9 อิเล็กโทรโฟรีซิส

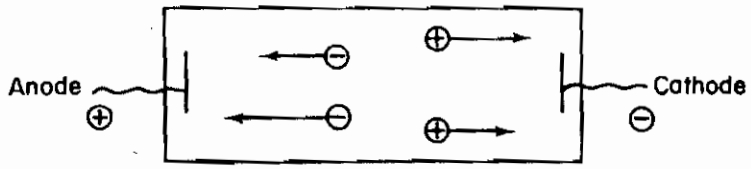
- บทนำ
- ประเภทของอิเล็กโทรโฟรีซิส
- การหานำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

บทนำ

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่คิดค้นโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดนชื่อ Arne Tiselius ในปี ค.ศ. 1930 เขาได้ใช้เทคนิคนี้ในการแยกโปรตีนจากซีรัม โดยสร้างอุปกรณ์พิเศษซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัวยู (U-shaped cell) ที่สามารถต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ทำให้เขาสามารถแยกและวิเคราะห์โปรตีนต่างๆ จากซีรัมได้ การคิดค้นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสของ Arne Tiselius ทำให้เขาได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ.1948 เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในเวลาต่อมา และได้มีการดัดแปลงให้มีความเหมาะสมกับคุณสมบัติของสารที่ต้องการแยกและวิเคราะห์

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการแยกหรือการวิเคราะห์สารที่มีประจุโดยใช้สนามไฟฟ้า ระบบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสประกอบด้วยขั้วไฟฟ้า ซึ่งสามารถต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เมื่อใส่สารละลายผสมที่ต้องการแยกลงสู่ระบบ และต่อสนามไฟฟ้าให้ครบวงจร สารที่มีประจุจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วที่มีประจุตรงกันข้าม โดยสารที่มีประจุบวก (cation) จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (cathode) ส่วนสารที่มีประจุลบ (anion) เคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) ดังรูปที่ 9.1 สารแต่ละชนิดสามารถแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิ ขนาด

และรูปร่างของโมเลกุล อิเล็กโทรโฟรีซิสนำมาใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์สารในงานสาขาต่างๆ เช่น งานวิจัยและวิเคราะห์ทางชีวเคมี งานด้านเภสัชวิทยา งานตรวจวิเคราะห์ทางคลีนิค และงานวิเคราะห์ด้านอาหาร เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากอิเล็กโทรโฟรีซิสให้ประสิทธิภาพในการแยกสูง ทำได้ง่ายและรวดเร็ว อีกทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ราคาไม่แพงนัก



รูปที่ 9.1 แสดงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า สารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ส่วนสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกสารภายใต้สนามไฟฟ้านั้น มีแรงกระทำทางไฟฟ้าต่อสารที่มีประจุคือ

$$F_{electric} = qE$$

$F_{electric}$ คือแรงเคลื่อนไฟฟ้า

q คือประจุสุทธิของโมเลกุลสาร มีหน่วยเป็นคูลอมบ์ (Coulombs)

E คือความแรงของสนามไฟฟ้า มีหน่วยเป็นโวลท์ต่อเมตร

แรงต้านการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุ คือแรงเสียดทานเนื่องจากสารเคลื่อนที่ผ่านสารละลายหรือตัวกลาง

$$F_{fraction} = vf$$

$F_{fraction}$ คือแรงเสียดทานเนื่องจากสารเคลื่อนที่ผ่านสารละลายหรือตัวกลาง

v คืออัตราเร็วคงที่ในการเคลื่อนที่ของสาร (velocity)

f คือสัมประสิทธิ์ความฝืด (fraction coefficient)

สัมประสิทธิ์ความฝืดขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลสาร รวมทั้งความหนืด (viscosity) ของสารละลาย ดังสมการต่อไปนี้

$$f = 6\pi r\eta$$

r คือรัศมีของโมเลกุลของสารที่มีรูปร่างกลม

η คือความหนืดของสารละลาย

ดังนั้นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีค่าสัมประสิทธิ์ความฝืดสูงกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และสารที่มีโมเลกุลไม่สมมาตรมีค่าสัมประสิทธิ์ความฝืดสูงกว่าสารที่มีโมเลกุลสมมาตร

ในระบบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อต่อสนามไฟฟ้าจนครบวงจร โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่โดยแรงกระทำทั้งสอง ที่สภาวะสมดุลแรงทั้งสองมีค่าเท่ากัน

$$F_{electric} = F_{fraction}$$

$$qE = vf$$

$$\frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

$$v = \frac{qE}{f}$$

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับประจุสุทธิของโมเลกุล และความแรงของสนามไฟฟ้า แต่ผกผันกับสัมประสิทธิ์ความฝืด เมื่อความแรงของสนามไฟฟ้าในระบบหนึ่งๆ มีค่าคงที่ ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของสารขึ้นกับอัตราส่วนของประจุสุทธิและสัมประสิทธิ์ความฝืด (q/f)

ระบบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสภายใต้สนามไฟฟ้าคงที่ค่าหนึ่ง ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร (d) ต่อเวลา (t) ต่อความแรงของสนามไฟฟ้า (E) คืออัตราเร็วของการเคลื่อนที่

ของโมเลกุล (electrophoretic mobility of molecule; U) ดังนั้นค่า U หมายถึงอัตราเร็วต่อหนึ่งหน่วยความแรงของสนามไฟฟ้า

$$U = \frac{d}{tE}$$

$$= \frac{v}{E}$$

เมื่อ $\frac{v}{E} = \frac{q}{f}$

ดังนั้น $U = \frac{q}{f}$

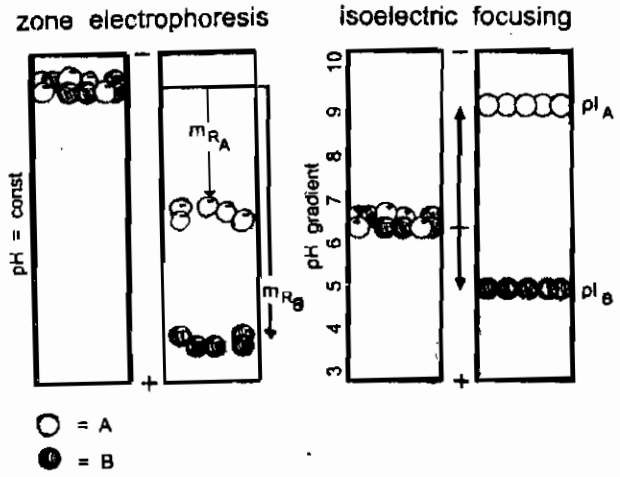
$$= \frac{q}{6\pi r\eta}$$

ค่า U เพิ่มขึ้น เมื่อสารมีประจุสุทธิเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า U ลดลง เมื่อขนาดของโมเลกุลหรือความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น และค่า U มีค่าเป็นศูนย์เมื่อสารไม่มีประจุ

สารชีวโมเลกุลที่นำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ น้ำตาล กรดอะมิโน เปปไทด์ และนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก สารชีวโมเลกุลส่วนใหญ่มีหมู่ที่แสดงประจุบนโมเลกุล เช่น กรดนิวคลีอิกมีหมู่ฟอสเฟตซึ่งแตกตัวให้โปรตอนได้ดี จึงทำให้กรดนิวคลีอิกมีประจุเป็นลบ สารชีวโมเลกุลบางชนิดมีทั้งหมู่ที่แสดงประจุบวกและประจุลบบนโมเลกุลเดียวกัน (amphoteric molecules) เช่น กรดอะมิโนซึ่งมีหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลบนโมเลกุล เนื่องจากค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant; pK) ของหมู่ที่แสดงประจุจะแตกต่างกัน ทำให้ประจุสุทธิบนโมเลกุลของสารขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายที่สารนั้นละลายอยู่ ดังนั้น pH จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสาร การเลือกชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และpH ที่เหมาะสม จะทำให้การแยกสารโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลที่ดี

ประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีน ขนาด และรูปร่าง มีผลต่อการแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกัน โปรตีนซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนมาเรียงต่อกัน pH ของสารละลายโปรตีนมีผลต่อประจุสุทธิของโปรตีน โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า isoelectric point (pI) ค่าหนึ่ง เช่น เบต้าแลกโตโกลบิน (β-lactoglobin) มีค่า pI เท่ากับ 5.34 และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) มีค่า pI เท่ากับ 7.07 เป็นต้น สารละลายที่มี pH มากกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนนั้นจะมีประจุสุทธิเป็นลบ จึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกภายใต้สนามไฟฟ้า ในทางตรงกันข้ามสารละลายที่มี pH ต่ำกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนนั้นจะมีประจุสุทธิเป็นบวก จึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบภายใต้สนามไฟฟ้า

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing; IEF) เป็นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกสารโดยอาศัยค่า pI บัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นระบบ pH เกรเดียนท์ (pH gradient) เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าสารจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่มีประจุตรงกันข้าม ขณะที่สารเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่บัฟเฟอร์มี pH เท่ากับ pI จะทำให้สารมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงหยุดการเคลื่อนที่ รูปที่ 9.2 เป็นการเปรียบเทียบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ isoelectric focusing กับการทำอิเล็กโทร-โฟรีซิสที่ใช้ pH ของบัฟเฟอร์คงที่ โดยใช้ระบบ zone electrophoresis (กล่าวในหัวข้อถัดไป) การเคลื่อนที่ของสารจะเป็นไปตามประจุสุทธิของสาร



รูปที่ 9.2 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ zone electrophoresis เปรียบเทียบกับ isoelectric focusing

