# บทที่ 2

# อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

## อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

### 1. อุปกรณ์

1.1 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific Supply Co.Ltd.,U.S.A.

1.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

1.3 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (shaker) รุ่น Gyrotary G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.

1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (controlled enviroment incubator shaker) รุ่น R-88 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.

1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น H-103N บริษัท Kokusan, Japan.

1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Z-320 บริษัท Hermel, U.S.A.

1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 บริษัท Beckman, U.S.A.

1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น Aquatherm G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.

1.9 เครื่องชั่งน้ำหนัก (balance) รุ่น A-200S บริษัท Sartorius, Germany.

1.10 เครื่องชั่งน้ำหนัก (balance) รุ่น L-2200P บริษัท Sartorius, Germany.

1.11 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (megnetic stirrer) รุ่น Cimarel-2 barnstead thermolyne model 546720-26, U.S.A.

1.12 เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Vortex-2 Genei model G-560E บริษัท Scientific Industries, U.S.A.

1.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, U.S.A.

1.14 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (pipette pump) รุ่น P-8049 ขนาด 2 มิลลิลิตร บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

1.15 ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) แบบ pipettman รุ่น P-10, P20, P100, P200, P1000, P5000 บริษัท Gilson Medical Electronics, France.

1.16 กระดาษกรอง (millipore membrane) รุ่น GSWP Pore size 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

1.17 กระดาษกรอง (millipore membrane) รุ่น HAWP Pore size 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

1.18 หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Nipro , Thailand.

1.19 อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco, West Germany.

1.20 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (sterio microscope) รุ่น SZH-10 บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan.

1.21 กล้องจุลทรรศน์ไลท์ไมโครสโคป (light microscope) รุ่น Lobopot+UFX-II บริษัท Nikon Corporation , Japan.

1.22 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) รุ่น JEOL model JEM-200CX , Japan.

1.23 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (automatic steam sterilizer) รุ่น Tomy SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co.Ltd., Japan.

1.24 ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น Contherm Series Five บริษัท Lab Focus Co. Ltd., Thailand.

2. สารเคมี

2.1 ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

2.2 แบคโตเปปโตน(bacto-peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

2.3 ไบโอติน (biotin) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.4 ฮิวมิค แอซิด (humic acid) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) บริษัท Merck , Germany

2.6 โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck , Germany

2.7 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 . 7H_2O$) บริษัท Merck , Germany

2.8 เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 . 7H_2O$) บริษัท Ajax Chemicals, Australia.

2.9 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) บริษัท Fluka Chemika , Switzerland

2.10 ไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.11 วุ้นผง (agar) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

2.12 ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.13 ไรโบเฟลวิน (riboflavin) บริษัท Merck , Germany

2.14 ไนอะซีน (niacin) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.15 ไพริดรอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.16 แคลเซียม-แพนโธทีเนท (Ca-pantothenate) บริษัท Merck , Germany

2.17 ไอโนซิทอล (inositol) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.18 พารา-อะมิโนเบนโซอิค (p-aminobanzoic acid) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.19 แมนนิทอล (mannitol) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

2.20 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck , Germany

2.21 โพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyetheleneglycol) บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.22 ยูรานิลอะซิเตด (uranyl acetate) บริษัท Fluka Chemika , Switzerland

2.23 โปแทสเซียมฟอสโฟทังสติคแอซิด (potassium phosphotungstic acid) บริษัท Fluka Chemika , Switzerland

**วิธีการทดลอง**

1. การแยกจุลินทรีย์ที่เป็นโฮสต์ของฟาจจากดิน

1.1 ตัวอย่างดิน

1.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บดินที่อยู่ลึกจากผิวหน้า 10-15 เซ็นติเมตร ประมาณ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกใสที่สะอาด บันทึก วัน เวลา สถานที่ สี พืชปกคลุม และลักษณะทั่วไปของดิน จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Davies and Williams, 1970)

1.1.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น (pH 7.0 ) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ นำสารแขวนลอยของดินไปปั่นด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 1-2 นาที ตั้งสารแขวนลอยของดินทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ตกตะกอน นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) (Reed and Cummings, 1945)

