วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

1. หนู mice แยกเพศ 2 กลุ่มๆละ 6 ตัว นำไปไว้ในโรงงานยางเป็นเวลานาน 10 เดือน
2. หนู mice กลุ่มควบคุมจำนวน 6 ตัวเลี้ยงไว้ในเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง
3. หนูทั้งหมดได้รับอาหารและการเปลี่ยนกรงเหมือนกัน

การวิเคราะห์เนื้อเยื่อ

เมื่อครบกำหนด 10 เดือนที่นำหนูเลี้ยงไว้ในโรงงานยางแล้ว หนูทั้งหมดถูกนำมาฆ่าโดยวิธี spinal shock และเก็บตัวอย่างโดยทำ perfusion ของหลอดลมและปอดโดยใช้ 0.1 M phosphate buffer และ 4% paraformaldehyde

ตัดหลอดลมที่ผ่านการ perfusion เป็นชิ้นเล็ก ๆ ดองไว้ใน 4% paraformaldehyde 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงตัดชิ้นเนื้อของสัตว์ทดลองโดยตัดออกมาจากหลอดลมตำแหน่งเดียวกัน นำชิ้นเนื้อที่ได้มาผ่านกระบวนการในการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

1. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M Phosphate buffer 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที
2. Dehydrate ด้วย 35%, 70%, 95% และ Absolute Ethanol แต่ละขั้นตอนใช้ เวลาขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง และแช่ตัวอย่างใน Absolute Ethanol อีก 1 ครั้ง ใช้เวลา 2 ชั่วโมง
3. Clearing โดยใช้ Xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 ชั่วโมง
4. Infiltrate ใน Paraffin ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง โดยใช้เวลา 2 ชั่วโมง 2 ครั้งและครั้งที่ 3 ใช้เวลา 24 ชั่วโมง
5. Embedding โดยใช้ Paraffin ใส่ลงใน block พลาสติกที่มีเนื้อเยื่อวางอยู่
6. นำไปตัดตัวอย่างวางลงบนสไลด์แก้ว

7. นำสไลด์ที่ติดตัวอย่างแล้วไปผ่านกระบวนการย้อมด้วยสี Haematoxylin & Eosin

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

1. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M Phosphate buffer 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที
2. Postfixation ด้วย 1% OsO_4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ล้างเนื้อเยื่อด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
4. นำไปย้อมด้วย 2% uranyl acetate 1 ชั่วโมง
5. ผ่านกระบวนการ Dehydrate 35 %, 70 %, 95 % และ Absolute Ethanol 2 ครั้ง แต่ละขั้นตอนใช้เวลาขั้นตอนละ 15 นาที
6. Infiltrateโดยใช้สารผสมระหว่าง Ethanol และ spurr ในอัตราส่วน 3:1 , 1:1 , 1:3 อย่างละ 1 ครั้งและใช้ pure spurr 2 ครั้ง แต่ละขั้นตอนใช้เวลา 0.5, 1, 1.5, 24 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
7. Embed เนื้อเยื่อใน spurr ณ.อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
8. นำเนื้อเยื่อที่ Embed เรียบร้อยแล้วมาทำ Thick section เพื่อเลือกบริเวณที่ต้องการศึกษา
9. เมื่อเลือกบริเวณที่ก้องการศึกษาได้แล้ว จึงทำ Thin section และนำไปวางบน grid
10. นำ grid ที่ได้ไปย้อมด้วย Uranyl acetate 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมด้วย Lead citrate 10 นาที
11. นำ grid ที่ผ่านการย้อมแล้วล้างด้วย 0.2 N NaOH 30 วินาที
12. ล้าง grid ด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

1. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M Phosphate buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
2. Postfixation ด้วย 1% OsO_4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. ล้างเนื้อเยื่อด้วย น้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
4. Dehydrate 35%, 70%, 95% และ Absolute Ethanol 2 ครั้งแต่ละขั้นตอนใช้เวลาขั้นตอนละ 15 นาที
5. นำไปทำ critical-point drying โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเป็น transitional fluid
6. นำตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วไปติดบน stub โดยใช้กาวผสมโลหะเงิน
7. นำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยทอง
8. นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด