

02738452 เคมีเชิงฟิสิกส์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ 12 พ.ย. 61

### SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE เป็นวิธีการแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (การเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้า) โดยใช้ polyacrylamide gels

หากนำโปรตีนมาแยกใน PAGE โดยตรง การแยกจะขึ้นอยู่กับทั้งประจุบนโปรตีน ณ pH ที่ทำการทดลอง ขนาดของโมเลกุลโปรตีน และแรงเสียดทานขณะที่โปรตีนเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ดังนั้นเพื่อที่จะทำให้การแยกโปรตีนที่ผสมกันอยู่ง่ายขึ้น จึงมีวิธีการที่จะให้โปรตีนแยกกันตามขนาดของโมเลกุลเพียงอย่างเดียว

วิธีดังกล่าว ทำได้โดยการ denature โปรตีนด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS)

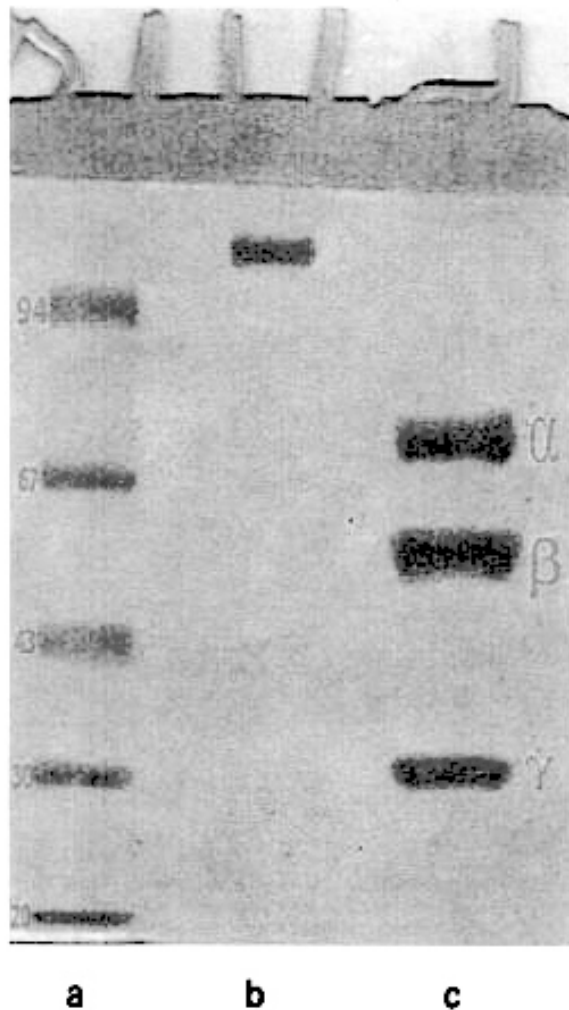
Dodecyl sulfate จะไปจับกับโปรตีนอย่างแน่นหนา ทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่ม้วนขดอยู่คลายตัวเป็น “แท่ง” ยาวยืดตัวออก โดยมี dodecyl sulfate เคลือบอยู่ โดยเฉลี่ยแล้วจะมีโมเลกุล dodecyl sulfate 1 โมเลกุล ต่อทุก ๆ สองกรดอะมิโน

เนื่องจาก dodecyl sulfate มีประจุลบ 1 ประจุ ณ pH ที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ประจุสุทธิของสาย polypeptide จะเป็นลบมากกว่าของสายที่ไม่ได้เคลือบ นอกจากนี้ อัตราส่วนประจุ/มวล จะเป็นเอกลักษณ์ของโปรตีนแต่ละชนิด ดังนั้น การแยกของโปรตีนที่ denature ด้วย SDS แล้วจะแยกกันตามขนาดของสาย polypeptide

