فصل سیزدهم
الکتروفورز[1]

۱۳-۱. تئوری الکتروفورز:

الکتروفورز تحت عنوان مهاجرت یون‌ها تحت تاثیر میدان الکتریکی اعمال‌شده تعریف می‌شود. الکتروفورز از این جهت به ته‌نشین‌سازی شبیه است که در هر دو تکنیک، مولکول‌های حل‌شونده تحت تاثیر یک میدان خارجی حرکت می‌کنند ولی الکتروفورز اساسا به بار مولکول و نه به جرم مولکولی آن بستگی دارد. الکتروفورز تکنیک مناسبی برای جدا کردن پروتئین‌ها و ماکرومولکول‌های دیگر در یک مخلوط به شمار می‌رود.

در میدان الکتریکی E، نیروی وارده بر مولکول‌های حل‌شونده باردار برابر است با ezE که در آن e بار الکتریکی و z تعداد بارهای روی مولکول است. شبیه به ته‌نشین‌سازی، بلافاصله پس از اعمال میدان خارجی، یون‌های حل‌شونده برای مدت زمان کوتاهی شتاب می‌گیرند ولی پس از اینکه نیروی الکترواستاتیک به وسیله نیروی اصطکاک اعمال‌شده توسط حلال به توازن رسید، حالت پایا بوجود می‌آید و در این حالت یون‌ها با سرعت ثابت v در میدان الکتریکی به حرکت خود ادامه می‌دهند. در این حالت خواهیم داشت:

$$F = ezE = fv \qquad (۱-۱۳)$$

و اگر ذره حل‌شونده کروی باشد،

$$ezE = ۶\pi\eta rv \qquad (۲-۱۳)$$

پس خواهیم داشت:

$$v = \frac{ezE}{f} = \frac{ezE}{۶\pi\eta r} \qquad (۳-۱۳)$$

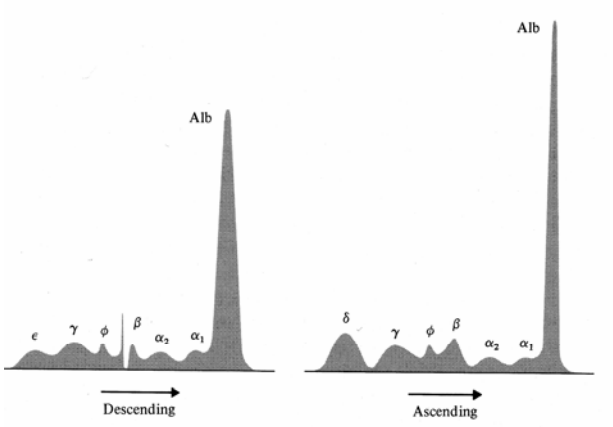
با تعریف تحرک الکتروفورزی[2] (u) به صورت سرعت در واحد میدان الکتریکی می‌توان نوشت:

---

[1] Electrophoresis
[2] Electrophoretic Mobility

$$u = \frac{v}{E} = \frac{ze}{f} = \frac{ze}{۶\pi\eta r} \qquad (۴-۱۳)$$

واحد تحرک الکتروفورزی، $m^{۲}.V^{-۱}.s^{-۱}$ است. با توجه به معادله فوق می توان دید که سهولت حرکت یک یون به طور مستقیم بستگی به بار آن دارد و به طور معکوس با اندازه یون و ویسکوزیته محیط متناسب است. توجه داشته باشید که این معادله بسیار ساده شده است زیرا فرض می‌کند که یون به صورت کروی است. همچنین این معادله تاثیر اتمسفر یونی را بر روی حرکت یون‌ها در نظر نگرفته است. با این وجود، این معادله به ما این امکان را می‌دهد که تحرک الکتروفورزی را تخمین زده و از الکتروفورز به عنوان ابزاری مناسب برای جدا کردن مخلوط ماکرومولکول‌ها به اجزا خالص استفاده کنیم. ارزش تکنیک الکتروفورز به خوبی در شکل (۱۳-۱) نشان داده شده است:



شکل (۱۳-۱): الگوی الکتروفورز پلاسمای طبیعی خون انسان در pH ۸/۸.

در شکل (۱۳-۱) مشاهده می‌نمایید که چگونه اجزاء مختلف پروتئین‌های پلاسمای انسانی به وسیله الکتروفورز در pH ۸/۸ از هم جدا شده‌اند. از آنجایی که پروتئین‌ها نقاط ایزوالکتریک متفاوتی دارند، به راحتی با استفاده از الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌شوند. در جدول (۱۳-۱) نقطه ایزو الکتریک چند پروتئین آمده است:

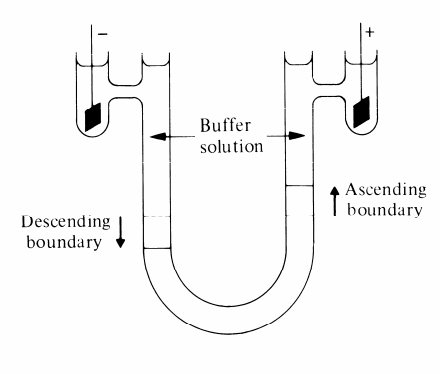
جدول (۱۳-۱): نقطه ایزوالکتریک چند پروتئین. مقدار دقیق نقطه ایزوالکتریک بستگی به دما و قدرت یونی محیط دارد.

