ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารและการย้อมเซลล์

1. Routine Mayer's Hematoxylin and Eosin stain (H&E)

Solution

1. Mayer's hematoxylin solution

Ammonium หรือ potassium alum	50.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.
Hematoxylin crystals	1.0	gm.
Sodium iodate	0.2	gm.
Citric acid	1.0	gm.
Chloral hydrate	50.0	gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย alum ใน distilled water ด้วย magnetic stirrer โดยไม่ใช้ความร้อน
2. ใส่ hematoxylin crystals ลงไป แล้วละลายให้เข้ากัน แล้วเติม sodium iodate citric acid และ choral hydrate ลงไป คนจนสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายสีม่วงแดง

2. Eosin solution

1% stock alcoholic eosin

Eosin Y, water soluble	1.0	gm.
Distilled water	20.0	gm.
95% alcohol	80.0	ml.

ละลาย eosin Y ใน distilled water ให้เข้ากัน แล้วเติม 95% alcohol

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Working eosin solution

Eosin stork solution	1	ส่วน
80% alcohol	3	ส่วน

เติม glacial acetic acid 0.5 ml. ต่อ working solution 100 ml. ก่อนนำไปใช้

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออกโดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95% , 80% , 70% และน้ำปะปา ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. ย้อมด้วย Mayer' s hematoxylin นาน 15 นาที
4. ล้างใน running tap water นาน 20 นาที
5. Counterstain ด้วย working eosin solution นาน 15 วินาที-2 นาที โดยจุ่มสไลด์ขึ้นลงก่อนแช่ในสารละลาย
6. Dehydration ด้วย alcohol 95%, 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
7. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
8. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Nuclei	ติดสีฟ้า
Cytoplasm	ติดสีชมพูถึงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2. Masson' s Trichrome stain (MSB)

Solution :

1. Bouin 's solution

Saturated aqueous piric acid solution	750.0	ml.
37% -40% formalin	250.0	ml.
Glacial acetic acid	50.0	ml.

2. Weigert 's iron hematoxylin working solution

Stock solution A

Hematoxylin	1.0	gm.
Ethyl alcohol 95%	100.0	ml.

Stock solution B

Ferric chloride 29.5%	4.0	ml.
Distilled water	95.0	ml.
Concentrated hydrochloric acid	1.0	ml.

3. Biebrich Scarlet – acid fushsin

Biebrich Scarlet, 1% aqueous	90.0	ml.
Acid fushsin, 1% aqueous	10.0	ml.

4. Phosphomolybdic – phosphotungstic acid solution

Phosphomolybdic acid	5.0	gm.
Phosphotungstic acid	5.0	gm.
Distilled water	200.0	ml.

5. Aniline blue solution

Aniline blue	2.5	gm.
Glacial acetic acid	2.0	ml.
Distilled water	100.0	ml.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

6. Light green solution

Light green	5.0	gm.
Glacial acetic acid	2.0	ml.
Distilled water	250.0	ml.

7. 1% Glacial acetic acid

Glacial acetic acid	1.0	ml.
Distilled water	99.0	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. ละลาย paraffin ออก โดยใช้ xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
2. Hydration ด้วย alcohol 95% , 80% , 70% และน้ำปะปา ครั้งละ 2 นาที ตามลำดับ
3. ถ้า fixation ด้วย formalin ให้แช่สไลด์เนื้อเยื่อด้วย Bouin 's solution ในตู้อบอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง
4. นำออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 10 นาที
5. ล้างด้วย running tap water จนกระทั่งสไลด์เนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง
6. ย้อมด้วย Weigert 's iron hematoxylin นาน 10 นาที
7. ล้างใน running tap water นาน 10 นาที แล้วนำไปจุ่มในน้ำกลั่น
8. ย้อมด้วย Biebrich Scarlet – acid fushsin นาน 2 นาที แล้วเก็บสารละลายไว้
9. จุ่มใน distilled water
10. ย้อมด้วย Phosphomolybdic – phosphotungstic acid นาน 10-15 นาที แล้วทิ้งสารละลาย
11. Counterstain ด้วย aniline blue นาน 5-10 นาที หรือ light green solution 1 นาที
12. จุ่มใน distilled water

13. ถ้า counterstain ด้วย aniline blue แช่ใน 1% glacial acetic acid นาน 3-5 นาที แต่ถ้า counterstain ด้วย light green solution ให้แช่ใน 5% phosphotungstic acid solution 15 นาที
14. Dehydration ด้วย alcohol 95%, 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
15. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
16. Mount ด้วย permount

ผลการย้อม

Nuclei	ติดสีดำ
Muscle , cytoplasm	ติดสีแดง
Collagen	ติดสีน้ำเงิน (ถ้าใช้ light green solution ติดสีเขียว)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

3. Alcian Blue Periodic Acid Schiff reagent method (AB-PAS)

Solution :

1. 1% Periodic acid solution

Periodic acid	1.0	gm.
Distilled water	100.0	ml.

