บทที่ 15
การย้อมสีโปรตีนและกรดนิวคลีอิก

เค้าโครงเรื่อง

15.1 การย้อมสีโปรตีน

15.1.1 ปฏิกริยามิลลอน

15.1.2 วิธีเมอร์คิวริกบรอมฟีนอลบลู

15.1.3 การใช้แฟสท์กรีน ย้อมสีฮีสโตน

15.2 การย้อมสีกรดนิวคลีอิก

15.2.1 การสกัด DNA

15.2.2 การสกัด RNA

15.2.3 การย้อมสี DNA

15.2.4 การย้อมสี RNA

สาระสำคัญ

1. โปรตีนเป็นสารพอลีเพปไทด์ของกรดอะมิโน แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ พวกที่เป็นไฟบรัสไม่ละลายน้ำ และพวกกลอบิวลาร์ละลายน้ำ และมักจะคอนจูเกทกับสารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน การย้อมสีโปรตีนไม่ค่อยจำเพาะนัก สามารถย้อมจำเพาะได้เพียงส่วนประกอบบางอย่างของโปรตีน เช่น กรดอะมิโน-ไทโรซีน หรือโปรตีนที่คอนจูเกทอยู่กับกรดนิวคลีอิก เช่น ฮีสโตน
2. การย้อมสีกรดนิวคลีอิกทั้งสองชนิด คือ DNA และ RNA ต้องทำสไลด์ควบคุม เพื่อให้เชื่อแน่ได้ว่าสไลด์ทดลองสำหรับสาธิต DNA และ RNA ย้อมติดสีจริง กล่าวคือ ถ้าใช้สารละลายชิฟฟ์ตามวิธีของฟิวลเจน ย้อมสี DNA ได้ผลบวกติดสีแดง สไลด์ควบคุมต้องได้ผลลบไม่มีสี ในทำนองเดียวกัน ถ้าใช้สีย้อมเมทิลกรีน-ไพรอนิน ย้อมสี RNA ได้ผลบวกติดสีแดงของไพรอนิน สไลด์ควบคุมต้องได้ผลลบ ไม่ติดสีแดง

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาจบบทนี้แล้ว

1. นักศึกษาสามารถบอกได้ว่าสีย้อมจำเพาะสำหรับโปรตีน มีกี่ชนิด ชนิดใดจำเพาะสำหรับฮีสโตน ชนิดใดจำเพาะสำหรับกรดอะมิโนไทโรซีน

2. นักศึกษาสามารถบอกกลไกการทำงาน หลักการย้อมสีกรดนิวคลีอิกทั้ง DNA และ RNAได้
3. นักศึกษาสามารถปฏิบัติการเตรียมสารละลายสีย้อม และทำการย้อมสีเนื้อเยื่อตัวอย่างเพื่อสาธิตโปรตีน และกรดนิวคลีอิกบางชนิดได้
4. นักศึกษาสามารถตอบคำถามในแบบฝึกหัดท้ายบทได้เกินกว่า 50 เปอร์เซนต์ ภายในหนึ่งสัปดาห์

โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่พบในเซลล์ทุกชนิด โปรตีนอยู่ในรูปของ (1)โปรตีนโครงสร้างย่อยง่าย เมื่อไฮโดรไลซิสจะได้ กรดอะมิโน และอนุพันธ์ของกรดอะมิโน (2)คอนจูเกเทดโปรตีนซึ่งเมื่อไฮโดรไลซิสนอกจากจะได้กรดอะมิโนแล้ว ยังได้สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนอีกด้วย โปรตีนอย่างง่ายอาจเป็นชนิด ไฟบรัส หรือ กลอบิวลาร์โปรตีน พวกที่เป็นไฟบรัสโปรตีนได้แก่ คอลลาเจน เรทิคิวลิน เคราติน และไฟบริน ซึ่งไม่ละลายน้ำ พวกที่เป็นกลอบิวลาร์โปรตีนได้แก่ แอลบิวมิน (ไข่ขาว) กลอบิวลิน กลอบิน และฮีสโตน ซึ่งละลายน้ำได้ พวกที่เป็นคอนจูเกเทดโปรตีนได้แก่ นิวคลีโอโปรตีน ลิโพโปรตีน และไกลโคโปรตีน

เนื่องจากโปรตีนกระจายอยู่ทั่วเซลล์ จึงยากที่จะย้อมสีติดว่ามีโปรตีนชนิดใดอยู่มาก ณ ที่ใด บางครั้งจึงต้องแน่ใจว่าส่วนไหนเป็นโปรตีน และส่วนไหนไม่ใช่ จึงต้องมีการย้อมสีโปรตีน ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีระเบียบวิธีใดค่อนข้างจำเพาะสำหรับโปรตีน แต่มีระเบียบวิธีที่จำเพาะต่อกรดอะมิโนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน จำเพาะต่ออะโรเมติกนิวเคลียส และจำเพาะต่อหน้าที่ของหมู่ฟีนอล หรือจำเพาะต่อหมู่กัวนีดีน ปฏิกริยามิลลอน (Millon reaction) ไม่จำเพาะต่อโปรตีน แต่จำเพาะต่อหมู่อะโรเมติกในกรดอะมิโน คือไทโรซีน ดังนั้นจึงจำเพาะต่อไทโรซีนซึ่งมักพบได้ในโปรตีนแทบทุกชนิด

15.1 การย้อมสีโปรตีน

15.1.1 ปฏิกริยามิลลอน (กอมอริ)

การทำให้คงสภาพ : สารทำให้คงสภาพที่ดีชนิดใดก็ได้

สารละลาย :

สารละลาย A :

เมอร์คิวริกแอซีเตท	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
กรดไตรคลอโรแอซีติก	15.0	กรัม

สารละลาย B :

1 เปอร์เซนต์ โซเดียมไนไตรท์ในน้ำ 10.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. นำสไลด์มารันนิ่งดาวน์จนถึงน้ำ (แผ่นบางของเนื้อเยื่อควรหนาประมาณ 10 ไมครอน)
2. แช่สไลด์ในสารละลาย A ในตู้อบ อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส 5-10 นาที
3. เติมสารละลาย B ลงไป แล้วอบต่อไปอีก 25 นาที
4. จุ่มล้างใน 70 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์
5. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

ไทโรซีนโปรตีน - สีชมพูจนถึงสีแดงอิฐ

ปฏิกริยามิลลอนของโรมิส (Romeis's Millon reaction)

ระเบียบวิธี :

1. ทำเช่นเดียวกับวิธีของกอมอริ
2. เตรียมสารละลายดังนี้ นำกรดไนตริกเข้มข้นมา 400 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 48 ชั่วโมง นำสารละลายนี้ 1 ส่วน มาผสมกับน้ำกลั่น 9 ส่วน แล้วเติมเมอร์คิวริกไนเตรทลงไปในสารละลายที่ทำให้เจือจางครั้งที่สองนี้ให้มากเกินพอ เขย่าบ่อยครั้ง ตั้งไว้หลายวันเพื่อให้ได้สารละลายอิ่มตัว กรอง นำสารละลาย 40 เปอร์เซนต์กรดไนตริก (สารละลายที่ทำครั้งแรก) ลงไป 3 มิลลิลิตร และโซเดียมไนไตรท์ 1.4 กรัมนำสไลด์จากขั้นตอนที่ 1 มาแช่ในสารละลายที่เตรียมได้ใหม่นี้ 3 ชั่วโมง
3. จุ่มล้างในสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์กรดไนตริก
4. ดึงน้ำออกอย่างรวดเร็ว ด้วยแอลกอฮอล์ เริ่มจาก 70 เปอร์เซนต์ แอลกอฮอล์ไป จนถึงแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

ไทโรซีน - สีกุหลาบหรือสีแดง

15.1.2 วิธีเมอร์คิวริก บรอมฟีนอลบลู (Mercuric bromphenolblue method)

การทำให้คงสภาพ : ใช้สารทำให้คงสภาพชนิดใดก็ได้

สารละลาย :

บรอมฟีนอลบลู :