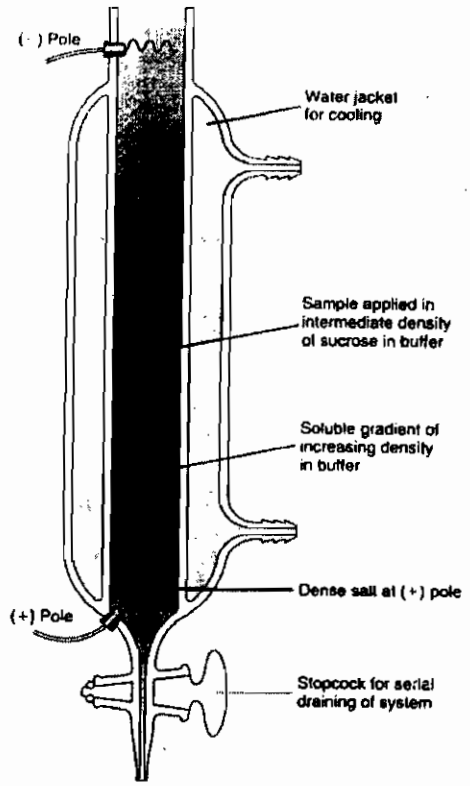
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยทั่วไป คือภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์ที่มีขั้วไฟฟ้า (chamber) และเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ซึ่งโดยทั่วไปใช้เครื่องกำเนิดไฟฟ้าที่สามารถปรับให้กระแสไฟฟ้าคงที่ (ปรับได้สูงสุดประมาณ 200 มิลลิแอมแปร์) หรือปรับให้ความต่างศักย์คงที่ (ปรับได้สูงสุดประมาณ 4 กิโลโวลท์)

ประเภทของอิเล็กโทรโฟรีซิส

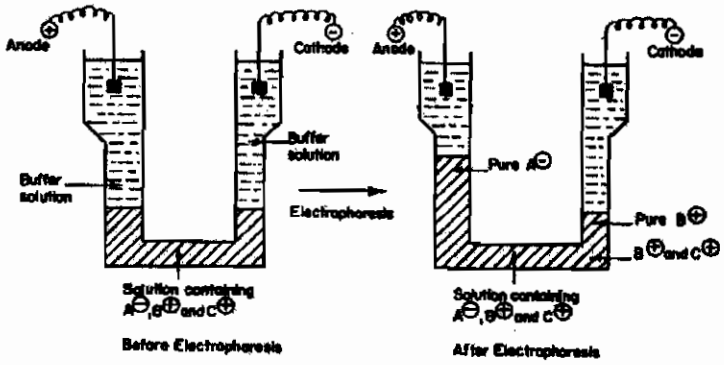
1. ระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะของเหลว (free solution electrophoresis) ดังรูปที่ 9.3 สารผสมที่ทำการแยกจะถูกบรรจุลงในระบบซึ่งมีบัฟเฟอร์อยู่ บัฟเฟอร์ที่มีสารประเภท nonionic และบางกรณีมีการเติมสารที่มีความหนาแน่นสูง เพื่อลดอัตราการแพร่ของสาร เช่น น้ำตาลหรือกลีเซอรอล เมื่อต่อสนามไฟฟ้าจนครบวงจร สารที่มีลักษณะโมเลกุลต่างกันจะแยกออกจากกันได้

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะของเหลว เช่นเดียวกับลักษณะที่ Arne Tiselius ใช้ในการแยกโปรตีนจากซีรัม ดังรูปที่ 9.4 โดยใช้อุปกรณ์รูปตัวยู อุปกรณ์นี้บรรจุสารละลายโปรตีนที่ต้องการแยก จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ลงไป และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้ครบวงจร เมื่อใช้เวลาแยกระยะหนึ่งจะทำให้โปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม ผลการวิเคราะห์ทำให้เห็นเป็นขอบเขตของการเคลื่อนที่ จึงเรียกว่า moving boundary electrophoresis

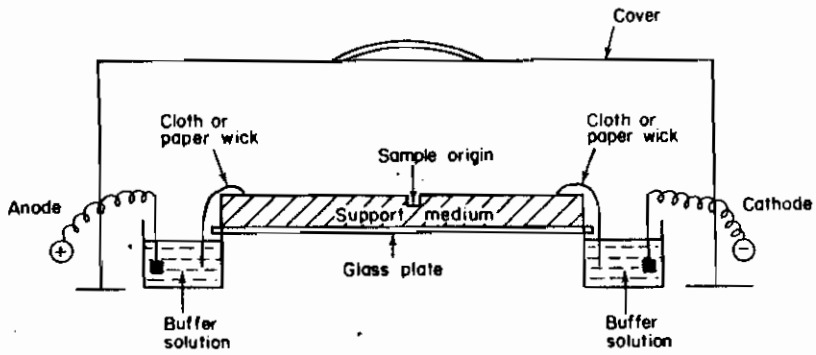
2. ระบบอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะที่มีตัวกลาง (zonal electrophoresis) ดังรูปที่ 9.5 ตัวกลางทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนสาร และลดอัตราการแพร่ของสารลง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงขึ้น ตัวกลางสามารถนำไปวิเคราะห์ผลการแยก และสามารถเก็บข้อมูลภาพที่แสดงผลการแยกไว้ได้



รูปที่ 9.3 ระบบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะของเหลว



รูปที่ 9.4 แสดงการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ moving boundary electrophoresis

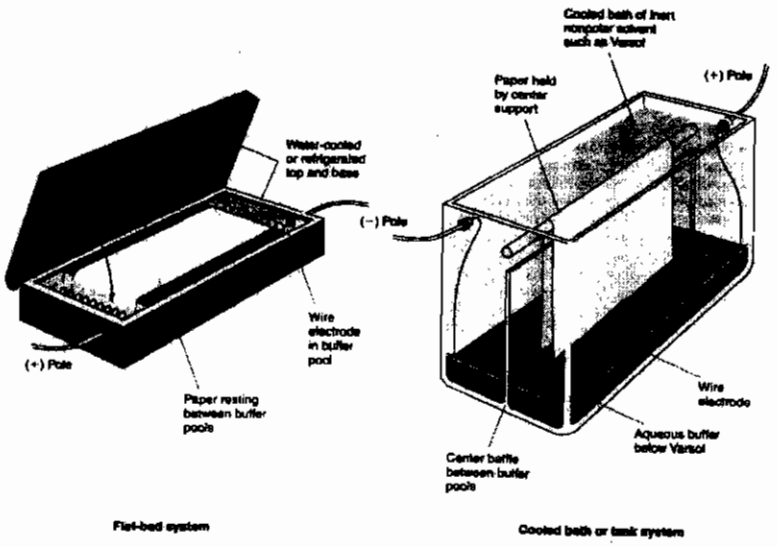


รูปที่ 9.5 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในสภาวะที่มีตัวกลาง

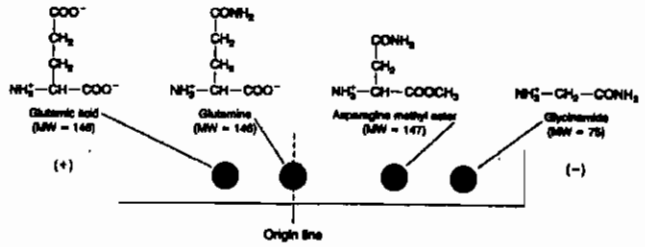
ตัวกลางมีลักษณะเฉื่อย ตัวกลางอาจเป็นของแข็งหรือเจล ตัวกลางที่เป็นของแข็ง เช่น กระดาษกรอง หรือเซลลูโลสอะซิเทต (cellulose acetate) ตัวกลางที่มีลักษณะเป็นเจล เช่น แป้ง อะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์ ตัวกลางแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการแยกสารได้แตกต่างกัน ชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซิสเรียกตามชนิดของตัวกลาง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นของแข็ง

2.1.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper electrophoresis) สิ่งที่ใช้เป็นตัวกลางคือกระดาษ เช่น กระดาษกรอง กระดาษใช้แยกสารที่มีประจุซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็ก วิธีทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ คือนำกระดาษมาตัดให้มีขนาดเหมาะสม แล้วนำไปจุ่มในบัฟเฟอร์ที่ใช้ควบคุม pH เมื่อกระดาษแห้งจึงนำมาหยดสารผสมที่ต้องการแยกลงส่วนกลางของกระดาษแล้วตั้งไว้ให้แห้ง บรรจุบัฟเฟอร์ในภาชนะที่มีขั้วไฟฟ้าขั้วบวกและขั้วลบ นำกระดาษไปใส่ลงในภาชนะโดยวางบนฐานรองรับ โดยให้ปลายกระดาษจุ่มลงในบัฟเฟอร์ โดยสามารถทำได้ทั้งในแนวนอนและแนวตั้ง ดังรูปที่ 9.6 หลังจากต่อระบบไฟฟ้าให้ครบวงจรและใช้เวลาในการแยกสารระยะหนึ่ง สารผสมจะแยกออกจากกันตามประจุสุทธิ ขนาด หรือรูปร่างของสาร เมื่อปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าจึงนำกระดาษไปวิเคราะห์ สารบางชนิดอาจต้องนำไปย้อมเพื่อให้เกิดสีขึ้น เช่น กรดอะมิโนย้อมสีด้วยนินไฮดริน เพื่อให้เกิดสีน้ำเงินม่วงตรงตำแหน่งที่มีกรดอะมิโน ดังรูปที่ 9.7 ซึ่งแสดงตัวอย่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษเพื่อแยกกรดอะมิโน



รูปที่ 9.6 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษในแนวนอนและแนวตั้ง

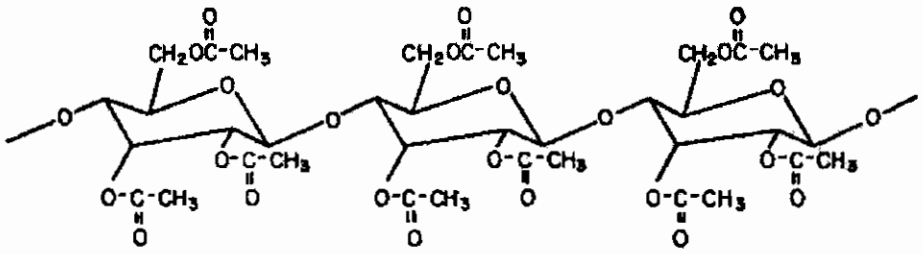


รูปที่ 9.7 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษเพื่อแยกกลูตามีน (glutamine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) เอสพาราจีนเมทิลเอสเทอร์ (asparagine methyl ester) และไกลซินาไมด์ (glycinamide) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH 6.0 ซึ่งทำให้กรดอะมิโนแต่ละชนิดแตกตัว และมีประจุสุทธิดังโครงสร้างด้านบน กลูตามีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงไม่เคลื่อนที่ กรดกลูตามิกมีประจุสุทธิเป็นลบจึงเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ส่วนเอสพาราจีนเมทิลเอสเทอร์ และไกลซินาไมด์มีประจุสุทธิเป็นบวกจึงเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ โดยที่ไกลซินาไมด์ เคลื่อนที่ได้ระยะทางมากกว่าเพราะมีขนาดเล็กกว่า

