

## บทที่ 9 การย้อมสี

### เค้าโครงเรื่อง

#### 9.1 ทฤษฎีของการย้อมสี

#### 9.2 แอ็กเซนทิวเอเทอร์และสารช่วยสีติด

##### 9.2.1 แอ็กเซนทิวเอเทอร์

##### 9.2.2 สารช่วยสีติด

#### 9.3 การย้อมสี

##### 9.3.1 การย้อมสีขณะมีชีวิต

##### 9.3.2 การย้อมสีเนื้อเยื่อที่ทำให้คงสภาพแล้ว

###### (1) การย้อมสีโดยตรง

###### (2) การย้อมสีทางอ้อม

###### (3) การย้อมสีแบบก้าวหน้า

###### (4) การย้อมสีแบบถอยหลัง

##### 9.3.3 การตีฟเฟวเรนซีเอชัน

##### 9.3.4 การซึมซาบ

##### 9.3.5 ปฏิกริยามิยูซเคมี

##### 9.3.8 การย้อมสีแบบเมตาโครมาติก

##### 9.3.7 การย้อมสีแบบพอลิโครมาติก

### สาระสำคัญ

1. กลไกการทำงานของสีย้อมยังไม่เป็นที่ทราบเด่นชัด ทฤษฎีอธิบายได้ทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ จึงเชื่อว่าการย้อมสีเป็นกลไกการทำงานผสมผสานทางเคมีและฟิสิกส์
2. สีย้อมบางชนิดย้อมเนื้อเยื่อติดไม่ได้ดี ต้องมีแอ็กเซนทิวเอเทอร์มาช่วยให้สีติดสวยขึ้น ซึ่งไม่ทราบกลไกการทำงานแท้จริง ในทำนองเดียวกัน สีย้อมบางชนิดต้องใช้สารช่วยสีติดไปเลยกับเนื้อเยื่อก่อน แล้วจึงจะสามารถมีพันธะกับสารช่วยสีติด ทำให้กลไกการทำงานของการย้อมสีสมบูรณ์
3. วิธีการย้อมสีมีหลายวิธี เช่น ย้อมขณะเนื้อเยื่อยังมีชีวิตอยู่ หรือย้อมหลังจากเนื้อเยื่อถูกทำให้คงสภาพแล้ว การเลือกการย้อมสีวิธีใดวิธีหนึ่งนั้น ยึดหลักการทำงานของสีย้อมและวัตถุประสงค์ของการสัทธิศาสตร์ประกอบของเนื้อเยื่อมาประกอบกัน

### วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่า ทฤษฎีของการย้อมสีเป็นการทำงานทางเคมีที่สีย้อมมีพันธะกับสารเคมีในเนื้อเยื่อ และผสมกับการทำงานทางฟิสิกส์ตามทฤษฎีไฟฟ้าของการย้อมสี
2. นักศึกษาสามารถบอกความแตกต่างระหว่างแอกเซนทิวเอเทอร์ และสารช่วยสีติดได้ โดยสารช่วยสีติดสามารถแลกกับเนื้อเยื่อได้
3. นักศึกษาสามารถบอกความแตกต่างของวิธีการย้อมสีแบบต่าง ๆ และสามารถเลือกใช้วิธีการย้อมสีที่เหมาะสมสำหรับการย้อมเนื้อเยื่อเพื่อสาธิตส่วนประกอบต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อตามวัตถุประสงค์ได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามท้ายบทได้เกินกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในหนึ่งสัปดาห์

เนื้อเยื่อโดยทั่วไปไม่ปรากฏสีเด่นชัดพอที่จะเห็นความแตกต่างของส่วนประกอบจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่จะทำให้ส่วนประกอบเหล่านั้นเด่นชัดขึ้นมาเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเติมสีลงไปที่เนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้เห็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อได้ จึงมีการเลือกสีที่เหมาะสมโดยทราบโครงสร้างทางเคมีและการทำปฏิกิริยาแล้วมาทำเป็นสีย้อมเพื่อการย้อมสีเนื้อเยื่อ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อทราบเอกลักษณ์ของเนื้อเยื่อแต่ละชนิด และสามารถทราบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดได้

#### 9.1 ทฤษฎีของการย้อมสี

เบเกอร์<sup>1</sup> (Baker, 1968) ได้นำปัญหาคำว่า "ย้อมและการย้อมสี" (stain and staining) มาสันนิษฐานว่า น่าจะเป็นคำที่ไม่ถูกต้องนัก เช่น เบลีฟุกซินย้อมโครมาติน โลหะเงินย้อมเส้นประสาท ชูตานแบล็กย้อมลิวิด ในทางฟิสิกส์และเคมี กระบวนการย้อมของสีทั้งสามชนิดดังกล่าวต่างกัน จึงน่าจะใช้คำว่า "สีและสารให้สี หรือสารสี" (colour and colouring or colourant) มาประยุกต์ใช้กับระเบียบวิธีให้มีสีหรือสารประกอบอินทรีย์ที่มีสี อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดเห็นด้วยกับแนวคิดนี้ ผู้ผลิตสียังคงใช้รายการผลิตภัณฑ์ของตนว่า "สีย้อม" (dye or stain) คณะกรรมการสีย้อมทางชีววิทยา (Biological Stain Commission) มีมติที่จะใช้คำว่า "สีย้อม" "ย้อม" และ "การย้อมสี" ต่อไปจนกว่าข้อเสนอของเบเกอร์จะเป็นที่ยอมรับใช้เป็นศัพท์มาตรฐาน เช่น ในกรณีของวิธีย้อมด้วยโลหะเงิน (silver impregnation) ซึ่งโลหะเงินไม่ใช่สีย้อม แต่ในระเบียบวิธีนี้เป็นสารให้สี จึงจะนำศัพท์ของเบเกอร์มาใช้ถ้าจำเป็น

