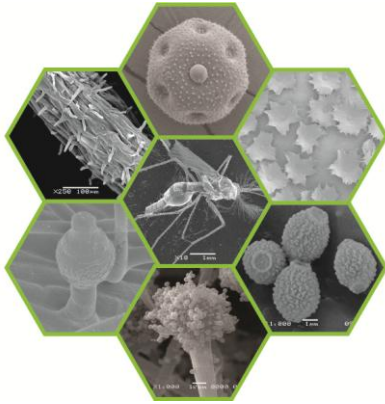


การเตรียมตัวอย่างชีวภาพด้วยวิธีทางเคมีสำหรับ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



ยุพดี เผ่าพันธ์

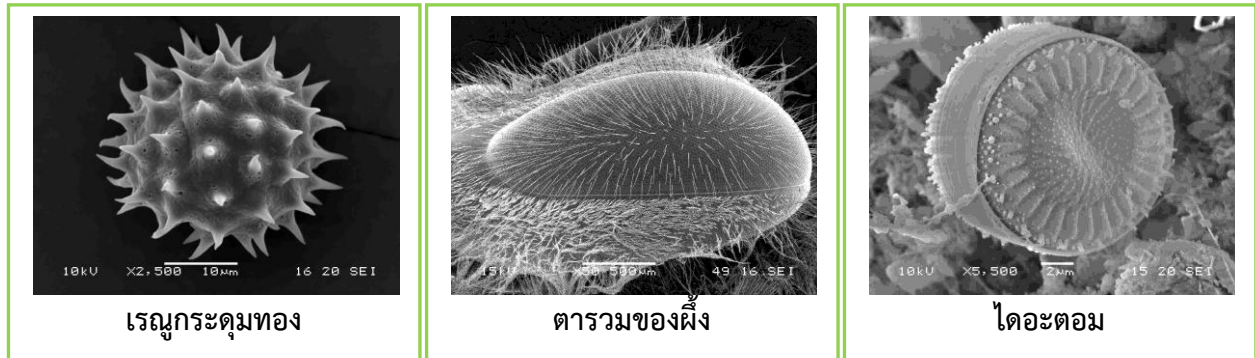
นักวิจัย

ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อ การศึกษาลักษณะของพื้นผิว และรูปร่างของตัวอย่างชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำงานภายใต้สภาวะ สูญญากาศแต่ตัวอย่างชีวภาพ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ มีน้ำเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ การที่ตัวอย่างมีความชื้น สูงและต้องอยู่ภายใต้สภาวะสูญญากาศจึงทำให้เกิดปัญหาการสูญเสียรูปร่างของตัวอย่างชีวภาพไปจากเดิม ดังนั้น เทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาลักษณะพื้นผิว และรูปร่าง ของตัวอย่างไว้ เพื่อให้ สามารถทนต่อการกระทบของลำอิเล็กตรอน อยู่ภายใต้สภาวะสูญญากาศ มีคุณสมบัติในการนำไฟฟ้า และปราศจาก สิ่งปนเปื้อนที่อาจไปบดบังรายละเอียดของตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีทางเคมีเป็น วิธีหนึ่งที่ได้รับนิยมนิยมเป็น อย่างมาก เนื่องจากสามารถรักษารูปร่างของเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยใช้เทคนิคการคงสภาพ เนื้อเยื่อด้วยสารเคมี 2 ชนิด (Double Fixation) ใช้ glutaraldehyde สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งแรกซึ่งเป็นสาร ในกลุ่ม aldehyde ทำปฏิกิริยาได้ดีกับโปรตีน และ osmium tetroxide สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งที่ 2 เป็นสารที่ ทำปฏิกิริยาได้ดีกับไขมัน และยังมีคุณสมบัติเป็นโลหะหนัก นอกจากนี้ใช้ในการคงสภาพเนื้อเยื่อแล้วยังเป็นการเพิ่ม คุณสมบัติความเป็นโลหะให้กับตัวอย่างชีวภาพอีกด้วย มีผลทำให้ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราดมี contrast ดีขึ้นตามไปด้วย การแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น acetone หรือ ethyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้นของสารต่ำไปหาความเข้มข้นสูง เมื่อดึงน้ำออกจาก ตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจึงทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying) ด้วยเทคนิคการทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical Point Drying) โดยนำเข้าเครื่อง Critical Point Dryer ซึ่งให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเข้าไปแทนที่สารอินทรีย์ที่ใช้ดึงน้ำออก จากอย่างจนกระทั่งแทนที่อย่างสมบูรณ์ จึงให้ความร้อนทำให้อุณหภูมิและความดันภายในช่องใส่ตัวอย่าง (Specimen Chamber) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ (อุณหภูมิ 31.1 °C และความดัน 1,073 psi) เมื่อถึงจุดนี้ ของเหลวและก๊าซจะมีความหนาแน่นเท่ากันทำให้กลายเป็นไอ ทำให้ได้ตัวอย่างที่แห้งและคงลักษณะรูปร่าง นำ ตัวอย่างที่แห้งแล้วไปติดบนแท่นวางตัวอย่างโดยใช้วัสดุในการเชื่อมติดตัวอย่างกับแท่นวางตัวอย่าง เช่น conductive carbon paint และ double sided carbon tape เป็นต้น จากนั้นนำไปเคลือบโลหะ เช่น ทองคำ ทองคำผสมพลาสมา เดียม และ แพลทตินัม เป็นต้น ด้วยเครื่อง Ion Coater หรือ Sputter Coater ความหนาของชั้นโลหะที่ฉาบลงบน

ตัวอย่างควรมีความหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร หากบางเกินไปอาจทำให้เกิดการสะสมของประจุบนผิวตัวอย่าง (Charging Effect) และหากหนาเกินไปก็อาจทำให้บังรายละเอียดของพื้นผิวตัวอย่างได้ แล้วจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป อย่างไรก็ตามการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีทางเคมีต้องใช้สารเคมีหลายชนิดซึ่งสิ้นแล้วแต่มีอันตรายสูง ดังนั้นควรทราบคุณสมบัติและความเป็นพิษของสารเคมีชนิดนั้นๆ เนื่องจาก สารเคมีบางชนิดมีพิษร้ายแรงจึงควรทำอย่างระมัดระวังโดยการสวมชุดป้องกัน ทุกขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างควรทำในตู้ดูดควัน (Fume Hood) และควรทำลายพิษของสารก่อนนำไปกำจัดต่อไป



เอกสารอ้างอิง

- เวคิน นพนิตย์. 2524. จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน: การประยุกต์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 99 น.
- อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2531. เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเบื้องต้น. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง บางเขน สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 74 น.
- Anthony W. Robards. 1985. Botanical Microscopy 1985, Publish in the United States, Oxford University press, New York. 368 p.
- Barbra L. Gabriel. 1982. Biological Electron Microscope. Van Nostrand Reinhold Company Inc. New York. 264 p.
- Dawes C.J. 1971. Biological Techniques in Electron Microscopy. University of South Florida, Harper & Row, Publishers, Inc. 193 p.
- Harris R. 1991. Electron Microscopy in Biology A Practical Approach. In statute of Cell and Tumor Biology German Cancer Research Center. Heidelberg. 308 p.
- 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.