กระดาษกรองที่ใช้ต้องไม่บางเกินไปเพราะจะทำให้ฉีกขาดง่าย และควรมีหมู่อัลฟาเซลลูโลส (α-cellulose) ประมาณ 96% ของเนื้อกระดาษ โดยทั่วไปจะใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่อนข้างสูงในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ เช่น การแยกกรดอะมิโนใช้ความต่างศักย์ประมาณ 200 โวลท์ต่อเซนติเมตร (V/cm) ถ้าใช้ความต่างศักย์ต่ำจะมีประสิทธิภาพในการแยกต่ำ แต่ในการใช้ความต่างศักย์สูงจะเกิดความร้อนขึ้น อาจใช้ระบบทำความเย็นเพื่อระบายความร้อนที่เกิดขึ้น

การใช้กระดาษกรองเป็นตัวกลางสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนั้น ทำได้ง่ายและรวดเร็วแต่มีข้อจำกัด คือใช้แยกเฉพาะโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ หรือนิวคลีโอไทด์ ในการแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก จะให้ผลการแยกไม่ดี เนื่องจากกระดาษกรองที่เป็นเซลลูโลสมีขนาดรูพรุนไม่สม่ำเสมอ และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ซึ่งสามารถดูดซับสารบางชนิดโดยเฉพาะโปรตีนได้ การดูดซับนี้จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของโปรตีน โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะมีผลต่อการแยกมาก ทำให้แถบหรือจุดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นหางยาว (tailing effect) ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการแยก อีกทั้งโปรตีนแต่ละชนิดจะถูกดูดซับที่บริเวณหมู่ไฮดรอกซิลได้แตกต่างกัน ทำให้ผลการแยกผิดไป

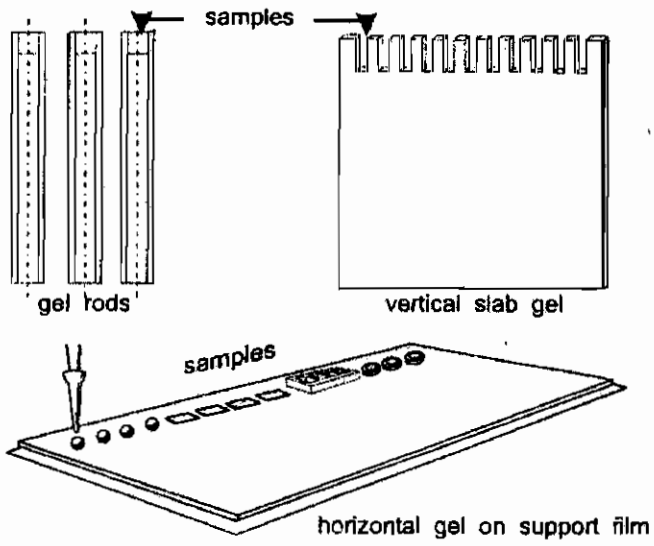
2.1.2 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซิเทต (cellulose acetate electrophoresis) ตัวกลางที่ใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสคือแผ่นเซลลูโลสอะซิเทตซึ่งมีขนาดรูพรุนสม่ำเสมอ หมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างเซลลูโลสของกระดาษถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่อะซิเทต (acetate group) ดังรูป 9.8 ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ดูดซับสาร ทำให้ผลการแยกดีกว่าใช้กระดาษกรองเป็นตัวกลาง และใช้ความต่างศักย์ต่ำกว่าการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลโดยการย้อมสีจะสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีพื้นหลัง (background) ที่เกิดสีน้อยกว่ากระดาษกรอง แผ่นเซลลูโลสอะซิเทตมีลักษณะเป็นแผ่นและมีความโปร่งใส จึงสามารถนำไปวิเคราะห์ผลโดยวิธีสเปกโทรโฟโทมิตรีได้



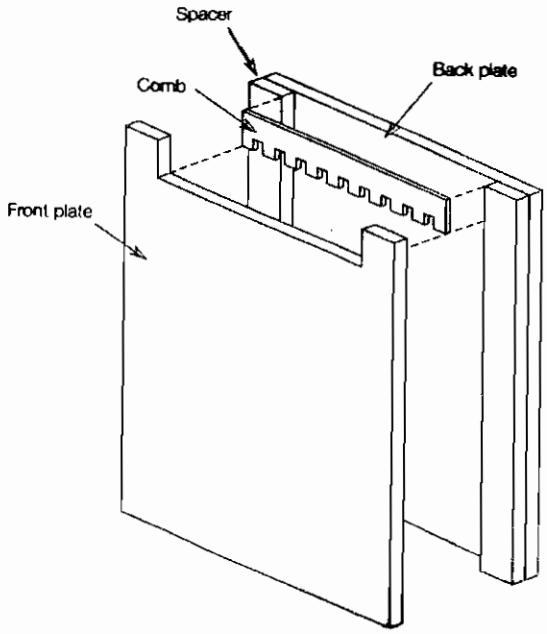
รูปที่ 9.8 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลสอะซิเทต

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซิเทต นิยมนำมาแยกสารที่มีขนาดเล็ก เช่น นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และเปปไทด์ ระบบการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทำเช่นเดียวกับการใช้กระดาษกรองเป็นตัวกลาง

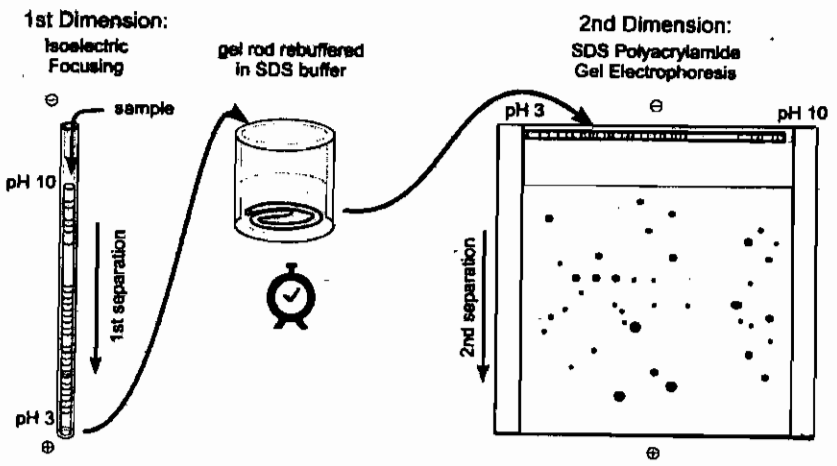
2.2 อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นเจล (gel electrophoresis) ใช้ตัวกลางเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเจล เช่น แป้ง อะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์ นิยมใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลในการแยกสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก เจลเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชัน (polymerization) แบบสายตรงและระหว่างสาย (cross-link) ทำให้เกิดสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะที่เป็นร่างแหสามมิติที่มีรูพรุน (porous) รูพรุนของเจลต้องมีขนาดเหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยก การทำให้เกิดเจล ถ้าทำในหลอดแก้ว จะเกิดเป็นเจลแท่ง (rod gel) ถ้าทำในภาชนะบางหรือทำให้เกิดเจลระหว่างแผ่นกระจก เจลจะมีสักษณะเป็นแผ่นบางๆ (slab gel) แบ่งเป็นแผ่นเจลแนวตั้ง (vertical slab gel) และแผ่นเจลแนวนอน (horizontal slab gel) ดังรูปที่ 9.9 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเจลแบบแผ่นบางได้แก่ แผ่นกระจก แผ่น spacer และซี่หวี (comb) ดังรูปที่ 9.10 การทำเจลแบบแผ่นจะมีช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างได้หลายช่อง บางกรณีมีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 ทิศทาง (two dimension electrophoresis) ดังรูปที่ 9.11



รูปที่ 9.9 แสดงอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลลักษณะต่างๆ



รูปที่ 9.10 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมเจลแบบแผ่นบาง ซึ่งประกอบด้วยแผ่นกระจก 2 แผ่น spacer ที่มีความหนาเท่ากับความหนาของเจลที่ต้องการ และซี่หวี (comb) ซึ่งทำให้เจลเกิดเป็นช่องว่างสำหรับใส่สาร



รูปที่ 9.11 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 ทิศทาง

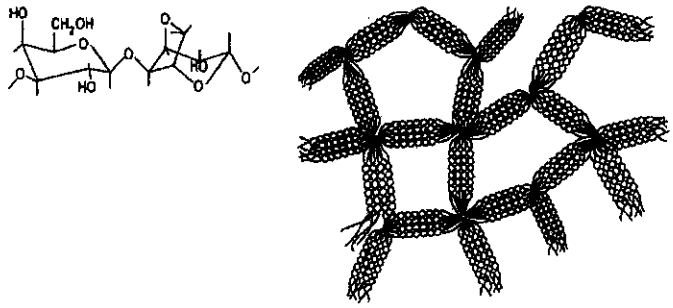
เจลอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมในการแยกสาร โดยบัฟเฟอร์จะบรรจุไว้ในภาชนะ (chamber) ทั้งด้านบนและด้านล่างซึ่งมีขั้วไฟฟ้าขั้วบวกและขั้วลบ เมื่อต่อเข้ากับระบบไฟฟ้า สารที่มีประจุจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วที่มีประจุตรงกันข้าม ในกรณีที่แยกสารซึ่งมีประจุสุทธิต่อโมเลกุลเท่ากัน และรูปร่างเหมือนกัน สารจะแยกออกจากกันตามขนาด สารที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ดีจึงมีระยะทางในการเคลื่อนที่มากกว่า ในขณะที่สารขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ไม่ดีจึงมีระยะทางในการเคลื่อนที่น้อย