---

\*\*\*1. Baker, J.R. 1968. Principles of Biological Techniques. New York, John Wiley & Co.

ปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมและเนื้อเยื่อเป็นเรื่องซับซ้อนและมีหลายทฤษฎีที่นำมาอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น แต่ยังไม่เป็นที่เข้าใจแจ่มชัดนัก

อย่างไรก็ตาม เป็นที่ยอมรับว่า สีย้อมแอซิดใช้ย้อมส่วนประกอบเบสิกของเนื้อเยื่อ และสีย้อมเบสิกใช้ย้อมส่วนประกอบแอซิดของเนื้อเยื่อ แต่ไม่เป็นจริงในทุกกรณี เช่น สีย้อมมาทอกซิลีน ซึ่งเป็นสีย้อมแอซิด มีความแรงสำหรับการย้อมนิวเคลียสเมื่อใช้กับสารช่วยย้อม

ถ้าปฏิกิริยาการย้อมสีมีธรรมชาติเป็นปฏิกิริยาเคมีเพียงอย่างเดียว ในทางทฤษฎี ปฏิกิริยาจะต้องเกิดต่อเนื่องจนสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งหมด เกิดปฏิกิริยาจนหมด และถ้าการย้อมสีมีธรรมชาติเป็นฟิสิกส์เพียงอย่างเดียว การย้อมสีน่าจะเกิดขึ้นด้วยกระบวนการออสโมซิส แรงดึงดูดในหลอดรูตีบ (capillary attraction) หรือความสามารถในการละลาย สีย้อมจะถูกดึงออกจากเนื้อเยื่อได้ง่าย แต่ความจริงไม่เป็นเช่นนั้น

ปฏิกิริยาการย้อมสีบางอย่างต้องใช้แอกเซนทิวเอเตอร์ (accentuator) สารช่วยย้อม หรือความร้อน หรือใช้ทุกอย่างรวมกันจึงจะทำให้การย้อมสีได้ผลสมบูรณ์

ทฤษฎีของการย้อมสีซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปคือ ทฤษฎีที่ว่า ปฏิกิริยาการย้อมสีเป็นการทำงานผสมผสานทางเคมีและฟิสิกส์ ทฤษฎีทางฟิสิกส์ที่สามารถอธิบายปฏิกิริยาการย้อมสีได้ดีคือ (1) ความสามารถในการละลาย และ (2) การดูดกลืน

ปฏิกิริยาความสามารถในการละลายยึดหลักที่ว่า สีย้อมละลายได้ดียิ่งขึ้นในสารที่กำลังถูกย้อมมากกว่าจะละลายได้ในตัวทำละลาย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ สีย้อมไขมัน ซึ่งละลายในไขมันได้ดีกว่าละลายใน 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ บางครั้งความสามารถในการละลายจะอ้างถึงการดูดกลืนด้วย

การดูดกลืนได้รับการขนานนามว่า "ทฤษฎีไฟฟ้าของการย้อมสี" (electrical theory of staining) โดยยึดหลักที่ว่า วัตถุขนาดใหญ่จะดูดอนุภาคขนาดเล็กเข้าหาตัว นั่นคือ อนุภาคสีย้อมซึมผ่านเซลล์เข้าไปสะสมหรือพันธะกับส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจมีผลกระทบจากคุณสมบัติของสีย้อมว่าเป็นแอซิด หรือเบสิก เนื้อเยื่อมี pH เป็นแอซิดหรือเบสิก หรือทั้งสองอย่าง หรือบางครั้งอาจค่อนข้างเป็นกรณีพิเศษ เช่นการย้อมสีแบบพอลิโครมาติก<sup>2</sup> ซึ่งส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเลือกติดสีต่าง ๆ โดยเฉพาะ

การทำให้คงสภาพก็มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการย้อมสี เนื้อเยื่อที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยสารละลายเกลือของโลหะหนัก เช่น เมอร์คิวริกคลอไรด์ (เซนเกอร์'ส ฟลูอิด) ช่วยให้การย้อมสีสดสวยขึ้นเมื่อใช้สีย้อมแอซิดคือโอซิน แต่เมื่อย้อมด้วยอะลัมมีนมาทอกซิลีนค่อนข้างจะยับยั้งการติดสีของนิวเคลียส ปรากฏการณ์

