เทคนิคการตัดตัวอย่างแบบ Thick section หรือ Semithin section
สำหรับศึกษาด้วยกล้องจุทรรศน์แบบใช้แสง

พัชรี อำรุง

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตัดตัวอย่างแบบ Thick section หรือ Semithin section เป็นขั้นตอนหนึ่งเพื่อตรวจสอบตัวอย่างที่ทำการเตรียมตัวอย่างทางเคมี ตลอดจนการแทนที่ด้วยเรซินและอบให้แข็งในแม่พิมพ์ นำมาทำการตัดด้วยเครื่อง Ultramicrotome โดยใช้มีดแก้วตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้บาง ในช่วง 500 นาโนเมตร ถึง 1,500 นาโนเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง นำมาวางบนแผ่นสไลด์ (slide) พร้อมย้อมสีเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด Compound microscope

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อตรวจสอบคุณภาพในการเตรียมตัวอย่างว่ามีการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ได้สมบูรณ์หรือไม่

วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อศึกษากลุ่มเซลล์ภาพรวมของชิ้นตัวอย่างที่เลือกมาทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด Compound microscope พร้อมบันทึกภาพลักษณะโครงสร้างภายใน ขนาดรูปร่าง และวัดขนาดเซลล์ โดยเลือกบริเวณกลุ่มเซลล์ที่ต้องการ จากนั้นทำการตัดแต่งหน้าบล็อกให้เล็กครอบคลุมบริเวณที่เลือกแล้วทำการตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section ความบางในช่วง 50 นาโนเมตร ถึง 100 นาโนเมตร เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) เพื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคในลำดับต่อไป

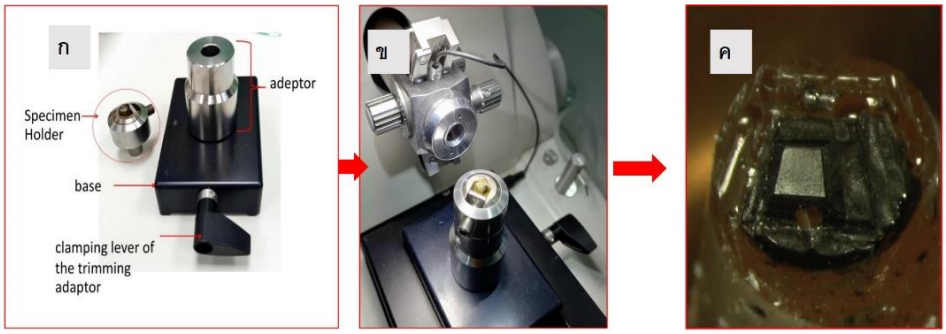
ขั้นตอนการตัดตัวอย่างแบบ Thick section หรือ Semithin section ประกอบด้วย

1. Trimming เป็นการตัดแต่งส่วนของบล็อกพลาสติกส่วนเกินออก ให้หน้าตัดของบล็อกพลาสติกเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูครอบบริเวณชิ้นตัวอย่างที่เราต้องการศึกษา ให้ด้านขนานของรูปสี่เหลี่ยมคางหมูขนานกันเพื่อที่เวลาเราตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Ultramicrotome จะได้ แผ่น section ออกมาเป็นแถวต่อเนื่องกัน **ดังภาพที่ 1ก และ 1ข**

- การตัดแต่งหน้าบล็อกตัวอย่าง มี 2 แบบ คือ
  - การตัดแต่งแบบหยาบ (Coarse trimming) คือการตัดแต่งด้วยมือโดยใช้ใบมีดโกนเฉือนแท่งพลาสติกภายใต้กล้อง Stereo microscope ที่ติดตั้งบนเครื่อง Ultramicrotome ทำการเฉือนพลาสติกออกทีละน้อยๆ จากด้านนอกเข้าไปด้านในหน้าบล็อกพลาสติก จนใกล้บริเวณ

ที่มีตัวอย่างขั้นตอนนี้ให้เหลือส่วนของพลาสติก ที่ยังปกคลุมตัวอย่างก่อนเพื่อพยุงชิ้นตัวอย่างเพื่อได้ขอบเขตของตัวอย่างทั้งหมดก่อน

- การตัดแต่งแบบละเอียด (Fine trimming) คือการตัดแต่งด้วยเครื่อง Ultramicrotome โดยใช้มีดแก้วเฉือนหน้าบล็อกพลาสติกภายใต้กล้อง Stereo microscope ด้วยเครื่องตัด Ultramicrotome ขั้นตอนนี้เราจะทำการเฉือนหน้าบล็อกให้เรียบด้วยวิธีใช้มือหมุนปุ่ม Hand wheel เพื่อให้หน้าบล็อกตัวอย่างที่ติดตั้งใน Specimen holder ประกอบเข้ากับ Specimen arm บนตัวเครื่อง Ultramicrotome เพื่อขับเคลื่อนตัวอย่างเข้าไปสัมผัสทีละน้อยๆกับมีดแก้วจนได้หน้าบล็อกที่เรียบ **ดังภาพที่ 1ค**