2.2.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลแป้ง (starch gel electrophoresis) การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มีการพัฒนาการเตรียมตัวกลางให้มีลักษณะเป็นเจล โดยระยะเริ่มแรกใช้แป้งมันสำปะหลังนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เซชัน แล้วนำมาต้มในสารละลายบัฟเฟอร์จนมีลักษณะใส จากนั้นทำให้เกิดเป็นเจลในภาชนะโดยให้มีความหนาของเจลประมาณ 5 ถึง 10 มิลลิเมตร แล้วนำมาแยกโปรตีนด้วยระบบอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถปรับขนาดของรูพรุนโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้ง การใช้แป้งเป็นตัวกลางทำให้ประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนดีกว่าแยกในสารละลายบัฟเฟอร์อย่างเดียว เพราะทำให้อัตราการแพร่ของโปรตีนลดลง และสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แป้งมีราคาถูกและเตรียมได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือรูพรุนระหว่างโมเลกุลมีขนาดเล็ก และโมเลกุลของแป้งมีหมู่

ซึ่งมีประจุลบ ซึ่งสามารถจับกับประจุบนโมเลกุลของโปรตีน ทำให้มีผลต่อการแยก ในเวลาต่อมาจึงมีการใช้เจลชนิดอื่นคือ อะกาโรส และพอลิอะคริลาไมด์ ซึ่งมีลักษณะเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับประจุบนโมเลกุลของโปรตีน หรือสารชีวโมเลกุลอื่นๆ ที่มีประจุ

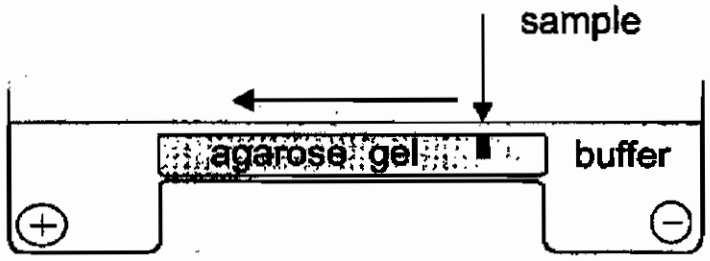
2.2.2 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) โดยอะกาโรสเจลที่เตรียมขึ้นมีขนาดของรูพรุนใหญ่กว่ารูพรุนของเจลของแป้ง คือสามารถเตรียมให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนได้มากกว่า 10 นาโนเมตร ขนาดของรูพรุนขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรส เจลมีรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 นาโนเมตร เมื่อใช้อะกาโรสเข้มข้น 1%(w/v) และรูพรุนขนาด 500 นาโนเมตร เมื่ออะกาโรสเข้มข้น 0.16% (w/v) อะกาโรสเจลจึงเหมาะสมในการแยกชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก (ขนาดประมาณ 50-30,000 คู่เบส) หรือโปรตีนขนาดใหญ่

อะกาโรสเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส และ 3,6-anhydrogalactose ที่สกัดจากสาหร่าย โครงสร้างของอะกาโรสและรูปร่างของสารพอลิเมอร์เมื่อเป็นเจลแล้วแสดงดังรูปที่ 9.12 การเตรียมอะกาโรสเจลทำได้ง่ายกว่าการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์ และไม่เป็นอันตราย อะกาโรสสามารถละลายได้ในน้ำเดือดและกลายเป็นเจลเมื่ออุณหภูมิประมาณ 40 $^{\circ}$C ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.4% ถึง 4% (w/v) อะกาโรสเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยก



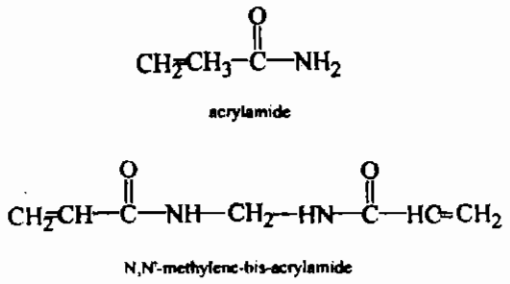
รูปที่ 9.12 สูตรโครงสร้างของอะกาโรส และรูปร่างเมื่อเกิดเป็นเจลพอลิเมอร์

ในการแยกดีเอ็นเอมีการเตรียมอะกาโรสเจลบนถาด แล้วนำไปวางในภาชนะสำหรับทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นเทบัฟเฟอร์ให้ท่วมอะกาโรสเจลและต่อกระแสไฟฟ้าให้ครบวงจร ดังรูปที่ 9.13 การเตรียมอะกาโรสเจลโดยทั่วไปจะเตรียมให้มีความหนาประมาณ 1 ถึง 10 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่จะใส่ลงในช่องของเจล ทั้งนี้ไม่ควรเตรียมเจลให้หนามากเกินไป เนื่องจากต้องนำเจลไปย้อมกับสารที่ทำให้เห็นแถบของดีเอ็นเอ เช่น เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide; EtBr) ถ้าเจลหนาเกินไปจะทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน การใช้อะกาโรสเจลในการแยกโปรตีน มีการเตรียมอะกาโรสเจลเคลือบบนแผ่นกระจก หรือแผ่นฟิล์ม เจลจึงมีลักษณะบาง



รูปที่ 9.13 แสดงตัวอย่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางโดยบรรจุอะกาโรสในภาชนะที่มีขั้วไฟฟ้า ซึ่งสามารถต่อเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า

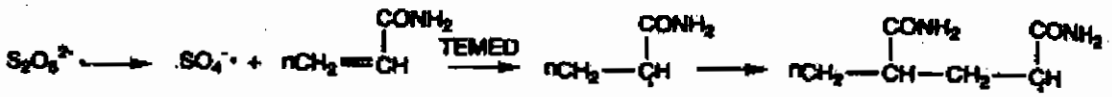
2.2.3 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) พอลิอะคริลาไมด์เจลเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชัน ระหว่างอะคริลาไมด์ (acrylamide) และสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโยง (cross-linking agent) คือ เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N′-methylenebisacrylamide) หรือเรียกสั้นๆ ว่าบิส (bis) ดังรูปที่ 9.14 คุณสมบัติของเจลและขนาดรูพรุนของเจลขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของมอโนเมอร์ซึ่งทำให้เกิดโอกาสในการเชื่อมโยงกัน (degree of cross-linking) เนื่องจากมอโนเมอร์ของอะคริลาไมด์เป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxin) จึงต้องทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง เช่น สวมถุงมือ และไม่ใช้ปากปิเปตต์สารละลายอะคริลาไมด์



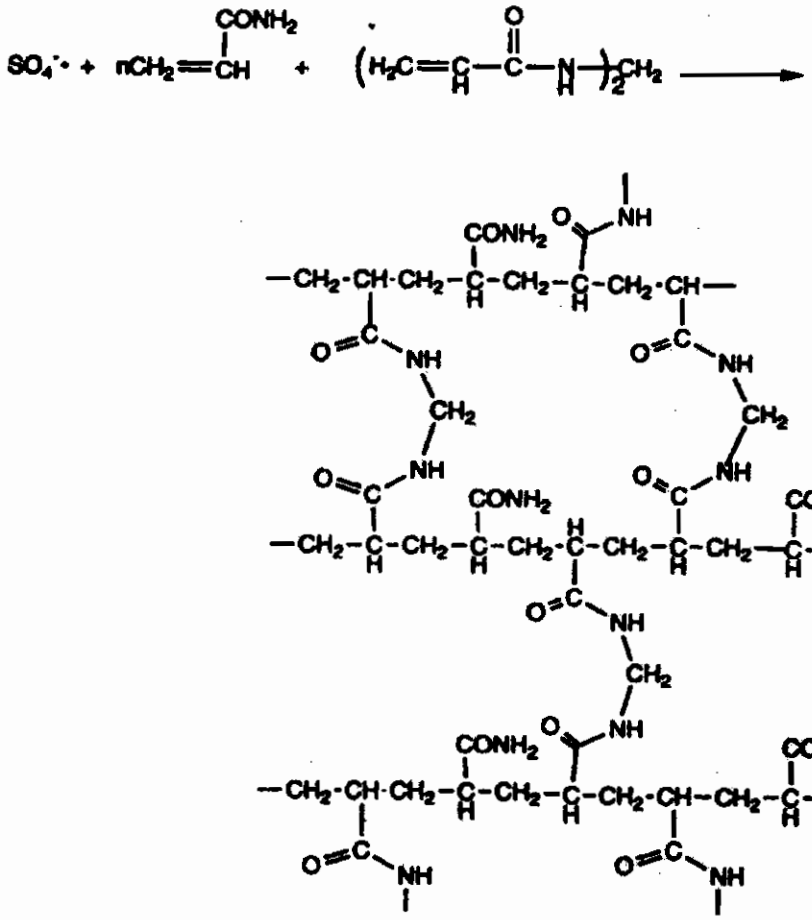
รูปที่ 9.14 โครงสร้างของอะคริลาไมด์และเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชันถูกชักนำโดย SO_4^- ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่มาจากการแตกตัวของแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) เมื่อละลายในน้ำ ในการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชัน โดยทั่วไปมักใส่ N,N,N′,N′–tetramethylethylenediamine (TEMED) เพื่อเป็นตัวคะตะลิสต์ ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระ SO_4^- มีความเสถียร อนุมูลอิสระเปอร์ซัลเฟตจะเปลี่ยนอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ไปเป็นอนุมูลอิสระแล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยากับมอโนเมอร์ที่ยังไม่ถูกแอคติเวต (unactivated monomer) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการสร้างสายโซ่อะคริลาไมด์ขึ้น ดังรูปที่ 9.15 สายโซ่พอลิเมอร์ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นนี้ แต่ละสายโซ่จะถูกเชื่อมโยงกันและกันเป็นตาข่ายร่างแหอย่างสุ่ม (random) ด้วยบิสอะคริลาไมด์ ดังปฏิกิริยารูปที่ 9.16

