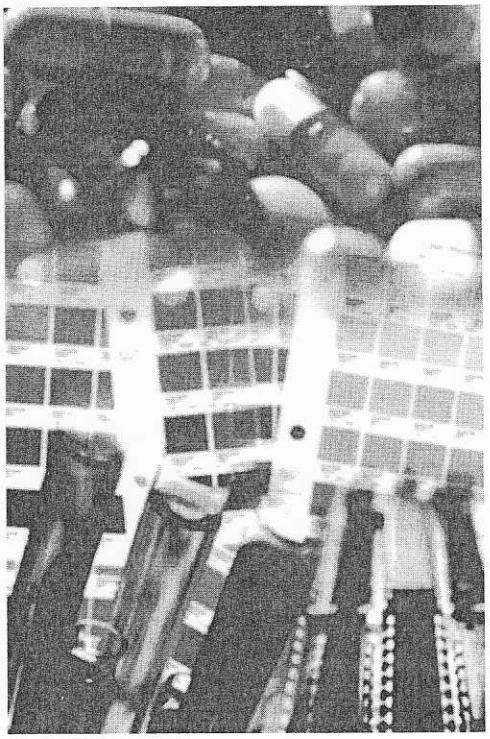
การตรวจวัดการติดสีย้อม ประเภท Diazo ของโปรตีน



การวิเคราะห์สีด้วย colorimeter หรือ spectrophotometer เป็นวิธีการที่สำคัญในงานอุตสาหกรรมหลายๆ ด้าน ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมสารเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหาร หมึกและงานกราฟฟิค สีและการเคลือบ กระดาษ ปิโตรเลียม ยา พลาสติก และสิ่งทอ ซึ่งในบทความนี้ผู้เขียนได้เรียบเรียงถึงการนำเทคนิคการวิเคราะห์นี้ไปใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

เรียบเรียงโดย พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์

เอกสารอ้างอิง

1. Mirjana Abramovic, Goran Nikolic, Colorimeteric Determination of Diazo-dyes Affinity for Elastic Tissue and Model Proteins, Facta Universitatis, series: Medicine and Biology Vol.11, No. 3, 2004, pp.143-147; available online: http://facta.junis.ni.ac.yu/facta/mab/mab200403/mab200403-09.pdf
2. http://www.headwallphotonics.com/analytical.asp
3. http://www.lamotte.com/pages/common/pdf/instruct/stc-1.pdf

พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. "การตรวจวัดการติดสีย้อมประเภท Diazo ของโปรตีน". / เรียบเรียงโดย พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์.

LAB. TODAY. 5, 36 (ส.ค. 2549) 34-38.

บทนำ

การส่องดูเส้นใยและเนื้อเยื่อบางๆ ที่มีความยืดหยุ่นด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นงานพื้นฐานของการศึกษาทำความเข้าใจพัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบหลักของ Elastic tissue

วิธีการดั้งเดิมที่ใช้คือการย้อมโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันด้วยสารย้อมพวก orcein, Fe-hematoxylin หรือ aldehyde-fuxin แต่วิธีการนี้ให้ผลลัพธ์ไม่เป็นที่น่าพอใจมากนักเนื่องจากกระบวนการต่างๆ ต้องอาศัยนักวิจัยที่มีทักษะและประสบการณ์เป็นอย่างมาก จากความแพร่หลายในการใช้สีย้อมประเภท aromatic ในงานด้านกายวิภาคศาสตร์ ทำให้นักวิจัยได้พัฒนาระบบจำลองที่สามารถศึกษาการติดสีประเภทนี้ได้โดยง่ายสำหรับการนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

