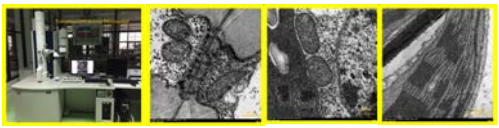
เทคนิคการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



พัชรี อำรุง
นักวิทยาศาสตร์
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

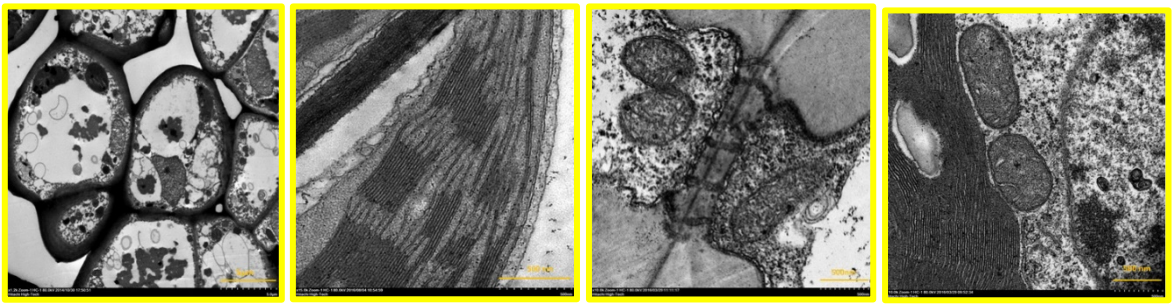
การศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ของพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) มีหลักสำคัญคือ ตัวอย่างต้องบางมากพอที่ลำอิเล็กตรอนผ่านได้เพราะภาพที่ได้เกิดจากการหักเหหรือเบี่ยงเบนของลำอิเล็กตรอนที่ผ่านตัวอย่างไปในมุมที่แตกต่างกันทำให้ความเข้มของอิเล็กตรอนที่ปรากฏบนชุดถ่ายทอดสัญญาณภาพแตกต่างกัน ภาพที่ได้เป็นสองมิติ สำหรับการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นพบว่า ในไซโทพลาซึมมีโครงสร้างขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เฉพาะเรียกว่า ออร์แกเนลล์ (organelle) มีหลายขนาด รูปร่าง จำนวน และหน้าที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ซึ่งจะประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานที่คล้ายคลึงกัน

การนำเทคนิคการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อวัตถุประสงค์ให้เนื้อเยื่อคงสภาพรูปร่างใกล้เคียงกับเมื่อยังมีชีวิตอยู่และแข็งแรงทนต่อการตัดตัวอย่างที่มีความหนาในช่วง 60 ถึง 90 นาโนเมตร บทความนี้กล่าวถึงวิธีการเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ (Cell Ultra structure) ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีการใช้สารเคมีเข้าช่วยในการคงสภาพเนื้อเยื่อดังนั้นการตัดเนื้อเยื่อพืช (Cutting) เป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งตัวอย่างควรมีขนาด 1x2 มิลลิเมตร เพื่อให้สารเคมีแทรกซึมเข้าในเซลล์ในระยะเวลารวดเร็วในขั้นตอนการคงสภาพเนื้อเยื่อพืช (Fixation) โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด และหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) เมื่อเซลล์ตายโดยทำการคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยสารเคมี 2 ชนิด (Double Fixation) สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งแรกซึ่งเป็นสาร ในกลุ่ม aldehyde ใช้ glutaraldehyde ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ดีกับโปรตีน สำหรับคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 ใช้ osmium tetroxide ทำปฏิกิริยาได้ดีกับไขมัน เนื่องจากสาร ทั้ง 2 ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในเซลล์ต่างกัน การใช้สารทั้ง 2 ชนิดได้ผลดีกว่าการใช้สารหนึ่งสารใดเนื่องจากสามารถรักษาองค์ประกอบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ดี การล้างเนื้อเยื่อพืช (Washing) หลังจากทำการคงสภาพเนื้อเยื่อซึ่งเป็นการป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำยาดองกับ Dehydration agent และระหว่างน้ำยาดองด้วยกัน ในกรณีที่ทำ double fixation สารดังกล่าวอาจทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนขนาดเล็กขึ้นในเซลล์ได้ สารที่ใช้ล้างควรเป็นชนิดเดียวกับตัวทำละลายในน้ำยาดอง ขั้นตอนการกำจัดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ทำการแทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วยอินทรีย์สารเช่น acetone หรือ ethanol เพราะพลาสติกที่ใช้ในขั้นตอนต่อไปไม่สามารถละลายในน้ำได้จะแยกตัวกันทำให้ขั้นตอนต่อไปจะไม่สมบูรณ์ การแทนที่ด้วย organic solvent ที่ความเข้มข้นต่างๆเริ่มที่ความเข้มข้นสารต่ำไปหาความเข้มข้นสารสูงจนกระทั่ง absolute solution ซึ่งขั้นตอนนี้ควรทำซ้ำ เพื่อให้แน่ใจว่าปราศจากน้ำ เพื่อในขั้นตอนการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ (Infiltration) อีกครั้งด้วย resin โดยลดปริมาณ organic solvent และเพิ่มปริมาณ Resin ขึ้นในแต่ละขั้นตอน จนถึง Resin บริสุทธิ์ ตามลำดับ ระยะเวลาขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง การฝังตัวอย่างในแม่พิมพ์พลาสติกและการทำให้แข็ง (Embedding and polymerization) การฝังมีภาชนะที่เหมาะสมด้วยกันหลายแบบเช่น flat Embedding molds , Beam capsule, Easy Molds ในขั้นตอนนี้ควรทำ label ฝังรวมกับเนื้อเยื่อไปให้เรียบร้อย นำไปอบด้วยเครื่อง Vacuum Oven Pump ที่แรงดัน 5 ปอนด์

