ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุ วิธีการ และขั้นตอนดำเนินการ

วัสดุ

1. กลุ่มประชากร

ผู้ป่วยคนไทยที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชม. ในช่วง ส.ค.2533 - ม.ค.2534 ประมาณ 20 คน มีคุณสมบัติดังนี้

1.1 อายุระหว่าง 15-70 ปี

1.2 มี normal looking oral mucosa ไม่มีรอยโรค เช่น แผล หรือ leucoplakia

1.3 ไม่ได้รับ immunosuppressive drugs มาก่อน

1.4 ไม่มี underlying autoimmune disease

2. เครื่องมือในการตัดชิ้นเนื้อ ประกอบด้วย punch biopsy, forceps, กรรไกร, เข็มและไหมเย็บแผล

3. ตู้แช่ชิ้นเนื้อ อุณหภูมิ -70°C.

4. Incubator 37°C.

5. Immunohistochemistry agent สำหรับย้อมโดย ATPase Technique

6. Monoclonal antibody : OKT6

7. Optical grid

วิธีการ

1. ตรวจประวัติผู้ป่วยที่เสียชีวิตไม่เกิน 24 ชม. คัดเลือกตาม criteria บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับผู้ป่วย เช่น เพศ, อายุ

2. ทำ punch necropsy ขนาด 4 mm. จากบริเวณดังต่อไปนี้ ตำแหน่งละ 2 ชิ้น

2.1 Hard palate

2.2 Upper labial mucosa

2.3 Lower labial mucosa

2.4 Buccal mucosa

3. นำชิ้นเนื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C. จนกว่าจะนำมา stain ชิ้นเนื้อ

4. นำชิ้นเนื้อที่ 1 มาทำการย้อมด้วยวิธี modified adenosine triphosphatase technique

ส่วนชิ้นที่ 2 นำมาทำ cryosection แล้วย้อมโดยใช้ peroxidase conjugated avidin staining method with monoclonal antibody OKT6

5. เมื่อทำการย้อมเซลเสร็จแล้วจึงนำมานับโดยใช้ optical grid ดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา และคำนวณจำนวนเซลต่อความยาวของ epidermis (mm.) และต่อพื้นที่ (mm^2)

6. รวบรวมข้อมูล นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติและเขียนรายงาน

Modified ATPase Histochemistry

1. นำชิ้นเนื้อมาแช่ใน EDTA ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8.4H_2O$) ทิ้งไว้ตลอดคืน

2. นำชิ้นเนื้อจาก 1. มาแยก epidermis ออกจาก connective tissue โดยใช้ forceps แล้วเข้าสู่ process

3. ล้างชิ้นเนื้อใน normal saline ที่อุณหภูมิห้อง 3 ครั้ง

4. Fixed ใน fresh 4% paraformaldehyde, pH 7.4, 7% sucrose ที่ 4°C. นาน 1 ชั่วโมง

5. ล้างใน normal saline ที่อุณหภูมิห้อง 3 ครั้ง

6. Incubate ชิ้นเนื้อใน Fresh solution of 0.5 mM. ATP (Sigma A-5394), 2.2 mM Lead nitrate, 10 nM Magnesium sulfate and 0.09 M Trismal/Sucrose buffer pH 7.6 ที่ 37°C. นาน 1 ชั่วโมง

7. ล้างใน normal saline 3 ครั้ง

8. ใส่ชิ้นเนื้อใน diluted ammonium sulfide (2 drops 20% ammonium sulfide in 50 ml. distilled water) นาน 5 นาที

9. ล้างใน distilled water 3 ครั้ง

10. mount บน slide โดยเอาด้านที่เป็น basal surface สู่ด้านบนปิดด้วย coverslip โดยใช้ univert mountant aqueous solution (product No.36118 : BDH company)

การย้อมชิ้นเนื้อด้วย monoclonal antibody OKT6 โดยวิธี peroxidase conjugated avidin

การเตรียมชิ้นเนื้อ

1. นำชิ้นเนื้อมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ cryostat ให้ได้ชิ้นเนื้อขนาด 4 ไมครอนวางบน slide สำหรับตรวจชิ้นเนื้อทั่วไป

2. นำ slide ที่มีชิ้นเนื้อแล้วไปแช่ใน acetone นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

3. แช่ใน 0.6% H_2O_2 ผสมกับ methanol เป็นเวลา 20 นาที

วิธีย้อม

4. ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) นาน 5 นาที

5. ใส่ normal horse serum (CWLTH serum labs, MELB., Australia) ซึ่ง dilute 1 : 30 เป็นเวลานาน 20 นาที

6. ใช้เครื่องดูด (suction) ดูด normal horse serum ออก

7. ใส่ mouse monoclonal antibody DAKO T-6 (M 721) diluted 1:50 นาน 45-60 นาที

8. เคาะ slide เอา DAKO T-6 ออก แล้วแช่ใน PBS นาน 5 นาที

9. ใส่ biotinylated horse antimouse IgG (BA 2001 : vector company laboratories) diluted 1:250 นาน 20-30 นาที

10. เคาะ slide เอา biotinylated Ab ออก แล้วแช่ใน PBS 5 นาที

11. ใส่ peroxidase conjugated avidin (Dakopatts code no. P364) diluted 1:250 นาน 20-30 นาที

12. เคาะ slide เอา peroxidase conjugated avidin ออก แล้วแช่ใน PBS นาน 5 นาที

13. ใส่ peroxidase substrate chromogen (DAB : Sigma D-5637) นาน 5-15 นาที แล้วดูดด้วยเครื่องดูดออก

14. ล้างในน้ำกลั่น

15. นำ slide ไป counterstain ด้วย hematoxylin

16. ปิดชิ้นเนื้อด้วย coverslip โดยใช้ permount (Fisher scientific company)

<u>วิเคราะห์ข้อมูล</u>

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ range, mean และ standard deviation นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้ one-way analysis of variance โดยกำหนดให้ p-value < 0.05 จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย