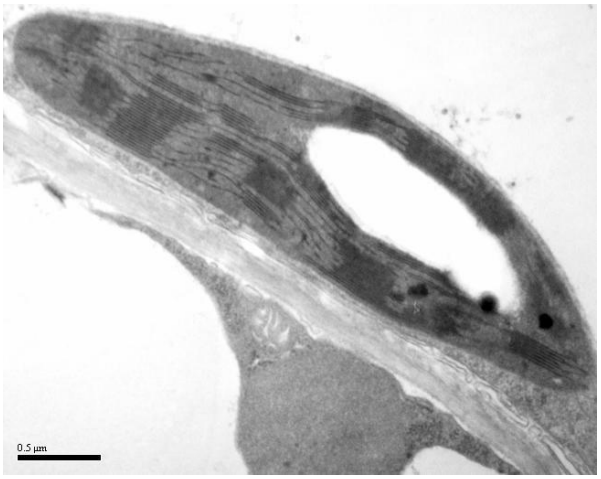
การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่าน (Transmission Electron Microscope)

ปุณยวีร์ เดชครอง
นักวิจัยชำนาญการ
ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
หน่วยอนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง

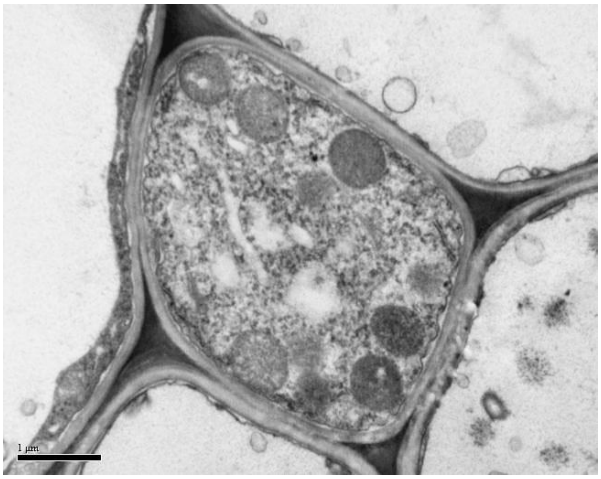
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูงที่สำคัญ ซึ่งช่วยค้นหาคำตอบของสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิตที่มีขนาดเล็กได้ในระดับนาโนเมตร กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีประสิทธิภาพและความสามารถของในการแจกแจงรายละเอียดของภาพเหนือกว่ากล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงปกติ (bright field microscope) ลักษณะการเกิดภาพของตัวอย่างเหมือนกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงปกติแต่แตกต่างกันที่แหล่งกำเนิดแสง และระบบภายในลำกล้อง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่านประกอบด้วยระบบสำคัญ 3 ระบบ คือ ระบบแสง (illumination system) ระบบภาพ (imaging system) และระบบสุญญากาศ (vacuum system) ซึ่งแหล่งกำเนิดแสงของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมาจากลวดทังสเตนบริสุทธิ์ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าจะเกิกการปลดปล่อยอิเล็กตรอนวงนอกสุดออกมากลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งภายในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจำเป็นต้องเป็นระบบสุญญากาศ เพื่อป้องกันการชนกันระหว่างอิเล็กตรอนกับโมเลกุลของอากาศ ซึ่งหากภายในลำกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมีโมเลกุลของอากาศและเกิดการชนกันกับอิเล็กตรอนก็จะส่งผลให้ความเร็วของอิเล็กตรอนไม่คงที่และเกิดการกระจายของทิศทางอิเล็กตรอนทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของแสงสี (chromatic aberration) และส่งผลให้การแจกแจงรายละเอียดและความคมชัดของภาพจะลดลง อิเล็กตรอนที่ถูกปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิดจะทะลุผ่านตัวอย่างที่มีความบางมากพอที่จะทำให้เกิดภาพบนฉากรับภาพ ซึ่งฉากรับภาพจะเคลือบด้วยสารเรืองแสง เมื่ออิเล็กตรอนวิ่งทะลุผ่านตัวอย่างลงมากระทบกับฉากจะทำให้เกิดภาพ

ในการศึกษาตัวอย่างทางชีววิทยา เช่น เนื้อเยื่อ เซลล์ และโครงสร้างภายในของสิ่งมีชีวิตซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่มาก จำเป็นต้องมีการรักษาสภาพตัวอย่างที่จะศึกษาให้คงอยู่ในสภาพเดิมหรือใกล้เคียงกับสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ ตัวอย่างจำเป็นต้องผ่านการเตรียมเป็นพิเศษสำหรับที่จะนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่าน ซึ่งตัวอย่างจะถูกรักษาสภาพด้วยสารเคมี (fixative) โดยทั่วไปการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยานิยมใช้วิธี double fixation ด้วยสารเคมี 2 ชนิด คือ aldehyde fixative เช่น

glutaraldehyde หรือ formaldehyde และ metallic fixative เช่น Osmium tetroxide โดย glutaraldehyde จะเป็น primary fixation ซึ่งสามารถคงสภาพโปรตีนได้ดี ส่วน Osmium tetroxide จะเป็น post fixation ที่สามารถคงสภาพ lipid และ phospholipid ได้ดี จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ หรือ acetone (ขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง) ต่อมาตัวอย่างจะถูกฝังในบล็อกที่มีสารผสมพลาสติกอยู่ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 24 ชั่วโมง จนกลายเป็นบล็อกพลาสติกแข็ง (เกิดปฏิกิริยา polymerization) เมื่อได้ตัวอย่างที่ฝังอยู่ในพลาสติกแข็งแรง ตัวอย่างจะถูกนำไปตัดให้เป็นแผ่นบางประมาณ 50-70 nm (เป็นความบางที่อิเล็กตรอนสามารถทะลุผ่านตัวอย่างและทำให้เกิดภาพได้) ด้วยเครื่อง ultramicrotome เมื่อได้แผ่นตัวอย่างที่มีความบางเหมาะสมแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีคุณสมบัติสามารถดูดจับอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น ซึ่งการย้อมสีจะช่วยให้ได้ภาพที่มีความคมชัดมากขึ้น จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่านต่อไป อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยานั้นมีการใช้สารเคมีชนิดที่เป็นไอระเหยซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นจึงควรปฏิบัติงานภายในตู้ดูดควัน (fume hood) เพื่อป้องกันตนเองจากความเป็นพิษของสารระเหย และควรศึกษาคุณสมบัติของสารเคมีและวิธีการลดความเป็นพิษของสารเคมีก่อนนำไปกำจัดต่อไป



ภาพที่ 1 คลอโรพลาสต์ขอบใบผักบุ้ง กำลังขยาย 25,000 เท่า ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่าน ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-1230



ภาพที่ 2 เซลล์พืช กำลังขยาย 15,000 เท่า ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่าน ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-1230

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ จึงสมานญาติ. 2529. หลักการและเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ณรงค์ จึงสมานญาติ. 2536. หลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านและส่องกราด, น. 3-22. ใน เอกสารประการฝึกอบรมทางวิชาการ. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

สุภาพรรณ เซราฟิน. 2552. เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและส่องผ่าน สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างระดับนาโนและไมโครเมตร. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 109 น.

สุภาพรรณ เซราฟิน. 2558. Journey into nano- and micro- world of Electron Microscopy and X-ray Spectroscopy. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ. ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Hayat, M.A. 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications (4th edition). Cambridge, United Kingdom Press.