1.1.3 การหาปริมาณน้ำ (water content) ในตัวอย่างดิน

นำถ้วยฟอยล์อบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำถ้วยฟอยล์วางไว้ในเดสสิคเคเตอร์ (desiccator) จนกระทั่งเย็น นำมาชั่งน้ำหนักจดบันทึกไว้เป็นน้ำหนักของถ้วยฟอยล์ ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ลงในถ้วยฟอยล์ ชั่งน้ำหนักรวมของตัวอย่างดินและถ้วยฟอยล์จดบันทึกไว้เป็นน้ำหนักรวมของตัวอย่างดินและฟอยล์ก่อนอบ นำถ้วยฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาวางไว้ในเดสสิคเคเตอร์จนกระทั่งเย็น ชั่งน้ำหนักของฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินจดบันทึกไว้เป็นน้ำหนักที่เวลา 48 ชั่วโมง นำฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินที่ชั่งน้ำหนักแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาวางไว้ในเดสสิคเคเตอร์จนกระทั่งเย็น นำมาชั่งน้ำหนักของฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินจดบันทึกไว้เป็นน้ำหนักที่เวลา 72 ชั่วโมง

นำฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินที่ชั่งน้ำหนักแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำออกมาวางไว้ในเดสสิคเคเตอร์จนกระทั่งเย็น นำมาชั่งน้ำหนักของฟอยล์ที่ใส่ตัวอย่างดินจดบันทึกไว้เป็นน้ำหนักที่เวลา 96 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาคำนวนหาปริมาณน้ำในตัวอย่างดินจากน้ำหนักที่สูญเสียไปของตัวอย่างดิน (ภาคผนวก จ. หมายเลข 1) (Lanning and Williams, 1982)

### 1.2 จุลินทรีย์

#### 1.2.1 การแยก *Actinomycetes* จากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานแล้ว ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เจือจางสารแขวนลอยดินในน้ำกลั่น (soil suspension) ที่ได้ ให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า (serial ten fold dilution) ประมาณห้าระดับ ($10^{-1}$-$10^{-5}$) ใช้ปิเปตที่อบฆ่าเชื้อแล้วดูดสารแขวนลอยในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด-วิตามิน อการ์ มีเดียม (Humic Acid-Vitamin Agar Medium, HV agar) (Hayakawa and Nonomura, 1987, ภาคผนวก ก. หมายเลข 1 ) ที่มีผิวหน้าแห้งพอเหมาะ จากนั้นกระจาย (spread) สารแขวนลอยดินให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 7-10 วัน จะพบการเจริญของ *Actinomycetes* โดยโคโลนีจะมีลักษณะย่นหรือมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็ก แยกเอาโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะดังกล่าวเก็บในอาหารวุ้นเอียง (agar slant) ชนิดแมนนิทอล ซอยบีน อการ์ มีเดียม (Mannitol Mungbean Agar Medium, MM medium) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2 ) โดยใช้ลูป (loop) ลากเชื้อบนอาหารแข็งชนิด MM medium นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10-14 วัน จึงนำมาศึกษาลักษณะโคโลนี สีเส้นใย สีสปอร์ ของเชื้อแต่ละชนิด และคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ กันไว้ (Sykes *et al.*, 1981)

#### 1.2.2 การเก็บรักษา *Actinomycetes* ที่แยกได้

เขี่ย *Actinomycetes* โดยใช้ลูปลากลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเอียงชนิด MM medium (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และ

ปกติจะถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ (subculture) ทุกๆ 1 เดือน เพื่อรักษาความเสถียร (stability) ของเชื้อไว้ โดยใช้วิธีเดียวกัน (Sykes *et al.*, 1981)

1.2.3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *Actinomycetes*

ปลูก *Actinomycetes* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขุดสปอร์ที่เจริญอยู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ 5 มิลลิลิตรของ 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานแล้ว 2 ครั้งปั่นด้วยเครื่องผสมสาร เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย เทสารแขวนลอยของสปอร์ออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์(ภาคผนวก ค. หมายเลข 3)จากนั้นใช้ 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เป็นตัวทำละลายและเจือจางให้มีความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรโดยนับด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) (ภาคผนวก จ. หมายเลข 2)ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ (Sykes *et al.*, 1981)

