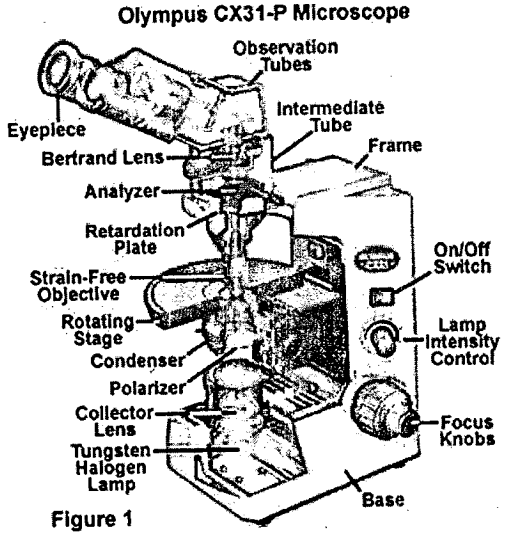
ภาคผนวก

การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (Light microscope; LM)

1. **หลักการทำงานของกล้อง** LM

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการมองวัตถุที่มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการมองเห็นของตาในการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ การที่กล้องจุลทรรศน์จะมีความสามารถในการขยาย (magnification) ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความสามารถในการแยกรายละเอียด (resolution/resolving power) ของจุดสองจุดที่อยู่ใกล้กันให้มองเห็นออกเป็นสองจุดได้ชัดเจน (two points of discrimination) กล้องจุลทรรศน์สามารถขยายภาพโดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) เป็นเลนส์ที่มีความยาวโฟกัสสั้น ภาพที่เห็นในเลนส์ชนิดนี้เป็นภาพกลับหัว ส่วนเลนส์ใกล้ตา (ocular lens/eyepiece) เป็นเลนส์ที่มีความยาวโฟกัสยาวภาพที่เห็นเป็นภาพหัวกลับขยาย กล้องจุลทรรศน์ทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาจจะมี ocular lens หนึ่งอัน (monocular) หรือ สองอัน (binocular) ก็ได้ ซึ่งจะมีความยาวคลื่น (wavelength) ประมาณ 540 nm. Resolution 0.2 และมีกำลังขยาย 2,000 เท่า หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง คือ เมื่อแสงไฟให้กำเนิดเป็นลำแสง ลำแสงถูกรวบรวมโดยเลนส์รวมแสง (condenser lens) ไปตกวัตถุที่วางอยู่บนแท่นวางวัตถุ (stage) จากนั้น objective lens จะรับแสงที่ผ่านชิ้นเนื้อ และขยายภาพแล้วส่งต่อไปที่ ocular lens เพื่อขยายภาพสุดท้ายจากนั้นแสง (ภาพ 33) และภาพก็จะถูกส่งต่อไปที่ตา



ภาพ 33 แสดงส่วนประกอบและทางเดินแสงของกล้อง LM

ที่มา: http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/polarized/ html

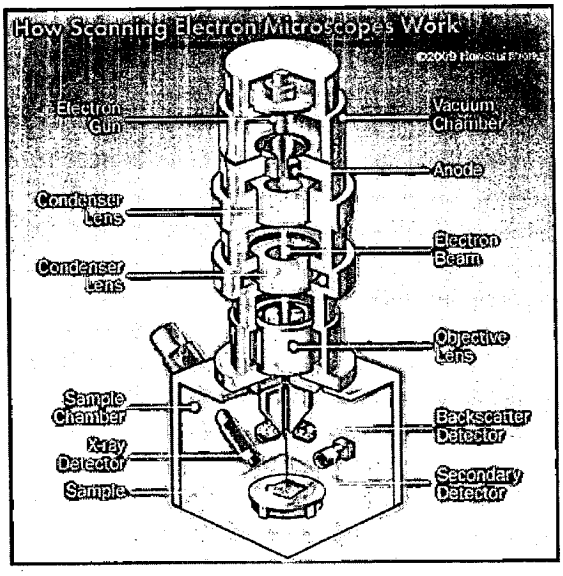
การศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

1. หลักการทำงานของกล้อง SEM

Scanning Electron Microscope (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยาย สูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร ซึ่งน้อยกว่าความสามารถในการขยายของกล้อง Transmission Electron Microscope (TEM) จึงใช้ SEM ศึกษากับตัวอย่างที่มีความหนามากกว่าตัวอย่างที่ศึกษาด้วยกล้อง TEM เพราะใช้หลักการสร้างภาพจากการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นกล้อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐาน และรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น

องค์ประกอบของกล้อง SEM (ภาพ 34) ที่สำคัญมีดังนี้

1. แหล่งกำเนิดแสงอิเล็กตรอน (electron gun)
2. เลนส์รวมแสง (condenser lens)
3. เลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens)
4. เครื่องตรวจจับอิเล็กตรอน (backscatter and secondary detector)
5. ช่องใส่ตัวอย่าง (sample chamber)



ภาพ 34 แสดงส่วนประกอบของกล้อง SEM

ที่มา: http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope.htm/printable