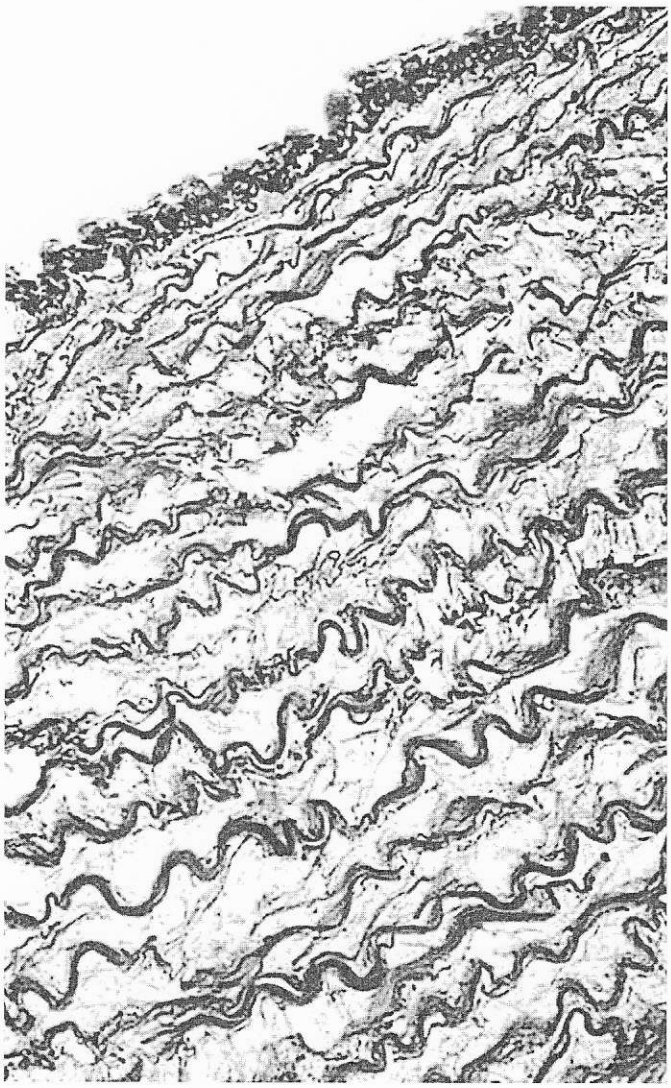
วัสดุและวิธีการ

ในการทดลองนี้ได้ใช้ตัวอย่างผนังหลอดเลือดของเส้นเลือดแดง (aorta) จากศพของชายผู้มีสุขภาพสมบูรณ์ อายุ 31 ปี ตัวอย่างผนังหลอดเลือดจะถูกแช่ลงในสารฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์แล้วจุ่มลงในพาราฟินและทำการตัดให้มีขนาด 5 ไมโครเมตร

หลังจากนั้นนำสาร elastin และ collagen ปริมาณ 1 กรัม มาทำการแช่ลงในสารละลายฟอร์มาลินแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

ก่อนที่จะทำการทดลอง เนื้อเยื่อและ elastin หรือ collagen ที่ได้เตรียมไว้จะถูกเติมด้วย xylol 2 ครั้ง จากนั้นอีก 15 นาที เติมเอทานอล 96, 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสุดท้ายนำไปรวมกับน้ำกลั่น หลังจากนั้นตัวอย่างที่ได้จะถูกนำไปปั่นด้วยอัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อกำจัดตัวทำละลายต่างๆ ออก มวลของตัวอย่างที่เหลือจะถูกนำไปตรวจวัดและย้อมด้วยสาร diazo เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้น้ำ เอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (EtOH) และ dimethyl-sulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสารย้อมจะถูกปรับเปลี่ยนตามความสามารถของ colorimeter แล้วทำการตรวจวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้งก่อนและหลังจากที่ได้เติมสารย้อม

ปริมาณการติดสีย้อมจะถูกคำนวณจากค่าความต่างของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างก่อนและหลังการย้อม ซึ่งจะอยู่ในรูป



เซลล์ของหลอดเลือดแดง

ของไมโครโมลต่อมวลของเนื้อเยื่อหรือโปรตีนที่ต้องการทราบ

ตัวอย่างบางตัวได้ทำการตรวจวัดด้วย UV/Vis spectrophotometer ซึ่งให้ผลการตรวจวัดที่สอดคล้องกับการตรวจวัดด้วย colorimeter