2. Schiff reagent solution

Basic fuchsin	1.0	gm.
Distilled water	200.0	ml.
Normal hydrochloric acid	20.0	ml.
Sodium bisulfite anhydrous		
หรือ sodium metabisulfite	1.0	gm.

วิธีเตรียมสารละลาย

1. ละลาย basic fuchsin ในน้ำกลั่นที่ร้อน แล้วนำไปต้มจนเดือด
2. ยกลงแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง
3. เติม normal hydrochloric acid แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติม sodium bisulfite anhydrous หรือ sodium metabisulfite
5. เก็บไว้ในที่มืดประมาณ 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองฟาง แล้วเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น

การทดสอบ Schiff reagent soluton

นำสารละลาย Schiff reagent ไปหยดใน 37-40% formaldehyde 10 ml. ถ้าสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงแดงทันที แสดงว่าสารละลายนี้ใช้ได้

3. Alciam blue solution pH 2.5

Alcian blue , 8GX	1.0	gm
3% Glacial acetic acid	100.0	ml.

ปรับให้สารละลายมี pH.5 แล้วกรอง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4. 0.5% Sodium metabisulfite solution

Sodium metabisulfite	0.5	gm.
Distilled water	100.0	ml.

ขั้นตอนการย้อม

1. Deparaffinize และ hydrate
2. Alcian blue solution 30 นาที
3. ล้างด้วยน้ำนาน 5 นาที
4. oxidize ด้วย 1% periodic acid solution 10 นาที
5. ล้างใน running water 5 นาที
6. Schiff reagent นาน 10 นาที
7. Rinse ด้วย sodium metabisulfite solution 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที
8. ล้างใน running water 10 นาที
9. Dehydrate ด้วย 95% 100% alcohol
10. Clear ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

ผลการย้อม

Polysaccharide และ mucosubstance	ติดสีแดงหรือม่วงแดงเข้ม
Hyaluronic acid	ติดสีน้ำเงิน

4. **การย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโน** (Immunohistochemistry method)
เทคนิค Labelled Streptavidin-Biotin Method

ขั้นตอนการย้อม

1. ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัด (microtome) โดยให้เนื้อเยื่อมีความหนาประมาณ 3 ไมโครเมตร ใช้สารเคลือบสไลด์เพื่อป้องกันการหลุดของสไลด์
2. เขียนหมายเลขสไลด์ พร้อมชนิดของแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา
3. นำสไลด์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อให้เนื้อเยื่อติดกับสไลด์ได้ดีขึ้น

4. แบ่งสไลด์ออกเป็นกลุ่ม ในการย้อมจะต้องมีสไลด์ควบคุมทุกครั้ง ทั้งที่เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control) อาจจะใช้แอนติบอดีคนละชนิดแทนหรือไม่ใส่แอนติบอดีที่ต้องการศึกษาบนสไลด์
5. นำสไลด์ที่ย้อมมาละลายพาราฟินออก โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
6. นำสไลด์มาผ่าน Isopropyl alcohol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
7. นำสไลด์แช่ใน 3% H_2O_2 ใน methanol เป็นเวลา 15-20 นาที
8. นำสไลด์มาผ่าน 95% alcohol และ 70% alcohol อย่างละ2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ตามลำดับ
9. ล้างด้วยน้ำประปาและแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที
10. นำสไลด์มาคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval treatment) โดยใช้ความร้อนจากตู้ไมโครเวฟ โดยนำสไลด์ใส่ rack พลาสติก จุ่มใน plastic staining dish ซึ่งบรรจุ 0.01M citric buffer pH 6.0 โดยให้ buffer ท่วมสไลด์ประมาณ 1 นิ้ว
11. นำ staining dish เข้าตู้ไมโครเวฟ (Amana, 1000 watt) ตั้งอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส โดยใช้ temperature probe ใช้เวลา 20 นาที
12. นำสไลด์ออกจากตู้ไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที
13. ล้างน้ำกลั่น 5 นาที
14. ใช้ปากกา water Repelling Pen (Hydrophobic Marker) วงรอบชิ้นเนื้อเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำยาไหลออกนอกชิ้นเนื้อ
15. นำสไลด์มาแช่ใน washing buffer (Tris-PBS-Tween) 5 นาที
16. เช็ดสไลด์รอบๆ ชิ้นเนื้อให้แห้ง หยด blocking protein (2.5% bovine serum albumin) 1-2 หยดหรือจนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 20 นาที วางสไลด์ในแนวนอนในกล่องเก็บความชื้น
17. เท blocking protein ทิ้ง เช็ดสไลด์ให้แห้ง หยด primary antibody ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ monoclonal antibody ต่อ human Epithelial Menbrane Antigen (EMA) ,clone E29 (DAKO M613)) dilution 1:1000 จำนวน 1-2 หยด โดยให้แผ่กระจายทั่วทั้งชิ้นเนื้อ ทิ้งไว้ค้างคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) ในการย้อมแต่ละครั้งต้องมีสไลด์ควบคุมผลบวก (positive control)

