

# สีย้อม Toluidine blue O

## สำหรับตัวอย่างพืชที่ตัดแบบ Thick section

ดารารัตน์ ช่างจันทร์

นักวิทยาศาสตร์

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2564

ส่วนต่างๆของพืช เช่น ใบ ลำต้น ราก เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างทางเคมีแล้วได้เป็นบล็อกพลาสติก เมื่อถูกนำมาตัดให้มีความหนาประมาณ 500 - 1,000 ไมโครเมตร จะเรียกว่า Semithin section หรือ Thick section จากนั้น Section ของตัวอย่างจะถูกนำไปย้อมสีเพื่อให้เห็นโครงสร้างรายละเอียดภายในเซลล์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

Toluidine blue O (TBO) ถูกคิดค้นโดย William Henry Perkin เมื่อปี ค.ศ. 1856 Toluidine blue O มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น Basic blue 17, Tolonium chloride เป็นต้น มีลักษณะเป็นผง สีเขียวเข้ม (Dark green) ก่อนใช้จะต้องนำมาละลายก่อนโดยสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์

Toluidine blue O หรือ TBO เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ย้อมตัวอย่างทางพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น Polychromatic dye ซึ่งสามารถย้อมสีติดองค์ประกอบภายในเซลล์ได้หลายส่วนและแต่ละส่วนจะติดสีที่ต่างกัน เช่น ใบของข้าวโพด นิวเคลียสติดสี Blue purple, Epidermal cell ติดสี Light blue, ผนังเซลล์ติดสี Green blue, Subsidiary cell ติดสี Pink violet, Vascular bundle cell ติดสี Blue green, Bulliform cell ติดสี Dark pink purple เป็นต้น นอกจากนี้ Toluidine blue O สามารถย้อมติดส่วนต่างๆของเซลล์ที่มีองค์ประกอบเป็น Lignin, Pectin, Polysaccharide, Polyphenol, Suberin และ Nucleic acid แต่ยังมีบางองค์ประกอบที่ Toluidine blue O ไม่สามารถย้อมติดสีได้ เช่น Callose, Starch เป็นต้น

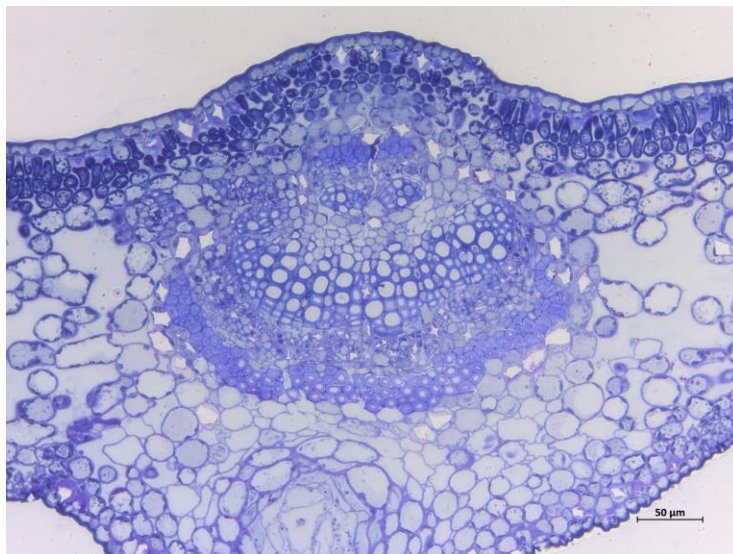
ขั้นตอนการย้อมสี Section พืชด้วย Toluidine blue O

1. เมื่อตัด Section พืชแล้ว ให้นำไปวางบนหยดน้ำที่อยู่บนแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นนำไปวางบนเครื่องให้ความร้อน (Hotplate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 85 °C ประมาณ 5 นาที เพื่อตรึง Section ให้ติดกับกระจกสไลด์

2. หยดสีย้อม Toluidine blue O ให้ทั่วบริเวณที่มี Section แล้วนำไปวางบน Hotplate ประมาณ 1 นาที<sup>1</sup> เพื่อให้สีย้อมติดกับองค์ประกอบภายในเซลล์ของตัวอย่างพืช

3. ล้างสีย้อม Toluidine blue ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวางบน Hotplate ประมาณ 5 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

<sup>1</sup> ทั้งนี้เวลาที่ใช้ในการย้อมขึ้นอยู่กับตัวอย่าง หากใช้เวลาย้อม 1 นาที แล้วสีติดองค์ประกอบภายในเซลล์น้อยเกินไป สามารถเพิ่มเวลาในการย้อมสีได้ แต่มีข้อควรระวัง คือ หากใช้เวลาในการย้อมสีนานเกินไป อาจทำให้สีแห้งและเกิดตะกอนสีซึ่งอาจไปบดบังส่วนของตัวอย่างได้



ภาพใบมะกรูดที่ย้อมด้วย Toluidine blue O  
ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Carl Zeiss : Axiostar plus)  
ที่กำลังขยาย 20X

### เอกสารอ้างอิง

1. อุไรวรรณ สุทธิพงษ์. (2524). เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (แบบ Transmission). กรุงเทพฯ: หน่วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
2. H.A. Retamales, T. Scharaschkin. (2014). A staining for identifying secondary compounds in Myrtaceae. *Appl Plant Sci.*, 2(10), 1-8.
3. M. A. Bellinger, S. K. Sidhu, C. G. Rasmussen. (2019). Staining Maize epidermal leaf peels with toluidine bue O, *BioProtoc*, 9, 1-11.
4. P.P. Mitra, D. Loque. (2014). Histochemical of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements, *J Vis Exp.*, 87, 1-11.
5. T. Manigandan, S. Kishorekumar, J. Nithya, N. Kavita, K. Kiruthika. (2014). Toloudine Blue-A Review with a Case Report, *RJPBCS*, 5(2), 1894-1899.