پروتئین	p*I*
آلبومین سرم انسانی	۴/۹
بتا- لاکتالبومین	۵/۲
کربوکسی پپتیداز	۶/۰
هموگلوبین	۶/۷
هموگلوبین S	۶/۹
رایبونوکلئاز	۹/۵
سایتوکروم C	۱۰/۷
لایزوزیم	۱۰/۷

در ادامه به معرفی چند نوع عمده الکتروفورز خواهیم پرداخت:

۱۳-۲. *الکتروفورز مرز متحرک*[۳]:

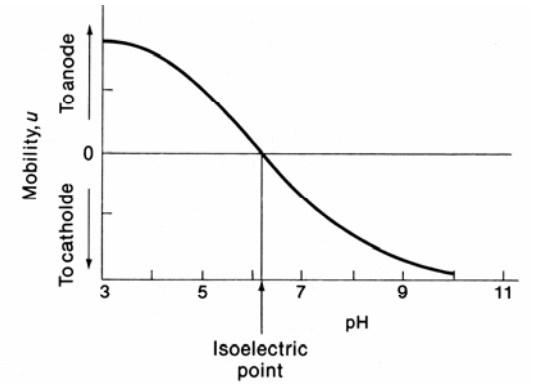
یکی از ساده‌ترین روش‌های اندازه‌گیری تحرک الکتروفورزی یون‌ها استفاده از روش مرز متحرک می‌باشد که در شکل (۱۳-۲) نشان داده شده است:



شکل (۱۳-۲): دستگاه الکتروفورز مرز متحرک.

[۳] Moving Boundary Electrophoresis

محلول مورد مطالعه در ته یک لوله U شکل ریخته می‌شود. سپس محلول بافر را با دقت بر روی محلول مورد مطالعه قرار می‌دهند تا مرزهای تیز[۴] به وجود آید. الکترودها در بازوهای جانبی فرو برده می‌شوند تا از افتادن محصولات حاصل از الکترولیز در نواحی مرزی جلوگیری گردد. سپس کل دستگاه در یک ترموستات قرار داده می‌شود. اگر مولکول‌های پروتئین دارای بارهای اضافی بر روی سطحشان باشند، مرزهای محلول بافر به سمت الکترود با علامت مخالف حرکت خواهند کرد زیرا جهت حرکت مولکول های پروتئین بستگی به pH محیط دارد. در مقادیر pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک، یک پروتئین دارای بار منفی است و مرزها به سمت آند حرکت خواهند کرد و در مقادیر pH پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک، بار خالص پروتئین مثبت است و مرزها به سمت الکترود کاتد حرکت خواهند کرد. در نقطه ایزوالکتریک بار خالص پروتئین صفر است و مرزها ثابت باقی خواهند ماند. تغییرات تحرک الکتروفورزی با pH در شکل (۱۳-۳) نشان داده شده است:



شکل (۱۳-۳): تعیین نقطه ایزوالکتریک یک پروتئین به وسیله رسم نمودار تغییرات الکتروفورزی پروتئین به عنوان تابعی از pH. در مقادیر pH پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک، پروتئین به سمت کاتد (قطب منفی) حرکت می‌کند و در مقادیر pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک، پروتئین به سمت آند (قطب مثبت) حرکت می‌کند.

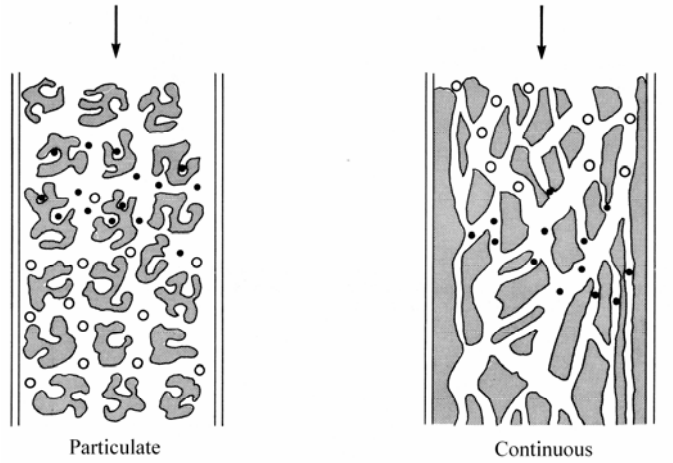
به منظور کاهش پدیده نفوذ و اختلالات دیگر، می‌توان از یک محیط ژله‌ای به عنوان محیط حامی[۵] برای جدا کردن پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها استفاده نمود. استفاده از محیط حامی موجب جدا

[۴] Sharp Boundaries
[۵] Supporting Medium

شدن بهتر بندهای الکتروفورز می‌شود زیرا در این صورت عمل جداسازی نه تنها بر اساس تفاوت بار الکتریکی بلکه بر پایه تفاوت در اندازه و شکل ماکرومولکول‌ها نیز خواهد بود.