ควบคู่ไปด้วย (การศึกษาครั้งนี้ใช้ renal cancer) สำหรับสไลด์ควบคุมที่ให้ผลลบ (negative colntrol slide) ไม่ต้องหยด primary antibody

18. ล้างสไลด์ด้วย buffer 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
19. เช็ดรอบๆ สไลด์ หยด biotinylated secondary antibody ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ Rabbit anti mouse immunoglobulin biotinylate rabbit $F(ab')_2$ (DAKO E413) เจือจาง 1: 400 ใช้เวลา 30 นาที
20. ล้างสไลด์ใน buffer 2 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
21. เช็ดรอบสไลด์ให้แห้ง หยด streptavidin/horseradish peroxidase conjugate (DAKO P397) เจือจาง 1:800 ทิ้งไว้ 30 นาที
22. ล้างสไลด์ใน buffer 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
23. หยด substrate และ chromogen โดยใช้ 0.02%H_2O_2 และ DAB 1 mg/ml ประมาณ 10 นาที ตรวจดูสีที่เกิดขึ้นในสไลด์ควบคุมที่ให้ผลบวก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา
24. ย้อมทับด้วยสี hematoxylin 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น
25. Dehydrate จาก alcohol 95% Isopropyl alcohol และ clearing ด้วย xylene
26. Mount สไลด์ด้วย permount
27. ปิดฉลากหมายเลขสไลด์และชนิดของการย้อม

การเคลือบสไลด์ด้วย Aminopropyltriethoxysilane

1. ล้างสไลด์ใน acetone 5 นาที
2. จุ่มใน 2% Aminoproplytriexysilane ใน acetone 5 นาที
3. ล้างใน acetone 2 ครั้ง
4. ล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
5. อบให้แห้งในตู้อบ

การเตรียมน้ำยาต่าง ๆที่ใช้ในการย้อม

Substrate solution

DAB (1 mg/ml) และ 0.02% H_2O_2

- ละลาย 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride 10 mg. ใน 0.5 tris-HCl 10 ml.
- เติม 3% H_2O_2 75 ml.
- ผสมให้เข้ากัน
- หยดลงไปบนชิ้นเนื้อ 3-4 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที
- ดูสีที่เกิดขึ้น เททิ้ง ล้างน้ำ

สารละลาย DAB+H_2O_2 ควรเตรียมใหม่ ไม่ควรเกิน 1-2 ชั่วโมง ควรเตรียม DAB เป็น stock solution ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น แล้วนำมาเจือจางก่อนใช้

การเตรียม Buffer

1) 0.05 M Tris-HCl pH 7.6

- ละลาย Tris (Tris hydroxymethyl aminomethane) 6.1 gm. ในน้ำกลั่น 500 ml.
- ปรับ pH ให้ได้ 7.6 โดยใช้ 1N HCl (ประมาณ 37 ml.) เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

2) 0.01M Phosphate Buffer saline (PBS) pH 7.4

- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 :$2H_2O$)	1.42	gm.
- Sodium Dihydrogen Phosphate (NaH_2Po4H_2O)	0.277	gm.
- NaCl	8.5	gm.
- distilled water	1,000.0	ml.

3)Tris-PBS buffer (washing buffer)

- 0.05M Tris buffer	1	ส่วน
- 0.01M PBS	9	ส่วน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

4)0.01M Citrate buffer pH 6.0 สำหรับการทำ microwave antigen retrieval treatment

- Citric acid monohydrate	2.1	gm.
- distilled water	900.0	ml.