เมอร์คิวริกคลอไรด์	10.0	กรัม
บรอมฟีนอลบลู	100.0	มิลลิกรัม
95 เปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์(หรือน้ำกลั่น)	100.0	มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก (ควรใช้แผ่นบางของเนื้อเยื่อที่มีขนาดหนาน้อยกว่า 5ไมครอน มิฉนั้นจะติดสีเข้ม)
2. เปลี่ยนมาที่ แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 1-2 นาที
3. ย้อมสีในสีย้อมบรอมฟีนอลบลูที่ละลายในแอลกอฮอล์ 15 นาที (ถ้าเตรียมสีย้อมด้วยน้ำกลั่น ต้องรันนิงดาวน์สไลด์ลงมาที่น้ำก่อน)
4. ล้างใน 0.5 เปอร์เซนต์ กรดแอซีติกในน้ำ 20 นาที เพื่อล้างสีที่เกินพอออกให้หมด
5. แช่ในน้ำประปา หรือบัฟเฟอร์ pH 6-7 3 นาที เพื่อเปลี่ยนสีของสีย้อมให้กลับมาเป็นแอลคาไลน์สีน้ำเงิน อย่าใช้แอมโมเนีย เพราะจะทำให้รายละเอียดของเนื้อเยื่อเสียหาย
6. ดึงน้ำออกอย่างรวดเร็ว โดยเปลี่ยนมาจุ่มในเทอร์เทียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

จำเพาะสำหรับโปรตีน และเพบไทด์ที่ไม่ถูกล้างออกไป - สีน้ำเงิน

ข้อสังเกตุ :

การแสดงให้ประจักษ์ว่ามีกรดอะมิโนชนิดใดอยู่ในเนื้อเยื่อ มีหลายวิธี แต่ค่อนข้างจะไม่แน่นอนนัก พวกที่พอจะสาธิตได้ ได้แก่ หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล ไทโรซีน ทริปโตเฟน ฮีสทิดีน หมู่ SS และ SH และอาร์จินีน ในตำราเล่มนี้จะแสดงไว้เฉพาะ ไทโรซีน และ ฮีสโตน เท่านั้น

15.1.3 การใช้แฟสท์กรีนย้อมสีฮีสโตน ฮีสโตนเป็นโปรตีนพื้นฐานของโครมาติน สามารถสาธิตได้ โดยวิธีของอัลเฟิร์ทและเกชวินด์ (Alfert and Geshwind method) ดังนี้

การทำให้คงสภาพ : 10 เปอร์เซนต์ ฟอร์มาลิน 3-6 ชั่วโมง สารทำให้คงสภาพชนิดอื่น เช่น เซนเกอร์ ซูซา และคาร์นอย ไม่อำนวยต่อการย้อมสีจำเพาะจึงต้องใช้ฟอร์มาลิน เสร็จแล้วล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลตลอดคืน

สารละลาย :

กรดไตรคลอแอซีติก (TCA)

กรดไตรคลอแอซีติก	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

แฟสท์กรีน :

แฟสท์กรีน FCF (C.I.42053)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.0-8.1 ด้วยการหยดสารละลาย NaOH ควรเตรียมแล้วใช้เลย ไม่ควรเตรียมเก็บไว้

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก แล้วรันนิงดาวน์จนถึงน้ำ
2. แช่ในสารละลายกรดไตรคลอแอซีติก โดยนำถ้วยย้อมสีใส่ลงในอ่างน้ำเดือดเพื่อช่วยดึงกรดนิวคลีอิกออกจากฮีสโตน 15 นาที
3. ล้าง TCA ออกให้หมดด้วยการเปลี่ยนมาใส่ใน 70 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์สองครั้ง ๆ ละ 10 นาที
4. ย้อมสีด้วย แฟสท์กรีน 30 นาที
5. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
6. เปลี่ยนมาใส่ใน 95 เปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ แล้วทำต่อจนถึงขั้นเมาท์

ผลที่ได้รับ :

ฮีสโตน - สีเขียว

ข้อสังเกต :

วิธีนี้เป็นวิธีจำเพาะสำหรับการย้อมสีโครโมโซม จากการทดลองพบว่า

ฮีสโตนและโพรทามีน (protamine) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการติดสี และถ้าไม่ดึงกรดนิวคลีอิกออกเสียก่อนสีจะจางลง สัดส่วนของฮีสโตน และ DNA ที่มีอยู่ในนิวเคลียสไม่เปลี่ยนแปลง ถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดขึ้นภายในเซลล์

