แผ่นบางจากการเฉือนติดต่อกันโดยความหนาแต่ละแผ่นประมาณ 4 ไมครอน ผลของการเฉือน

เป็นแผ่นบางของพาราพลาสท์จะดีเท่ากับวิธีการฝังสองครั้ง (double embedding)[1] ไม่จำเป็นต้องใช้ระเบียบวิธีพิเศษ เพราะพาราพลาสท์ละลายได้ดีในสารทำให้ใส การทำให้ชิมชาบและการฝังทำได้เช่นเดียวกับพาราฟิน

5.4.1.3 ไบโอลอยด์ (bioloid) เหมาะสำหรับการฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างที่มีผนังบางและรูปทรงกลมโดยเฉพาะลูกตา ไบโอลอยด์ยืดหยุ่นดีจึงทำให้รูปทรงเดิมของเนื้อเยื่อกลับคืนมาได้หลังจากการเฉือนเป็นแผ่นบางแล้ว

5.4.1.4 เจลาติน (gelatin) เหมาะสำหรับเนื้อเยื่อที่แตกหักง่ายหรือเนื้อเยื่อที่แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้ว เจลาตินละลายน้ำได้จึงไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการดึงน้ำออกและการทำให้ใส เจลาตินมีจุดหลอมเหลวต่ำ เนื้อเยื่อที่ฝังในเจลาตินจึงไม่เสียหายจากการแข็งเพราะความร้อน การชิมชาบทำได้ที่ 37 องศาเซลเซียส ดังนี้

ก. ล้างสารที่ทำให้คงสภาพออกจากเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยใช้น้ำไหล ถ้าทำให้คงสภาพด้วย 10 เปอร์เซนต์ฟอร์มัลดีไฮด์ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงขึ้นไป

ข. แช่เนื้อเยื่อตัวอย่างใน 10 เปอร์เซนต์เจลาตินที่มี 1 เปอร์เซนต์ ฟีนอล ใช้เวลา 24 ชั่วโมง

ค. เปลี่ยนเนื้อเยื่อมาแช่ใน 20 เปอร์เซนต์เจลาตินที่มี 1 เปอร์เซนต์ฟีนอล เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ง. ฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างใน 20 เปอร์เซนต์เจลาตินที่มี 1 เปอร์เซนต์ ฟีนอล ทำให้เย็นโดยใส่ในห้องเย็นหรือตู้ทำความเย็น

จ. ตัดแต่งก้อนเจลาตินตามขนาดที่ต้องการ

ฉ. ทำให้ก้อนเจลาตินแข็งโดยแช่ไว้ใน 10 เปอร์เซนต์ฟอร์มัลดีไฮด์ 12-24 ชั่วโมง

การเติม 1 เปอร์เซนต์ฟีนอลลงไปในเจลาตินก็เพื่อป้องกันไม่ให้ราขึ้น เนื้อเยื่อที่ใช้วิธีการฝังในเจลาตินควรมีขนาดไม่เกิน 2-3 มิลลิเมตรเนื่องจากเจลาตินยับยั้งการแช่แข็ง

5.4.1.5 ขี้ผึ้งละลายน้ำได้ (water soluble wax) ทางการค้ามีหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นพวกพอลีเอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol) การเลือกใช้ถือน้ำ

***1. double embedding คือการฝังในตัวกลางเพื่อการฝังสองชนิดเพื่อการเป็นการง่ายต่อการเฉือนเป็นแผ่นบางสำหรับเนื้อเยื่อที่มีความเปราะบางหรือแตกหักง่าย วิธีการทำศึกษาได้จากตำราทางไมโครเทคนิคทั่วไป

หนักโมเลกุลเป็นหลัก ที่ใช้กันทั่วไปคือ 1,000 และ 1,500 ซึ่งมีจุดหลอมเหลว 38-42 และ 45-56 องศาเซลเซียสตามลำดับ จุดหลอมเหลวไม่แน่นอนนัก ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์แต่ละรุ่นที่ผลิตออกมาใช้

ข้อดีของพอลีเอทีลีนไกลคอลเมื่อเทียบกับพาราฟินคือ

ก. ทำให้เนื้อเยื่อหดตัวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการดึงน้ำออกและการทำให้ใส