ก. บล็อกพลาสติกที่นำมายึดด้วย Specimen Holder ข. วางตัวอย่างใต้กล้อง Stereo Microscope ค. บล็อกตัวอย่างตัดแต่งเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู

ภาพที่ 1 แสดงการตัดแต่งหน้าบล็อกตัวอย่าง

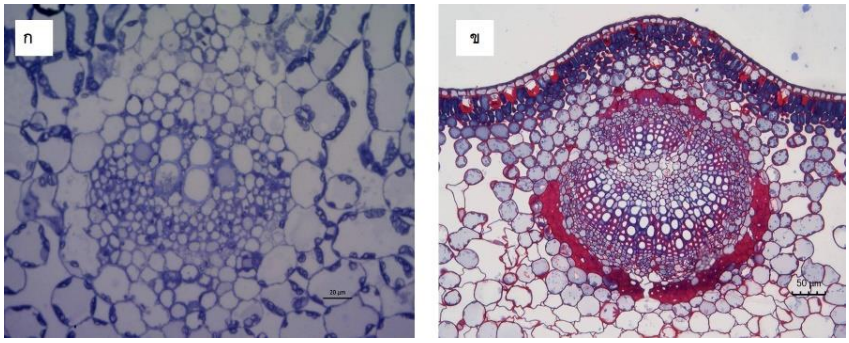
2. Sectioning and Staining การตัดตัวอย่างและการย้อมสี

- ตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Ultramicrotome โดยใช้มีดแก้วที่ติดตั้งอ่างรองรับน้ำกลั่นเป็นที่เรียบร้อยแล้ว เมื่อตัดตัวอย่างออกมาได้ความบางในช่วง 500 นาโนเมตร ถึง 1,500 นาโนเมตร เพื่อให้ตัวอย่างออกมาเป็นแผ่น **ดังภาพที่ 2** จากนั้นใช้ Loop ช้อนตักชิ้นตัวอย่าง วางบนแผ่นสไลด์ (slide) ซึ่งมีหยดน้ำกลั่นอยู่ นำไปทำให้แห้งบนเครื่องอังความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ถึง 20 นาที เพื่อตรึงชิ้นตัวอย่างไว้ขณะนำมาย้อมสีเพื่อเพิ่มความคมชัดในเซลล์ตัวอย่าง จะไม่หลุดจากแผ่นสไลด์

1.กรณีย้อมเพียงสีเดียว ย้อมด้วยสี Toluidine blue หยดลงบนชิ้นตัวอย่างที่ตรึงอยู่บนแผ่นสไลด์ ประมาณ 2 นาที บนเครื่องอังความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้แห้งบนเครื่องอังความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที จากนั้นใช้น้ำยาเปอร์เมาต์ (Permount) เป็นตัวกลางปิดด้วยกระจกสไลด์ (cover slip) ปล่อยให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer) จนแห้งนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด Compound microscope **ดังภาพที่ 3ก**

2.กรณีย้อมสองสี ให้ย้อมสีแรกตามข้อที่ 1 ถึงขั้นล้างส่วนเกินของสี Toluidine blue แล้วทำให้แห้งบนเครื่องอังความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที ให้ หยดสี Basic Fuchsin ลงบนชิ้นตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้แห้งบนเครื่องอังความร้อน (Hotplate) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ถึง 10 นาที จากนั้นใช้น้ำยาเปอร์เมาต์ (Permount) เป็นตัวกลางปิดด้วยกระจกสไลด์ (cover slip) ปล่อยให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer) จนแห้งนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด Compound microscope **ดังภาพที่ 3ข**

ภาพที่ 2 ภาพเครื่อง Ultramicrotome แสดงการ Thick section หรือ Semithin section ตัวอย่างบาง 500 – 1,500 นาโนเมตร



ภาพที่ 3 แสดงสีที่ติดกับตัวอย่างพืช ก. ย้อมด้วย toluidine blue ข. ย้อมด้วย toluidine blue และ basic fuchsin

เอกสารอ้างอิง

1. อุไรวรรณ สุทธิพงษ์. (2524). เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (แบบ Transmission). กรุงเทพฯ: หน่วย เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. M.A. Bellinger, S.K. Sidhu, C.G. Rasmussen, Staining Maize epidermal leaf peels with toluidine blue O, BioProtoc, 2019, 9, 1-11.
3. P. Umroong, D. Changchan, J. Sangawang, Comparative of the morphology and ultrastructure of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) leaves Attacked by Citrus canker symptoms with microscopic techniques, *Microsc. Microanal* Res, **35**, 21-25 (2022).