หลักการทำงานของกล้อง SEM จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (condenser lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (secondary electron) ขึ้น ซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึก และแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ และถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอแสดงภาพต่อไป และสามารถบันทึกภาพจากหน้าจอแสดงได้เลย

ข้อดีของกล้อง SEM เมื่อเปรียบเทียบกับกล้อง TEM คือ ภาพโครงสร้างที่เห็นจากกล้อง SEM จะเป็นภาพลักษณะ 3 มิติ ในขณะที่ภาพจากกล้อง TEM จะให้ภาพลักษณะ 2 มิติ อีกทั้งวิธีการใช้งานเครื่อง SEM จะมีความรวดเร็ว และใช้งานสะดวกกว่ากล้อง TEM มาก

2. **ลักษณะการใช้งานกล้อง** SEM

ในทางปฏิบัติ ลักษณะการใช้งานของกล้อง SEM อาจแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มหลัก ดังนี้

1. High Resolution Mode ใช้สำหรับงานที่ต้องการกำลังขยายสูงๆ จึงต้องการจุดตกกระทบขนาดเล็ก ๆ

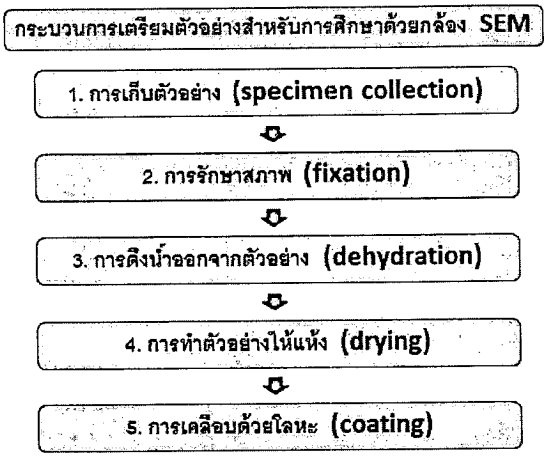
2. High Depth of Field Mode สำหรับงานที่ต้องการความชัดลึกสูง จึงต้องการใช้มุมคอนเวอร์เจนต์ของลำอิเล็กตรอนเล็ก ๆ

3. High Current Mode สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยต้องการปริมาณกระแสมากๆ เพื่อเพิ่มความไวต่อการตรวจวัดปริมาณของธาตุ

4. Low Voltage Mode สำหรับการศึกษาที่ต้องการข้อมูลพื้นผิวที่ดีขึ้น และลดปริมาณประจุที่สะสมบนผิวทำให้ตัวอย่างที่นำมาศึกษาไม่ต้องเคลือบทอง หรือเคลือบคาร์บอน

3. **กระบวนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้อง** SEM

กระบวนการต่าง ๆ ในการเตรียมตัวอย่างในเทคนิคทาง SEM ขั้นตอนแรก ๆ จะคล้ายกับการเตรียมตัวอย่างของเทคนิคทาง TEM โดยจะแตกต่างกันออกไป หลังจากกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยกระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญดังนี้ (ภาพ 35)



ภาพ 35 แสดงกระบวนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้อง SEM

4. หลักการในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการเตรียมเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM

1. การเก็บตัวอย่าง (specimen collection)

เป็นขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจากพืชหรือสัตว์ โดยต้องคำนึงถึงลักษณะทางกายวิภาคที่มองเห็น (gross anatomy) ความชอกช้ำ (atraumatic) ความสะอาด (sterile technique) และขนาดของเนื้อเยื่อที่ทำการเก็บ หลักการในทางปฏิบัติ คือ

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างด้วยความรวดเร็วมากที่สุด

1.2 ทำการล้างตัวอย่างในน้ำยา เช่น 0.85 % NaCl หรือ Ringer's solution

2. การรักษาสภาพตัวอย่าง (fixation)

เป็นขั้นตอนการคงสภาพของเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันการเกิดการเสื่อมสภาพ (tissue autolysis) ทำให้เนื้อเยื่อที่มีอยู่ในสภาวะ semi-fluid กลายเป็น semi-solid การทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพ โดยเป็นกระบวนการทำให้โปรตีนซึ่งมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกิดความแข็งตัว สำหรับการทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพไม่นิยมใช้ความร้อน เพราะความร้อนสามารถทำลายของประกอบในเซลล์ (organelles) ได้ น้ำยารักษาสภาพ (fixative solution) ที่ดีต้องมีคุณสมบัติที่ช่วยหยุดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะการเสื่อมสภาพภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อันเป็นผลจากการแข็งตัว หรือตกตะกอนของโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (denature protein) โดยลักษณะของตัวอย่างต้องคำนึงถึงความต้องการในการศึกษาสภาพพื้นผิวของตัวอย่างนั้น ๆ

3. การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration)

เป็นขั้นตอนดึงน้ำออกจากตัวอย่าง เพื่อทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพ โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น ethyl alcohol หรือ acetone เทคนิคการจุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในตัวทำละลาย

อินทรีย์เพื่อดึงน้ำออกนั้นจะต้องทำหลายครั้ง โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์มีเวลาการทำงานเพียงพอ และทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างค่อย ๆ แห้งอย่างมีประสิทธิภาพ

4. การทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying)

การทำตัวอย่างให้แห้งมีหลายวิธี

4.1 วิธีที่ทำให้แห้งคือ การทำให้แห้งด้วยบรรยากาศ (air drying) วิธีการนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีความคงทนแข็งแรงเช่น แมลง แก่นไม้ ใยของพืช เป็นต้น

4.2 วิธีที่เรียกว่า critical point drying หรือเรียกย่อ ๆ ว่า CPD วิธีนี้ใช้หลักการคือ สารอินทรีย์ของเหลวทุกชนิดจะเปลี่ยนสภาพเป็นไอ ณ ความดัน และอุณหภูมิหนึ่งที่เรียกว่าจุดวิกฤต (critical point) โดยไม่ทำให้สภาพของพื้นผิว และความตึงผิวเปลี่ยนแปลงไปจากความเป็นจริง วิธีการนี้เริ่มจากการขจัดน้ำออก แล้วนำไปผ่านสารอินทรีย์เหลว ซึ่งเป็น intermediate fluid เช่น Freon 113 ก่อนที่จะนำไปใส่ใน transitional fluid เช่น Freon 12 หรือ CO_2 ซึ่งขั้นตอนสุดท้ายจะต้องทำในภาชนะพิเศษที่สามารถควบคุมความดัน และอุณหภูมิได้ ภาชนะนี้เรียกว่า CPD Bomb หรือ Chamber ของเหลวอินทรีย์ขั้นสุดท้าย ซึ่งขณะนี้ได้เข้าไปแทนที่ของเหลวภายในตัวอย่าง และจะกลายเป็นไอ อย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มความดัน และอุณหภูมิให้ถึงจุดวิกฤตของของเหลวที่ใช้เป็น transition fluid โดยจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงความตึงผิวของตัวอย่าง ผลที่ได้คือตัวอย่างที่แห้งสนิท และพร้อมที่จะนำไปวางบนแผ่นตัวอย่าง (specimen stub) เพื่อที่จะนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

5. การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (metal coating)

นำตัวอย่างที่แห้งจากขั้นตอน drying ไปวางบน stub โดยใช้กาวเป็นตัวเชื่อมผิวล่างของตัวอย่างให้ติดอยู่บนผิวของ stub เรียกว่า ขั้นตอน mounting โดยกาวที่ใช้จะต้องมีโลหะผสม หรือต้องเป็นสารตัวนำไฟฟ้า เช่น ผงถ่านที่ผสมในกาว เรียกว่า carbon colloidal adhesive หลังจากขั้นตอน mounting แล้วจะต้องนำตัวอย่างพร้อม stub ไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลของโลหะ (metal coating) ใน vacuum evaporator หรือ sputtering unit

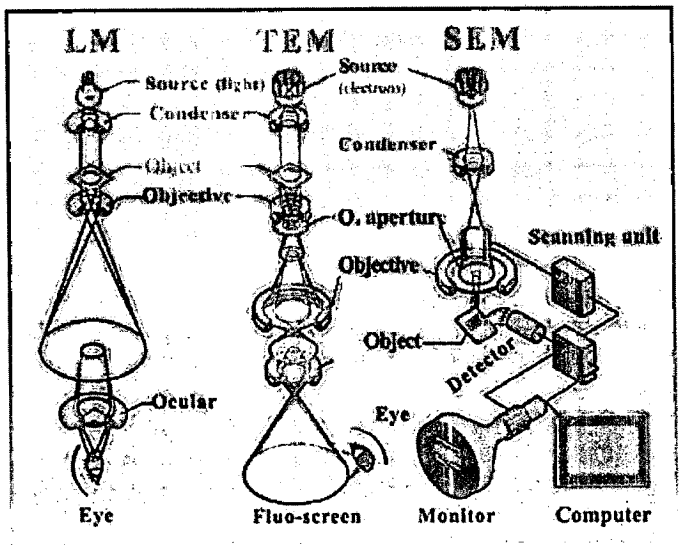
การ coating เริ่มต้นด้วยการฉาบคาร์บอนเพื่อเพิ่มการนำของไฟฟ้า จากนั้นทำการฉาบด้วยทองผสมพาลาเดียม (gold-palladium) ความหนาของแผ่นโมเลกุลของโลหะรวมกันแล้วไม่ควรเกิน 15 นาโนเมตร ตัวอย่างที่ผ่านการเคลือบทองผสมพาราเดียมแล้ว พร้อมที่จะนำไปศึกษาภายใต้กล้อง SEM ได้ทันที

ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

1. **หลักการทำงานของกล้อง** TEM

กล้อง TEM มีหลักการสร้างภาพขยายที่คล้ายกับการขยายภาพกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope หรือ LM) โดยใน LM จะมีแหล่งกำเนิดคลื่นพลังงานที่ใช้ส่องตัวอย่างเป็นหลอดไฟฟ้าวางอยู่ด้านล่างสุด (ภาพ 36) โดยแสงที่ได้จากหลอดไฟจะผ่านเลนส์รวมแสงที่เรียกว่า condenser lens เพื่อให้แสงเข้มขึ้นตามความเหมาะสมกับลักษณะตัวอย่าง โดยแสงที่ถูกทำให้เข้มขึ้นนี้จะส่องผ่านตัวอย่างที่ถูกเตรียมเป็นชิ้นบาง ภาพของตัวอย่างที่ถูกส่องสว่างนี้จะถูกขยายด้วยเลนส์วัตถุ (objective lens) สร้างภาพที่เรียกว่า intermediate image และเลนส์ใกล้ตา (ocularlens) จะทำหน้าที่ขยายภาพที่ได้เป็นภาพขยายสุดท้าย