ในกรณีที่เตรียมให้เกิดเป็นเจลไม่ได้ อาจเนื่องจากการเกิดพอลิ-เมอไรส์เซชันของอะคริลาไมด์เกิดได้ไม่ดี หรืออาจจะไม่เกิดขึ้นเลย ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน หรือ pH ที่ไม่เหมาะสม โดยแผ่นกระจกควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขณะที่เตรียมเจล สภาวะที่มีออกซิเจนจะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชัน สภาวะที่ pH เป็นกลาง-ด่าง จะเหมาะสมสำหรับตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ใช้คือ TEMED และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ที่ pH เป็นด่างการทำงานของตัวเริ่มต้นเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพสูง แต่ที่ pH เป็นกรด TEMED อยู่ในรูปที่มีโปรตอน (protonated from) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชันช้าลง



รูปที่ 9.15 การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชันของอะคริลาไมด์ที่ถูกชักนำโดย $SO_4^{\cdot-}$



รูปที่ 9.16 การเกิดพอลิอะคริลาไมด์เจล

พอลิอะคริลาไมด์เจลมีความเสถียรมาก เนื่องจากเป็นการสร้างพันธะโควาเลนท์ สามารถเตรียมเจลให้มีเปอร์เซนต์ต่างๆ (5-20%) รูพรุนจึงมีขนาดต่างๆ โดยทั่วไปสามารถแยกโปรตีนขนาด 5,000 ถึง 200,000 ดาลตัน หรือแยกพอลินิวคลีโอไทด์ขนาด 5 เบส ถึง 2,000 คู่เบส

การแยกโมเลกุลโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจล ต้องพิจารณาถึงขนาดของรูพรุน โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ต้องเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลให้รูพรุนมีขนาดใหญ่ ในทางตรงกันข้ามโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ต้องเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลให้มีรูพรุนขนาดเล็ก ซึ่งขนาดของรูพรุนที่เกิดขึ้นนั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณรวมของอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ (%T) และอัตราส่วนของตัวเชื่อมโยง (%C) โดยคำนวณจากสมการ

$$\%T = \frac{(a + b) \times 100}{V}$$

$$\%C = \frac{b \times 100}{a + b}$$

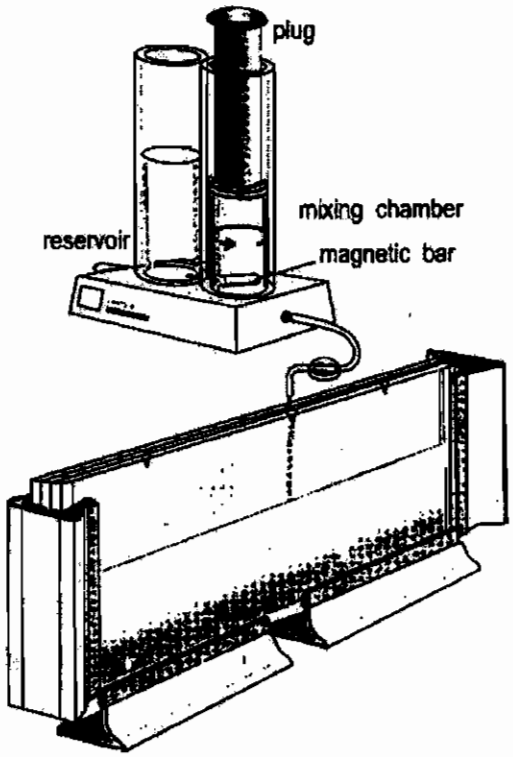
เมื่อ a คือน้ำหนักของอะคริลาไมด์ (หน่วยเป็นกรัม)

b คือน้ำหนักของบิส (หน่วยเป็นกรัม)

V คือปริมาตรในการเตรียมเจล (หน่วยมิลลิลิตร)

เมื่อ %T เพิ่มขึ้น เจลจะมีรูพรุนขนาดเล็ก เมื่อ %T คงที่ และ %C เท่ากับ 5 เจลจะมีรูพรุนขนาดเล็กที่สุด

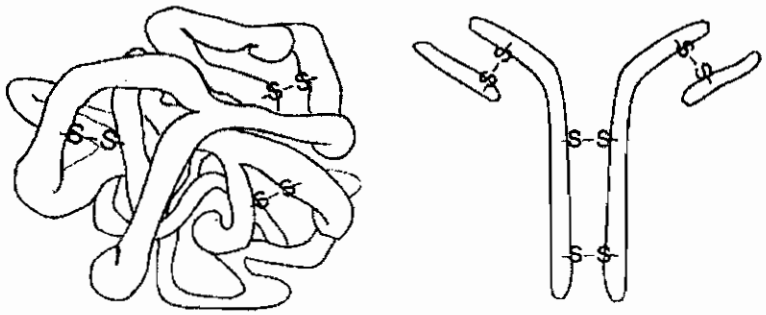
การเตรียมเจลมีทั้งวิธีเตรียมเจลให้ได้เปอร์เซ็นต์เจลเท่ากันทั้งแผ่น หรือเตรียมเจลในระบบเกรเดียนท์ ดังรูปที่ 9.17



รูปที่ 9.17 การเตรียมเจลระบบเกรเดียนท์

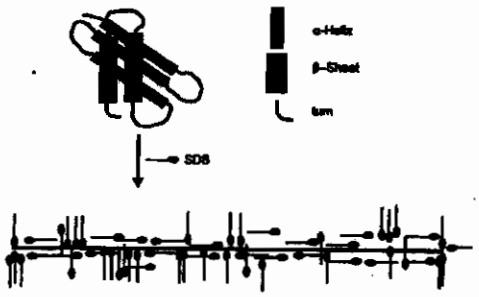
การหานำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (PAGE) ที่มีการใช้สารซักฟอก (detergent) ซึ่งมีชื่อว่าโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ใส่ในระบบบัฟเฟอร์ SDS มีสูตรโมเลกุลคือ $CH_3(CH_2)_{11}SO_3^-Na^+$ เป็นสารซักฟอกชนิดแอนไอออนิก (anionic detergent) ซึ่ง SDS สามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนและแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ทำให้โครงสร้างของโปรตีนคลายออกเป็นสายยาว และร่วมกับการใส่สารพวกไทออล (thiol) เช่น β-mercaptoethanol หรือ dithiothreitol ซึ่งสามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ที่พบในโครงสร้างระดับตติยภูมิ และระดับจตุรภูมิของโปรตีน ดังรูป 9.18 การทำ PAGE ที่มี SDS จึงเรียกว่า SDS-PAGE หรือ denaturing electrophoresis เนื่องจากทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ

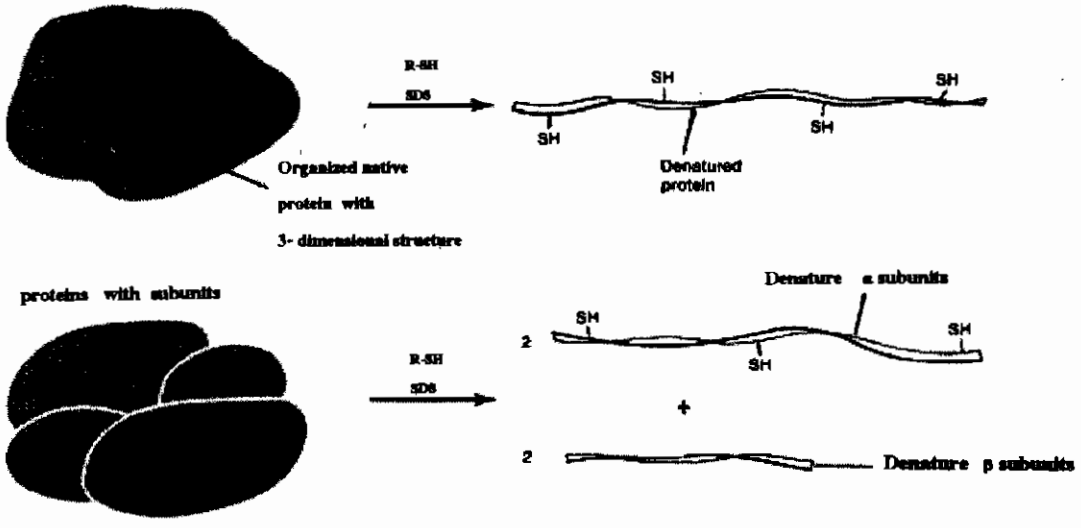


รูปที่ 9.18 พันธะไดซัลไฟด์ที่พบในโครงสร้างระดับตติยภูมิ และระดับจตุรภูมิของโปรตีน

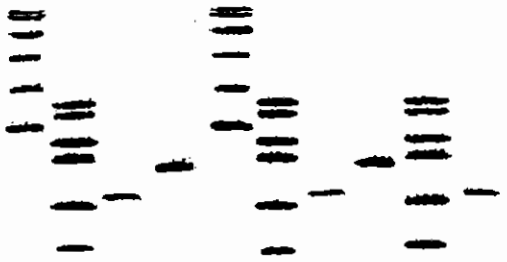
เทคนิค SDS-PAGE ใช้ในการแยกโปรตีนออกเป็นหน่วยย่อย (subunit) และสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อย โดย SDS สามารถจับกับสายพอลิเปปไทด์ด้วยอัตราส่วนคงที่ ดังรูปที่ 9.19 (อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ SDS ต่อโปรตีนเป็น 1.4 ต่อ 1) จึงทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบต่อโมเลกุลโดยเฉลี่ยเท่ากัน และทำให้โปรตีนแตกออกเป็นหน่วยย่อย (subunit) ที่เป็นเส้นตรง รูปที่ 9.20 โปรตีนจึงมีประจุสุทธิต่อน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน และมีรูปร่างเหมือนกัน ดังนั้นการแยกโปรตีนด้วยระบบ SDS-PAGE จึงเป็นการแยกโปรตีนตามขนาด สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางมากกว่า ดังรูปที่ 9.21