ข. เนื้อเยื่อไม่เปราะและไม่ต้องใช้ความร้อนสูง

ค. เหมาะสำหรับงานเพื่อการสาธิตเอนไซม์ ซึ่งจะเสียหรือเสื่อมสภาพถ้าใช้วิธีการฝังในพาราฟิน

ง. เหมาะสำหรับการสาธิตลิพิด ซึ่งละลายได้ในสารละลายที่ใช้ในวิธีการฝังในพาราฟิน

จ. พอลีเอทิลีนไกลคอลช่วยให้เนื้อเยื่อคงสภาพได้ดีกว่าพาราฟิน

ถึงแม้ว่าจะมีข้อดี แต่ก็ไม่ใช้ในงานประจำ เพราะเมื่อนำมาเฉือนเป็นแผ่นบางแล้วจะไม่ลอยตัว (floating out) และติดสไลด์ยาก ด้วยหลายสาเหตุคือ ละลายน้ำได้ แล้วยังละลายในสารดึงน้ำออกและสารทำให้ใสอีกด้วย จึงต้องป้องกันโดยเติมสบู่ลงไปเล็กน้อยแล้วเติม 10-20 เปอร์เซนต์พอลีเอทิลีนไกลคอล 900 ลงไปในที่ใช้ลอยแผ่นบาง จะช่วยป้องกันมิให้เนื้อเยื่อแผ่นบางกระจายออกไป จึงสามารถใช้สไลด์ช้อนตักเพื่อเม้าท์[1]ได้

ถ้ามีความจำเป็น ล้างสารทำให้คงสภาพออกให้หมดก่อน จึงจะนำมาทำให้ชื้มซาบตามขั้นตอนต่อไปนี้

ก. แช่เนื้อเยื่อตัวอย่างใน 70 เปอร์เซนต์ พอลีเอทิลีนไกลคอลในน้ำ 45 นาที

ข. เปลี่ยนเนื้อเยื่อมาแช่ใน 90 เปอร์เซนต์พอลีเอทิลีนไกลคอลในน้ำ 1 นาที

ค. เปลี่ยนเนื้อเยื่อมาแช่ใน 100 เปอร์เซนต์พอลีเอทิลีนไกลคอล ทำ 3 ครั้ง แช่ครั้งละ 25 นาที

---

1. การเม้าท์ (mounting) สไลด์ คือการทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างที่เฉือนออกมาเป็นแผ่นบางแล้วติดกับกระจกสไลด์ และรวมถึงการปิดกระจกปิดเพื่อการทำเป็นสไลด์ถาวรด้วย

นำเนื้อเยื่อมาทำการฝังใน 100 เปอร์เซนต์ พอลีเอทิลีนไกลคอล แล้วนำบล๊อก[1] (block) มาทำให้เย็นที่ 5 องศาเซลเซียส

5.4.2 การฝัง

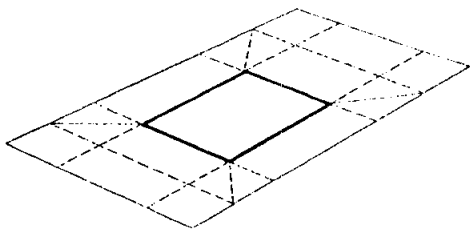
5.4.2.1 โอเรียนเทชัน (orientation) คือการวางเนื้อเยื่อตัวอย่างลงในพิมพ์ (mold) ให้อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่งกำหนดไว้ล่วงหน้าก่อนจะทำการฝังเนื้อเยื่อ ถ้าเกรงจะสับสนว่าผิวด้านใดของเนื้อเยื่อเป็นผิวที่ต้องการจะเฉือน ควรทำเครื่องหมายผิวด้านตรงข้ามก้อนเหลี่ยมของเนื้อเยื่อไว้ด้วยอินเดียนอิงค์ (indian ink) หรือโดยหยักร่องเล็ก ๆ ลงบนผิวของเนื้อเยื่อ ควรวางแผนการจัดการก่อนการฝังโดยยึดหลักที่ว่า ส่วนที่อ่อนของเนื้อเยื่อจะถูกเฉือนออกไปก่อนส่วนที่แข็ง โดยเฉพาะเนื้อเยื่อชนิด หนัง และกระดูก