ในกล้อง TEM การสร้างภาพขยายจะคล้ายกับ LM มาก แต่คลื่นพลังงานที่ใช้ส่องตัวอย่างเป็นอิเล็กตรอนแทนแสง ซึ่งสร้างจากอุปกรณ์ที่เรียกว่า electron gun หรือเรียกว่าแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน โดยอิเล็กตรอนที่ได้จะผ่าน condenser lens เพื่อปรับให้มีความเข้มตามความเหมาะสมกับลักษณะตัวอย่าง ลำอิเล็กตรอนที่ถูกทำให้เข้มขึ้นนี้จะส่องผ่านตัวอย่างที่ถูกเตรียมเป็นชิ้นบางมากๆ (ultrathin structure) ภาพของตัวอย่างที่ถูกส่องสว่างนี้จะถูกขยายด้วยเลนส์วัตถุ (objective lens) สร้างภาพที่เรียกว่า intermediate image โดยที่ projector lens ทำหน้าที่ขยายภาพขยายสุดท้ายลงบนฉากเรืองแสง หรือบันทึกลงบนฟิล์ม



ภาพ 36 แสดงการเปรียบเทียบหลักการทำงานของกล้อง LM, TEM **และ** SEM

ที่มา: http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/info/fesemfaq/

อุปกรณ์หลักในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM)

1. LENS

ประกอบด้วย objective lens และ projector lens เป็น electro magnetic lens ดังที่อธิบายไว้แล้ว เลนส์ในชุดนี้ทำงานคล้ายกับเลนส์ในกล้อง LM โดย objective lens ทำหน้าที่สร้าง intermediate image ซึ่งจะถูกขยายต่อโดย projector lens จากนั้นจะฉายภาพขยายลงบนฉากเรืองแสง หรือฟิล์ม รับภาพสำหรับกล้องที่บันทึกภาพเป็นระบบดิจิตอล projector lens เทียบได้กับ ocular lens ในกล้อง LM

2. น้ำยาและสารละลายทางเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 น้ำยาล้าง (Rinsing solution) ใช้เพื่อล้างตัวอย่างในขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างก่อนทำการเก็บตัวอย่าง คือ 0.85 % NaCl หรือ Rinsing solution

2.2 Buffer solution ใช้สำหรับล้างตัวอย่างภายหลังจากการรักษาสภาพ หรือผสมน้ำยารักษาสภาพ ได้แก่ 0.2 M Sodium phosphate monobasic และ 0.2 M Sodium phosphate dibasic โดยก่อนใช้ควรผสมสารเคมีสองชนิดเข้าด้วยกันแล้วใช้งานทันที นอกจากนี้ยังมี cacodylate buffer เพื่อใช้ผสมในน้ำยารักษาสภาพ และล้างชิ้นเนื้อภายหลังการรักษาสภาพ

2.3 น้ำยารักษาสภาพ (Fixative solution) ได้แก่ 4% osmium tetraoxide (aqueous solution) ควรเตรียมไว้เป็น stock solution เพื่อสำหรับเตรียมน้ำยารักษาสภาพ

3. การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเก็บตัวอย่างถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง และควรให้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ เพื่อป้องกันตัวอย่างเหล่านั้นถูกทำลาย หรือเสื่อมสภาพไปจากเดิม ตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาจะเป็นเนื้อสัตว์และพืชที่เก็บมาโดยการเจาะ ตัด เฉือน หรือหั่น แล้วนำมารักษาสภาพ หรือแช่ในน้ำยาเคมี เพื่อรักษาสภาพให้คงเดิม หรือมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับสภาพเดิมให้มากที่สุด การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลองและคน สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

3.1 การเก็บจากศพ หรือร่างที่ปราศจากการมีชีวิต

โดยการผ่าศพ หรือชากสัตว์ที่ตายแล้ว (autopsy) แล้วตัดชิ้นเนื้อ หรือเก็บตัวอย่างอื่น ๆ ที่ไม่ใช่มวลหรือก้อนเนื้อ อาทิเช่น ของเหลวจากส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะ หรือในท่อกลวงภายในอวัยวะ หรือร่างกาย

3.2 การเก็บตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย หรืออวัยวะในขณะที่ร่างกายยังมีชีวิตอยู่โดยการเก็บ (biopsy) ตัวอย่างที่เก็บมาโดยการใช้วิธีนี้ส่วนใหญ่นิยมใช้ในโรงพยาบาล หรือสถานพยาบาลที่ต้องการส่งชิ้นเนื้อผู้ป่วยไปตรวจ เพื่อการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา วิธีการตัดชิ้นเนื้อจากร่างกายในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ อาจทำได้โดยการทำ biopsy เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาดเล็กโดย