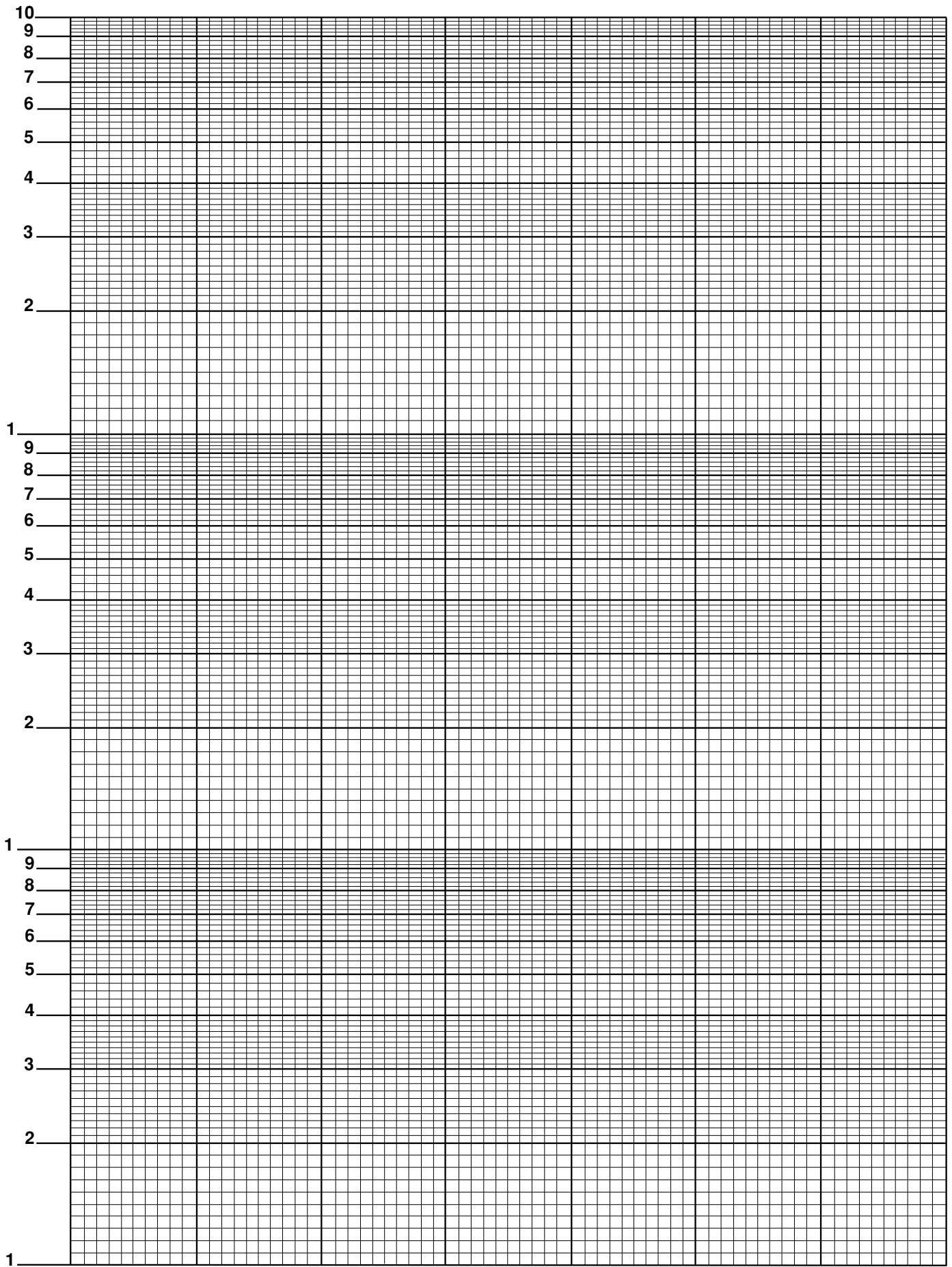
**ตัวอย่าง** การทดลองแยกโปรตีน cobra venom factor (CVF) ด้วยวิธี SDS-PAGE