นอกจากนี้โอเรียนเทชันยังหมายถึงการวางบล๊อกลงบนแป้นยึดบล๊อกของไมโครโตมก่อนการเฉือน โดยหันส่วนที่ต้องการเฉือนเข้าหาคมมีดและยังหมายถึงการจัดวางแผ่นบางที่เฉือนได้ลงบนกระจกสไลด์ให้อยู่ในตำแหน่งและทิศทางที่ต้องการ

5.4.2.2 พิมพ์ที่ใช้สำหรับการฝังเนื้อเยื่อ สามารถหาซื้อได้จากบริษัทผู้ผลิตหลายบริษัท วัสดุที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพวกพลาสติกทนความร้อนได้ อย่างไรก็ตามนักปฏิบัติการสามารถทำพิมพ์ขึ้นใช้ได้เองจากวัสดุที่หาได้ง่าย เช่น กระดาษและอลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) เมื่อใช้แล้วแกะทิ้งได้ ซึ่งสะดวกและประหยัด การพับกระดาษเพื่อทำพิมพ์ทำได้ง่ายดังรูป 5-1

รูป 5-1 การพับกระดาษหรืออลูมินัมฟอยล์เพื่อใช้สำหรับการฝังเนื้อเยื่อ

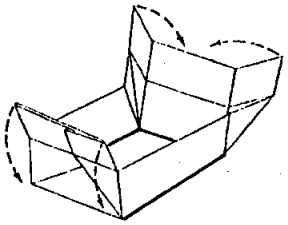
ก. พับกระดาษตามแนวรอยปรุ เส้นทึบจะเป็นส่วนล่างของพิมพ์

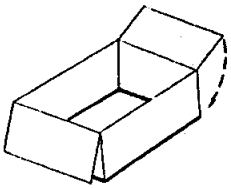


***1. block หมายถึงก้อนเหลี่ยมของเนื้อเยื่อ หรือก้อนเหลี่ยมของสารตัวกลางที่ฝังเนื้อเยื่อไว้แล้ว

ข. พับรอยทั้งสี่ด้านขึ้น

ค. พับขอบด้านกว้างลงให้เสมอกับด้านยาว





เขียนโค้ด[1] (code) ด้วยดินสอดำลงบนขอบพิมพ์ด้านนอก เพื่อจะได้ทราบชนิดของเนื้อเยื่อพร้อมทั้งตัดกระดาษขนาดเล็กเขียนโค้ดเดียวกันกับบนพิมพ์แต่ละพิมพ์ ใส่ลงไปในพิมพ์ โดยหันด้านที่เขียนด้วยดินสอดำเข้าชิดผนังด้านข้างข้างใดข้างหนึ่งของพิมพ์ ค่อย ๆ เทสารตัวกลางสำหรับการฝังเนื้อเยื่อ (เช่น พาราฟินหลอมเหลว) ลงในพิมพ์ระวังไม่ให้เกิดฟอง ใช้คีม (ลนไฟให้ร้อนก่อน) คีบเนื้อเยื่อที่ทำให้ชิมซาบแล้ว และอยู่ในสารตัวกลางเหลวมาจัดวางลงในพิมพ์โดยคว่ำด้านผิวหน้าที่จะทำการเฉือนลงไปให้สัมผัสกับด้านล่างของพิมพ์ หมุนเนื้อเยื่อให้หันตามทิศทางที่ต้องการตามวิธีโอเรียนเทชันในข้อ 5.4.2.1 พึงระลึกเสมอว่าเนื้อเยื่อที่ทำการฝังลงไปในสารตัวกลางที่ใส่ไว้ในพิมพ์นั้นถูกต้องตรงกันกับโค้ดที่เขียนกำกับและใส่ไว้ในพิมพ์ ปล่อยไว้ให้เย็นแล้วจึงเก็บบล็อกไว้ในห้องเย็นหรือตู้เย็น