วิธี percutaneous biopsy หรือ needle biopsy จากอวัยวะ และอีกวิธีหนึ่งของการเก็บตัวอย่างจากร่างกายที่ยังมีชีวิตอยู่ คือการตัด หรือการเฉือนโดยตรงจากอวัยวะ เช่น จากกล้ามเนื้อ ก้อนเนื้องอกที่ตัดในขณะศัลยกรรมผู้ป่วย ซึ่งเป็นตัวอย่างประเภทพยาธิวิทยาศัลยกรรม (surgical pathology) ชิ้นเนื้อส่วนหนึ่งจะถูกเก็บนำส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM และในขณะเดียวกันก็ส่งตรวจโดยวิธีการพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อ (histopathology) ธรรมดา ซึ่งใช้กล้อง LM

การรักษาสภาพตัวอย่าง

การรักษาสภาพตัวอย่างเป็นวิธีการเก็บรักษาเซลล์ และเนื้อเยื่อ หรือตัวอย่างทางชีวภาพซึ่งเก็บมาโดยวิธีการทั้ง biopsy และ autopsy การรักษาสภาพตัวอย่างจัดเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญที่สุดขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง เพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

วิธีการรักษาสภาพตัวอย่างสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบที่ใช้ในการรักษาสภาพ

1. การรักษาสภาพโดยวิธีกายภาพ (physical fixative)
2. การรักษาสภาพโดยวิธีการทางเคมี (chemical fixative)

การรักษาสภาพโดยวิธีกายภาพ เป็นวิธีการเก็บรักษาเซลล์ และเนื้อเยื่อ โดยใช้ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความร้อน ความเย็น หรือการนำชิ้นเนื้อมาแช่แข็งในการทำ frozen section หรือการตัดให้บางภายหลังการแช่แข็ง

การรักษาสภาพโดยวิธีสารเคมี เป็นวิธีการรักษาลักษณะ และคุณสมบัติบางประการของเซลล์ โดยใช้สารเคมีหรือไอของสารเคมี วิธีการเช่นนี้นิยมใช้อย่างแพร่หลายในรักษาสภาพตัวอย่างประเภทต่าง ๆ จากสัตว์และพืช เพื่อการเตรียมการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพราะให้ผลที่มีคุณภาพ และง่ายต่อการควบคุม

หากพิจารณาการรักษาสภาพโดยใช้สารเคมีถึงชนิดที่ใช้ในการรักษาสภาพแต่ละครั้ง สามารถแบ่งวิธีการรักษาสภาพตามจำนวนของสารเคมีที่ใช้ได้ ดังนี้

1. การรักษาสภาพโดยการใช้สารเคมีชนิดเดียว เรียกว่า single fixation
2. การรักษาสภาพโดยการใช้สารเคมีมากกว่า 2 ชนิด เรียกว่า double fixation โดยการรักษาสภาพตัวอย่างด้วยน้ำยาชนิดที่ 1 เป็นระยะเวลาไม่นาน หลังจากนั้นนำมารักษาสภาพในน้ำยารักษาสภาพ ตัวอย่างที่ 2 อีกระยะหนึ่ง ซึ่งระยะหลังนี้เรียกว่า post fixation เช่น การรักษาสภาพด้วย aldehyde แล้วตามด้วย OsO_4 เป็น post fixation ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลดี เพราะสารเคมีทั้งสองชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบภายในเซลล์ได้มากกว่าการใช้สารเคมีเพียงชนิดเดียว

ถึงแม้ว่ารายละเอียดเกี่ยวกับปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่างยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากปฏิกิริยาของการรักษาสภาพตัวอย่างจะบรรลุเป้าหมายขึ้นกับปัจจัยดังนี้

1. ความสัมพันธ์หรือสัดส่วนระหว่างขนาดของตัวอย่างกับปริมาตรของน้ำยารักษาสภาพ (specimen size: fixative solution)

2. ระยะเวลาของการรักษาสภาพ (fixation time) โดยส่วนใหญ่ควรใช้เวลามากกว่า 1 ชั่วโมง (> 1 ชม.)

3. อุณหภูมิขณะรักษาสภาพ (temperature)

