การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กบนแผ่นเยื่อกรองเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

Microalgae sample preparation for scanning electron microscopy analysis using membrane filter technique

ยุพดี เผ่าพันธ์
นักวิจัยเชี่ยวชาญ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (มิถุนายน 2565)

เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กจะมีลักษณะการเจริญแขวนลอยอยู่ในน้ำดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเทคนิคในการยึดจับสาหร่ายขนาดเล็กไว้เพื่อให้สามารถนำมาเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เทคนิคการใช้แผ่นเยื่อกรอง (membrane filter) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสะดวกในการยึดจับตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กเอาไว้ก่อนนำไปผ่านขบวนการทางเคมีต่อไป ซึ่งแผ่นเยื่อกรองที่นำมาใช้นั้นต้องเลือกให้มีขนาดของรูพรุนที่มีความเหมาะสมกับขนาดของตัวอย่างสาหร่ายด้วยหากใช้แผ่นเยื่อกรองที่มีรูพรุนขนาดใหญ่เกินไปก็อาจไม่สามารถยึดจับสาหร่ายขนาดเล็กไว้ได้ แผ่นเยื่อกรองที่แนะนำให้ใช้เป็นเยื่อกรองชนิด nitrocellulose membrane ขนาด 0.22 ไมครอน สามารถยึดจับตัวอย่างไว้ได้ดี โดยอาศัย filter holder ช่วยในการกรองเซลล์สาหร่ายที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ ทำการกรองเซลล์สาหร่ายเพื่อให้ติดอยู่บนแผ่นกรอง แล้วนำไปผ่านขบวนการเตรียมตัวอย่างทางเคมีต่อไป ในขั้นตอนของการผ่านสารเคมีต่างๆ จะใช้เวลาน้อยกว่าการเตรียมตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ เนื่องจากสาหร่ายขนาดเล็กมีโครงสร้างค่อนข้างอ่อนบาง หากใช้เวลานานเกินไปอาจทำให้เกิดความเสียหายกับตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กได้ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมสาหร่ายขนาดเล็กบน membrane filter ดังนี้

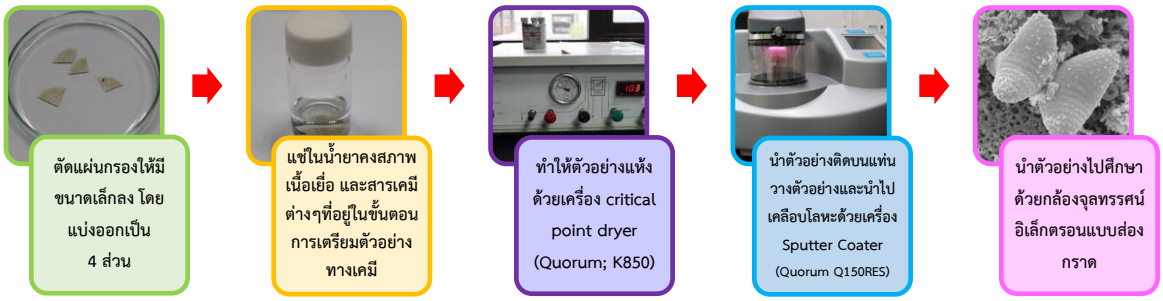
การกรองตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็ก

1. นำแผ่นเยื่อกรอง (membrane filter) ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมครอน ใส่เข้าไปใน filter holder วางยาง O-ring ทับส่วนของแผ่นกรอง จากนั้นประกอบ filter holder เข้าด้วยกัน
2. นำ filter holder ไปวางบนบีกเกอร์ (beaker) ขนาด 30 มิลลิลิตร
3. ใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ดูดสาหร่ายที่แขวนลอยอยู่ในน้ำขึ้นมา
4. นำปลายกระบอกฉีดยาใส่เข้ากับ filter holder แล้วฉีดสาหร่ายที่แขวนลอยอยู่ในน้ำลงไป สาหร่ายจะติดอยู่ที่แผ่นกรอง ดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 การกรองสาหร่ายขนาดเล็กด้วยแผ่นเยื่อกรอง (membrane filter)

การเตรียมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กที่อยู่บนแผ่นเยื่อกรองทางเคมี

1. เปิด filter holder เพื่อเอาแผ่นกรองออกมา แช่ในน้ำกลั่น ตัดแผ่นกรองให้มีขนาดเล็กลง โดยแบ่งเป็น 4 ส่วน
2. นำแผ่นกรองที่ได้แช่ใน 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium phosphate buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อคงสภาพเซลล์สาหร่ายครั้งที่ 1 (primary fixation)
3. ล้างด้วย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
4. คงสภาพเซลล์สาหร่ายครั้งที่ 2 (secondary fixation) โดยนำไปแช่ตัวอย่างใน 1% osmium tetroxide ในน้ำกลั่น นาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
5. ดึงน้ำออกด้วย ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% และ absolute ethanol โดยที่ absolute ethanol ทำซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทั้งนี้อาจหลีกเลี่ยงการใช้ acetone เนื่องจาก acetone อาจทำละลายแผ่นเยื่อกรองบางชนิดได้
6. นำแผ่นกรองสาหร่ายไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
7. นำชิ้นส่วนตัวอย่างสาหร่ายบนแผ่นกรองที่แห้งแล้ว ติดบนแท่นวางตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
8. นำไปเคลือบหรือฉาบโลหะด้วยเครื่อง sputter coater โดยความหนาของโลหะไม่ควรเกิน 20 นาโนเมตร
9. นำตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสาหร่ายขนาดเล็กเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เอกสารอ้างอิง

1. Gabriel B. L. Biological Electron Microscopy. Van Nostrand Reinhold Company. New York. 264 p.
2. Hayat M.A. 2000. Principle and Techniques of Electron Microscopy Biology Application. Kean University, Union, New Jersey. Cambridge University Press. United Kingdom. 543 p.
3. Juniper B.E.1970.Techniques for Plant Electron Microscopy. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh. 108 p.