\*\*\*1. สีย้อมแอซิดใช้ย้อมไซโทพลาซึม ถ้าจะย้อมนิวเคลียสติดสีได้ดีต้องใช้สีย้อมเบสิก

2. คู่มือ 9.3.7

เหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point)

จุดไอโซอิเล็กทริกหมายถึงจุดที่ pH ของโปรตีนไม่เป็นบวกหรือลบ กล่าวคือ เป็นจุดที่ผลรวมของประจุบวกและประจุลบเป็นศูนย์ เมื่อโมเลกุลของโปรตีนอยู่ที่จุดไอโซอิเล็กทริก โปรตีนมีคุณสมบัติเป็นแอมโฟเทริก (amphoteric) กล่าวคือ สามารถเปลี่ยนจากกรด (ประจุลบ) หรือเบส (ประจุบวก) ได้ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายที่มีโปรตีนชนิดนั้น สารละลายที่มีความเป็นกรดมากกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก จะเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นเบส ในทางตรงกันข้าม สารละลายที่มีความเป็นเบสมากกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก จะเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นกรด

สารทำให้คงสภาพที่มีเกลือของโลหะหนักเมื่อรวมกับหมู่คาร์บอกซิลจะทำให้หมู่แอมิโนเป็นอิสระ จุดไอโซอิเล็กทริกจะเปลี่ยน pH สูงขึ้น (เป็นเบสมากขึ้น) และให้ประจุบวกมากขึ้น จึงทำให้จับกับสีย้อมแอนิไดน์ได้มากขึ้นด้วย อาจกล่าวได้ว่า มีการจับกับสีย้อมแอนิไดน์ได้ง่าย ฟอรัมาลินจะรวมกับอนุมูลเบสแล้วปล่อยให้หมู่คาร์บอกซิลเป็นอิสระ ซึ่งอนุมูลกรดจากหมู่คาร์บอกซิลจะไปเปลี่ยนจุดไอโซอิเล็กทริกให้ pH ลดลง (เป็นกรดมากขึ้น) โดยทั่วไปสารทำให้คงสภาพจะมีจุดไอโซอิเล็กทริกต่างกันเพียง เล็กน้อยเท่านั้น

### กิจกรรม 9.1

ให้นักศึกษาอ่านทำความเข้าใจพร้อมทั้ง เขียนสูตรโครงสร้างของโปรตีนโดยศึกษาจากตำราหลักชีววิทยา หรือตำราเคมีที่มีอยู่หลายเล่มในห้องสมุด

## 9.2 แยกเซนทิวเอเทอร์และสารช่วยสีติด

### 9.2.1 แยกเซนทิวเอเทอร์

แยกเซนทิวเอเทอร์เป็นสารที่เพิ่มความเฉพาะการติดสี หรือเพิ่มกำลังการติดสีของสีย้อม คือช่วยเพิ่มความเข้มของการติดสีให้มากขึ้น แยกเซนทิวเอเทอร์มิได้มีส่วนในการจับหรือพันธะระหว่างสีย้อมกับเนื้อเยื่อ หรือมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาการย้อมสีแต่อย่างใด ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือฟอสฟอรัสในคาร์บอลฟูกซัน และพอนแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในสารละลายเมทิลีนบลู

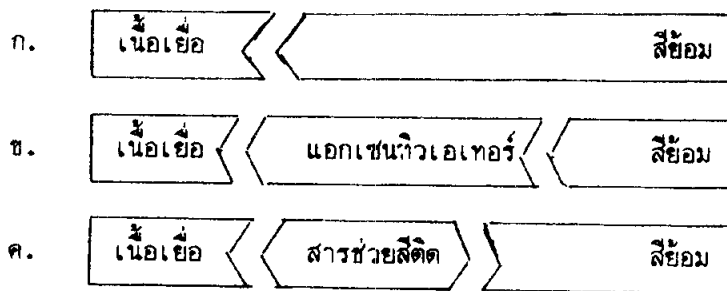
แยกเซนทิวเอเทอร์ที่ใช้ในวิธีซีมซาบด้วยเกลือโลหะ เพื่อการย้อมสีระบบประสาท นิยมเรียกว่า แยกเซเลเรเทอร์ (accelerator) ตัวอย่างคือ เวนอนัล (veronal) ที่ใช้ในวิธีคาลล์ (Cajal's method) เพื่อการย้อมไซสัณฑัง

### 9.2.2 สารช่วยสีติด

เมื่อนำคาร์มีนมาละลายในสารละลายอะลูมิเนียมซัลเฟต ได้สารละลายมีประจุบวก ทำหน้าที่เป็นสีย้อมเบสิก สารประกอบที่เกิดขึ้นจากอนุมูลของสีย้อมไปมีพันธะกับเกลือ หรือไฮดรอกไซด์ของโลหะที่มี

