การประยุกต์ใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสำหรับตัวอย่างแบคทีเรีย

Application of Transmission Electron Microscopy techniques for Bacterial sample

พัชรี อำรุง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2564(2)

เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) ขึ้นชื่อว่าเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่อยู่อันดับท้ายสุดที่นักวิจัย และนักวิทยาศาสตร์ต้องการใช้เพื่อศึกษาตัวอย่างที่ตนเองสนใจเกี่ยวกับ ขนาด รูปร่าง และตลอดจนการเปลี่ยนแปลงในระดับโครงสร้างภายในของเซลล์ ด้วยนั้นเนื่องจากสาเหตุหลักมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากและมีหลักสำคัญคือ ตัวอย่างต้องบางมากพอที่ลำอิเล็กตรอนสามารถผ่านได้เพราะภาพที่ได้เกิดจากการหักเหหรือเบี่ยงเบนของลำอิเล็กตรอนที่ผ่านตัวอย่างไปในมุมที่แตกต่างกันทำให้ความเข้มของอิเล็กตรอนปรากฏบนชุดถ่ายทอดสัญญาณภาพแตกต่างกันอีกทั้งยังได้รายละเอียดสูงและสามารถแยกแยะได้ดีระดับนาโนเมตร ศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในโครงสร้างเซลล์ ภาพที่ได้เป็นสองมิติ ในบทความนี้ผู้เขียนนำเทคนิคการศึกษาขนาดรูปร่างของแบคทีเรียใช้วิธี Dip preparation and Negative staining สำหรับศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ใช้วิธี Cell Ultra structural ซึ่งรายละเอียดและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาจจะต้องอาศัยความชำนาญของนักวิจัย นักวิทยาศาสตร์ที่ปฏิบัติงานการเตรียมตัวอย่างที่ศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- Dip preparation and Negative staining

นำตัวอย่างแบคทีเรียที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย(suspension)ในบัฟเฟอร์มาหยดลงบนแผ่น Parafilm แล้วนำแผ่นกริด grid coated วางคว่ำบนหยดสารแขวนลอยแบคทีเรีย นาน 1-3 นาที จากนั้นทำการล้างส่วนเกินของบัฟเฟอร์และแบคทีเรียออกด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 หยด ใช้กระดาษกรองซับพอหมาดบริเวณขอบแผ่นกริด จากนั้นทำการย้อมด้วย uranyl acetate ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 7 หยดแล้วซับให้แห้งนำ grid coated ที่มีตัวอย่าง ใส่ในกล่องสำหรับเก็บตัวอย่าง (Grid Box) บันทึกรายละเอียดตัวอย่างบน Grid Box แล้วนำไปวางไว้ตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปตรวจด้วยTEM **(ดังภาพที่ 1)**

- ศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ (Cell Ultra structure)

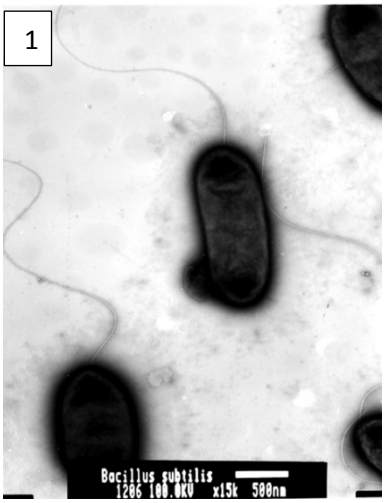
การศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนั้นจำเป็นต้องตัดเซลล์หรือเนื้อเยื่อออกเพื่อให้เห็นโครงสร้างภายในได้อย่างชัดเจนและความหนาของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกตัดออกควรหนาประมาณ 60-70 นาโนเมตร ยอมให้ลำอิเล็กตรอนสามารถทะลุผ่านได้ แต่ที่ความหนาดังกล่าวเนื้อเยื่อธรรมดาไม่สามารถทนต่อการตัดของเครื่องตัดเนื้อเยื่อได้จำเป็นต้องใช้สารเคมีเข้าช่วยในการเตรียมตัวอย่างและการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์

- ตัวอย่างแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวต้องทำการปั่นล้างส่วนเกินของอาหารเลี้ยงเชื้อออกให้หมดแล้วใส่น้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อ glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์
- ตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงในอาหารแข็งสามารถตัดบริเวณผิวหน้าให้ติดวุ้นเล็กน้อยให้ได้ขนาดชิ้น 1X2 มิลลิเมตรใส่ในขวดน้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อ glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

