การศึกษาวิธีการย้อมสีเจล SDS-PAGE เพื่อการวิเคราะห์โปรตีนเชิงเปรียบเทียบใน *Bombyx mori* สำหรับงานโปรตีโอมิกส์

THE STUDY OF SDS-PAGE GEL STAINING METHOD FOR COMPARATIVE PROTEIN ANALYSIS IN *Bombyx mori* FOR PROTEOMIC STUDIES

กัญญ์วรา ทรวงแก้ว[1], เอกวิทย์ ตรีเนตร[1,*], อัจฉรา แกล้วกล้า[1] และ สิริวัฒน์ บุญชัยศรี[2]

Kanwara Suangkaew[1], Ekawit Threenet[1,*], Achara Kleawkla[1] and Siriwat Boochaisri[2]

[1] *สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290*

[2] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000*

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน: เอกวิทย์ ตรีเนตร อีเมล: ekawit73@hotmail.com

บทคัดย่อ:

การวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ใน *Bombyx mori* ด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เอสดีเอส-เพจ) จำเป็นต้องคัดเลือกวิธีการย้อมสีที่เหมาะสม เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้จาก *Bombyx mori* มักมีปริมาณน้อยและมีสารรบกวนจากเนื้อเยื่อปนเปื้อนอยู่ด้วย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการย้อมสีเจล เอสดีเอส-เพจ จำนวน 5 วิธี ได้แก่ (1) คูมาสซีบริลเลียนต์บลู อาร์-250 (2) แฟสต์คูมาสซี คอลลอยด์ จี-250 (3) การย้อมสีซิลเวอร์ (4) การย้อมสีซิลเวอร์ภายหลังการล้างสีจากคูมาสซีบริลเลียนต์บลู อาร์-250 และ (5) การย้อมสีซิลเวอร์ภายหลังการล้างสีจากแฟสต์คูมาสซี คอลลอยด์ จี-250 โดยใช้โปรตีนที่สกัดจาก *Bombyx mori* ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก-อะซีโตน (ทีซีเอ-อะซิโตน) การประเมินผลครอบคลุมความไวในการตรวจจับ ความคมชัดของแถบโปรตีน จำนวนแถบที่ตรวจพบ และคุณภาพของพื้นหลังเจล ผลการศึกษาพบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 21.24 ± 7.34 µg/ µl เมื่อทำการย้อมด้วยคูมาสซีบริลเลียนต์บลู อาร์-250 ให้ประสิทธิภาพโดยรวมสูงสุด โดยสามารถตรวจพบแถบโปรตีนได้ถึง 26 แถบ ในช่วงความเข้มข้น 120–360 ไมโครกรัมต่อหลุม และให้ความคมชัดของแถบดีในช่วงโปรตีนขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ในขณะที่แฟสต์คูมาสซี คอลลอยด์ จี-250 ตรวจพบแถบโปรตีนได้เพียง 10 แถบ และให้ความคมชัดต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการย้อมสีซิลเวอร์ตรวจพบแถบโปรตีนได้ 13 แถบ แต่พบปัญหาพื้นหลังที่ไม่สม่ำเสมอและความไม่ชัดเจนของแถบ สำหรับการย้อมสีซิลเวอร์ภายหลังการล้างสีจากคูมาสซีบริลเลียนต์บลู อาร์-250 และแฟสต์คูมาสซี คอลลอยด์ จี-250 นั้น ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจจับได้เป็น 23 และ 18 แถบตามลำดับ โดยเฉพาะโปรตีนขนาดเล็กในช่วงต่ำกว่า 15 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของโปรตีนสูงกว่า 180–360 ไมโครกรัมต่อหลุม พบการลากยาวของแถบโปรตีน อย่างชัดเจนในทุกวิธี ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกวิธีการย้อมสีและการควบคุมความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนมีผลสำคัญต่อประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์โปรตีนด้วย เอสดีเอส-เพจ

คำสำคัญ: การย้อมสีเจล โปรตีโอมิกส์ เอสดีเอส-เพจ

Abstract:

Proteomic analysis in *Bombyx mori* using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) requires careful selection of an appropriate staining method, as proteins extracted from *Bombyx mori* tissues are often present in low abundance and may be contaminated with interfering substances. This study aimed to compare the performance of five SDS-PAGE gel staining methods (1) Coomassie Brilliant Blue R-250 (2) Fast Coomassie Colloidal G-250 (3) silver staining (4) silver staining after destaining of Coomassie Brilliant Blue R-

250 and (5) silver staining after destaining of Fast Coomassie Colloidal G-250. Proteins extracted from *Bombyx mori* using trichloroacetic acid–acetone (TCA–acetone) precipitation were used for analysis. The evaluation criteria included detection sensitivity, band sharpness, number of detectable protein bands and gel background quality. The results of the study showed that average protein concentration was 21.24 ± 7.34 µg/µL. These results demonstrated that Coomassie Brilliant Blue R-250 provided the highest overall performance, detecting up to 26 protein bands at loading concentrations of 120–360 µg per lane and producing clear bands, particularly for medium- to high-molecular-weight proteins. In contrast, Fast Coomassie Colloidal G-250 detected only 10 bands and exhibited significantly lower band clarity. Silver staining detected 13 protein bands but showed uneven background staining and reduced band definition. Sequential silver staining following destaining of Coomassie Brilliant Blue R-250 and Fast Coomassie Colloidal G-250 improved detection sensitivity to 23 and 18 bands, respectively, particularly for low-molecular-weight proteins below 15 kDa. However, at higher protein loadings 180–360 µg per lane, pronounced band trailing was observed with all staining methods. These findings indicate that the choice of staining method and proper control of protein loading concentration are critical factors influencing the efficiency and reliability of protein analysis by SDS-PAGE.

Keywords: Protein staining, Proteomics, SDS-PAGE