2. <u>แยกฟาจจากดินด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ (enrichment method)</u>

นำตัวอย่างดิน 25 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่บรรจุนิวเตรียนท์บร์อท (nutrient broth) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 4) 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อตามมาตรฐานแล้ว เติม 1 มิลลิลิตร สปอร์แขวนลอยของ *Actinomycetes* ที่แยกได้จากดินความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในเครื่องเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (controlled environment incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centifuge) ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาทีกรองสารละลายใสผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์(millipore filter) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด (pore size) 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้จากการกรองคือฟาจแขวนลอย (phages suspension) ซึ่งจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ( Adams, 1959)

**3.ตรวจสอบฟาจที่แยกได้ด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็งสองชั้น(double agar layer method)**

เจือจางฟาจแขวนลอยด้วยนิวเตรียนท์บร์อท จนมีความเข้มข้น $10^{-1}$- $10^{-3}$ ตามลำดับ นำฟาจแขวนลอยแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ เติมสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ที่แยกได้สายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ใน ตอนต้น ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติม สล็อบปี้ อการ์ (sloppy agar) (นิวเตรียนท์บร์อท + 0.5 % อการ์) 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเขย่าให้เข้ากันเททับลงบนจานนิวเตรียนท์ อการ์ ที่เตรียมไว้จานที่เสร็จแล้วมีลักษณะเป็นอาหารแข็งสองชั้น (double agar layer) โดยอาหารแข็งชั้นล่างคือ นิวเตรียนท์ อการ์(nutrient agar) ส่วนอาหารแข็งชั้นบนคือ สล็อบปี้ อการ์ (sloppy agar) ที่ผสมกับฟาจแขวนลอยและสปอร์แขวนลอย (รูปที่ 8) บ่มเชื้อ 16 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนับพล๊าคที่เกิดขึ้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ (Adams, 1959)

