ภาคผนวก ก

Routine Meyer's hematoxylin and eosin stian

Meyer's hematoxylin

Hematoxylin crytals	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
Sodium iodate	0.2	กรัม
Ammonium หรือ potassium alum	50.0	กรัม
Citric acid	1.0	กรัม
Chloral hydrate	50.0	กรัม

ละลาย alum ในน้ำโดยไม่ต้องใช้ความร้อน เติม hematoxylin ลงไปและละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติม sodium iodate , citric acid และ chloral hydrate ลงไป คนจนสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายที่ได้จะเป็นสีม่วงแดง

1% stock alcoholic eosin

Eosin Y, water soluble	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	20.0	มิลลิลิตร
ละลาย และเติม		
Alcohol , 95%	80.0	มิลลิลิตร

Working eosin solution

Eosin stock solution	1	ส่วน
Alcohol , 80%	3	ส่วน

ก่อนใช้เติม glacial acetic acid 0.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน

วิธีการย้อม

1. Deparaffinize and hydrate to water
2. Meyer's hematoxylin 15 นาที

3. ล้างในน้ำประปา 20 นาที

4. Eosin 15 วินาที - 2 นาที (ขึ้นกับอายุของ eosin)

5. Dehydrate ใน alcohols 95% และ 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

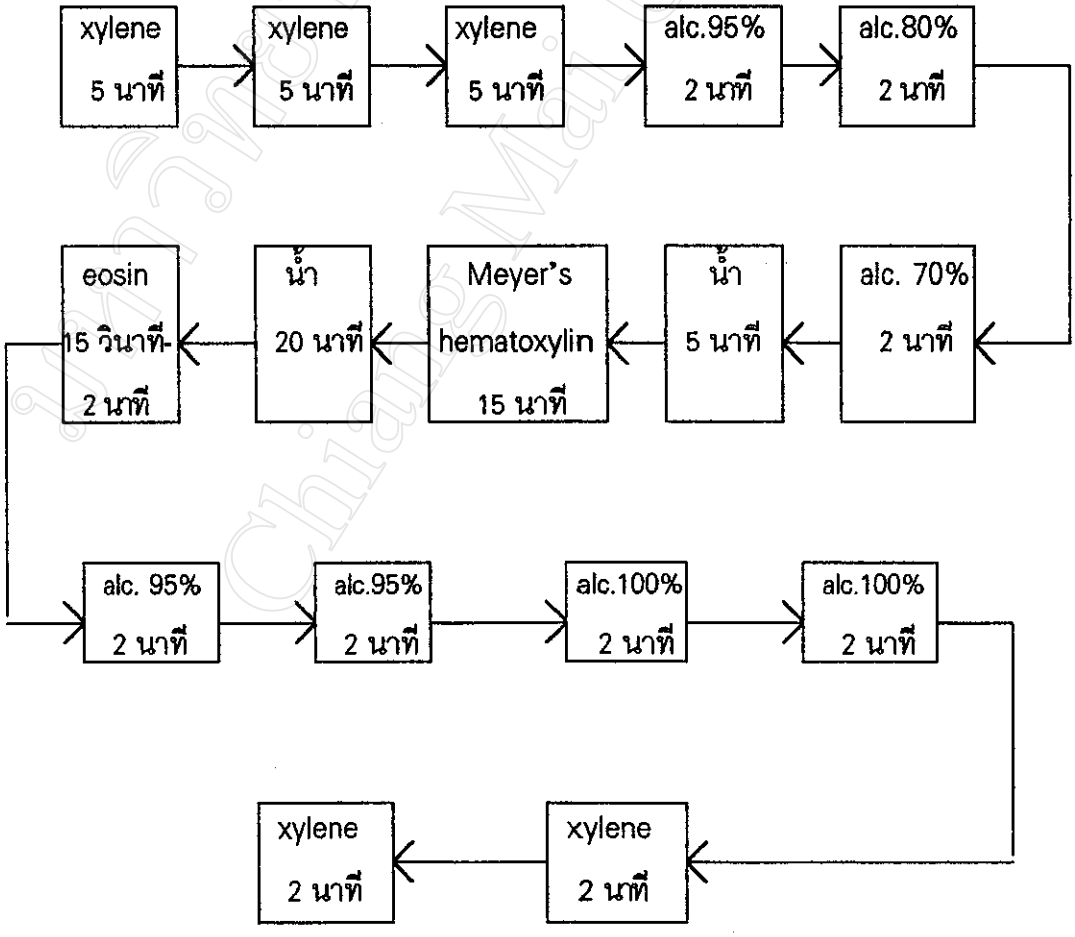
6. clear ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