4. ความเป็นกรด-ด่างของน้ำยารักษาสภาพ (pH) โดยทั่วไปมีค่า pH ระหว่าง 6.5 ถึง 8.0

ตาราง 5 แสดงลักษณะของส่วนประกอบภายในเซลล์ปกติที่แสดงคุณภาพการรักษาสภาพที่ดี

ส่วนประกอบของเซลล์	ลักษณะที่สังเกตเห็น
ผนังเซลล์ (cell wall)	มีลักษณะเป็นแนวทึบที่ต่อเนื่อง ไม่ขาดช่วง
รายละเอียดภายใน cytoplasm	ปรากฏเป็นตะกอนละเอียดทั่วไป ไม่มีช่องว่าง
Endoplasmic reticulum	มีลักษณะเป็น เยื่อบาง ต่อเนื่อง ไม่ขาดหรือถูกทำลาย
Glycogen	มีลักษณะเป็นก้อนทึบชัดเจน
Golgi complexes	เป็นชั้นๆ เยื่อบาง เป็นระเบียบ ไม่ขาดเป็นระยะ
Lipid	ทึบ เป็นเนื้อเดียวกัน
Microbodies	เยื่อบุชั้นนอกไม่ขาด และเห็นแกนกลางที่มีลักษณะทึบ
Mitrochondria	เยื่อบุมีลักษณะบาง เห็นเป็น 2 ชั้น ไม่แยกจากกัน ไม่บวม
Nuclear envelope	เยื่อบุมีลักษณะบาง เห็นเป็น 2 ชั้น ไม่แยกจากกัน ขนานกันโดยตลอด
Plasma membrane	มีลักษณะเป็นแนวทึบที่ต่อเนื่อง
Vacuoles	เยื่อบุผิวมีช่องว่างต่อเนื่องโดยไม่ขาดตอน

วิธีการรักษาสภาพ (Method of fixation) สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การจุ่มตัวอย่างลงในน้ำยารักษาสภาพ (immersion fixation)

เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ และในห้องศัลยกรรม หรือเหมาะแก่การเก็บตัวอย่างขนาดเล็กที่ได้จากการทำ biopsy เป็นส่วนใหญ่ โดยการหั่นหรือตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ล้างในน้ำเกลือ แล้วจุ่มลงในน้ำยารักษาสภาพ

2. การฉีดหรือใส่น้ำยารักษาสภาพเข้าสู่อวัยวะ หรือท่อกลวง

เป็นวิธีการที่ให้ผลดี เหมาะสำหรับการรักษาสภาพอวัยวะขนาดใหญ่ทั้งอวัยวะที่ตัดออกจากร่างกายคนหรือสัตว์ทดลอง และเหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลองหลังจากการวิจัย เพื่อเก็บตัวอย่าง

น้ำยารักษาสภาพ (Fixative solution)

น้ำยารักษาสภาพส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่าง เพื่อการเตรียมสำหรับงานด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประกอบด้วย ตัวทำละลาย และสารเคมี ทั้งตัวสารเคมีที่ทำหน้าที่รักษาสภาพเพื่อรักษาองค์ประกอบของเซลล์ และสารเคมีประเภทที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำยารักษาสภาพ สารเคมีที่เป็นสารประกอบที่สำคัญและนิยมใช้ มี 2 ชนิดดังนี้

1. Glutaraldyhyde ($C_5H_8O_2$)

เป็น dialdehyde ที่สามารถละลายน้ำได้ และสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอมิโนในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความคงทน ทั้งนี้ควรทำการเตรียมใหม่ก่อนการใช้งานทุกครั้งสำหรับการรักษาสภาพตัวอย่าง และจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ โดยความเข้มข้นของ glutaral dehyde ที่ใช้มีค่าอยู่ที่ประมาณ 1.5 - 4%

2. Paraformaldehyde ($HO(CH_2O)_nH$)

มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีความคงทน ไม่สลายตัวง่าย และไม่ถูก oxidized ง่าย การเตรียมสารละลาย paraformaldehyde จำเป็นต้องใช้ NaOH ซึ่งน้ำยารักษาสภาพ paraformaldehyde ในสารละลาย phosphate buffer จัดเป็นน้ำยารักษาสภาพที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพรักษาองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ แต่อาจทำลาย enzyme บางส่วน

ทั้ง glutaraldehyde และ paraformaldehyde จัดเป็นน้ำยารักษาสภาพในกลุ่มที่หนึ่ง จึงเรียกน้ำยารักษาสภาพทั้งสองชนิดนี้ว่า น้ำยารักษาสภาพปฐมภูมิ (primary fixative) ในการใช้งานบางครั้งอาจผสมน้ำยาทั้งสองชนิดเข้าด้วนกัน

3. Osmium tetraoxide (OsO_4)

เป็นสารเคมีที่มีคุณภาพดีที่สุดในการเตรียมสำหรับการใช้รักษาสภาพ ซึ่งเป็นที่นิยมในการใช้สำหรับรักษาสภาพตัวอย่าง เพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน OsO_4 เป็น fixative solution ที่จัดอยู่ในกลุ่มน้ำยารักษาสภาพแบบทุติยภูมิ (secondary fixative solution)

OsO_4 ไม่เพียงแต่ทำหน้าที่รักษาองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญ เช่น unsaturated fat เท่านั้น ยังมีบทบาทในการเพิ่มความเข้มให้กับ membrane ต่าง ๆ ของเซลล์ โดยการจัดตัวของโมเลกุล osmium กับ membrane จึงเสมือนกับ osmium ทำหน้าที่ในการย้อมด้วยส่วนหนึ่ง