กิจกรรม 15.1

ให้นักศึกษาเตรียมสารละลายที่จะใช้ย้อมสีฮีสโตน ตามวิธีของอัลเฟิร์ทและเกชวินด์ ในข้อ 15.1.3 แล้วนำเนื้อเยื่อของเซลล์ตับที่เฉือนเป็นแผ่นบางไว้แล้วในกิจกรรมตอนต้น (กิจกรรม 7.1) มาทำการทดลองย้อมสีฮีสโตน ตามระเบียบวิธีในข้อ 15.1.3 ตรวจสอบผลที่ได้รับว่าฮีสโตนอยู่ที่ส่วนใดของเซลล์ตับมากที่สุด

15.2 การย้อมสีกรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกตามปกติจะคอนจูเกทอยู่กับโปรตีนพื้นฐานเป็นสารประกอบเชิงซ้อนนิวคลีโอโปรตีน ถ้าต้องการสาธิตเฉพาะกรดนิวคลีอิก จำเป็นต้องแยกโปรตีนออกโดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด กรดนิวคลีอิกประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 อย่าง คือ (1) กรดฟอสฟอริก ซึ่งเชื่อว่า มีกลไกการทำงานในการย้อมสีติดกับสีย้อมเบสิก (2) น้ำตาลเพนโทส และ (3) เบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ น้ำตาลมีเพียงสองชนิด คือ ดีออกซิไรโบส และไรโบส ซึ่งจะเป็นส่วนสำคัญของการทำให้กรดนิวคลีอิกแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ DNA และ RNA

DNA พบได้มากในนิวเคลียส และโครโมโซม ส่วน RNA พบได้มากในไซโทพลาซึม และที่นิวคลีโอลัสภายในนิวเคลียส และพบเพียงบางส่วนของโครโมโซมเท่านั้น

การสาธิตกรดนิวคลีอิกชนิดใดชนิดหนึ่ง จำเป็นต้องทำสไลด์ควบคุม(control slide or section) ควบคู่กันไปกับการทำสไลด์ทดสอบ (test slide or section) สำหรับสไลด์ควบคุมนั้น ต้องดึงเอากรดนิวคลีอิกออก ดังนั้นผลของการย้อมสีจึงไม่มีการติดสีของกรดนิวคลีอิก

15.2.1 การสกัด DNA (DNA extraction) นิยมใช้กรดแทนเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ดีออกซิไรโบนิวคลีเอสราคาแพงมาก นำสไลด์ที่มีแผ่นบางของเนื้อเยื่อที่ต้องการสกัดเอา DNA ออก มาแช่ในสารละลาย 5 เปอร์เซนต์กรดเพอร์คลอริก (perchloric acid) ในน้ำ อุ่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทั้ง DNA และ RNA จะหลุดออกมาจากโปรตีน ทำให้เป็นกลางด้วยการเติมสารละลาย 1 เปอร์เซนต์โซเดียม-

คาร์บอเนต ตั้งไว้อีก 5 นาที นำสไลด์ออกมาล้างด้วยน้ำไหล 5 นาที แล้วจึงนำไปย้อมสี

อาจใช้สารละลาย 5 เปอร์เซนต์กรดไตรคลอแอซีติกในน้ำ แทนสารละลายเพอร์-คลอริก ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน แต่ต้องอุ่นที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำออกมาล้างด้วยน้ำไหลได้ ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 5 นาที จึงนำไปย้อมสี

15.2.2 การสกัด RNA (RNA extraction) เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส สามารถหาซื้อได้ในรูปของผลึก นำมาละลายน้ำกลั่นทำให้เป็นสารละลาย 0.01 เปอร์เซนต์ แล้วนำสไลด์ที่ต้องการสกัด RNA ออก มาแช่ไว้ในเอนไซม์ 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส นำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาแช่ในน้ำกลั่น(ไม่มีเอนไซม์) ใช้เวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซล-เซียสเช่นเดียวกัน น้ำกลั่นไม่ควรมีผลต่อการสกัด RNA และเมื่อนำมาย้อมสีสไลด์แผ่นนี้ควรให้ผลบวก ส่วนสไลด์อีกแผ่นหนึ่งที่ถูกกระทำด้วยเอนไซม์ ควรให้ผลลบ สำหรับ DNA ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อในสไลด์แผ่นเดียวกันไม่ได้รับผลกระทบแต่อย่างใด เพราะเอนไซม์ไรโบ-นิวคลีเอสทำงานเฉพาะต่อ RNA เท่านั้น

