

การเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยา  
สำหรับศึกษาด้วย  
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

Microscopic Center, faculty of Science,  
Burapha University

ผู้จัดทำ

ผศ.จักรพันธ์ ถาวรธิดา

นางสาวจันทิพย์ นพรัตน์อาภากุล

# การเก็บตัวอย่าง

แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS)  
ที่ 4°C นาน 4 hrs.



ล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



เก็บรักษาพยาธิไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4°C

# การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้อง TEM

นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ~ 1 x 1 mm



Fixed ด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1M PBS ที่ 4°C นาน 2 hrs.



ล้างด้วย 0.1M PBS ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



Dehydrated ด้วย ethyl alcohol

(70%, 80%, 90%, 95% 2 ครั้ง และ 100% 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ)



Infiltrated ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที,

PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 hr. และ (1:2) นาน 12-14 hrs.





**embedded ใน pure Araldite 502 resin**



**polymerized ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 hrs., 45°C และ 60°C  
เป็นเวลาอย่างละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ**



**นำไปตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome**

## Semi-thin section

(หนา ~ 500-700 nm)

ย้อมด้วยสี methylene blue ในน้ำ

(1% methylene blue, 1% sodium tetraborate)



ศึกษาด้วยกล้อง LM

## Ultra-thin section

(หนา ~ 60-90 nm)

นำ section วางลงบน

Copper grid



ทิ้งไว้จนแห้ง

ย้อมด้วย saturated uranyl acetate ใน  
70% methanol และ 0.1% lead citrate  
ในน้ำ (อย่างละ 15 นาที)



ทิ้งไว้จนแห้ง

นำไปศึกษาด้วยกล้อง TEM

(TECHNI 20, Philips) ที่ 75 kV

# การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM

นำตัวอย่างที่เก็บไว้ Fixed ด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS, pH 7.4 ที่ 4°C นาน 2 hrs.



ล้างด้วย 0.1M PBS, pH 7.4 ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



Dehydrated ด้วย ethyl alcohol

(70%, 80%, 90%, 95% 2 ครั้ง และ 100% 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ)



นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง Critical point drying



ติดตัวอย่างบน stub + เคลือบด้วยโลหะหนัก

เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

# เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับ SEM

- Critical point drying
- Ion sputter coater



# Critical point drying (CPD)



Polaron Range รุ่น CPD 7501

- เครื่องทำแห้งตัวอย่าง ณ จุดวิกฤต
- ทำให้ตัวอย่างแห้งโดยไม่ให้เสียรูปร่าง
- เหมาะกับตัวอย่างทางชีววิทยา

# Ion sputter coater

- เครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (ทองบริสุทธิ์) หรือคาร์บอน
- เหมาะสำหรับตัวอย่างทางชีววิทยา หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย EDS



Polaron Range รุ่น SC 7620

# เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับ TEM

- เครื่องตัดตัวอย่าง (Ultramicrotome)



- ตัวอย่างต้องผ่านการเตรียมและฝังในเรซิน
- ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างทางชีววิทยา
- สามารถตัดตัวอย่างทางวัสดุศาสตร์ ที่มีลักษณะเหมือนกับพลาสติก

Leica รุ่น Leica Ultracut R

Thank you