

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission Electron Microscope ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสในพืช

พัชรี อารุง
นักวิทยาศาสตร์

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2563)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission Electron Microscope ; TEM เป็นกล้องที่ให้รายละเอียดสูงและสามารถแยกแยะได้ระดับนาโนเมตร ศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในโครงสร้างเซลล์มีหลักสำคัญคือ ตัวอย่างต้องบางมากพอที่ลำอิเล็กตรอนผ่านได้เพราะภาพที่ได้เกิดจากการหักเหหรือเบี่ยงเบนของลำอิเล็กตรอนที่ผ่านตัวอย่างไปในมุมที่แตกต่างกันทำให้ความเข้มของอิเล็กตรอนที่ปรากฏบนชุดถ่ายภาพแตกต่างกัน ภาพที่ได้เป็นสองมิติ ภาพสามารถบอกขนาดและลักษณะของอนุภาคไวรัสได้ เนื่องจากตัวอย่างไวรัสขนาดที่เล็กกว่า 200 นาโนเมตร จึงจำเป็นที่จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อนำตัวอย่างเข้าไปศึกษาในกล้อง TEM วัสดุที่กล่าวถึงคือ กริด (Grids) ทำหน้าที่คล้ายกับสไลด์แก้ว (microscope slides) ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา นั่นเอง แตกต่างกันตรงขนาดรูปร่างและวัตถุที่นำมาทำเป็นโลหะที่มีลักษณะเป็นแผ่นกลมบาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 3.05 มิลลิเมตร ทำด้วยทองแดงผสม (copper alloy) ทองแดงล้วน (copper) เงิน (silver) ทอง (gold) ภายในแผ่นโลหะมีลักษณะเป็นช่อง ขนาดเล็กหลายช่อง เพื่อให้ลำอิเล็กตรอนผ่านได้ โดยทั่วไปมีช่องอยู่ในช่วง 100-400 mesh ก่อนนำไปใช้เตรียมตัวอย่างต้องเคลือบด้วยแผ่นรองรับที่เป็นสารพลาสติก เช่น Formvar (Polyvinyl Formal Resin) วัสดุรองรับตัวอย่างมีอยู่ 2 แบบ ด้วยกันคือ plastic film และ carbon film

Plastic film เตรียมได้จากสารละลายพลาสติก Formvar ละลายใน chloroform เข้มข้น (0.1/0.5%) ความบางของพลาสติกที่เคลือบควรอยู่ในช่วง 60-90 นาโนเมตร โดยการจุ่มแผ่นสไลด์ลงในสารละลาย Formvar ที่ทำละลายโดย chloroform ลงไปประมาณครึ่งแผ่นประมาณ 3 วินาที ยกขึ้นตรงๆ โดยความเร็วในการยกต้องสม่ำเสมอ ซับสารส่วนเกินด้วยกระดาษกรอง จากนั้นเอียงสไลด์ทำมุม 45 องศา ลงบนผิวน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ค่อยๆจุ่มสไลด์จนกระทั่งแผ่นฟิล์มลอยออกมาเหนือน้ำแล้วดึงแผ่นสไลด์ออก โดยเอียงออกด้านข้าง เราจะสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มที่ลอยออกมาเหนือน้ำเมื่อกระทบกับแสงไฟแล้วจะเห็นเป็นสีเงินซึ่งแสดงว่าความหนาของแผ่นฟิล์มอยู่ในช่วง 60-90 นาโนเมตร จากนั้นนำกริดด้านที่ใช้จับตัวอย่างคว่ำลงบนแผ่นฟิล์มใช้กระดาษกรองหรือแผ่นพาราฟิล์มที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ตักแผ่นฟิล์มขึ้นมาวางในจานเพาะเชื้อที่รองรับด้วยกระดาษกรองทิ้งให้แห้งในตู้ดูดความชื้นข้ามคืนแล้วนำไปทำการเคลือบด้วยไอคาร์บอนในเครื่อง Vacuum Evaporator เพื่อเพิ่มความทนทานต่อการกระทบของลำอิเล็กตรอนให้กับแผ่นพลาสติก ความหนาที่เคลือบดูจากสีที่ได้เปรียบเทียบกับสีชาคือควรได้เป็นสีชาอ่อนๆแต่เมื่อนำไปทำการลดแรงตึงผิวของแผ่นพลาสติกบนกริด ด้วยเครื่อง Ion Coater หรือ Sputter Coater การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอนุภาคของไวรัสในพืช แบบ Dip preparation and Negative staining

- ตัดใบพืชบริเวณที่แสดงอาการของโรคเป็นชิ้นเล็กๆ บดในโกรง (ไวรัสบางชนิดโกรงต้องแช่เย็น) โดยใช้ buffer 0.1M pH (7.0-7.4) จนน้ำคั้นพืชออกมา หยดน้ำคั้นพืชบนแผ่น Parafilm แล้วลอย grid coated นาน 5-15 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 จำนวน 30 หยด เพื่อล้างส่วนเกินของสารละลายพืชและ buffer ออก ซับพอหมาด

- ย้อมด้วยสี uranyl acetate ความเข้มข้น 2% ในน้ำกลั่น 6-8 หยดแล้วซับให้แห้งนำ grid coated บรรจุในกล่องสำหรับเก็บตัวอย่าง (Grid Storage Box) พร้อมบันทึกรายละเอียดตัวอย่างนำกล่องวางไว้ในตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจด้วยกล้อง TEM พร้อมบันทึกภาพเพื่อทำการวิเคราะห์ผล

จะเห็นได้ว่าวิธีที่เตรียมตัวอย่างจากพืชสด โดยนำใบพืชที่แสดงอาการของโรคใบพืชสดๆบดในสารละลายที่เหมาะสม เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับใช้กันมาก สามารถศึกษาขนาดและรูปร่างของตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นอนุภาคหรือเซลล์เดี่ยว โดยการย้อมสีแบบ Negative staining ซึ่งไม่จำเป็นต้องตัด Section ก็สามารถศึกษารูปร่าง ขนาด เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้

เอกสารอ้างอิง

ธีระ สูตะบุตร .2522.วิสาวิทยาเบื้องต้นของพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 106 หน้า.

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

Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss.2003.Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting 2nd Edition. North carolina state university. 219–285.



ภาพแสดงไวรัสที่ เตรียม แบบ Dip preparation and Negative staining บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission Electron Microscope; TEM (Hitachi : HT7700) ณ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ค่าความต่างศักย์ ไฟฟ้า 80 กิโลโวลต์ กำลังขยาย x 40,000 เท่า สเกล 200 นาโนเมตร