**4. การทำฟาจให้บริสุทธิ์และการเก็บรวบรวมฟาจให้มีปริมาณมาก**

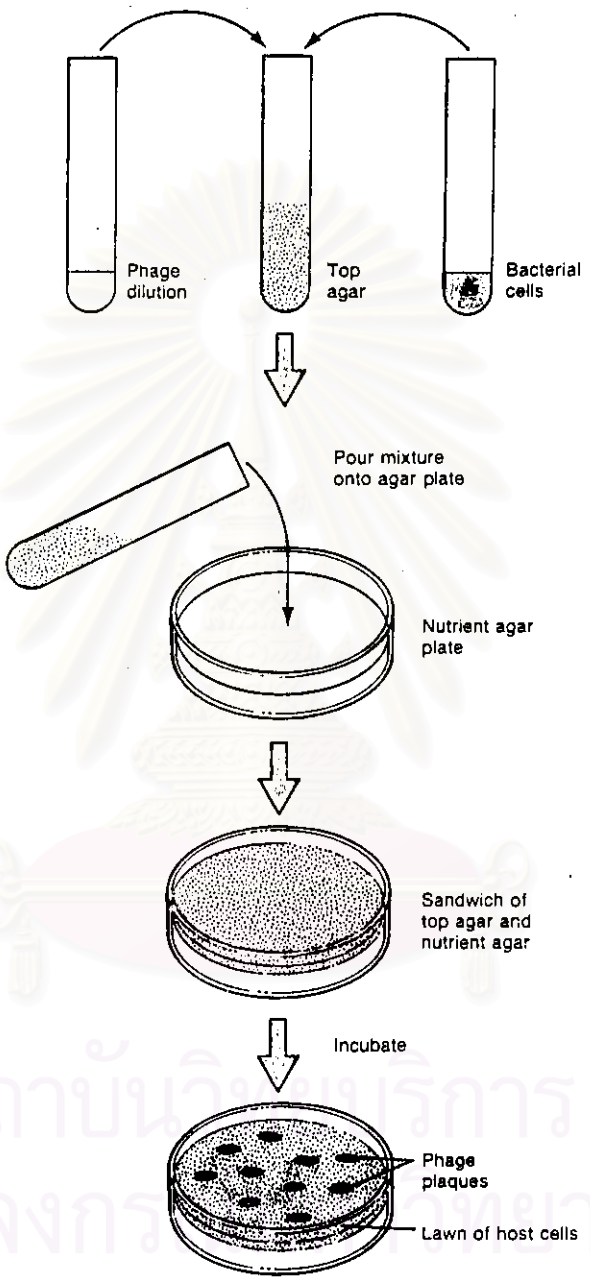
**4.1 การทำฟาจให้บริสุทธิ์**

ใช้พลาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) ปลอดเชื้อ ดูดฟาจจากพล๊าคเดี่ยวๆ ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุนิวเตรียนท์บร์อท ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ 1 - 2 นาที กรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ (millipore filter) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไปหาความสามารถในการทำให้เกิดพล๊าค (plaque forming ability ; p.f.u.) ด้วยวิธีดังข้อ 3. (Sykes *et al.*, 1981)

$$\text{plaque forming units (p.f.u.)} = \frac{\text{number of plaque}}{\text{dilution of sample used x volume used}}$$

**4.2 การเก็บรวบรวมฟาจให้มีปริมาณมาก**

ฟาจแขวนลอยบริสุทธ์ที่เตรียมได้จะถูกเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยการนำฟาจแขวนลอยบริสุทธิ์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ เติมสปอร์แขวยลอยของจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในตอนต้นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมสล็อบปี้




รูปที่ 8 ขั้นตอนการทดสอบฟาจด้วยวิธีเลี้ยงบนอาหารแข็งสองชั้น (Brock, 1988)

อการ์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนิวเตรียนท์ อการ์ ทำซ้ำ 10 จานต่อฟาจแขวนลอยหนึ่งชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดพล๊าค มาเติมนิวเตรียนท์บร๊อท ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อจาน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Adams, 1959) นำสารละลายใสที่ได้จาก 10 จานมารวมกันและนำไป ตกตะกอนฟาจแขวนลอยด้วย 2.92 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 10 เปอร์เซนต์ โพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyetheleneglycol) บ่มข้ามคืน (over night) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แขวนลอยตะกอนของฟาจใน 0.1 โมล่าร์ แอมโมเนียมอะซิเตคบัฟเฟอร์ (ammonium acetate buffer) (pH 7.0) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) (Kuhn *et al.*, 1987)

5. การศึกษาลักษณะของฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

นำฟาจแขวนลอยบริสุทธิ์ใน 0.1 โมล่าร์แอมโมเนียมอะซิเตค บัฟเฟอร์ (pH 7.0) หยดลงบนกริด (grid) ที่ทำด้วยทองแดง (copper) แบบ 300 ช่องเล็ก ที่ผ่านการฉาบคาร์บอน (carbon) แล้ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ใช้กระดาษกรองซับฟาจแขวนลอยส่วนเกินออก หยดยูรานิลอะซิเตค เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (pH 4.3) ประมาณ 5-10 หยดโดยหยดผ่านบนกริดทีละหยดอย่างช้าๆ ใช้กระดาษกรองซับสีย้อมส่วนเกินออก ใช้น้ำกลั่นหยดผ่านกริด 10-15 หยดเพื่อล้างสีส่วนเกินออก ใช้กระดาษกรองซับน้ำส่วนเกินออกอีกครั้ง วางกริดไว้ในที่มีอากาศถ่ายเท เมื่อกริดแห้งนำกริดไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังไฟฟ้า 80 กิโลโวลต์ ใช้ระบบคับเบิ้ลคอนเดนเซอร์เลนท์ (double condenser lens) และใช้กำลังขยายประมาณ 40,000 - 80,000 เท่า เมื่อได้ภาพที่ต้องการ จะทำการถ่ายภาพเก็บไว้ศึกษา โดยภาพที่ได้จะเป็นภาพเสมือน สองมิติ ขาว-ดำ การย้อมฟาจแขวนลอยด้วยฟอสโฟทังสติคแอซิด เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (pH 7.4) และฟอสโฟทังสติคแอซิด ที่เติม 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส ก็กระทำเช่นเดียวกับขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (Brenner and Horne, 1959)