เวเลนซี 2 หรือ 3 ซึ่งจะทำหน้าที่ไปจับกับเนื้อเยื่อ เรียกว่า เลค (lake) เกลือที่ใช้เพื่อการเลคเรียกว่า สารช่วยลีดิต (mordant แปลว่า กัด) เลคอาจไม่เสถียรหรือไม่ละลายน้ำ ตามปกติจะจุ่มเนื้อเยื่อลงในสารละลายช่วยลีดิตเสียก่อนที่จะนำไปย้อมในสารละลายสีย้อม เพื่อให้เกิดการเลคขึ้นในเนื้อเยื่อ คำว่าสารช่วยลีดิตต่างจากแอคเซนทิวเอเทอร์ เพราะถึงแม้จะมีคุณสมบัติในการเพิ่มความเข้มของสีหรือช่วยให้ลีดิตขึ้นเหมือนกัน แต่สารช่วยลีดิตเป็นศัพท์ที่ใช้เรียกเฉพาะสารที่เป็นเกลือหรือไฮดรอกไซด์ของโลหะที่มีเวเลนซี 2 หรือ 3 เท่านั้น ข้อแตกต่างการทำงานของแอคเซนทิวเอเทอร์และสารช่วยลีดิตแสดงไว้ในแผนภาพ (รูป 9-1)

รูป 9-1 แผนภาพแสดงรูปแบบปฏิกิริยาการย้อมสี ก. การย้อมสีโดยตรง ข. การย้อมสีโดยใช้แอคเซนทิวเอเทอร์ หรือแอคเซลเรเทอร์ ค. การย้อมสีโดยใช้สารช่วยลีดิต



การใช้สารช่วยลีดิตให้ประโยชน์หลายอย่าง กล่าวคือ เมื่อใช้สีย้อมที่มีสารช่วยลีดิต สีจะจับติดกับเนื้อเยื่ออย่างถาวร ไม่ละลายในสารละลายที่เป็นกลาง แล้วอาจย้อมทับด้วยสีย้อมชนิดอื่นได้ อีกการดึงน้ำออกไม่ทำให้สีที่ย้อมติดติดอยู่แล้วจางหรือซีดลง วิธีการใช้สารช่วยลีดิตมี 3 วิธี คือ

- (1) ใช้สารช่วยลีดิตก่อนการใช้สีย้อม
- (2) ใช้สารช่วยลีดิตไปพร้อมกับการใช้สีย้อม
- (3) ใช้สารช่วยลีดิตภายหลังการย้อมสี (ไม่นิยมใช้นัก)

สารช่วยลีดิตที่นิยมใช้กับสีคาร์มีน และสีมาทอกซิลิน คือ เกลือของเหล็กและโครเมียม และอะลัมของพอสเซียม แอมโมเนีย เหล็กและโครเมียม สารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์เฟอริกคลอไรด์<sup>1</sup> สามารถใช้แทนสารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์เฟอริกอะลัม โดยเฉพาะควรใช้กับสีสีมาทอกซิลินที่บ่มด้วยฟอสเฟต เฟอริกคลอไรด์ช่วยให้การย้อมสีเนื้อเยื่อติดได้เร็วกว่าเฟอริกอะลัม

1. acetocarmine ผสมกับเฟอริกคลอไรด์แล้วใช้ย้อมทันที เหมาะสำหรับย้อมสีโครโมโซม ได้สีแดงปนน้ำเงิน

สำหรับการเก็บสารละลายผสมระหว่างสารช่วยสัติดและสีย้อมเพื่อเอาไว้ใช้ได้นาน ควรเลือกสารช่วยสัติดที่ไม่มีการทำงานของออกซิเดชันเข้ามาเกี่ยวข้อง หรือถ้าบังเอิญมีก็ควรให้น้อยที่สุด สารช่วยสัติดที่ดีคือ แอมโมเนียมอะลัม<sup>1</sup> พอแทสเซียมอะลัม กรดฟอสไฟทิงสติก (phosphotungstic acid) กรดฟอสไฟโบลินดิก (phosphomolybdic acid) และ ไอออนอะลัม-เฟอร์รัสซิลเฟต ถ้าไม่ต้องการเก็บเอาไว้ใช้นาน ควรเลือกสารช่วยสัติดที่มีออกซิเดชันรุนแรง เพราะการหวังผลใช้งานต้องการความรวดเร็วเพียงแค่วินาที จึงควรเตรียมสารละลายแล้วใช้ทันที สารช่วยสัติดในกลุ่มนี้คือ เฟอร์ริกคลอไรด์ เฟอร์ริกแอสซิเตท และเฟอร์ริกอะลัม