ผลการทดลองและอภิปราย

โดยทั่วไปเนื้อเยื่อที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น คอลลาเจน จะให้ผลของการติดสีในปริมาณที่ต่ำ การทดลองนี้จึงได้พยายามทำให้การติดสีย้อมของเนื้อเยื่อเหล่านี้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นและพัฒนาวิธีการเลือกสารย้อมตามลักษณะโครงสร้างที่มีความแตกต่างในการติดสีของเนื้อเยื่อ elastic tissue, collage และ elastin

สารละลายที่มีฟอร์มาลิน เอทานอล หรือกรด picric เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นสารที่ถูกนำมาใช้ในขั้นตอนการย้อม elastica ซึ่งจากผลการวิจัยในหลายๆ งานได้แสดงให้เห็นว่าสารละลายที่มีปริมาณฟอร์มาลินสูงเป็นองค์ประกอบหลักมีความเหมาะสมมากที่สุด สารฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมต่อการย้อม elastica ด้วยสารย้อมที่เป็นกรดและช่วยหลีกเลี่ยงการไม่ละลายของโปรตีนในตัวทำละลาย

ข้อมูลการยินยอมให้แสงผ่านของตัวอย่างก่อนและหลังการติดสีย้อมด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในรูปของเปอร์เซ็นต์และปริมาณ (ไมโครโมลต่อกรัม) แสดงดังตารางที่ 1-3

ในตารางที่ 4 เป็นตารางแสดงค่าปริมาณการติดสีย้อมของโปรตีนที่ได้เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับ elastic tissue ซึ่งจากตารางจะเห็นได้ว่าโดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณการติดสีของ elastin และ collagen มีค่าน้อยกว่าการติดสีของเนื้อเยื่ออยู่เพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวัดสีของสารย้อมที่ถูกดูดซับบน elastic tissue

สารย้อม (ความเข้มข้น มิลลิโมลต่อลิตร)	ตัวทำละลาย	มวลของเนื้อเยื่อ (มิลลิกรัม)	ปริมาตรของสารละลาย (มิลลิลิตร)	การส่องผ่านแสง (เปอร์เซ็นต์) ก่อนย้อม / หลังย้อม	การดูดซับสี	
					(เปอร์เซ็นต์)	(ไมโครโมลต่อกรัม)
Acid Red 151	H_2O	2.6	3.0	54.0 / 64.0	27.6	14.0
(4.4×10^{-2})	EtOH	1.9	4.1	33.0 / 37.0	10.3	9.8
	DMSO	2.2	3.7	21.0 / 25.0	11.2	8.3
Acid Red 66	H_2O	2.9	4.0	16.5 / 18.5	6.5	3.1
(3.56×10^{-2})	EtOH	2.7	3.7	20.0 / 24.0	11.3	5.5
	DMSO	2.7	3.6	46.5 / 48.5	5.5	2.6
Acid Red 112	H_2O	3.4	3.9	43.5 / 45.0	4.1	1.7
(3.59×10^{-2})	EtOH	1.7	4.0	54.0 / 56.5	7.3	6.2
	DMSO	1.9	4.0	51.0 / 55.5	11.2	8.5
Acid Red 150	H_2O	2.3	4.2	61.5 / 66.0	14.5	4.8
(1.8×10^{-2})	EtOH	-	-	-	-	-
	DMSO	2.2	3.6	53.0 / 57.5	12.8	3.8
Acid Red 114	H_2O	1.3	3.5	46.5 / 5705	27.7	27.0
(3.61×10^{-2})	EtOH	2.4	3.3	43.5 / 46.5	8.0	4.0
	DMSO	2.6	4.0	35.0 / 41.5	16.2	9.0

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวัดสีของสารย้อมที่ถูกดูดซับบน elastin