ที่มา: Frontiers in Biophysics vol.6 หน้า 71

จงหาขนาดโมเลกุลของ  $\alpha$ ,  $\beta$ , และ  $\gamma$  chain โดยวัดระยะทางจากกันหลุมใส่สารตัวอย่างถึงขอบล่างของแถบโปรตีน แล้วพล็อตลงในกราฟ semilog โดยให้ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ได้เป็นแกนนอน (non-log) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลเป็นแกน y (log)



**Fig. 3. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of (a) molecular weight markers (Pharmacia), from top : phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), (b) purified cobra venom factor and (c) separated subunits of cobra venom factor: a chain (68.5 kDa), b chain (48.5 kDa) and g chain (32 kDa).**



02738452 เคมีเชิงฟิสิกส์ทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ 12 พ.ย. 61

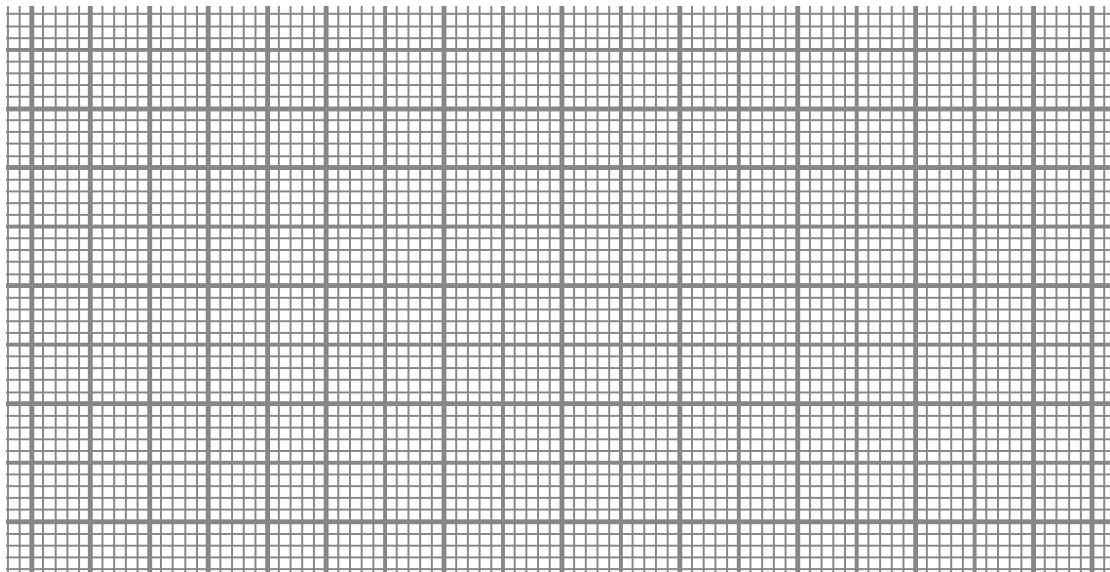
### SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (ต่อ)

แบบฝึกหัด The relative electrophoretic mobilities of several protein-SDS complexes in a polyacrylamide gel are as follows:

Protein	Molar Mass ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Log Molar Mass	Relative Mobilities ( $R_f$ )
Myoglobin	17,200		0.95
Trypsin	23,300		0.82
Aldolase	40,000		0.59
Fumarase	49,000		0.50
Carbonic anhydrase	29,000		0.73
<b>Creatine kinase</b>			0.60

Plot log (molar mass) versus relative mobility. The relative mobility of creatine kinase is 0.60.

What is its molar mass? Compare your result with the molar mass of 80,000 obtained by ultracentrifugation. What conclusions can you draw?