ต่อตารางนิ้ว ในอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสติกแข็งตัวทนต่อการตัดตัวอย่างและย้อมสีในขั้นตอนต่อไป (Sectioning and Staining) ซึ่งการตัดตัวอย่างให้บางพิเศษในระดับนาโนเมตร หรือ Ultra- thin sections เราต้องอาศัยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบอัลตราไมโครโทม (Ultramicrotome) มีดที่ใช้ตัด มีดแก้ว มีดเพชร ตัวอย่างพืชจะมีความหนาอยู่ในช่วง 60 ถึง 90 นาโนเมตร วางบนแผ่นกริด ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร จากนั้นทำการย้อมด้วยสีโลหะหนักเพื่อเพิ่ม contrast ให้กับตัวอย่างโดยใช้ Uranyl acetate จะทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกและโปรตีน และ Lead citrate จะทำปฏิกิริยากับฟอสโฟไลปิดและไกลโคเจน จากนั้นปล่อยตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดความชื้น นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เนื่องจากสารเคมีที่ใช้มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมมาก ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรศึกษาข้อมูลเฉพาะของสารเคมีแต่ละตัว เกี่ยวกับลักษณะความเป็นอันตราย พิษ วิธีใช้ การเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดและการจัดการอื่นๆ เพื่อให้การดำเนินการเกี่ยวกับสารเคมีนั้นเป็นไปอย่างถูกต้องและปลอดภัย ทุกขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเราควรปฏิบัติงานในตู้ดูดควัน (Fume Hood) และผู้ปฏิบัติงานควรสวมชุดป้องกันเช่น เสื้อกาว แว่นตา หน้ากากป้องกันสารพิษเสมอ

ภาพตัวอย่างพืชที่บันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภาพที่ได้เป็น 2 มิติ



เปลือกมะนาว **คลอโรพลาสต์ในใบพืช** **ไมโทคอนเดรียในใบพืช** **เม็ดแป้งในคลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียในใบพืช**

เอกสารอ้างอิง

เวคิน นพนิตย์ . 2524. จุลทัศน์อิเล็กตรอน Electron Microscopy. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา นครินทร์ หาดใหญ่. 156 หน้า.

อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์ 2531. เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเบื้องต้น. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 190 หน้า.

A.R. Spurr, A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. Journal of Ultrastructure Research, 1969, 26, 31-43

E.S. Reynolds. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology. 1963, 17, 208–212.

Hayat, M..A. 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications Fourth Edition. Published by The Syndicate of The University of Cambridge, United Kingdom. 543 p.