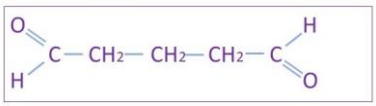
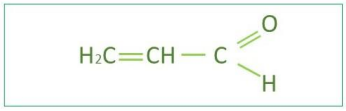
คงสภาพตัวอย่างทางชีวภาพอย่างไรให้ได้โครงสร้างที่สมบูรณ์ สำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ยุพดี เผ่าพันธ์
นักวิจัยเชี่ยวชาญ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ธันวาคม 2565)

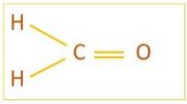
การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพมีความจำเป็นต้องทำก่อนการนำตัวอย่างไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เนื่องจากตัวอย่างทางชีวภาพมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำให้ตัวอย่างแห้งและคงรูปร่างก่อนนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การเตรียมตัวอย่างทางเคมีสำหรับตัวอย่างทางชีวภาพประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ การคงสภาพตัวอย่าง (Fixation), การดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (Dehydration) และการทำให้ตัวอย่างแห้ง (Drying) ซึ่งการคงสภาพตัวอย่างเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการรักษาสภาพของตัวอย่างชีวภาพ ในการคงสภาพตัวอย่างสามารถทำได้หลายวิธีการด้วยกัน การทำ Double Fixation เป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการรักษาลักษณะรูปร่างและองค์ประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี สารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยวิธีการนี้ประกอบด้วยสาร 2 กลุ่ม โดยสารเคมีในกลุ่มที่ 1 เป็นสารเคมีในกลุ่ม aldehyde ได้แก่ formaldehyde, acrolein และ glutaraldehyde ซึ่งสารในกลุ่มนี้นิยมใช้ glutaraldehyde เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าสารอื่นๆที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน สามารถสังเกตได้จากโครงสร้างทางเคมีที่ glutaraldehyde จะมีโครงสร้างของหมู่ carboxaldehyde (-CHO) 2 หมู่ ในขณะที่ formaldehyde และ acrolein มีเพียงหมู่เดียว



glutaraldehyde



acrolein



formaldehyde

สารเคมีในกลุ่มที่ 2 ที่ใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อคือ สารเคมีในกลุ่ม osmium ได้แก่ osmium tetroxide ซึ่งใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อหลังจากตัวอย่างผ่านการคงสภาพด้วย glutaraldehyde เรียบร้อยแล้ว การทำ Double Fixation แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย

1. Primary Fixation เป็นการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งที่ 1 ด้วย glutaraldehyde ซึ่ง glutaraldehyde
2. Secondary Fixation เป็นการคงสภาเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 โดยทำหลังจากที่คงสภาพครั้งที่ 1 เรียบร้อยแล้ว

ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มมีความสามารถในการทำปฏิกริยากับองค์ประกอบของเนื้อเยื่อได้แตกต่างกัน จึงทำให้เทคนิคการทำ Double Fixation เป็นเทคนิคที่ใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อของตัวอย่างทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากมี

ความสามารถในการทำปฏิกิริยาได้ค่อนข้างสมบูรณ์มากกว่าการใช้สารคงสภาพเนื้อเยื่อเพียงสารเดียวเท่านั้น ซึ่งความสามารถในการทำปฏิกิริยามีรายละเอียดดังตาราง

องค์ประกอบของตัวอย่างหรือเนื้อเยื่อ	glutaraldehyde	osmium tetroxide
nucleic acid	ทำปฏิกิริยาอ่อน	ทำปฏิกิริยาอ่อน
protein	ทำปฏิกิริยาดีมาก	ทำปฏิกิริยาปานกลาง
phospholipid	ทำปฏิกิริยาอ่อน	ทำปฏิกิริยาดีมาก
polysaccharide	ทำปฏิกิริยาอ่อน	ทำปฏิกิริยาอ่อน
saturated lipid	ทำปฏิกิริยาอ่อน	ทำปฏิกิริยาอ่อน
unsaturated lipid	ทำปฏิกิริยาอ่อน	ทำปฏิกิริยาดีมาก

ในการคงสภาพเนื้อเยื่อนิยมใช้สารที่มีความเข้มข้นไม่มากจนเกินไป ซึ่งสามารถปรับความเข้มข้นให้มีความเหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิด โดยนิยมใช้ glutaraldehyde ที่ความเข้มข้นในช่วง 1-3% ใน phosphate buffer โดยตัวอย่างที่มีความอ่อนบางอาจใช้ความเข้มข้นต่ำๆเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเกิดการเสียหายที่เกิดจากสารที่ใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อ เนื่องจาก glutaraldehyde ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจทำให้ตัวอย่างเกิดการเหี่ยวย่นได้ สำหรับ osmium tetroxide นิยมใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 % ในน้ำกลั่น หรือ phosphate buffer การใช้สาร osmium tetroxide ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป อาจทำให้ตัวอย่างเกิดการบวมจนถึงตัวอย่างเกิดการแตกเสียรูปร่างได้เช่นกัน เนื่องจาก osmium tetroxide เป็นสารเคมีที่มีความอันตรายสูง และมีคุณสมบัติเป็นโลหะหนัก ทำให้มีความเป็นพิษสูงต่อผู้ใช้และอาจปนเปื้อในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นผู้ที่ใช้สารชนิดนี้มีความจำเป็นต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ผู้ใช้ต้องปฏิบัติงานภายใต้ Fume hood เท่านั้น และต้องสวมชุดพร้อมอุปกรณ์ป้องกัน สวมแว่นตา สวมหน้ากาก และ สวมถุงมือยาง ให้เป็นไปตามมาตรฐานความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งไม่ทิ้งสารออกสู่สภาพแวดล้อม อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องเก็บรักษาไว้ให้มีความปลอดภัยเพื่อรอการส่งกำจัดอย่างถูกวิธีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Gabriel B. L. 1982. Biological Electron Microscope. Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York. 264 p.

Juniper B.E.1970.Techniques for Plant Electron Microscopy. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh. 108 p

เวคิน นพนิตย์. 2527. จุลทัศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน:Scanning Electron Microscopy การประยุกต์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 99 น.

ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์, อรัญญา ตันติปัญจพร และ วิรัช ธรรมวินิจฉัย. 2535. คู่มือหลักสูตรเร่งรัด จุลทรรศน์อิเล็กตรอนสำหรับงานวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 101 น.