เมื่อใช้สารช่วยสัติดแยกต่างหากจากสีย้อม สามารถใช้ประเภทใดก็ได้ (ทั้งที่มีการทำงานแบบไม่มีออกซิเดชันและมีออกซิเดชัน) ถ้าสีย้อมที่จะใช้เป็นสีย้อมทอกซิลินที่บ่มแล้ว ถ้ายังไม่ได้บ่ม ควรใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นออกซิไดซิงเอเจนท์ทำเป็นสารละลายช่วยสัติด เช่น กลีโอฟेरริก หรือกลีโอบริเมียม คุณสมบัติของสารละลายกลีโอฟेरริกและกลีโอบริเมียม คือ เมื่อเติมสารละลายย้อมทอกซิลินที่บ่มด้วยแอมโมเนียจะ ได้ตะกอนเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์และโคโรเมียมไฮดรอกไซด์ การใช้สารช่วยสัติดสองครั้งสามารถทำได้และให้ผลดีด้วย สารช่วยสัติดที่ใช้ครั้งแรกควรเป็นสารละลายแอมโมเนียหรือพอแทสเซียมอะลัม เฟอร์ริกแอมโมเนียมอะลัม<sup>2</sup> และเฟอร์ริกคลอไรด์<sup>3</sup> ต่อมาย้อมสีย้อมทอกซิลินผสมแอมโมเนียมอะลัมที่บ่มแล้ว สีนิวเคลียสของเนื้อเยื่อจะติดสีน้ำเงินสด ถ้าย้อมสีย้อมทอกซิลินผสมพอแทสเซียมอะลัมที่บ่มแล้ว นิวเคลียสของเนื้อเยื่อจะติดสีม่วง ถ้าย้อมสีย้อมทอกซิลินที่บ่มแล้ว นิวเคลียสของเนื้อเยื่อจะติดสีน้ำเงินปนเทา และถ้าย้อมสีย้อมทอกซิลินผสมเฟอร์ริกอะลัมที่บ่มแล้ว นิวเคลียสของเนื้อเยื่อจะติดสีน้ำเงินเข้มจนถึงสีดำ

การเลือกโลหะที่เหมาะสมเพื่อผสมกับย้อมทอกซิลินแล้วนำไปบ่ม เพื่อนำมาใช้ย้อมสีตามวัตถุประสงค์ของการสัติด ควรเลือกดังนี้

นิวเคลียส	: อลูมิเนียม เหล็ก และทังสเตน
ไมอิลิน	: โคโรเมียม เหล็ก และทองแดง
เส้นใยอีลาสติก	: เหล็ก
เส้นใยคอลลาเจน	: โมลิบดีนัม

\*\*\*1. แอมโมเนียมอะลัมใช้ผสมกับกรดคาร์มินิก (carminic acid) ในการเตรียมสารละลายสัติด เมเยอร์'ส คาร์เมลัม (Mayer's carmalum) เหมาะสำหรับการย้อมสีทั้งตัวสัตว์พวกไฮดรา พยาธิใบไม้และคัพภะ

2. และ 3. ถ้าเติมกรด HCl ลงไป 2-3 หยดจะช่วยเพิ่มความชัดของสีมากขึ้น

ไฟโบรเจลลีย, ไมโอเจลลีย, นิวโรเจลลีย, เส้นใยนิว : ทั้งสแตน

ไซสันทั้ง : ตะกั่ว

มิวซิน : เหล็ก

ไฟบริน : ทั้งสแตน

การทำให้เกิดเลคชันระหว่างสารช่วยสีติดและสีย้อมโดยการย้อมสีแบบก้าวหน้า (progressive staining) ทำด้วยการใช้สารช่วยสีติดก่อนแล้วตามด้วยสีย้อม แต่การย้อมสีแบบถอยหลัง (regressive staining) จะให้ผลดีกว่า

## กิจกรรม 9.2

ให้นักศึกษาเตรียมสีย้อมเมเยอร์'ส คาร์เมอแลม (Mayer's carmalum) ดังนี้

กรดคาร์มินิก (C.P. carmine, C.I. 75470)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมอะลัม	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร
เมื่อละลายหมดแล้วเติม 40 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลดีไฮด์	1.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ใช้เป็นสารละลายสต็อก แอมโมเนียมอะลัมที่มีอยู่ในสารละลายสต็อกทำหน้าที่เป็นสารช่วยสีติดที่ไม่มีการทำงานของออกซิเดชัน จึงสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน

## 9.3 การย้อมสี

### 9.3.1 การย้อมสีขณะมีชีวิต

การย้อมสีขณะมีชีวิต (vital staining) เป็นการย้อมสีส่วนประกอบของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในร่างกาย เรียกว่า *intra vitam* หรือ การย้อมสีแบบอินวิโทร (*in vitro staining*) ทำโดยฉีดสารละลายสีย้อมที่เจือจางเข้าไปในอวัยวะ หรือทำโดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อสด ๆ มาแช่ในสารละลายสีย้อมเรียกว่า *supra vitam* หรือการย้อมสีแบบอินวิโทร วิธีย้อมสีขณะมีชีวิตเป็นการย้อมสีเพื่อศึกษาเซลล์ออร์แกเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย นิวทริลเรดแควคิวโอล หรือเพื่อศึกษากลไกการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่กินสิ่งแปลกปลอม ก็จะสามารถเห็นว่าเซลล์เหล่านั้นกินอนุภาคสีเข้าไป

### 9.3.2 การย้อมสีเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว

(1) การย้อมสีโดยตรง (direct staining) เป็นการย้อมสีโดยใช้สีย้อมอย่างง่าย ย้อมเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดสีเพียงสีเดียว แต่ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อติดสีเข้มหรือจางต่างกัน