รูปที่ 9.19 การจับของ SDS กับสายพอลิเปปไทด์



รูปที่ 9.20 การทำงานของ SDS และ thiol



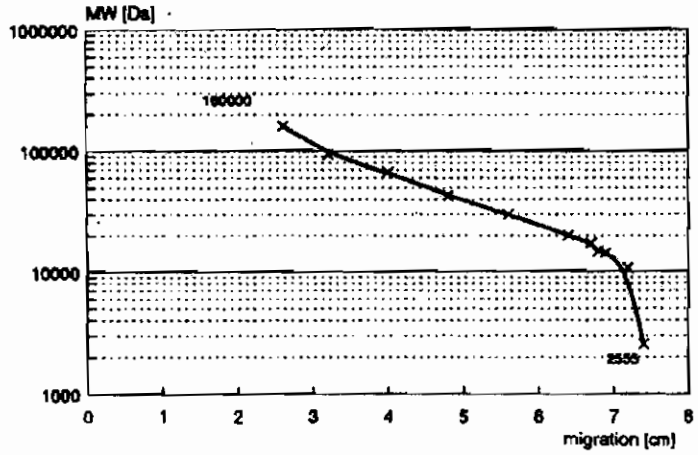
รูปที่ 9.21 การเคลื่อนที่ของโปรตีนเนื่องจากการทำ SDS-PAGE ช่องที่ 1, 5 คือ low molecular weight markers ช่องที่ 2, 6, 9 คือ peptide markers (2.5 – 1.7 kDa) ช่องที่ 3,7,10 คืออินซูลิน ช่องที่ 4,8 คือ อพรอไทนิน

สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โดยหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างน้ำหนักโมเลกุลระยะทางการเคลื่อนที่ โดยความสัมพันธ์ระหว่าง log MW กับค่า relative mobility (R_f) จะได้กราฟเส้นตรง ค่า R_f หาได้จากสมการดังต่อไปนี้

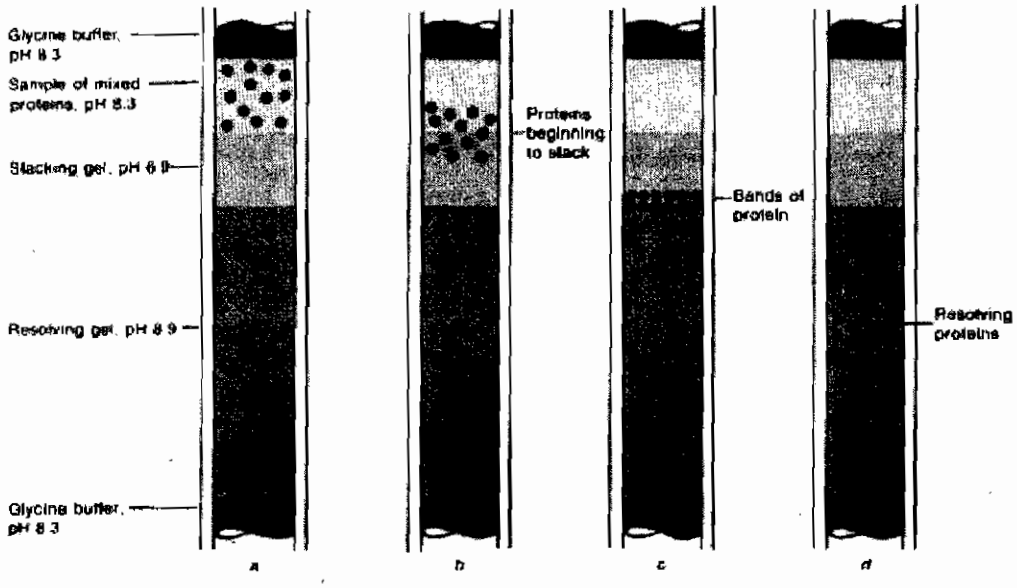
$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสีติดตาม}}$$

การทำ SDS-PAGE ทำให้เราทราบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ดังรูปที่ 9.22 ทั้งนี้ต้องใช้เจลที่เป็นระบบเดียวกันและมีเปอร์เซ็นต์เจลเท่ากัน

การทำ SDS-PAGE โดยทั่วไปจะประกอบด้วยเจล 2 แบบในแผ่นเดียวกัน คือ stacking gel และ separating gel หรือเรียก resolving gel เรียก discontinuous ("disc") ดังรูปที่ 9.23 ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะใส่สารลงในช่องเจลของ stacking gel ซึ่งมีรูพรุนขนาดเล็ก stacking gel จะทำให้โมเลกุลของโปรตีนเคลื่อนที่เป็นระเบียบก่อนที่จะแยกกันใน separating gel



รูปที่ 9.22 กราฟมาตรฐานในการทำ SDS-PAGE



รูปที่ 9.23 discontinuous gel electrophoresis

การทดลองที่ 9.1

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอสามารถใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยอาศัยหลักการที่ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุเป็นลบเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มี pH 7-8 ภายใต้สนามไฟฟ้า ดังนั้นดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ตัวกลางที่นิยมใช้เป็นตัวค้ำจุน คือ อะกาโรสเจล และพอลิอะคริลาไมด์เจล

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ รวมทั้งการเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ เนื่องจากทำได้ง่าย และมีความไวสูง คือสามารถตรวจดีเอ็นเอที่มีปริมาณเพียง 1 นาโนกรัม ได้

ปัจจัยที่มีผลในการแยกกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสคือ ธรรมชาติของสาร ชนิดของบัฟเฟอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า รวมทั้งคุณสมบัติและความเข้มข้นของตัวกลาง

ธรรมชาติของสารที่มีผลต่อการแยก ได้แก่ ประจุสุทธิ รูปร่าง และขนาดของสาร ประจุสุทธิต่อมวลสำหรับดีเอ็นเอแต่ละสายนั้น จะใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากในโครงสร้างของพอลินิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันเฉพาะเบส ซึ่งเบสแต่ละชนิดมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน ดังนั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน จึงมีประจุสุทธิต่อมวลเท่ากัน และเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่ากันภายใต้สนามไฟฟ้า

รูปร่างของดีเอ็นเอแบ่งเป็น ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นสายยาว (linear DNA) เช่น ดีเอ็นเอที่สกัดจากโครโมโซมของสัตว์หรือพืช ดีเอ็นเอรูปร่างเป็นเกลียว (supercoiled DNA) ดีเอ็นเอรูปร่างเป็นวงกลม (closed circular DNA) เช่น ดีเอ็นเอของพลาสมิด การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอนั้น ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเกลียวจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่ารูปร่างอื่นๆ ส่วนดีเอ็นเอรูปร่างกลมเคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด ในด้านขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่

บัฟเฟอร์ เช่น TBE บัฟเฟอร์ ซึ่งองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ คือ Tris-HCl, Boric acid และ EDTA สำหรับ Tris-HCl ทำหน้าที่รักษาระดับ pH โดยปกติจะใช้ pH ประมาณ 7.5 ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอมีประจุสุทธิเป็นลบ Boric acid ทำหน้าที่แตกตัวให้ประจุ และ EDTA ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) นิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยกรดนิวคลีอิก โดย EDTA จะไปจับกับ Mg^{2+} ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์นิวคลีเอส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

ความต่างศักย์ไฟฟ้า โดยปกติจะใช้ความต่างศักย์ประมาณ 1.5–5 โวลท์/เซนติเมตร

คุณสมบัติของตัวกลาง นิยมใช้อะกาโรสเจลเป็นตัวกลางในการแยกกรดนิวคลีอิกที่มีความแตกต่างกันประมาณ 50 คู่เบสขึ้นไป ในกรณีที่มีขนาดแตกต่างกันน้อย คือตั้งแต่ 1 เบส สามารถใช้ตัวกลางเป็นพอลิอะคริลาไมด์

ตารางแสดงความเข้มข้นอะกาโรสเจลในการแยกกรดนิวคลีอิก

เปอร์เซนต์อะกาโรส	ขนาดของกรดนิวคลีอิก (คู่เบส)
0.3	5,000 – 50,000
0.5	2,000 – 25,000
0.8	700 – 9,000
1.0	500 – 7,000
1.2	400 – 5,000
1.5	200 – 3,000
2.0	100 – 2,000

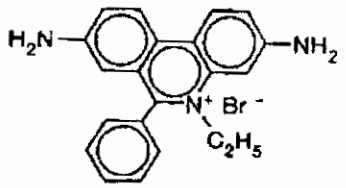
การหยอดสารละลายตัวอย่างลงในเจล

เมื่อต้องการใส่ดีเอ็นเอลงในเจล ให้ทำการผสมดีเอ็นเอกับ loading dye ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีความหนาแน่นสูง และสารย้อม (dye) สารที่มีความหนาแน่นสูง เช่น ซูโครส กลีเซอรอล หรือไฟคอล (Ficoll 100) ใช้ผสมกับสารละลายดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันไม่ให้

สารละลายดีเอ็นเอฟุ้งกระจาย ขณะที่ทำการใส่ดีเอ็นเอลงในช่องของเจล สารย้อม เช่น โบรโมฟีนอลบลูซึ่งใส่ลงไปใน loading dye เพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากเป็นสารที่มีประจุลบ การเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลูจะใกล้เคียงกับดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส

การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

การตรวจหาตำแหน่งของดีเอ็นเอภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ดังรูป ซึ่งเอทิเดียมโบรไมด์จะไปจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่เกิดเป็นสารเชิงซ้อน สารเชิงซ้อนนี้สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร และปล่อยแสงวาวสีส้มที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร การย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิเดียมโบรไมด์สามารถใช้กับดีเอ็นเอที่มีปริมาณเพียง 10 ถึง 50 นาโนกรัม



Ethidium bromide

โครงสร้างของเอทิเดียมโบรไมด์

การใช้เอทิเดียมโบรไมด์ต้องใช้อย่างระมัดระวัง ควรสวมถุงมือขณะทำการย้อมเจล เนื่องจากเอทิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง

การหาขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำได้โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด โดยทั่วไปบอกเป็นจำนวนคู่เบส

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

เจลแชมเบอร์ (gel chamber) และหวี (comb)

เครื่องกำเนิดไฟฟ้า

UV transilluminator

สารเคมี

Tris–EDTA buffer (TE buffer) pH 7.5 (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