7. mount ด้วยน้ำยา permount

ผลการย้อม

Nuclei	ติดสีฟ้า
Cytoplasm	ติดสีชมพู

สรุปขั้นตอนการย้อมสี Meyer's hematoxylin และ eosin



McManus' method for glycogen (PAS)

Normal hydrochloric acid solution

Hydrochloric acid, sp. gr. 1.19	83.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	916.5 มิลลิลิตร

Schiff reagent solution

ละลาย basic fuchsin 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนถึงจุดเดือด ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส นำไปกรอง แล้วเติม normal hydrochloric acid 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม anhydrous sodium bisulfite หรือ sodium metabisulfite 1 กรัม เก็บไว้ในที่มืด 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายเป็นสีเหลืองฟาง เก็บไว้ในตู้เย็น

การทดสอบ Schiff reagent solution

หยด Schiff reagent solution ลงใน 37-40% formaldehyde 10 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าสารละลายนั้นใช้การได้ดี แต่ถ้าปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นช้าและได้สีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าสารละลายใช้ไม่ได้

0.5% periodic acid solution

Periodic acid	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

0.2% light green solution (stock)

Light green , SF yellowish	0.2 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	0.2 มิลลิลิตร

Light green solution (working)

light green (stock)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อม

1. Deparaffinize and hydrate to water
2. periodic acid solution 5 นาที
3. จุ่มน้ำกลั่น
4. Schiff reagent solution 15 นาที
5. ล้างน้ำ 10 นาที จนกระทั่งเนื้อเยื่อมีสีชมพู
6. light green 2-3 วินาที
7. dehydrate ใน 95% alcohol , 100% alcohol และ clear ใน xylene อย่างละ 2 ครั้ง
8. mount ด้วยน้ำยา Permount

ผลการย้อม

Glycogen, mucin, reticulin, fibrin หรือ thrombi, colloid droplets, hyalin of arteriosclerosis, hyalin deposits in glomeruli, basement membranes, colloid ของ pituitary stalks และ thyroid, amyloid infiltration จะมี positive reaction คือติดสีชมพูถึงม่วงแดง

Nuclei	ติดสีฟ้า
Fungi	ติดสีแดง
Background	ติดสีเขียงจาง ๆ (ถ้าใช้ light green counterstaining)

Gomori's one step trichrome method

Bouin's solution

Picric acid , saturated aqueous solution	750.0 มิลลิลิตร
37-40% formalin	250.0 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50.0 มิลลิลิตร

Trichrome stain

Chromotrope 2R	0.6 กรัม
Aniline blue	0.3 กรัม
Glacial acetic acid	1.0 มิลลิลิตร
Phosphotungstic acid	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

Weigert's iron hematoxylin

Solution A

Hematoxylin crytals	1.0 กรัม
Alcohol , 95%	100.0 มิลลิลิตร

Solution B

Ferric chloride , 29% aqueous	4.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	95.0 มิลลิลิตร
Hydrochloric acid , concentrated	1.0 มิลลิลิตร

Working solution

นำ solution A และ solution B มาผสมกัน ในอัตราส่วนที่เท่ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