(2) การย้อมสีทางอ้อม (indirect staining) เป็นการย้อมสีโดยใช้สารช่วยสีติดด้วย หรือใช้สารแอกเซนทิวเอเทอร์ เพื่อเพิ่มความเฉพาะในการติดสีของส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ หรือเพื่อ

ความเข้มของการติดสี

(3) การย้อมแบบก้าวหน้า เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเรียงตามลำดับชั้นตอนที่กำหนดไว้ และตามเวลาที่กำหนดด้วย ไม่มีการล้างสีออกหรือการทำสีให้จางลง เนื่องจากไม่มีการย้อมสีนานเกินพอดี วิธีนี้ควบคุมคุณภาพของการย้อมสีโดยหมั่นตรวจสอบการติดสีด้วยกล้องจุลทัศน์

(4) การย้อมสีแบบถอยหลัง เป็นเทคนิคที่เนื้อเยื่อถูกย้อมจนมากเกินพอดีแล้วล้างสีย้อมออก ต่อไปทำสีให้จางลง เรียกว่าการตีฟเฟเรนซิเอชัน เพื่อให้เห็นส่วนประกอบส่วนใดส่วนหนึ่งของเซลล์หรือเนื้อเยื่อเด่นกว่าส่วนอื่น วิธีนี้ต้องหมั่นตรวจสอบความเข้ม-จางของสีด้วยกล้องจุลทัศน์ และเพื่อเพิ่มความแตกต่างของส่วนประกอบของเนื้อเยื่อมากขึ้น นิยมย้อมสีกับส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่ถูกตีฟเฟเรนซิเอทให้จางลงด้วยสีย้อมต่างชนิดกับชนิดแรก

9.3.3 ตีฟเฟเรนซิเอชัน เป็นขั้นตอนหนึ่งของการย้อมสีแบบถอยหลัง โดยมีจุดมุ่งหมายให้ส่วนประกอบใดส่วนประกอบหนึ่งของเซลล์หรือเนื้อเยื่อติดสีเด่นชัดกว่าส่วนประกอบอื่น ทำโดยแช่เนื้อเยื่อที่ย้อมสีจนมากเกินพอดีในสารละลายตีฟเฟเรนซิเอเทอร์ซึ่งนิยมใช้สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดไฮโดรคลอริกใน 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ลึกหรือติดสีแน่นจะไม่ถูกตีฟเฟเรนซิเอเทอร์ล้างออกไป (เช่นนิวเคลียสหรืออวัยวะภายใน ในกรณีย้อมทั้งตัว) ส่วนประกอบที่อยู่นอกหรือย้อมติดสีไม่แน่นจะถูกล้างออกมาอยู่ในสารละลายตีฟเฟเรนซิเอเทอร์

9.3.4 การซึมซาบ มิได้มีความหมายเพียงการที่สารตัวกลางเพื่อการฝังเข้าไปแทนที่สารทำให้ใสในเนื้อเยื่อเท่านั้น แต่หมายถึงระเบียบวิธีในการย้อมสีด้วยการซึมซาบเป็นการย้อมสีที่ไม่ใช่สีย้อมโดยตรง แต่เป็นการทำให้เกลือของโลหะหนักซึมซาบเข้าไปในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ แล้วสะสมอยู่ภายในเซลล์หรือภายในส่วนประกอบของเนื้อเยื่อหรือบริเวณรอบเซลล์ ผลที่ได้คือการทินแสงเป็นบางส่วนภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งจะต่างไปจากการย้อมสีตามปกติที่เนื้อเยื่อมักติดสีกันออกมาเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างของการซึมซาบคือ วิธีซึมซาบด้วยซิลเวอร์ (silver impregnation) สำหรับการสาธิตเรทคิวลิน โดยทั่วไปนิยมใช้สำหรับการสาธิตระบบประสาท หรือพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับระบบประสาท เกลือของโลหะหนักที่นิยมใช้คือ เกลือของ ทอง ตะกั่ว ออสเมียม และเงิน

9.3.5 ปฏิกริยามิอูซเคมี (histochemical reaction) เป็นปฏิกริยาระหว่างสารไม่มีสีกับส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่สามารถได้ผลผลิตที่มีสีเพื่อนิสูจน์เอกลักษณ์สารเฉพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ ปฏิกริยาฟีวล์เจน (feulgen reaction) สำหรับสาธิตกรดนิวคลีอิก ปฏิกริยาระหว่างสารเคมีกับสารที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อได้ผลผลิตที่มีสีซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของสารเฉพาะชนิดใดชนิดหนึ่ง ก็ถือว่าเป็นปฏิกริยามิอูซเคมี เช่น ปฏิกริยาเพิร์ล'ส ปรัสเซียน บลู (Perls' prussian blue reaction) สำหรับสาธิตฮีโมซิเดริน (hemosiderin) และปฏิกริยาฟอเชท์ (Fouchet reaction) สำหรับสาธิตไบล์ซอลท์ (bile salt)