Tris–borate buffer (TBE buffer) pH 8.0 (89 mM Tris, 89 mM Boric acid, 2.5 mM EDTA)

loading dye (0.025% bromphenol blue, 40% sucrose, 0.5% SDS)

stainiag solution (ethidium bromide 2.5 μg/ml)

λ/*Hin*d III

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมดีเอ็นเอ

1.1 นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนในเอทานอล มาเซนตริฟิวจ์ที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.2 เทเอทานอลส่วนบนทิ้ง ซับเอทานอลที่ปากหลอดด้วยกระดาษทิชชู ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

1.3 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

2. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.1 ชั่งอะกาโรส 1 กรัม ใส่ในบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้อะกาโรสละลาย

2.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิประมาณ 60 °C เทลงในเจลแชมเบอร์ที่เสียบหวีไว้แล้ว รอให้เจลแข็งตัว แล้วดึงหวีออก

2.3 เทบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมเจล

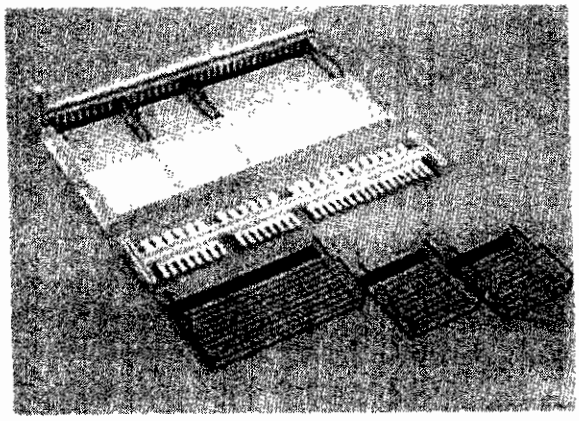
2.4 ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading dye ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วหยอดลงในช่องเจล

2.5 ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยตั้งความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลท์

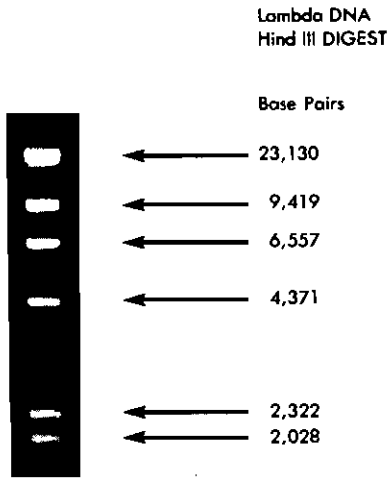
2.6 หลังจากที่ใช้เวลาในการแยกดีเอ็นเอประมาณ 60 นาที จึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า แล้วนำเจลไปย้อมด้วย staining solution ประมาณ 5 – 10 นาที

2.7 ล้าง staining solution ที่ไม่จับกับดีเอ็นเอออกด้วยการแช่น้ำกลั่นประมาณ 10 – 20 นาที

2.8 นำเจลไปส่องแสง UV เพื่อดูแถบดีเอ็นเอ



ผลการทดลอง



คำถาม

1. ดีเอ็นเอที่นำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด

.....

.....

.....

2. ดีเอ็นเอที่แยกได้มีขนาดเท่าใด

.....

.....

.....

การทดลองที่ 9.2

การวิเคราะห์โปรตีนจากใบไม้ด้วยวิธี SDS – PAGE

การวิเคราะห์โปรตีนที่มีในใบไม้ด้วยวิธี SDS – PAGE และย้อมเจลด้วยวิธี Coomassie Brilliant Blue หรือ Silver stain โดยการทำ SDS – PAGE จะใส่โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในช่องเจล เพื่อทำ SDS – PAGE ไปพร้อมๆ กับโปรตีนตัวอย่าง โดยใช้เปอร์เซนต์ของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่เหมาะสมในการแยกโปรตีน

ตารางแสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล (Da)
lysozyme (chicken egg white)	14,300
soybean trypsin inhibitor (soybean)	21,500
carbonic anhydrase (bovine erytocytes)	31,000
albumin (egg)	45,000
albumin (bovine serum)	66,200
phosphorylase b (rabbit muscle)	97,400
β-galactosidase (*E. coli*)	116,000
myosin (rabbit muscle)	205,000

ตารางแสดงเปอร์เซนต์เจลที่เหมาะสมในการแยกโปรตีน

เปอร์เซนต์เจล	ขนาดของโปรตีนที่แยก (Da)
7.5	45,000 - 200,000
10	20,000 - 200,000
12	14,000 - 70,000
15	5,000 - 70,000
20	5,000 - 45,000

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ปิเปตต์อัตโนมัติ

ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสในแนวตั้ง

เครื่องกำเนิดไฟฟ้า

สารเคมี

1. 30% acrylamide

acrylamide	29.2	กรัม
bis	0.8	กรัม

เติมน้ำกลั่น คนให้ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสงที่ 4 $^{\circ}$C

2. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris base	18.15	กรัม

เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 1 N HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

3. 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base	3.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1 N HCl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร

4. 10% SDS

SDS	10.0	กรัม

เติมน้ำกลั่น คนให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. 10% ammonium persulfate (APS)

ammonium persulfate	0.1	กรัม

เติมน้ำกลั่นเป็น 1 มิลลิลิตร ควรเตรียมใหม่ก่อนใช้

6. 4× separating gel buffer

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	20.0	มิลลิลิตร
10% SDS	1.6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	18.4	มิลลิลิตร

7. 4× stacking gel buffer

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	20.0	มิลลิลิตร
10% SDS	1.6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	18.4	มิลลิลิตร

8. 1× electrophoresis buffer

Tris base	12.0	กรัม
glycine	57.6	กรัม
SDS	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	4.0	ลิตร

ปรับ pH เป็น 8.3 ปรับปริมาตรเป็น 4.0 ลิตร

9. 4× sample loading buffer

4× stacking gel buffer	1.0	มิลลิลิตร
10% SDS	1.8	มิลลิลิตร
β-mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
glycerol	2.0	มิลลิลิตร
1% bromophenol blue	5.0	ไมโครลิตร

10.สารเคมีสำหรับย้อมเจลด้วยวิธี Coomassie Brilliant Blue

- สารละลายสำหรับย้อม (staining solution)

  0.025% Coomassie Brilliant Blue R 250, 40% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก

- 40% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก
- 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก

11.สารเคมีสำหรับย้อมเจลด้วยวิธี Silver stain

- 45% เมทานอล และ 12% กรดอะซิติก
- 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก
- 10% glutaraldehyde
- 0.01 M dithiothreitol (DTT)
- 0.1% (w/v) ซิลเวอร์ไนเทรต ($AgNO_3$)
- 3% โซเดียมคาร์บอเนต และ 0.019% ฟอร์มอลดีไฮด์
- 1% กรดอะซิติก
- น้ำ DI (deionized water, DI Water)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเจล

1.1 ผสมสารละลายเพื่อเตรียม separating gel ตามเปอร์เซนต์ที่ต้องการ ดังตาราง โดยใส่ TEMED เมื่อพร้อมที่จะเทเจลลงในแผ่นกระจก

ตารางแสดงการเตรียม separating gel เข้มข้น 10%, 12% และ 15%

สาร	ปริมาตรสารที่ใช้ในการเตรียม separating gel		
	10%	12%	15%
น้ำกลั่น	3.25 ml	2.70 ml	1.92 ml
4× separating gel buffer	2 ml	2 ml	2 ml
30% acrylamide	2 ml	3 ml	4 ml
10% APS	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl

1.2 ใช้ปิเปตต์ดูด separating gel ใส่ลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยให้ระดับความสูงเหลือประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นเหนือเจล ตั้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดพอลิเมอร์ จึงเทน้ำกลั่นออก ใส่หวีพลาสติก (comb) ลงระหว่างแผ่นกระจก

1.3 ผสมสารละลายดังตาราง เท stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel จนเต็ม ตั้งไว้ให้เกิดพอลิเมอร์จึงดึงหวีออก

ตารางแสดงการเตรียม stacking gel เข้มข้น 10%, 12% และ 15%

สาร	ปริมาตรสารที่ใช้ในการเตรียม stacking gel
น้ำกลั่น	4.6 ml
4× separating gel buffer	2 ml
30% acrylamide	1.3 ml
10% APS	48 µl
TEMED	5 µl

2. การเตรียมโปรตีนตัวอย่าง

2.1 นำใบไม้ 2 กรัม มาบดในครกกระเบื้อง (mortar) ให้ละเอียด แล้วนำมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ เซนตริฟิวจ์ด้วยยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.2 นำสารละลายส่วนบนมาเติม 4× sample loading buffer ในอัตราส่วน 3 : 1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้อุณหภูมิลดลง ก่อนนำไปใส่ในช่องเจลที่เตรียมไว้

3. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1 ต่ออุปกรณ์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นใส่บัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (1x electrophoresis buffer) ที่ส่วนบนและส่วนล่างของแชมเบอร์

3.2 ใส่สารละลายโปรตีนจากใบไม้ที่ผสมกับ loading buffer ไว้แล้ว โดยใส่ที่ช่องว่างของเจล ปริมาตร 10 – 20 ไมโครลิตร

3.3 ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในช่องว่างของเจล

3.4 ต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้ขั้วลบอยู่ด้านบนของแชมเบอร์ ขั้วบวกอยู่ด้านล่าง เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 25 มิลลิแอมแปร์ เมื่อการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลูเหลือระยะประมาณ 2-3 เซนติเมตร จากด้านล่าง ให้ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า นำสายไฟออก และนำเจลออกจากแผ่นกระจกใส่ในภาชนะ เพื่อนำไปย้อมต่อไป

4. การย้อมเจล

การวิเคราะห์ผล หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ต้องนำเจลมาวิเคราะห์ผลการแยกอีกขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากเราไม่สามารถมองเห็นโปรตีนที่อยู่ในเจล จึงต้องนำมาย้อม (staining) ด้วยสารที่สามารถจับกับโปรตีนแล้วปรากฏแถบที่สามารถมองเห็นได้ เช่น การย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue ซึ่งโปรตีนควรมีปริมาณตั้งแต่ 1 ไมโครกรัมจึงย้อมติดสี หรือระบบการย้อมด้วยซิลเวอร์ (Silver stain system) ซึ่งสามารถย้อมโปรตีนที่อยู่บนเจลที่มีปริมาณเพียง 10 นาโนกรัม

