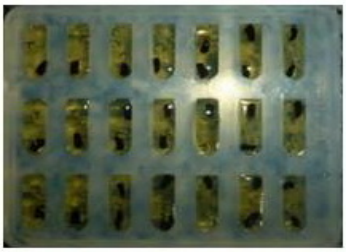
# การเตรียมสไลด์ถาวรด้วยเรซิน

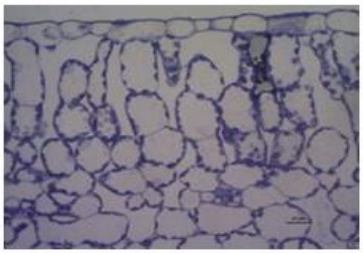
**พัชรี อำรุง**
**นักวิทยาศาสตร์ ชำนาญการ**
**ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ปี 2564)**

การศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ของ พืช สัตว์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ผ่านมานั้นใช้เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวรด้วยพาราฟินซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดในการตัดชิ้นตัวอย่างออกมาได้บางที่สุดในพืช 15 ไมโครเมตร ส่วนตัวอย่างสัตว์ก็สามารถตัวอย่างออกมาได้บางที่สุดเพียง 5 ไมโครเมตร เท่านั้น เนื่องจากขณะที่ตัดตัวอย่างที่ฝังโดยพาราฟินด้วยเครื่อง Rotary microtome หน้าบล็อกจะเกิดการเสียดสีจนเกิดความร้อนและตัวพาราฟินเองมีลักษณะอ่อนนุ่มด้วย จึงสามรถตัดชิ้นตัวอย่างออกมาได้ตามที่ระบุข้างต้นซึ่งเป็นเหตุไม่สามารถนำตัวไปศึกษาต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านได้

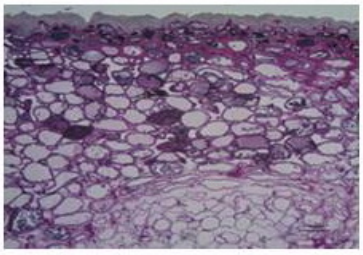
ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวรด้วยเรซิน เพื่อศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ของพืช สัตว์ เพื่อเป็นทางเลือกให้ นักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย นำเทคนิคนี้ไปประยุกต์กับงานวิจัยได้ เทคนิคนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เนื้อเยื่อคงสภาพรูปร่างใกล้เคียงกับเมื่อยังมีชีวิตอยู่และแข็งแรงทนต่อการตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Ultra microtome มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้ การตัดชิ้นตัวอย่าง 1x2 มิลลิเมตร การคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยสารเคมี 2 ชนิด (Double Fixation) โดยใช้ glutaraldehyde สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งแรกซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Aldehyde ทำปฏิกิริยาได้ดีกับโปรตีน และ osmium tetroxide สำหรับคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 เป็นสารที่ทำปฏิกิริยาได้ดีกับไขมัน และยังมีคุณสมบัติเป็นโลหะหนัก การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น acetone หรือ ethyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆซึ่งเริ่มจากความเข้มข้นของสารต่ำไปหาความเข้มข้นสูงในระดับ absolute solution ตามลำดับซึ่งขั้นตอนนี้ควรทำซ้ำ เพื่อให้แน่ใจว่าปราศจากน้ำ เพื่อในขั้นตอนการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ (Infiltration) อีกครั้งด้วย Resin โดยลดปริมาณ Organic solvent และเพิ่มปริมาณ Resin ขึ้นในแต่ละขั้นตอน จนถึง Resin บริสุทธิ์ ตามลำดับ ระยะเวลาขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง การฝังตัวอย่างในแม่พิมพ์พลาสติกและการทำให้แข็ง ( Embedding and polymerization ) การฝังชิ้นตัวอย่างมีภาชนะที่เหมาะสมด้วยกันหลายแบบเช่น Flat embedding molds , Beam capsule, Easy Molds ในขั้นตอนนี้ควรทำ label ฝังรวมกับชิ้นตัวอย่างไปให้เรียบร้อย (ดังภาพที่ 1 ) นำไปทำการอบด้วยเครื่อง Vacuum Oven Pump ที่แรงดัน 5 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว ในอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จากนั้นทำการตัดตัวอย่างแบบ Semi - thin บาง 500 ถึง 1,500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Ultra microtome วางบนแผ่นสไลด์ พร้อมย้อมสี Toluidine blue เพียงสีเดียวก็ได้ (ดังภาพที่ 2 ) หรือ Toluidine blue และ Basic Fuchsin (ดังภาพที่ 3) เพื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ซึ่งตัวอย่างที่ฝังด้วยเรซินนั้นสามารถนำไปตัดแบบ Ultra – thin บาง 60 ถึง 100 นาโนเมตร วางบนแผ่นกริดสำหรับรองรับตัวอย่างพร้อมย้อมสีสำหรับนำไปศึกษาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ในคราวเดียวกันได้อีกด้วย (ดังภาพที่ 4 )



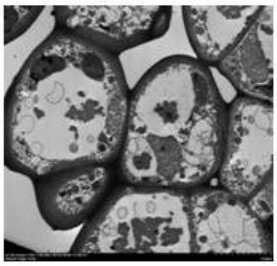
ภาพที่ 1 แสดงการวางชิ้นตัวอย่างลงในแม่พิมพ์ พร้อมใส่รหัสฝังไปพร้อมกัน



ภาพที่ 2 ตัวอย่างใบแว่นแก้วแทนที่และฝังด้วย Spurr's resin ตัด semi thin บาง 1,000 นาโนเมตร ย้อมด้วยสี Toluidine blue บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์จุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด compound microscope กำลังขยาย 20 X สเกลบาร์ 50 ไมโครเมตร



ภาพที่ 3 ตัวอย่างเปลือกมะม่วงแทนที่และฝังด้วย Spurr's resin ตัด semi - thin บาง 1,000 นาโนเมตร ย้อมด้วยสี Toluidine blue และ Basic Fuchsin บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์จุลทรรศน์ แบบใช้แสงชนิด compound microscope กำลังขยาย 20 X สเกลบาร์ 50 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4 ตัวอย่างเปลือกมะนาวแทนที่และฝังด้วย Spurr's resin ตัดแบบ Ultra - thin บางที่ 70 นาโนเมตร บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ที่กำลังขยาย 1,200 เท่า สเกลบาร์ 5 ไมโครเมตร

## เอกสารอ้างอิง


1. **Patcharee Umroong.** 2018. **Leaf Anatomy and Minimal Structure in Leaves of** ***Hydrocotyle umbellata*** **L., Obtained from Water Stress, were Examined under Electron Microscope and Light Microscope.** Microscopy and Microanalysis Research The Journal of The Microscopy Society of Thailand. January-June 2018. Vol 31(1).pp29-33.
2. **Patcharee Umroong** and Panumas Kotepong**. 2019. Ultrastructure studies of fungus** ***Colletotrichum gloeosporioides*** **cause of Anthracnose disease of mango by microscope technique.** Microscopy and Microanalysis Research The Journal of The Microscopy Society of Thailand Res. 2019, Vol 32(2) pp. 1-5. Published 30 October 2020.
3. Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss.2003.Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting 2nd Edition. North carolina state university. 219–285.