9.3.6 การย้อมสีแบบเมตาโครมาติก (metachromatic staining) โดยทั่วไปเซลล์และส่วนประกอบของเนื้อเยื่อจะติดสีเข้ม-จาง หรือสีอ่อนสีแก่ต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อม แต่มีสีย้อมเบสิกที่จัดอยู่ในหมู่แอนิลีนที่เมื่อใช้ย้อมเนื้อเยื่อแล้วจะทำให้ส่วนประกอบของเนื้อเยื่อติดสีต่างไปจากสีดั้งเดิมของสีย้อมนั้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า เมตาโครมาซี (metachromasy) และธาตุของเนื้อเยื่อที่ให้เกิดปฏิกิริยานี้เรียกว่ามีการทำให้ปรากฏเป็นเมตาโครมาเซีย (metachromasia) ตัวธาตุของเนื้อเยื่อเองเรียกว่าโครโมโทรป (chromotrope)

ปรากฏการณ์เมตาโครมาซี เชื่อกันว่าสีที่เปลี่ยนไปนั้นเกิดขึ้นจากการพอลิเมไรเซชัน (polymerization) สารน้ำหนักโมเลกุลมากเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดเมตาโครมาเซีย สารที่มีหมู่ซัลเฟตจะมีโครโมโทรปมากกว่าสารที่มีหมู่คาร์บอกซิล หรือหมู่ฟอสเฟต ถ้าต้องการทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีเมตาโครมาเซียขึ้น สามารถทำได้โดยเติมกรดซัลฟูริกเข้าไปในสีย้อม เฮปาริน (heparin) ซึ่งอยู่ในแกรนูลของมาสต์เซลล์ (mast-cell) ก็มีหมู่ซัลเฟตมาก จึงมีเมตาโครมาเซียได้ดี

สีย้อมเมตาโครมาติกที่สำคัญคือ เมทิลีนบลู ไทโอนิน (thionin) และโทลูอิดีนบลู (toluidine blue) เมทิลไวโอเลต (methyl violet) มีเมตาโครมาเซียได้ แต่ไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเป็นเมตาโครมาเซียที่แท้จริง หรือเกิดเนื่องมาจากความไม่บริสุทธิ์ของสีย้อม

เอมิลอยด์ (amyloid) กระจุกก้อน มาสต์เซลล์แกรนูล และมิวซิน (mucin) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่สามารถสาธิตได้ด้วยวิธีการย้อมสีแบบเมตาโครมาติกดังตัวอย่างประกอบในตาราง

สีย้อม	ชนิดส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ	สีที่ได้
ไทโอนิน	โครมาติน	น้ำเงิน
	มิวซิน (เมทริกซ์ของกระจุกก้อน)	แดง
	มาสต์เซลล์แกรนูล	แดง

9.3.7 การย้อมสีแบบพอลิโครมาติก (polychromatic staining) เป็นระเบียบวิธีที่สีย้อมชนิดหนึ่งเปลี่ยนเป็นสีย้อมชนิดอื่นต่อเนื่องไปด้วยตนเอง ตัวอย่างที่เห็นชัดคือสีย้อมโรมานอฟสกี (Romanowsky stain) ซึ่งนิยมใช้ย้อมเลือด สารเมทิลีนบลูในสีย้อมโรมานอฟสกี ถูกออกซิไดส์ได้สารประกอบในกลุ่มที่มีหมู่เมทิลโมเลกุลเล็กลงอีกชนิดหนึ่งหรือมากกว่า ดังนั้นสารละลายเมทิลีนบลู เมื่อเก็บไว้ในขวดจะมีสารประกอบในกลุ่มเดียวกันหลายชนิดปนกัน ซึ่งมักจะได้แก่ แอซัวร์ A และ B (azure A and B) และเมทิลีนบลูรวม เรียกว่าพอลิโครมเมทิลีนบลู แอซัวร์ให้สีค่อนข้างสีม่วง และมีการทำงานเลือกเฉพาะมากกว่าเมทิลีนบลูที่ไม่ใช่พอลิโครม จึงเหมาะสำหรับการย้อมสีเม็ดเลือดเพื่อสาธิตความต่างชนิด

ของเม็ดเลือดขาว เมื่อนำสารละลายพอลิโครมเมทิลีนบลูมาผสมกับสารละลายอีโอซิน จะได้ตะกอนไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในแอลกอฮอล์เรียกว่าสีย้อมไรท์<sup>1</sup> (Wright's stain) ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

ใส่ผงสีย้อมไรท์ 0.1 กรัมลงในครกกระเบื้อง เติมแอลกอฮอล์ที่เป็นกลางและปราศจากอะซีโตนลงไป 60 มิลลิลิตร บดให้ผงสีละลายจนหมด ตรวจสอบว่าละลายหมดหรือไม่ด้วยการรินแอลกอฮอล์ออกมาใส่ในบีกเกอร์ ถ้ายังเห็นตะกอนอยู่ก็บดครกเทกลับลงไปแล้วบดใหม่ ทำหลาย ๆ ครั้งจนละลายหมด