หลักการในการเตรียมตัวอย่างในเทคนิค TEM

กระบวนการเตรียมตัวอย่างทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพประกอบด้วย วิธีการที่จัดไว้เป็นระบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในการเตรียมตัวอย่างประเภทชิ้นเนื้อ และเซลล์เพื่อการศึกษา ยังคงใช้หลักการสากลเช่นเดียวกับปฏิบัติการสำหรับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง (specimen collection)
2. การรักษาสภาพ (fixation)
3. การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)
4. การนำตัวกลางเข้าสู่เนื้อเยื่อ (infiltration)
5. การฝังตัวอย่างในพลาสติก (embedding)
6. การทำให้พลาสติกแข็งตัว (polymerization)
7. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการตัดให้บาง (block trimming)
8. การตัดตัวอย่างให้บาง (ultra thin sectioning)
9. การวางตัวอย่างบนแผ่นวางตัวอย่าง
10. การย้อมด้วยโลหะหนัก (metal staining)
11. การศึกษาด้วยกล้อง TEM

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการศึกษาด้วยกล้อง TEM

1. การเก็บตัวอย่าง (specimen collection)

เป็นขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจากพืช หรือสัตว์ โดยต้องคำนึงถึงลักษณะทางกายวิภาคที่มองเห็น (gross anatomy) ความชอกช้ำ (atraumatic) ความสะอาด (sterile technique) และขนาดของเนื้อเยื่อที่ทำการเก็บ หลักการในทางปฏิบัติ คือ

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างด้วนความรวดเร็วมากที่สุด

1.2 ทำการล้างตัวอย่างในน้ำยา เช่น 0.85% NaCl หรือ Ringer's solution

2. การรักษาสภาพตัวอย่าง (fixation)

เป็นขั้นตอนการคงสภาพของเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันการเกิดการเสื่อมสภาพ tissue autolysis ทำให้เนื้อเยื่อที่มีอยู่ในสภาวะ semi-fluid กลายเป็น semi-solid การทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพ โดยเป็นขบวนการทำให้โปรตีนซึ่งมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกิดความแข็งตัว สำหรับการทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพไม่นิยมใช้ความร้อน เพราะความร้อนสามารถทำลายของประกอบในเซลล์ (organelles) ได้ น้ำยารักษาสภาพ (fixative solution) ที่ดีต้องมีคุณสมบัติที่ช่วยหยุดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะการเสื่อมสภาพภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว อันเป็นผลจากการแข็งตัวหรือตกตะกอนของโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (denature protein) โดยลักษณะของตัวอย่างต้องคำนึงถึงความต้องการในการศึกษาสภาพพื้นผิวของตัวอย่างนั้น ๆ

3. การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration)

เป็นขั้นตอนดึงน้ำออกจากตัวอย่างเพื่อทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพ โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น ethyl alcohol หรือ acetone เทคนิคการจุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อดึงน้ำออกนั้น จะต้องทำหลายครั้งโดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์มีเวลาการทำงานเพียงพอ และทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างค่อย ๆ แห้งอย่างมีประสิทธิภาพ

4. การนำสารตัวกลางเข้าสู่ในเนื้อเยื่อ (infiltration)

เป็นขั้นตอนการนำสาร embedding media เข้าสู่เนื้อเยื่อโดยเริ่มต้นจากการ clearing ทำโดยแช่ตัวอย่างลงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของสาร clearing กับ embedding media หลาย ๆ ครั้ง แต่ละครั้ง เปลี่ยนน้ำยาให้มีความเข้มข้นของ embedding media เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงความเข้มข้นสูงสุด (100%) ทำให้ตัวอย่างเนื้อเยื่อถูกตัวกลาง embedding แทรกซึมอย่างค่อยเป็นค่อยไปจนกระทั่งถึงทุกส่วน สารที่นิยมได้แก่ epon, araldite เป็นต้น

5. ฝังตัวอย่างในพลาสติก (embedding)

ภาชนะที่ใช้สำหรับเทคนิคอิเล็กตรอนชนิด TEM นิยมใช้ capsule ชนิดปลายแหลมมีลักษณะคล้ายกระสุน ตัวกลางที่ใช้ embedding ที่ใช้ในครั้งนี้ต้องเป็นชนิดเดียวกันกับขั้นตอนที่แทรกซึม ในส่วนของ resin plastic หรือ resin epoxy ให้นำไปอบความร้อนในตู้อบหลังจากตัวกลาง embedding แข็งตัวแล้วให้แคะออกจากภาชนะ วัสดุที่ได้ทั้งหมดเรียกว่า tissue block พร้อมสำหรับการนำเนื้อเยื่อนั้นมาตัดให้ได้ความบางตามต้องการ

6. การทำให้พลาสติกแข็งตัว (polymerization)

ทำได้โดยการอบพลาสติกที่มีตัวอย่างฝังอยู่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนพลาสติกมีการแข็งตัว โดยทั่วไปจะใช้ระยะประมาณ 48-72 ชั่วโมง

7. การเตรียมตัวอย่างที่แข็งเพื่อการตัดให้บาง (block trimmimg)

ทำการตัด หรือเฉือนเอาพลาสติกส่วนเกินออก เพื่อให้หน้าตัดของตัวอย่างที่ฝังในพลาสติก มีขนาดเหมาะสม (0.1-0.2 มิลลิเมตร) ทำให้สะดวก และง่ายต่อการตัดให้บาง

8. การตัดตัวอย่างให้บาง (Ultra thin sectioning)