ในกรณีที่ไม่ซื้อเอนไซม์ อาจจัดหาเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสได้จากน้ำลาย นำมาเก็บในภาชนะที่เหมาะสม แล้ววางลงในอ่างน้ำเย็น ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิของอ่างน้ำขึ้นจนถึง 80 องศาเซลเซียส แล้วรักษาอุณหภูมินี้ไว้ 10 นาที ปล่อยให้เย็น เซนตริฟิวก์ นำน้ำใสข้างบนมาใช้ ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเป็นส่วนใหญ่

กรดเพอร์คลอริกที่ทำให้เป็นสารละลาย 5 เปอร์เซนต์ในน้ำ สามารถนำมาใช้สกัด RNA ได้ โดยแช่สไลด์ของเนื้อเยื่อไว้ในกรดชนิดนี้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4-18 ชั่วโมง RNA จะถูกสกัดออกมาจากสไลด์ ส่วน DNA ยังคงอยู่ในเนื้อเยื่อ เมื่อนำไปย้อมสีด้วยปฏิกริยาฟิวลเจนจะได้ผลบวก แต่อาจติดสีแดงเมื่อย้อมสีด้วยวิธีเมทิลกรีนไพรอนิน (methylgreen-pyronin method) ดังนั้นควรทำสารละลายกรดเพอร์-คลอริกให้เป็นกลางด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนต ในน้ำประมาณ 5 นาที นำไปล้างด้วยน้ำไหลประมาณ 5 นาที แล้วจึงนำสไลด์ไปย้อมสี

15.2.3 การย้อมสี DNA โดยวิธีของฟิวลเจน (Feulgen's method)

การทำให้คงสภาพ : ควรใช้ 10 เปอร์เซนต์นิวทรัลฟอร์มาลิน, คาร์นอย'ส ฟลูอิด,นิวคัมเมอร์ ฟลูอิด,หรือเซนเกอร์ ฟลูอิด,ห้ามใช้บัวแอง ฟลูอิด

สารละลาย :

สารละลาย 1 N กรดไฮโดรคลอริก :

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น(ความถ่วงจำเพาะ 1.19)

83.5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น ทำให้เป็น 1000.0 มิลลิลิตร

ทำในฟลาสค์ วัดปริมาตร 1 ลิตร ด้วยความระมัดระวัง[1]

หรือ

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น(ความถ่วงจำเพาะ 1.18)

85.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น ทำให้เป็น 1000.0 มิลลิลิตร

สารละลายชิฟฟ์ (Schiff's reagent)

โรซานิลิน เบสิกฟุกซิน (C.I.42510) 1.0 กรัม

น้ำกลั่น 200.0 มิลลิลิตร

ต้มน้ำกลั่น แล้วค่อย ๆ เติมโรซานิลิน คนจนละลายหมด ปล่อยให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส กรอง แล้วเติม 1 N กรดไฮโดรคลอริก 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้เย็นจนถึง 25 องศาเซลเซียส แล้วเติมโซเดียมเมตาไบซัลเฟต (แอนไฮดรัส) 1 กรัม ตั้งไว้ 24 ชั่วโมงสารละลายควรเปลี่ยนเป็นสีฟางข้าว นำมากรองผ่านผงถ่านกัมมันต์สารละลายที่กรองได้ควรปราศจากสี เก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายกรดซัลฟิวรัส :

10 เปอร์เซนต์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ในน้ำ

6.0 มิลลิลิตร

1 N กรดไฮโดรคลอริก 5.0 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

สารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์ไวท์กรีน SF (C.I.42095) ในน้ำ :

ละลาย 0.5 กรัม ไวท์กรีน ในน้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. นำสไลด์ที่จะย้อมสีมาดึงพาราฟินออก แล้วรันนิงดาวน์จนถึงน้ำ นำสไลด์ควบคุมมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำพร้อมกันไป