อีกวิธีหนึ่งง่ายกว่าแต่ช้ากว่า ทำโดยใส่ผงสีย้อมไรท์ 0.3 กรัม ลงในขวดแก้ว เติมเมทิลแอลกอฮอล์ลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรินลงไป 3 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยจุกแก้ว เช้าเป็นครั้งแรกประมาณ 24 ชั่วโมง สีย้อมจะละลายหมดและพร้อมที่จะนำมาใช้ได้ ตรวจสอบว่าใช้ได้หรือไม่ โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายสีมาหยดลงบนกระดาษกรอง ถ้าเป็นจุดสีน้ำเงิน แสดงว่าใช้ได้แล้ว แต่ถ้าเป็นจุดสีน้ำเงินและวงรอบนอกเป็นสีชมพูยังไม่ใช้ได้ เมื่อนำมาใช้ทำให้เจือจางอัตราส่วน 1:1 ด้วยบัฟเฟอร์ หรือสารทำให้เจือจาง<sup>2</sup> (diluent)

### กิจกรรม 9.3

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายสต็อกสีย้อมไรท์ตามวิธีในข้อ 9.3.7 โดยให้ปริมาตรสารละลายสีย้อมมีทั้งหมด 1 ลิตร เก็บใส่ขวดแก้วสีชาวยุติด้วยจุกแก้ว ติดป้ายชื่อสารละลายและวันเดือนปีที่เตรียม

### สรุป

การย้อมสีมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เห็นส่วนประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อเด่นชัดขึ้น การทำงานของสีย้อมยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเป็นการทำงานผสมผสานทางเคมีและฟิสิกส์ การย้อมสีอาจทำได้โดยตรงหรือใช้สารอื่นช่วยเพื่อให้การติดสีดีขึ้น วิธีการย้อมสีมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อมและวัตถุประสงค์เพื่อการสัณฐานส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อ

- 
- \*\*\*1. สีย้อมไรท์ที่มีขายมี 3 ชนิด คือ (1) ผงแห้งบรรจุขวดขนาด 1, 10, 25 หรือ 100 กรัม (2) ผงแห้งบรรจุแคปซูลขนาด 0.1 กรัม (3) สารละลายบรรจุขวด 1, 4, 8 หรือ 16 ออนซ์
2. ดูการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารทำให้เจือจางได้ในภาคผนวก 5

## แบบฝึกหัดที่ 9

1. จงอธิบายทฤษฎีของการย้อมสีว่ามีกลไกการทำงานทางเคมีและฟิสิกส์อย่างไร  
(ตอบ : ดูข้อ 9.1)
2. แยกเส้นทิวเอเทอร์และสารช่วยย้อมสีติดมีกลไกการทำงานอย่างไร  
(ตอบ : ดูข้อ 9.2)
3. จงเปรียบเทียบหลักการย้อมสีแบบเมตาโครมาติกกับแบบพอลิโครมาติก พร้อมทั้งยกตัวอย่างด้วย  
(ตอบ : ดูข้อ 9.3.6 และ 9.3.7)
4. การย้อมสีขณะมีชีวิตทำโดยฉีดสารสีย้อมเข้าไปใน..... หรือ .....  
ที่ ..... โดยทั่วไปสัตว์ยังไม่ตายแต่อยู่ในสภาพสลบ  
(ตอบ : ดูข้อ 9.3.1)
5. การย้อมสีโดยตรงเป็นการย้อมสีที่ใช้สีย้อม ..... ย้อมแล้วติดสี .....  
แต่ความเข้ม-จางของสีในส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ .....  
(ตอบ : ดูข้อ 9.3.2 (1))
6. การย้อมสีทางอ้อมต้องใช้ ..... หรือ ..... มาเพิ่มเข้าไป  
กับสีย้อมปกติ  
(ตอบ : ดูข้อ 9.3.2 (2))
7. การทำให้เกิดเลคตินระหว่างสารช่วยย้อมสีติดและสีย้อม ควรเลือกวิธีการย้อมสีแบบใด
  1. การย้อมสีโดยตรง
  2. การซึมซาบ
  3. การย้อมสีแบบก้าวหน้า
  4. การย้อมสีแบบถอยหลัง
8. การตีฟเฟอเรนซีเอชันเป็นขั้นตอนหนึ่งของวิธีการย้อมสีแบบใด
  1. การย้อมสีทางอ้อม
  2. การย้อมสีแบบก้าวหน้า
  3. การย้อมสีแบบเมตาโครมาติก
  4. การย้อมสีแบบถอยหลัง
9. สารช่วยย้อมสีติดที่ไม่มีการทำงานของออกซิเดชันเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่สารใด
  1. แอมโมเนียมอะลัม
  2. เฟอริกอะลัม
  3. เกลือของโลหะหนัก
  4. เฟอริกคลอไรด์
10. สีย้อมที่ให้ปฏิกิริยามิวซ์เคมีคือสีย้อมชนิดใด
  1. แอซัวร์
  2. นิวส์เจน
  3. ยีมาทอกซิลิน
  4. ไรท์

(คำตอบ : ข้อ 7 ตอบ 2, ข้อ 8 ตอบ 4, ข้อ 9 ตอบ 1, ข้อ 10 ตอบ 2)