เครื่องมือที่ใช้สำหรับตัด block พาราฟิน เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดTEM ต้องใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อที่มีมีดเพชร หรือมีดแก้ว จึงจะสามารถตัดตัวอย่างได้ขนาดที่บางตั้งแต่ 60-90 นาโนเมตร ภาคตัดที่มีความบางที่สุดจะมีสีเงินเมื่อสะท้อนแสง หากหนาขึ้นจะมีสีทองหรือสีอื่น

9. การติดตัวอย่างบางบนแผ่นวางตัวอย่าง

วัสดุรองรับที่ใช้สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นแผ่นตะแกรงขนาดเล็กทำด้วยโลหะเรียกว่า กริด (grid) กริดที่นิยมใช้เป็นกริดทองแดง (copper grid) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร จำนวน หรือตารางช่องของกริดแต่ละแผ่นมีขนาดตั้งแต่ 100, 150, 200 ถึง 400 ช่อง

10. การย้อมด้วยโลหะ (metal staining)

ทำได้โดยการจุ่มตัวอย่างที่ติดบนกริดในสารละลายโลหะหนักคือ uranyl acetate และ lead citrate ตามลำดับ เพื่อเพิ่มความเข้มและการทึบแสงให้แก่องค์ประกอบภายในตัวอย่าง กริดพร้อมตัวอย่างที่ย้อมเรียบร้อยควรเก็บไว้ในกล่อง หรือจานพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง

11. การศึกษาด้วยกล้อง TEM

ทำการใส่ตัวอย่างที่ย้อมด้วยโลหะหนักแล้ว ใส่ช่องใส่ตัวอย่างของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากนั้นทำการศึกษา และถ่ายภาพตามต้องการ เมื่อเสร็จแล้วนำภาพถ่ายไปวิเคราะห์และประเมินผล การแปลผลของภาพที่ได้จากเทคนิคทาง TEM เป็นขั้นตอนสุดท้าย ผู้ปฏิบัติต้องเรียนรู้จากการดู การศึกษา รวมทั้งการเปรียบเทียบผลที่ปรากฏออกมา เพื่อให้ได้ความหมายข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับรายละเอียดของเซลล์

ส่วนประกอบของน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ (Fixative solution formulas)

1. Karnovsky's fixative

ส่วนประกอบ

1.	0.2 M phosphate buffer	50	ml
2.	10% paraformaldehyde	20	ml
3.	25% glutaraldehyde	10	ml

จะได้น้ำยารักษาสภาพ 100 ml ซึ่งประกอบด้วย 2% paraformaldehyde และ 2.5% glutaralhehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4

2. Karnovsky's fixative, Sodium cacodylate

Solution A

Paraformaldehyde	2	g
Distilled water	20	ml

ปรับ pH ด้วย NaOH ประมาณ 1-3 หยด

Solution B

50% glutaraldehyde	5	ml
Distilled water	5	ml
ได้ 25% glutaraldehyde	10	ml

Solution C

0.2 M sodium cacodylate	50	ml
0.2 M HCl	2.7	ml
Sucrose	1.5	g

นำมาผสมกันโดยใช้ สาร A = 20 ml + B = 10 ml + C = 50 ml ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml แล้วเติม 25 mg $CaCl_2$ anhydrous

Cacodylate 0.2 M pH. 7.2–7.3

Sodium cacodylate	42.8	g
1 N. HCl	6.9	ml
Distilled water	เติมให้ได้ปริมาตร 1,000 ml	

การเตรียม 4% OsO_4 aqueous solution

ล้างหลอดบรรจุ OsO_4 ให้สะอาดเช็ดให้แห้ง แล้วห่อหลอดที่บรรจุ OsO_4 ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ทุบให้หลอดที่ถูกห่อแตก แล้วจึงถ่ายลงในขวดแก้วสีชาทั้งหมด

ในกรณีที่ใช้ OsO_4 1 กรัม จะต้องเติมน้ำให้ได้ 25 ml เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ค้างคืนในตู้ดูดควันจนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน (สีฟางข้าว) กรองด้วยกระดาษกรอง บรรจุลงในขวดใหม่ ปิดด้วยพาราฟิน เก็บไว้ในที่ปลอดภัย

เวลาใช้ต้องลดความเข้มข้นด้วย phosphate buffer และสังเกตสีของน้ำยา ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน หรือสีเทาแสดงว่าน้ำยาเสื่อมสภาพต้องเตรียมใหม่

การเตรียม 2% Osmium tetraoxide **ใน** phosphate buffer pH 7.2

ทำการดูดสารละลาย 4% OsO_4 มา 1 ส่วน เติม phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน

การเตรียม Embedding plastic

Araldite

ส่วนประกอบ

Araldite 502	30	g
DDSA	23	g
Catalyst DMP-30	42-44	หยด

ใช้ไม้คนให้เข้ากัน เมื่อผสมเสร็จแล้วเก็บส่วนที่เหลือในหลอดฉีดยาแล้วปิดด้วย parafilm เพื่อป้องกันอากาศเข้า และเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

Epon (Embed and Poly/Bed) Formulation

Mixture A

Epon 812	5	ml
DDSA	8	ml

Mixture B

Epon 812	8	ml
NMA	7	ml