<u>วิธีการย้อม</u>

1. Deparaffinize and hydrate to water
2. ใส่ใน Bouin's solution ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. ล้างน้ำจนกระทั่งสีเหลืองหายไป
4. ย้อม nuclei ด้วย Weigert's iron hematoxylin 10 นาที
5. ล้างน้ำ
6. Trichrome stain 15-20 นาที
7. จุ่มใน 0.5% gracial acetic water 2 นาที ถ้า section เข้มเกินไป ให้จุ่มใน 1%gracial acetic water ที่มี phosphotungstic acid อยู่ 0.7 กรัม
8. จุ่มในน้ำกลั่น
9. dehydrate ใน 95% alcohol , 100% alcohol และ clear ใน xylene อย่างละ 2 ครั้ง
10. mount ด้วยน้ำยา Permount

<u>ผลการย้อม</u>

Muscle fibers	ติดสีแดง
Collagen	ติดสีฟ้า
Nuclei	ติดสีฟ้าถึงดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

การวัดความสูงของ epithelial cells

การวัดความสูงของเซลล์นี้ กระทำได้โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า micrometer ซึ่งประกอบด้วย ocular และ stage micrometer

Ocular micrometer เป็นแผ่นแก้วกลมใส ตรงกลางจะมีสเกลพร้อมตัวเลขกำกับ ซึ่งไม่ทราบขนาดของสเกลที่แน่นอน

Stage micrometer ลักษณะเหมือนสไลด์ ตรงกลางเป็นสเกลที่วัดไว้แน่นอนแล้วคือ แต่ละเส้น (1 ช่อง) จะห่างกัน 0.01 มม. stage micrometer นี้ใช้เป็นมาตรฐานในการคำนวณหาขนาดของสเกลบน ocular micrometer

ในการคำนวณหาขนาดของสเกลบน ocular micrometer นั้น ทำได้ดังนี้

1. ใส่ ocular micrometer ลงใน eyepiece ของกล้องจุลทรรศน์
2. วาง stage micrometer ลงบน stage ของกล้อง
3. ปรับปุ่มปรับภาพเพื่อให้เห็นสเกลของ stage micrometer ชัดเจน
4. เลื่อน ocular และ stage micrometer ให้สเกลของทั้งสองมาอยู่ขนานกัน และให้บางส่วนเชื่อมต่อกันหรือทับกันดังรูป ให้เส้นแรกของสเกลของ ocular micrometer ทับกับเส้นแรกของสเกลของ stage micrometer ทางซ้ายมือ
5. นับไปทางขวามือดูว่าเส้นที่เท่าไรต่อไปของ micrometer ทั้งสองทับกันอีก
6. เนื่องจากเราทราบระยะระหว่างเส้นบน stage micrometer เราจึงสามารถหาระยะระหว่างเส้นบน ocular micrometer ได้โดยการคำนวณ

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า 25 ช่องของ ocular micrometer เท่ากับ 65 ช่อง ของ stage micrometer จึงคำนวณหาขนาดของ ocular micrometer ได้ โดยเราทราบแล้วว่า 1 ช่อง ของ stage micrometer เท่ากับ 0.01 มม.