ปรับ pH ด้วย NaOH ประมาณ 13 ml. ให้ได้ pH 6.0 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงการวิเคราะห์ข้อมูล

ตาราง 9 แสดงจำนวน Principal cell ในแต่ละบริเวณของ collecting duct ในไตมนุษย์

ไต	บริเวณ			
	CCD	OSOMCD	ISOMCD	IMCD
1	877	948	726	613
2	801	926	771	603
3	830	850	669	634
4	872	860	679	689
5	877	885	695	575
6	865	942	717	620
7	815	883	696	643
8	819	838	869	509
9	885	950	721	543
10	897	910	710	580
11	837	923	682	610
12	796	891	633	600
13	900	906	709	567
14	900	907	730	671
15	874	916	771	656
16	818	892	789	687
17	839	899	765	683
18	815	898	737	700
19	973	945	712	657
20	817	895	760	672

ตาราง 10 แสดงการเปรียบการกระจายตัวของ principal cell ทั้ง 4 บริเวณของ collecting duct ในไตมนุษย์ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One -Way ANOVA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	952705.64	3	317568.55	193.952	0.00
Within Groups	1244390.35	76	1637.360		
Total	1077145.0	79			

ตาราง 11 แสดงค่า Multiple comparision เปรียบเทียบการกระจายตัวของ principal cell เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละบริเวณโดยวิธีของ Dunnett ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

(I)Type Area	(J)type Area	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95%Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CCD	OSOMCD	-52.85*	12.80	0.00	-81.91	-23.79
	ISOMCD	131095*	12.80	0.00	99.36	164.54
	IMCD	224.75*	12.80	0.00	185.20	264.30
OSOMCD	CCD	52.85*	12.80	0.00	23.79	81.91
	OSOMCD	184.80*	12.80	0.00	153.62	215.98
	ISOMCD	277.60*	12.80	0.00	239.11	316.09
ISOMCD	CCD	-131.95*	12.80	0.00	-164.54	-99.36
	OSOMCD	-184.80*	12.80	0.00	-215.98	-153.62
	ISOMCD	92.80*	12.80	0.00	51.84	133.76
IMCD	CCD	-224.75*	12.80	0.00	-264.30	-185.20
	OSOMCD	-277.60*	12.80	0.00	-316.09	-239.11
	ISOMCD	-92.80*	12.80	0.00	-133.76	-51.84

* The mean difference is significant at the 0.05 level

ตาราง 12 แสดงจำนวน intercalated cell ในแต่ละบริเวณของ collecting duct ในไตมนุษย์

ไต	บริเวณ			
	CCD	OSOMCD	ISOMCD	IMCD
1	123	52	274	387
2	199	74	229	397
3	170	150	331	366
4	128	140	321	311
5	123	115	305	425
6	135	58	283	380
7	185	117	304	357
8	181	162	304	491
9	115	50	279	457
10	103	90	290	420
11	163	77	318	390
12	204	109	367	400
13	100	94	291	433
14	100	93	370	329
15	126	84	229	344
16	182	108	211	313
17	161	101	235	317
18	185	102	263	300
19	127	55	288	343
20	183	105	240	328

ตาราง 13 แสดงการเปรียบเทียบการกระจายตัวของ intercalated cell ทั้ง 4 บริเวณของ collecting duct ของไตมนุษย์ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	952705.64	3	317568.55	193.952	0.00
Within Groups	124439.35	76	1637.360		
Total	1077145.0	79			

ตาราง 14 แสดงค่า Multiple comparision เปรียบเทียบการกระจายตัวของ intercalated cell ในแต่ละบริเวณของ collecting duct โดยใช้วิธีทดสอบของ Dunnett ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

(I)Type Area	(J)type Area	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95%Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CCD	OSOMCD	52.85*	12.80	0.00	23.79	81.91
	ISOMCD	-131095*	12.80	0.00	-164.54	-99.36
	IMCD	-224.75*	12.80	0.00	-264.30	-185.20
OSOMCD	CCD	-52.85*	12.80	0.00	-81.91	-23.79
	OSOMCD	-184.80*	12.80	0.00	-215.98	-153.62
	ISOMCD	-277.60*	12.80	0.00	-316.09	-239.11
ISOMCD	CCD	131.95*	12.80	0.00	99.36	164.54
	OSOMCD	184.80*	12.80	0.00	153.62	215.98
	ISOMCD	-92.80*	12.80	0.00	-133.76	-51.84
IMCD	CCD	224.75*	12.80	0.00	185.20	264.30
	OSOMCD	277.60*	12.80	0.00	239.11	316.09
	ISOMCD	92.80*	12.80	0.00	51.84	133.76

* The mean difference is significant at the 0.05 level

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวขนิษฐา ทองรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	31 กรกฎาคม 2517
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี เมื่อปีการศึกษา 2535
	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิชาเอกกายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา2539

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University