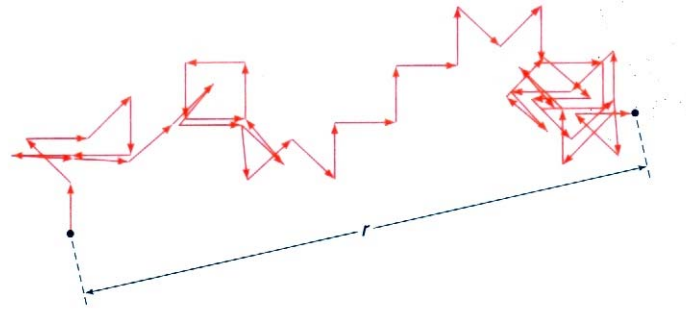
### The Random-Walk Model

ให้นิสิตจินตนาการถึงโพลิเมอร์สายยาวที่ประกอบด้วยหน่วย  $-\text{CH}_2-$  ซ้ำ ๆ กัน ละลายอยู่ในตัวทำละลาย และเพื่อให้ง่ายเข้า ขอให้ไม่สนใจปฏิริยาระหว่างตัวทำละลาย-ตัวถูกละลาย และตัวถูกละลาย-ตัวถูกละลายทุกอย่าง ถ้ามว่า: รูปร่างของโพลิเมอร์น่าจะเป็นอย่างไร ?

มองแบบสุดขีดด้านหนึ่ง ก็คือ สายโซ่ยืดยาวออกอย่างสมบูรณ์ และอีกด้านหนึ่งคือ สายโซ่ขดกันแน่นจนคล้ายกับเส้นด้ายที่ขดกันเป็นลูกบอลกลม ๆ

แต่โดยทั่วไปแล้ว โครงสร้างที่แท้จริงจะอยู่ระหว่างสองแบบที่กล่าวมา

ถ้าหน่วยซ้ำของโพลิเมอร์ไม่มีทิศทางหรือเรียงตัวโดยเฉพาะ เราสามารถนำ “แบบจำลองเดินสุ่ม” มาใช้หาโครงสร้างได้ ภาพข้างล่างนี้แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อกันของโพลิเมอร์ที่มีหน่วยซ้ำ 50 หน่วย ค่าที่เราสนใจคือ ระยะห่างระหว่างปลายทั้งสองของสายโซ่ ( $r$ ) ซึ่งพอจะเป็นแนวทางหาขนาดของโมเลกุล



**Figure 16.13**

A two-dimensional, 50-step, random-walk model. (Reprinted from P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Copyright 1953 by Cornell University. Used by permission of Cornell University Press.)

ที่มา: Raymond Chang. 2005. Physical chemistry for the biosciences. p.614

จากการคำนวณทางสถิติหาค่าเฉลี่ยของการเดินสุ่มหลาย ๆ ครั้ง พบว่าค่าเฉลี่ยของกำลังสองของระยะทาง  $r$  หาได้จาก

$$\overline{r^2} = nl^2$$

เมื่อ  $n$  คือจำนวนของพันธะ และ  $l$  คือความยาวของแต่ละพันธะ ระยะทาง root-mean-square เท่ากับ

$$\overline{r_{rms}} = (\overline{r^2})^{1/2} = l(n^{1/2})$$

ตัวอย่างเช่น สายโซ่ที่มีพันธะ C-C 1000 พันธะ แต่ละพันธะมีความยาว 1.54 Å จะได้ว่า

$$r_{rms} = 1.54 \text{ \AA} \times 1000^{1/2} = 48.7 \text{ \AA}$$

ซึ่งสั้นกว่าความยาวของสายโซ่ที่ยืดตัวอย่างสมบูรณ์มาก ( $1000 \times 1.54 \text{ \AA} = 1540 \text{ \AA}$ )

นอกจากนี้ ค่าที่มีความสำคัญอีกค่าหนึ่งคือ ความน่าจะเป็น  $P(r)$  ที่จะพบปลายทั้งสองด้านของสายโซ่มีระยะห่างกัน  $r$

$$P(r) = Ar^2 \exp(-3r^2/2nl^2) \quad \text{เมื่อ } A \text{ เป็นค่าคงที่}$$

แต่ในความเป็นจริง พันธะไม่สามารถหมุนไปมาอย่างอิสระทุกรูปแบบได้ เช่น polyethylene ต้องมีมุมพันธะใกล้เคียงกับ  $109^\circ$