4.1 การย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue

4.1.1 นำเจลมาแช่ในสารละลายสำหรับย้อม เขย่าเบาๆ ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

4.1.2 เทสารละลายสำหรับย้อมออกแล้วล้างด้วย 40% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

4.1.3 ล้างเจลด้วย 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก ประมาณ 2 ครั้ง แล้วแช่เจลใน 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก บริเวณที่มีโปรตีนจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงิน

4.1.4 เก็บเจลโดยใช้แผ่นเซลโลเฟน (cellophane) ที่เปียกน้ำ 2 แผ่น โดยประกบบนแผ่นเจลทั้งด้านบนและด้านล่าง และไล่ฟองอากาศออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง หรือใช้เครื่องดูดอากาศ (vacuum)

4.2 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ (silver stain)

ใช้หลักการที่ซิลเวอร์ไอออนเข้าจับกับหมู่ซัลไฮดริล และหมู่คาร์บอกซิลบนโมเลกุลของโปรตีน ภายหลังจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงตรึงโปรตีนไว้กับเจล แล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเทรต เติมสารรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนไอออนของ Ag^{+} ให้เป็นโลหะซิลเวอร์ (Ag) ซึ่งจะตกตะกอนบนโปรตีน ทำให้เห็นแถบสีดำ จากนั้นล้างซิลเวอร์ส่วนที่เกินออก

4.2.1 นำเจลมาแช่ในสารผสมของ 45% เมทานอล และ 12% กรดอะซิติก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.2.2 เทสารข้อ 4.2.1 ออก ล้างด้วย 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติก ปริมาตรประมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ล้างเช่นนี้ 2 ครั้ง

4.2.3 นำเจลมาแช่ใน 10% glutaraldehyde 30 นาที

4.2.4 ล้างด้วยน้ำ DI 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง

4.2.5 แช่เจลใน 0.01 M dithiothreitol 30 นาที

4.2.6 นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย 0.1% ซิลเวอร์ไนเทรต 30 นาที

4.2.7 ล้างเจลด้วยน้ำ DI 1 นาที 2 ครั้ง

4.2.8 นำเจลมาใส่ใน 3% โซเดียมคาร์บอเนต และ 0.019% ฟอร์มอลดีไฮด์ 1 นาที เขย่าตลอดเวลา เมื่อปรากฏแถบของโปรตีนให้เทสารดังกล่าวทิ้งทันที ล้างด้วยน้ำ DI แล้วเติม 1% กรดอะซิติก แช่เจลไว้ 5 นาที

4.2.9 เท 1% กรดอะซิติกทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำ DI หลายๆ ครั้ง

การวิเคราะห์ผล

1. วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน และระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู จากจุดเริ่มต้น

2. คำนวณหาค่า relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างที่ปรากฏบนเจล

3. เขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้แกนนอนเป็นค่า R_f ส่วนแกนตั้งเป็นค่า log MW ของโปรตีนมาตรฐาน

4. คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง

คำถาม

1. โปรตีนตัวอย่างมีกี่หน่วยย่อย

.....

.....

.....

2. สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างได้อย่างไร

.....

.....

.....

3. เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้มาใส่ SDS แล้วนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลแผ่น จงเขียนแผนภาพที่เกิดขึ้น

ก. ไมโอโกลบิน

ข. ฮีโมโกลบิน

α subunits 2 หน่วย (MW = 15,500)

β subunits 2 หน่วย (MW = 16,000)

.....

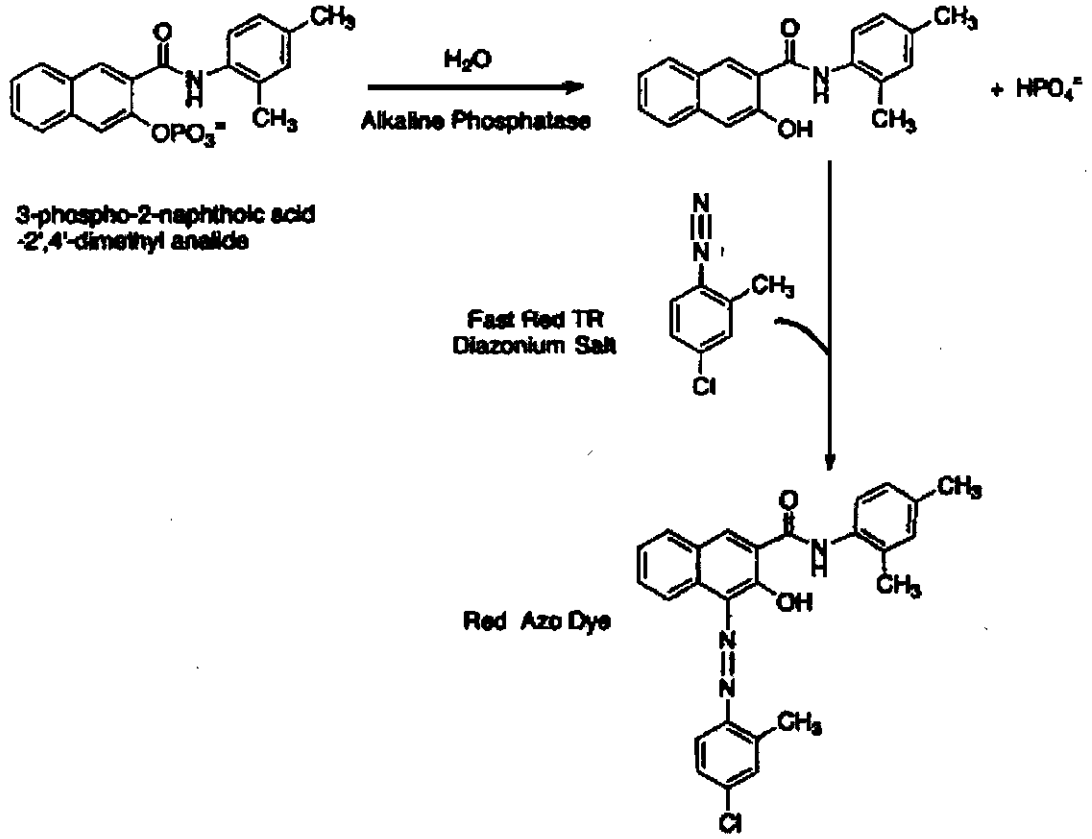
.....

.....

การทดลองที่ 9.3

การวิเคราะห์เอนไซม์ alkaline phosphatase โดยวิธี PAGE

การวิเคราะห์เอนไซม์ alkaline phosphatase โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในแบบที่โปรตีนไม่เสียสภาพธรรมชาติด้วยวิธี PAGE ภายหลังการแยกแล้ว ทำการวิเคราะห์ผลโดยย้อมเจลด้วยวิธี activity stain ดังปฏิกิริยา



อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสในแนวตั้ง

เครื่องกำเนิดไฟฟ้า

สารเคมี

1. **4x separating gel buffer**

   1.5 M Tris-HCl, pH 8.7

2. **4x stacking gel buffer**

   0.5 M Tris-HCl, pH 8.0

3. **electrophoresis buffer**

Tris base	4	กรัม
glycine	45.5	กรัม
น้ำกลั่น	5	ลิตร

4. **4x sample loading buffer**

4x stacking gel buffer	1.0	มิลลิลิตร
glycerol	2.0	มิลลิลิตร
1% bromophenol blue	50	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.0	มิลลิลิตร

5. **สารละลายโปรตีน**

alkaline phosphatase	1	มิลลิกรัม

ละลายน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

6. **สารละลายสำหรับย้อมเจลแบบ alkaline phosphatase activity staining**

สารผสมระหว่าง 4-chloro-2-methylbenzenediazonium salt และ 3-phospho-2-naphthoic acid-2′,4′-dimethyl anilide โดยใช้ Tris buffer เป็นตัวทำละลาย

วิธีการทดลอง

1. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.1 เตรียมสารละลายโปรตีนที่ผสมระหว่าง alkaline phosphatase กับโปรตีนชนิดอื่นๆ

1.2 เตรียมเจลเช่นเดียวกับการทำ SDS-PAGE แต่ใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่มี SDS

1.3 นำสารละลายผสมมาเติม 4x sample loading buffer ในอัตราส่วน 3 : 1

1.4 ใส่สารละลายโปรตีนลงในช่องเจล 2 ช่อง ให้มีระยะห่างกันพอสมควร

1.5 ภายหลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จแล้ว นำเจลออก และตัดเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ย้อมด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 ส่วนที่ 2 ย้อมด้วยวิธี alkaline phosphatase activity staining เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้

2. การย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R – 250

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 9.2

3. การย้อมเจลด้วยวิธี alkaline phosphatase activity staining

3.1 แช่เจลในสารละลายสำหรับย้อมเจลแบบ alkaline phosphatase activity staining จนกระทั่งปรากฏแถบสีแดงขึ้น จึงเทสารละลายออก (เก็บไว้ใช้ได้อีก)

3.2 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง สังเกตสีของแถบโปรตีน

คำถาม

1. ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส มีปัจจัยใดบ้างที่ทำให้สารชีวโมเลกุลเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แตกต่างกัน

.....

.....

.....

2. จงเขียนผลการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ โดยใช้เจลแผ่น (slab gel) เพื่อแยกโปรตีนเหล่านี้ออกจากกัน ไลโซไซม์ (MW = 14,300), อัลบูมินจากไข่ขาว (MW = 45,000), ไคโมทริปซิน (MW = 21,600) และอัลบูมินจากซีรัม (MW = 65,400)

.....

.....

.....

3. จงอธิบายประโยชน์ของสารต่อไปนี้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ PAGE

ก. อะคริลาไมด์

ข. บิสอะคริลาไมด์

ค. TEMED

ง. Coomassie blue

จ. Bromophenol blue

.....

.....

.....