*** 1, กรดแก่และน้ำ เมื่อผสมกันจะให้ความร้อนสูง การรินโดยไม่ระมัดระวังจะทำให้เกิดการกระเด็น หรือระเบิดขึ้นได้ นักศึกษาควรมีพื้นฐานความรู้เคมีมากพอสมควรในการเตรียมสารละลาย

2. จุ่มใน 1 N กรดไฮโดรคลอริก
3. นำสไลด์ควบคุมมาทำเพิ่มอีกหนึ่งสไลด์[1] รวมทั้งสิ้นเป็น 3 สไลด์ แช่ทั้ง 3 สไลด์ ในสารละลาย 1 N กรดไฮโดรคลอริกที่อุ่นไว้ล่วงหน้าจนถึง 60 องศาเซลเซียสแล้ว ระยะเวลาในการแช่สไลด์ ขึ้นอยู่กับว่าสไลด์ที่จะทำการทดสอบเพื่อสาธิต DNA นั้นทำให้คงสภาพด้วยสารคงสภาพชนิดใด ดูได้จากรายการดังต่อไปนี้

คาร์นอย ฟลูอิด	6-8	นาที
ฟอร์มาลิน	8	นาที
นิวคัมเมอร์ ฟลูอิด	6-8	นาที
เชนเกอร์ ฟลูอิด	5	นาที

4. จุ่มล้างในน้ำกลั่น
5. ย้อมสีด้วยสารละลายชิฟฟ์ 30-90 นาที
6. ล้างด้วยสารละลายกรดซัลฟิวรัส 1 นาที
7. ล้างด้วยสารละลายกรดซัลฟิวรัสอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที
8. ล้างให้สะอาดปราศจากกรดด้วยน้ำกลั่น
9. จุ่มย้อมสีในสารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์ไวท์กรีนในน้ำ 30-60 วินาที
10. ดึงน้ำออก ทำให้ใส แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

DNA - สีแดงจนถึงสีม่วงแดง

ส่วนประกอบอื่น - สีเขียว

ทฤษฎีของวิธีนี้คือ เนื้อเยื่อที่ทำให้คงสภาพแล้วเมื่อถูกไฮโดรไลส์ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริกที่ 60 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่พอดี จะทำให้หมู่แอลดีไฮด์หลุดออกมาจากน้ำตาลดีออกซิไรโบสของ DNA ซึ่งหลังจากล้างด้วยน้ำแล้วจะทำปฏิกริยากับสารละลายชิฟฟ์ได้สารประกอบให้สีแดงถึงสีม่วงแดงขึ้นภายในโครมาตินของนิวเคลียส ยังไม่เป็นที่ทราบว่าทำไม RNA จึงไม่ให้ปฏิกริยานี้

***1. สไลด์ควบคุมที่ทำเพิ่มขึ้นในขั้นตอนนี้ เมื่อย้อมสีชิฟฟ์ในขั้นตอนที่ 5 แล้วควรได้ผลลบ ถ้าบังเอิญได้ผลบวก แสดงว่าเกิดหมู่แอลดีไฮด์อิสระขึ้นก่อนการไฮโดรไลส์ด้วยกรด

15.2.4 การย้อมสี RNA ด้วยวิธี เมทิลกรีน-ไพรอนิน[1] (methylgreen - pyronin method) ถือว่ามีความจำเพาะสำหรับ RNA เมื่อใช้ด้วยวิธีสกัดกรดนิวคลีอิก และมีสไลด์ควบคุมทำการย้อมคู่กันไปด้วย

การทำให้คงสภาพ : ควรใช้ คาร์นอย ฟลูอิด, แอลกอฮอล์สัมบูรณ์, เชนเกอร์ ฟลูอิด, อะซีโตนเย็น ถ้าใช้ 10 เปอร์เซนต์ฟอร์มาลิน ควรปรับ pH ให้ได้7.0 และควรใช้ในช่วงเวลาสั้นก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นกรด ซึ่งจะทำให้ไซโทพลาซึมติดสีเขียวจาง ๆ กรดพิกริกจะพอลีเมอไรส์ DNA ทำให้โครมาตินเป็นสีเขียว

สารละลาย :

สารละลายเมทิลกรีน :

