

สีย้อม Uranyl acetate และ Lead citrate สำหรับตัวอย่างทางชีวภาพที่ตัดแบบ Ultrathin section

ดรรารัตน์ ช่างจันทร์

นักวิทยาศาสตร์

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอย่างทางชีวภาพที่ถูกตัดให้มีความหนาของ Section 50 – 100 นาโนเมตร เรียกว่า Ultrathin section ซึ่งจะถูกนำไปวางบนกริด เมื่อนำมาย้อมสี แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะทำให้เห็นรายละเอียดของโครงสร้างภายในเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น สีที่ใช้ย้อมเป็นสารโลหะหนัก (Heavy metal) ซึ่งจะช่วยเพิ่มการหักเหของลำอิเล็กตรอนเมื่อผ่านตัวอย่าง ทำให้ Contrast¹ เพิ่มขึ้น การย้อมสีตัวอย่างทางชีวภาพนิยมใช้สีย้อม 2 ชนิด (Double staining) คือ Uranyl acetate และ Lead citrate ซึ่งสีทั้ง 2 ชนิดย้อมติดองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์แตกต่างกัน โดยสีแรกที่ใช้ย้อมคือ Uranyl acetate และย้อมตามด้วยสี Lead citrate ทั้งนี้เวลาที่ใช้ในการย้อมสีขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างด้วย

Uranyl acetate หรือ UA มีลักษณะเป็นผลึกสีเขียวเหลือง เมื่อเป็นสารละลายจะทำปฏิกิริยากับแสง ทำให้เกิดตะกอน ซึ่งตะกอนอาจไปบดบังตำแหน่งของตัวอย่างที่ต้องการดู ดังนั้นภาชนะที่ใช้บรรจุสีควรหุ้มให้มิดชิด และขณะย้อมสีควรใช้วัสดุทึบแสงปิด Petri dish ที่มีหยดสีและตัวอย่างอยู่ โดย Uranyl acetate จะย้อมติดส่วนต่างๆของเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีน โดยจะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดกับกรดนิวคลีอิก

Lead citrate จะทำปฏิกิริยากับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ทำให้เกิดตะกอน Lead carbonate ได้ สามารถป้องกันการเกิดตะกอนโดยน้ำที่ใช้ในการละลาย lead citrate ควรเป็นน้ำที่ปราศจาก CO₂ นอกจากนี้ในขณะที่ทำการย้อมสีควรทำในภาชนะที่ปิดมิดชิดและป้องกันสีทำปฏิกิริยากับ CO₂ ในอากาศโดยวางเม็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงใกล้ๆกับหยดสี โดย Lead citrate จะย้อมติดส่วนต่างๆของเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็นฟอสโฟลิปิดและไกลโคเจน

ขั้นตอนในการย้อมสี ให้หยด Uranyl acetate ผ่าน Filter syringe ลงไปบนแผ่นพาราฟิล์มที่วางใน Petri dish พลาสติก จากนั้นคว่ำกริดด้านที่มีตัวอย่างลงไปบนหยดสี ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ² 3 ครั้ง แล้วใช้กระดาษกรองซับน้ำที่กริดให้แห้ง ระหว่างที่รอให้ครบเวลาการย้อมสี Uranyl acetate ให้เตรียมการย้อมสี Lead citrate โดยนำแผ่นพาราฟิล์มวางใน Petri dish พลาสติก จากนั้นวางเม็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) รอบๆแผ่นพาราฟิล์ม แล้วหยด Lead citrate ผ่าน Filter syringe ลงไปบนแผ่นพาราฟิล์ม นำกริดด้านที่มีตัวอย่างที่ย้อม Uranyl acetate เสร็จแล้วคว่ำลงไปบนหยดสี ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ² 3 ครั้ง แล้วใช้กระดาษกรองซับน้ำที่กริดให้แห้ง จากนั้นเก็บใส่ Grid storage box แล้วนำไปเก็บในตู้ดูดความชื้น ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

¹ Contrast คือ ความสัมพันธ์ความแตกต่างระหว่างส่วนที่มีดและส่วนที่สว่างของภาพ การเพิ่มค่า contrast ส่งผลให้ภาพมีความคมชัดมากยิ่งขึ้น หรืออีกความหมายหนึ่ง contrast คือ ตัวอย่างที่อิเล็กตรอนผ่าน ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างขาวกับดำได้ชัดเจน

- low contrast คือ ตัวอย่างที่อิเล็กตรอนผ่านได้ดี มีการเบี่ยงเบนน้อย ทำให้ได้ภาพที่มี contrast ต่ำ

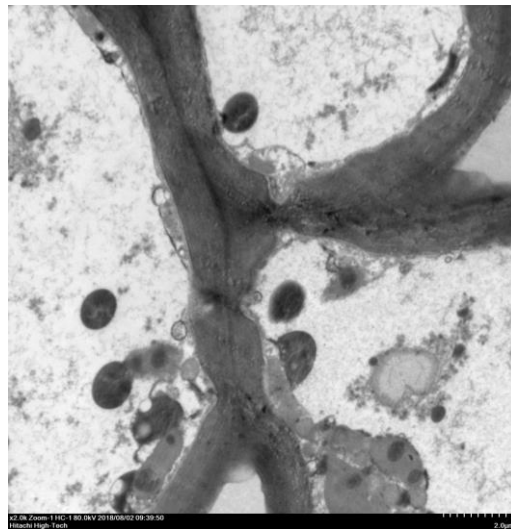
- high contrast คือ ตัวอย่างที่อิเล็กตรอนเบี่ยงเบนได้ดี ทำให้ได้ภาพที่มี contrast สูง

² น้ำที่ใช้ล้างสีย้อมเป็นน้ำกลั่นที่นำไปต้มให้เดือดเพื่อกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วปล่อยให้อุณหภูมิของน้ำลดลงมาจนถึงอุณหภูมิห้อง

ภาพตัวอย่างที่ย้อมด้วย Uranyl acetate และ Lead citrate



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายคลอโรพลาสต์ของใบมะกรูด
ที่กำลังขยาย 7,000 เท่า จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องผ่าน (Hitachi: HT7700)



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายผนังเซลล์ของใบมะกรูด
ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องผ่าน (Hitachi: HT7700)

เอกสารอ้างอิง

1. อุไรวรรณ สุทธิพงษ์. (2524). เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (แบบ Transmission). กรุงเทพฯ: หน่วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
2. Dawes, C.J. (n.d.). Biological techniques in electron microscope. New York, U.S.A: Harper & Row, Publisher, Inc.
3. Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 17(1), 208-212.