เทคนิคการตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section เพื่อศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)

พัชรี อำรุง

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การนำเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy หรือ TEM) มาประยุกต์ใช้นิยมเลือกใช้ในการศึกษาวิจัยด้านชีวภาพ เนื่องจากโครงสร้างทางชีวภาพประกอบด้วยสารอินทรีย์มวลเบาส่วนใหญ่ นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ ด้านชีววิทยาจึงนำเทคนิคทาง TEM ช่วยขยายและแยกแยะรายละเอียดที่สูงขึ้นกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Optical microscopy หรือ OM) เพื่อสามารถศึกษาโครงสร้างจุลภาคภายในที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรหรือเล็กกว่าได้

การศึกษาโครงสร้างจุลภาคภายในพืชโดยใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในไซโทพลาซึมมีโครงสร้างขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เฉพาะเรียกว่า ออร์แกเนลล์ (organelle) ได้อย่างละเอียด อีกทั้งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ถึงในปัจจุบันจะมีเทคนิควิเคราะห์ด้านชีววิทยาได้มีการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วก็ตาม แต่การวิเคาระห์ภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านยังปรากฏในงานตีพิมพ์ผลงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง จึงเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy หรือ TEM) ต่องานวิจัยทางชีวภาพเป็นอย่างมาก

การตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section ด้วยเครื่อง Ultramicrotome

คือการตัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Ultramicrotome ที่ความหนาในช่วง 50 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นได้หลังจากที่เราทำการตัดตัวอย่างแบบ Thick Section หรือ Semithin Section โดยใช้มีดแก้วตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้หนาในช่วง 500 นาโนเมตร ถึง 1,500 นาโนเมตร เพื่อศึกษาภาพรวมของชิ้นตัวอย่างที่เราทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด Compound Microscope

ขั้นตอนการตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section ประกอบด้วย

หลังจากที่มีการเลือกบริเวณบนชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแล้ว ทำการตัดแต่งหน้าบล็อกตัวอย่างด้วยมือโดยใช้ใบมีดโกนเฉือนแท่งพลาสติกเหลือไว้ส่วนที่เลือกบริเวณบนชิ้นเนื้อเยื่อภายใต้กล้อง Stereo Microscope ที่ติดตั้งบนเครื่อง Ultramicrotome

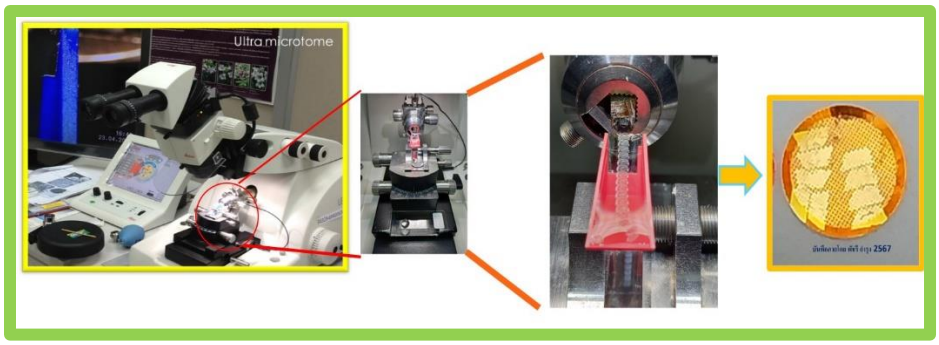
1. ทำการตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section โดยจะต้องตั้งค่าความหนาที่ต้องการตัดบนชุดควบคุมการทำงานของเครื่อง Ultramicrotome ก่อนทุกครั้ง เมื่อตัดตัวอย่างออกมา จะใช้แผ่นกริด หรือ perfect loop ตัก แผ่นเนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีเงินหรือสีทองตามค่าที่เราตั้งไว้ตามที่ต้องการ จากนั้นนำมา

วางบนแผ่นกริด **ดังภาพที่ 1** ปล่อยให้แห้งบนกระดาษกรองแล้วเก็บบรรจุใส่ grid box บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง นำเก็บเข้าตู้ดูดความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. ทำการเพิ่มความคมชัดด้วย การย้อมด้วยสี Uranyl acetate จะเข้าไปจับสารจำพวก protein และ Nucleic acid ส่วน Lead citrate จะเข้าไปจับอยู่ใน Lipid เป็นต้น จากนั้นนำไปทำการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)

เอกสารอ้างอิง

1. อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์ 2531. เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเบื้องต้น. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 190 หน้า.
2. Hayat, M.A. 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications Fourth Edition. Published by The Syndicate of The University of Cambridge, United Kingdom. 543 p.
3. Patcharee Umroong, Dararat Changjan and Juthamanee Sangsawang. 2022. Comparative of the Morphology and Ultrastructure of Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) Leaves Attacked by Citrus Canker Symptoms with Microscopic Techniques, 35(1) pp. 21-25.



ภาพที่ 1 แสดงการตัดตัวอย่างแบบ Ultrathin section ด้วยเครื่อง Ultramicrotome และตัวอย่างที่วางบนแผ่นกริด

ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเซลล์พืชจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Hitachi: HT7700) ตัวอย่างตัดแบบ Ultrathin section ด้วยเครื่อง Ultramicrotome บาง 70 นาโนเมตร