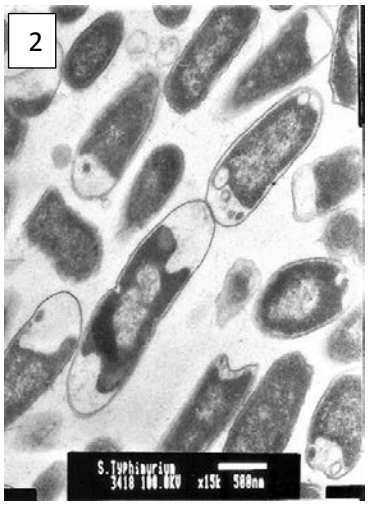
ในขั้นตอนการคงสภาพเซลล์ด้วยสารเคมี glutaraldehyde และ osmium tetroxide ในการคงสภาพแบคทีเรียเป็นหลัก การล้างเซลล์ (Washing) หลังจากทำการคงสภาพเนื้อเยื่อซึ่งเป็นการป้องกันการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำยาดองกับ dehydration agent และระหว่างน้ำยาดองด้วยกัน ในกรณีที่ทำ double fixation สารดังกล่าวอาจทำปฏิกิริยาเกิดตะกอนขนาดเล็กขึ้นในเซลล์ได้ สารที่ใช้ล้างควรเป็นชนิดเดียวกับตัวทำละลายในน้ำยาดอง ขั้นตอนการกำจัดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) ทำการแทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วยอินทรีย์สารเช่น acetone เพราะพลาสติกที่ใช้ในขั้นตอนการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ต่อไปไม่สามารถละลายในน้ำได้จะแยกตัวกันทำให้ขั้นตอนต่อไปจะไม่สมบูรณ์ การแทนที่ด้วย acetone ที่ความเข้มข้นต่างๆเริ่มที่ความเข้มข้นสารต่ำไปหาความเข้มข้นสารสูง จนกระทั่ง absolute solution เพื่อให้แน่ใจ

ว่าปราศจากน้ำ ซึ่งในขั้นตอนการแทนที่องค์ประกอบภายในเซลล์ (Infiltration) อีกครั้งด้วย resin โดยลดปริมาณ acetone และเพิ่มปริมาณ resin ขึ้นในแต่ละขั้นตอน จนถึง resin บริสุทธิ์ ตามลำดับ การฝังตัวอย่างในแม่พิมพ์พลาสติกและการทำให้แข็ง (Embedding and polymerization) ในขั้นตอนนี้ควรทำ label ฝังรวมกับตัวอย่างให้เรียบร้อย นำไปอบด้วยเครื่อง Vacuum Oven Pump ที่แรงดัน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสติกแข็งตัวทนต่อการตัดตัวอย่างและย้อมสีในขั้นตอนต่อไป (Sectioning and Staining) ซึ่งการตัดตัวอย่างให้บางพิเศษในระดับนาโนเมตร หรือ Ultra-thin sections เราต้องอาศัยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบอัลตราไมโครโทม (Ultramicrotome) มีดที่ใช้ตัดมีดแก้ว จะมีความหนาอยู่ในช่วง 60 ถึง 70 นาโนเมตร วางบนแผ่นกริด ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร จากนั้นทำการย้อมด้วยสีโลหะหนักเพื่อเพิ่ม contrast ให้กับตัวอย่างโดยใช้ Uranyl acetate จะทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกและโปรตีน และ Lead citrate จะทำปฏิกิริยากับ ฟอสโฟไลปิดและไกลโคเจน จากนั้นปล่อยตัวอย่างให้แห้งในตู้ดูดความชื้น นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 80 ถึง 100 กิโลโวลต์ **(ดังภาพที่ 2)**

ซึ่งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียดังกล่าวอาจสืบค้นข้อมูลจากบทความทางวิชาการที่เผยแพร่ที่มีลักษณะงานที่มีความใกล้เคียงหรือคล้ายคลึงกันกับเชื้อตัวที่เราทำการศึกษา เพื่อนำมาประกอบการตัดสินใจที่จะเลือกใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมกับชนิดและลักษณะปัจจัยที่แตกต่างกันในการทำวิจัยสำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียต่อไป



ภาพที่ 1 ภาพแบคทีเรีย เตรียมด้วยวิธี Dip preparation and Negative staining บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 15,000 เท่า สเกลบาร์ 500 นาโนเมตร



ภาพที่ 2 ภาพแบคทีเรีย เตรียมด้วยวิธี Cell Ultra structure บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy; TEM) ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 15,000 เท่า สเกลบาร์ 500 นาโนเมตร

เอกสารอ้างอิง

1. อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2540. ข้อคิดและเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาพ I.ตัวอย่างทางชีววิทยา.ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สถาบันผลิตผลการเกษตรฯมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 44 น.

2. John J. Bozzola. Conventional specimen Preparation Techniques for Transmission Electron Microscopy of Cultured Cells, Electron Microscopy Methods and Protocols, 2nd Edition, New Jersey: Humana Press; 2007:
1–18 pp.