สารย้อม (ความเข้มข้น มิลลิโมลต่อลิตร)	ตัวทำละลาย	มวลของเนื้อเยื่อ (มิลลิกรัม)	ปริมาตรของสารละลาย (มิลลิลิตร)	การส่องผ่านแสง (เปอร์เซ็นต์) ก่อนย้อม / หลังย้อม	การดูดซับสี	
					(เปอร์เซ็นต์)	(ไมโครโมลต่อกรัม)
Acid Red 151	H_2O	4.3	5.0	59.5 / 63.5	12.5	6.4
(4.4×10^{-2})	EtOH	4.3	3.8	37.0 / 41.5	11.5	4.5
	DMSO	1.5	4.4	21.5 / 22.5	3.0	3.8
Acid Red 66	H_2O	1.5	4.0	30.0 / 31.0	2.7	2.6
(3.56×10^{-2})	EtOH	2.2	3.9	28.5 / 29.0	1.4	0.9
	DMSO	1.8	4.0	45.5 / 46.0	1.4	1.1
Acid Red 112	H_2O	2.1	4.2	21.5 / 22.5	3.0	2.1
(3.59×10^{-2})	EtOH	1.9	4.2	28.5 / 29.0	1.4	1.1
	DMSO	-	-	-	-	-
Acid Red 150	H_2O	2.9	4.0	40.5 / 45.0	11.7	2.9
(1.8×10^{-2})	EtOH	-	-	-	-	-
	DMSO	2.1	4.0	50.5 / 51.0	1.4	0.5
Acid Red 114	H_2O	2.1	4.4	58.0 / 66.0	23.7	17.9
(3.61×10^{-2})	EtOH	2.2	4.2	39.5 / 49.5	24.3	16.7
	DMSO	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดสีของสารย้อมที่ถูกดูดซับบน collagen

สารย้อม (ความเข้มข้น มิลลิโมลต่อลิตร)	ตัวทำละลาย	มวลของเนื้อเยื่อ (มิลลิกรัม)	ปริมาตรของสารละลาย (มิลลิลิตร)	การส่องผ่านแสง (เปอร์เซ็นต์) ก่อนย้อม / หลังย้อม	การดูดซับสี	
					(เปอร์เซ็นต์)	(ไมโครโมลต่อกรัม)
Acid Red 151	H_2O	1.2	4.0	42.5 / 44.0	4.1	5.9
(4.4×10^{-2})	EtOH	1.6	4.4	56.5 / 57.5	3.1	3.7
	DMSO	1.8	4.2	21.5 / 22.0	1.5	1.5
Acid Red 66	H_2O	2.9	3.9	16.5 / 17.0	1.7	0.8
(3.56×10^{-2})	EtOH	1.9	4.0	22.5 / 23.5	2.7	2.2
	DMSO	1.8	4.6	45.5 / 46.0	1.4	1.3
Acid Red 112	H_2O	4.2	3.8	59.5 / 63.5	12.5	4.1
(3.59×10^{-2})	EtOH	3.0	4.0	40.5 / 45.0	11.7	5.6
	DMSO	-	-	-	-	-
Acid Red 150	H_2O	4.0	4.2	40.5 / 43.5	7.9	1.5
(1.8×10^{-2})	EtOH	-	-	-	-	-
	DMSO	3.1	4.0	68.5 / 71.5	11.3	2.6
Acid Red 114	H_2O	4.0	4.0	58.0 / 68.0	29.2	10.5
(3.61×10^{-2})	EtOH	3.6	4.0	39.5 / 46.0	16.4	6.6
	DMSO	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณการติดสีย้อมของ elastic tissue และโปรตีนที่ได้เตรียมขึ้น

สารย้อม	ตัวอย่าง	การดูดซับสี (ไมโครโมลต่อกรัม)		
		H2O	EtOH	DMSO
Acid Red 151	elastin	6.4	4.5	3.8
	collagen	5.9	3.7	1.5
	elastin + collagen	12.3	8.2	5.3
	tissue	14.0	9.8	8.3
Acid Red 66	elastin	2.6	0.9	1.1
	collagen	0.8	2.2	1.3
	elastin + collagen	3.4	3.1	2.4
	tissue	3.1	5.5	2.6
Acid Red 112	elastin	2.1	1.1	-
	collagen	4.1	5.6	-
	elastin + collagen	6.2	6.7	-
	tissue	1.7	6.2	8.5
Acid Red 150	elastin	2.9	-	0.5
	collagen	1.5	-	2.6
	elastin + collagen	4.4	-	3.1
	tissue	4.8	-	3.8
Acid Red 114	elastin	17.9	16.7	-
	collagen	10.5	6.6	-
	elastin + collagen	28.4	23.3	-
	tissue	27.0	4.0	9.0