กิจกรรม 5.4

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการทำให้ชิมซาบในพาราฟินมาแล้วในกิจกรรม 5.3.1 และ 5.3.2 มาทำการฝังในพาราฟินเหลวดังวิธีในข้อ 5.4.2.1 และ 5.4.2.2 เมื่อบล็อกเย็นลงแล้วนำเก็บไว้ในตู้เย็น

สรุป

การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อก็เพื่อให้เนื้อเยื่อถูกแทนที่ด้วยสารทำให้ใส ซึ่งรวมเป็นเนื้อ

***1. ใช้หลักการบาร์โค้ด หรือ โค้ดตัวเลข เพื่อกำหนดชนิดของสารทำให้คงสภาพ ชนิดของเนื้อเยื่อ และจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อ โดยมีการจดบันทึกไว้เป็นสมุดบันทึกข้อมูล

เดียวกับน้ำไม่ได้ แล้วให้เนื้อเยื่อชิบชาบสารตัวกลางเพื่อการฝังอีกทอดหนึ่ง ซึ่งสารดังกล่าวรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับสารที่ทำให้ใส สำหรับงานประจำทั่วไปนิยมใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นจากต่ำไปสูงสำหรับการดึงน้ำออก ไซลีนสำหรับการทำให้ใส และพาราฟินผสมกับไซลีนเพื่อการทำให้ชิมชาบ ก่อนที่จะฝังลงในพาราฟิน เมื่อเป็นบล็อกแล้วนำเก็บไว้ในที่เย็นและพร้อมสำหรับขั้นตอนการเฉือนต่อไป

แบบฝึกหัดที่ 5

1. จงบอกหลักการเลือกสารเพื่อใช้ในการนำเนื้อเยื่อเข้าสู่ระเบียบวิธีการฝังลงในสารตัวกลาง
   (ตอบ : ดูหลักการในความนำประกอบกับเค้าโครงเรื่องทั้งหมด)
2. การดึงน้ำออก การทำให้ใสมีความจำเป็นเสมอหรือไม่ต่อระเบียบวิธีการฝังเนื้อเยื่อ
   (ตอบ : ดูข้อ 5.4.1.5)
3. การใช้แอลกอฮอล์หรือ..... - .. เพื่อการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ มีข้อดีเพราะทำได้รวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถสาธิต ..... เพราะถูกละลายหมด
   (ตอบ : ดูข้อ 5.1)
4. สารที่ทำให้ใสที่มีข้อเสียน้อยที่สุดที่ท่านทราบคือ .....
   อย่างไรก็ตาม สารชนิดนี้ถูกนำมาใช้น้อยกว่า ..... ซึ่งใช้สำหรับงานประจำ เพราะข้อด้อยที่ว่า สารทำให้ใสชนิดแรกทำงานได้ ..... กว่า
   (ตอบ : ดูข้อ 5.2.1, 5.2.2 และ 5.2.3)
5. สารทำให้ใสสำหรับเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว คือสารใด
   1. คลอโรฟอร์ม 2. น้ำมันสน
   3. โทลูอีน 4. เบนซีน
6. นักปฏิบัติการในประเทศไทยควรเลือกใช้สารตัวกลางเพื่อการฝังเนื้อเยื่อสำหรับงานประจำชนิดใดจึงจะเหมาะสมกับลักษณะภูมิประกาศ
   1. เจลาติน 2. ไบโอลอยด์
   3. พาราพลาสท์ 4. พาราฟินจุดหลอมเหลวต่ำ
7. ถ้าต้องการสาธิตเอนไซม์ เมื่อทำเนื้อเยื่อให้คงสภาพแล้ว ควรเลือกระเบียบวิธีการฝังเนื้อเยื่อในสารใด

1. เจลาติน
2. ชี้ผึ้งละลายน้ำได้
3. พาราฟินจุดหลอมเหลวต่ำ
4. พาราพลาสท์

8. ตามสภาพเศรษฐกิจของไทย นักปฏิบัติการควรใช้พิมพ์เพื่อทำบล๊อกจากวัสดุใด
   1. อลูมินัมฟอยล์
   2. พลาสติกสำเร็จรูปผลิตโดยบริษัทที่มีมาตรฐาน
   3. กระดาษสมุดเหลือใช้หรือกระดาษกรอง
   4. กระดาษหนังสือพิมพ์

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