เมทิลกรีน (C.I.42590) 0.2 กรัม

0.1M แอซีเตทบัฟเฟอร์(pH 4.2)หรือน้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

ก่อนเตรียมสารละลายเมทิลกรีน ควรทำสีย้อมเมทิลกรีนให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ใช้เมทิลกรีน 10 กรัม ต่อ คลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่า กรองด้วยวิธีดูด ทำซ้ำโดยลดปริมาตรคลอโรฟอร์มลงจนสารละลายคลอโรฟอร์มมีสีเขียวแกมน้ำเงิน แทนที่จะมีสีดอกลาเวนเดอร์หรือสีม่วงอ่อน(ปกติสกัด 3 ครั้ง) ทำให้แห้งเก็บใส่ขวดมีจุกปิดแน่น สีย้อมที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะเสถียร

สารละลายไพรอนิน :

ไพรอนิน Y (C.I.45005)อิ่มตัวในอะซีโตน ถ้าต้องการสีอ่อนลง ใช้ไพรอนิน Y ใน 10 เปอร์เซนต์อะซีโตน

ระเบียบวิธี :

1. ดิงพาราฟินออก แล้วรันนิงดาวน์จนถึงน้ำ
2. ย้อมสีด้วยสารละลายเมทิลกรีน 6 นาที

*** 1. เมทิลกรีน-ไพรอนิน ใช้ย้อมสีมาสท์เซลล์ได้ผลดี เพราะมาสท์เซลล์มีขนาดใหญ่ มีปริมาณของRNA และ DNA มาก

3. ซับด้วยกระดาษกรอง แล้วแช่ในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ เปลี่ยน 2 ครั้ง ๆละ 2-3 นาที

4. ย้อมสีด้วยสารละลายไพรอนิน 30-60 วินาที ถ้าสไลด์ติดสีเข้มเกินไป ใช้วิธีจุ่มย้อมสี 2-3 ครั้ง

5. ทำให้ใสในซีดาร์วู๊ดออยล์ และไซลีน แล้วเมาท์

ผลที่ได้รับ :

ไซโทพลาซึมที่มี RNA - สีแดง

นิวคลีโอลัส - สีแดง

โครมาติน - สีเขียวสด

เม็ดเลือดแดง - สีน้ำตาล

อีโอซิโนฟิลแกรนุล - สีแดง

เมทริกซ์ของกระดูกอ่อน - สีเขียว

เมทริกซ์ของกระดูก - สีชมพูมีรอยสีม่วง

ข้อสังเกตุ :

สีย้อมทั้งสองชนิดติดสีกรดนิวคลีอิก ตามจำนวนมากน้อยของพอลีเมอร์ ถ้าพอลีเมอร์ยาวจะติดสีเมทิลกรีน ถ้าพอลีเมอร์สั้นทั้ง DNA และ RNA จะติดสีไพรอนิน เมื่อทำตามวิธีปกติสีย้อมเมทิลกรีนออกมาค่อนข้างซีด และถ้าพยายามทำให้เข้มขึ้น เวลาล้างด้วยน้ำแล้วดึงน้ำออกด้วยอะซีโตนจะทำให้ล้างสีไพรอนินออกมา ถ้าดึงน้ำออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ จะล้างสีออกจนเกือบหมด ไอโซโพรพิลและเทอร์เทียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ก็ล้างสีออกเช่นเดียวกัน จึงจำเป็นต้องใช้เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ที่ล้างไพรอนินออกพร้อมทั้งมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยดิฟเฟเรนชิเอทสีย้อมเมทิลกรีนได้ เคอร์นิก (Kurnick) จึงดัดแปลงการใช้สีย้อมเมทิลกรีน-ไพรอนิน โดยนำมาให้ละลายอิ่มตัวในอะซีโตน(เพราะอะซีโตนต้องไม่มีน้ำ จึงแก้ปัญหาการถูกล้างสีออกในขั้นตอนการดึงน้ำออกได้) วิธีใช้ ต้องเตรียมสีย้อมเสร็จแล้วใช้ทันที แต่ผลออกมายังไม่ดี ต่อมาจึงดัดแปลงวิธีใช้ ดังนี้

สารละลาย :