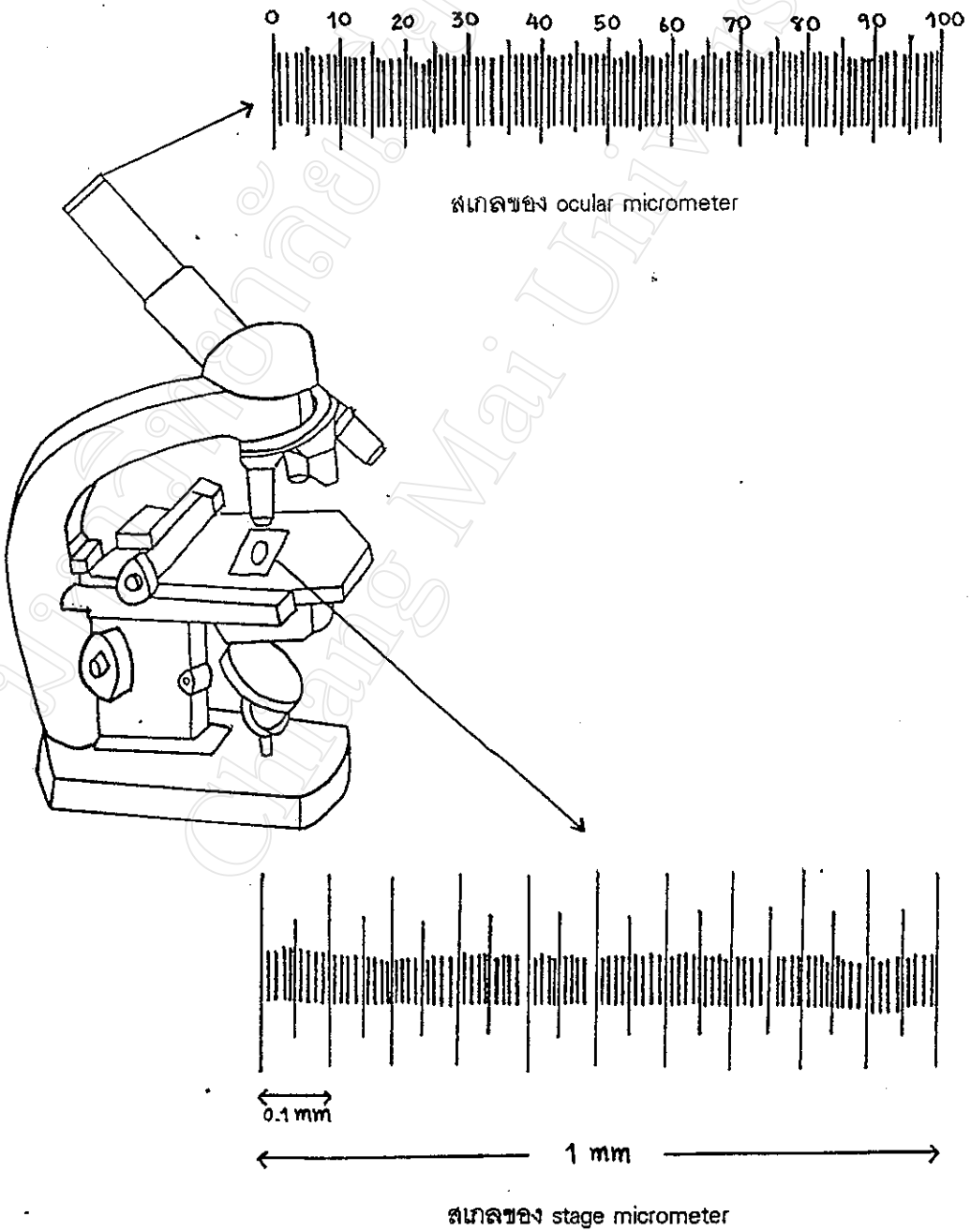
ดังนั้น 25 ช่อง ของ ocular micrometer = 65 X 0.01 มม.

เพราะฉะนั้น 1 ช่อง ของ ocular micrometer = $\frac{65 \times 0.01}{25}$ มม.

= 0.026 มม.

= 26 ไมโครเมตร

แสดงว่า เมื่อเราดูด้วยกำลังขยายต่ำ (40 เท่า) 1 ช่องของ ocular micrometer จะเท่ากับ 26 ไมโครเมตร แต่ในการศึกษาครั้งนี้ เราทำการวัดที่กำลังขยายสูง (400 เท่า) ดังนั้น 1 ช่องของ ocular micrometer จะมีขนาดเท่ากับ 2.6 ไมโครเมตร เมื่อเราทราบขนาดของ 1 ช่องของ ocular micrometer แล้ว เราก็นำค่าที่เราวัดได้เป็นจำนวนช่องของ ocular micrometer มาคูณกับ 2.6 ก็จะได้ความสูงจริงของเซลล์



รูป 38 แสดงสเกลของ ocular micrometer และ stage micrometer (มรกต, 2532)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวหทัยรัตน์ เครือไวศยวรรณ
วัน เดือน ปี เกิด	29 กันยายน 2514
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ที่โรงเรียนสตรีนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ เมื่อปีการศึกษา 2528
	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนสตรีนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ เมื่อปีการศึกษา 2531
	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิชาเอกกายภาพบำบัด จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2535

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University