ไพรอนิน Y 2 เปอร์เซนต์ (2 กรัม/น้ำ 100 มิลลิลิตร)	12.5 มิลลิลิตร
เมทิลกรีน 2 เปอร์เซนต์	7.5 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 30.0 มิลลิลิตร

ระเบียบวิธี :

1. ดึงพาราฟินออก รันนิงตาวน์จนถึงน้ำ
2. ย้อมสีด้วยสารละลายเมทิลกรีน-ไพรอนิน 6 นาที
3. ซับสไลด์ด้วยความระมัดระวังด้วยกระดาษกรอง
4. ดึงน้ำออกด้วย เอ็น-บิวทิล แอลกอฮอล์ เปลี่ยน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
5. ทำให้ใสในไซลีน 5 นาที เปลี่ยนมาแช่ในซีดาร์วู๊ดออยล์ 5 นาที
6. เมาท์

กิจกรรม 15.2

ให้นักศึกษานำเนื้อเยื่อของม้ามที่เฉือนเป็นแผ่นบางแล้วเมาท์ติดกระจกสไลด์ไว้แล้วในกิจกรรมตอนต้น(กิจกรรม 7.1) มาทำสไลด์ควบคุม ตามวิธีในข้อ 15.2.1 แล้วทำการเตรียมสีย้อม ตามวิธีของฟิวลเจนในข้อ 15.2.3 แล้วจึงทำการย้อมสีทั้งสไลด์ควบคุมและสไลด์ทดลองเพื่อสาธิต DNA ตามระเบียบวิธีในข้อ 15.2.3 สังเกตุผลที่ได้รับว่า DNA ในเซลล์ของม้ามซึ่งส่วนใหญ่เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆให้สีตามที่ระบุไว้ในตำราหรือไม่

สรุป

โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ทุกชนิด การย้อมสีโปรตีนไม่จำเพาะนัก สามารถย้อมสีจำเพาะได้แต่เพียงองค์ประกอบบางอย่างของโปรตีน เช่น ไทโรซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโน การย้อมสีกรดนิวคลีอิกทั้งสองชนิด คือ DNA และ RNA ต้องทำควบคู่กันไปกับสไลด์ควบคุม ซึ่งสกัดเอา DNA และ RNA ออก เพื่อเป็นการยืนยันว่ามี DNA และ RNA ในสไลด์ทดลองเพื่อสาธิต สีที่นิยมใช้ย้อมกรดนิวคลีอิก คือ สารละลายฟิลว์เจน และสารละลายเมทิลกรีน-ไพรอนิน

แบบฝึกหัดที่ 15

1. จงบอกชื่อสีย้อมจำเพาะที่ใช้สำหรับโปรตีน หรือกรดอะมิโนบางชนิดมาเท่าที่ทราบ
   (ตอบ: ดู 15.1)
2. จงบรรยายวิธีสกัด RNA จากเนื้อเยื่อ เพื่อทำเป็นสไลด์ควบคุม โดยใช้เอนไซม์ไรโบ-นิวคลีเอส
   (ตอบ: ดู 15.2.2)
3. ปฏิกริยามิลลอนไม่จำเพาะต่อโปรตีน แต่จำเพาะต่อ.....ของกรดอะมิโน คือ.....ซึ่งมีอยู่ในโปรตีนแทบทุกชนิด
   (ตอบ: ดู ความนำก่อนข้อ 15.1)
4. สารละลายกรด ไม่ว่าจะเป็นกรด.....หรือกรด.....สามารถไฮโดรไลส์กรดนิวคลีอิกทั้ง DNA และ RNA ได้ ที่อุณหภูมิ.....องศาเซลเซียส และ .....องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ถ้าต้องการคง DNA ไว้ในเซลล์ควรไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์.....
   (ตอบ: ดู 15.2.1 และ 15.2.2)
5. การย้อมสีติดของสีย้อมเมทิลกรีน-ไพรอนิน ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความจำเพาะว่าสีใดจำเพาะต่อ DNA หรือ RNA แต่ขึ้นอยู่กับ..... ถ้าเส้นยาวมีโมเลกุลมากจะติดสี .....ถ้าเส้นสั้นโมเลกุลน้อยจะติดสี.....
   (ตอบ: ดู ข้อสังเกตุ ข้อ 15.2.4)