۱۳-۳. ژل الکتروفورز:

در چنین سیستمی حرکت مولکول به وسیله تحرک الکتروفورتیکش در ژل و در برخی موارد به وسیله جذبش به ساختار ژل تعیین می‌شود ولی فاکتور اصلی توانایی مولکول در عبور از منافذ ژل است. تاثیر اندازه منافذ بر تحرک مولکول بستگی به پیوسته[۶] و یا ناپیوسته یا ذره‌ای[۷] بودن ژل دارد (شکل ۱۳-۴):

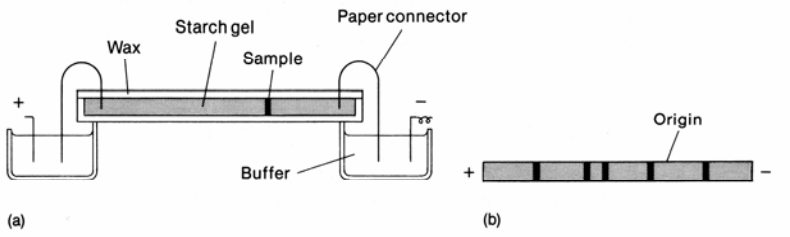


شکل (۱۳-۴): جداسازی مولکول‌های بزرگ (دایره‌های توخالی) از مولکول‌های کوچک (دایره‌های توپر) در سیستم‌های ژل پیوسته و ناپیوسته. در ژل ناپیوسته فرض بر این است که فضای بین ذرات ژل معمولا به اندازه کافی بزرگ می‌باشد که به تمام مولکول‌ها اجازه عبور دهد ولی مولکول‌های کوچکتر اغلب وارد منافذ ذرات شده و موقتا حبس می‌شوند. از اینرو، به طور میانگین این مولکول‌ها کندتر از مولکول‌های بزرگ در ژل حرکت می‌کنند. در ژل پیوسته، مولکول‌های کوچکتر مسیرهای عبور باریک زیادی را نسبت به مولکول‌های بزرگتر در اختیار دارند و در نتیجه مولکول‌های کوچکتر سریعتر در ژل حرکت می‌کنند.

---

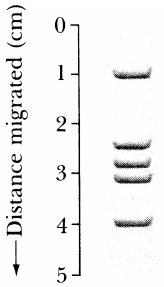
[۶] Continuous
[۷] Particulate

در ژل ناپیوسته اصل بر این است که همیشه مولکول‌های کوچکتر بهتر از مولکول‌های بزرگتر قادر به رخنه در منافذ ژل می‌باشند. در سیستمی که از ذرات ژل تشکیل شده است، مولکول‌ها، هم می‌توانند وارد ذرات ژل شده و هم از بین ذرات ژل عبور کنند. احتمال ورود به درون ذرات ژل برای مولکول‌های بزرگتر کمتر از مولکول‌های کوچکتر است. وقتی که یک مولکول وارد ذرات ژل می‌شود، نمی‌تواند به سمت جلو حرکت کند مگر اینکه دوباره از آن خارج شود. از اینرو، مولکول‌های کوچکتر نسبت به مولکول‌های بزرگتر در حرکت در درون ژل ناپیوسته با مقاومت ذرات ژل روبرو می‌شوند و جدا سازی در ژل‌های نشاسته و دکستران بر همین اساس صورت می‌گیرد. جدا کردن پروتئین‌ها با استفاده از این تکنیک در شکل (۱۳-۵) نشان داده شده است:



شکل (۱۳-۵): (a) الکتروفورز ژل نشاسته. ژل به وسیله قرار دادن دانه‌های نشاسته در یک بافر و متورم شدن ذرات آن تشکیل می‌شود. سپس برشی در ژل ایجاد شده و نمونه در محل برش قرار داده می‌شود. برای جلوگیری از خشک‌شدن، ژل بوسیله موم پوشانده می‌شود. (b) الکتروفورگرام پروتئین‌های جدا شده توسط ژل نشاسته. پس از آنکه الکتروفورز خاتمه یافت، برای مشاهده بندهای پروتئینی ژل رنگ‌آمیزی می‌گردد. توجه نمایید که پروتئین‌ها بسته به بار الکتریکی‌شان در دو جهت مخالف مهاجرت نموده‌اند.

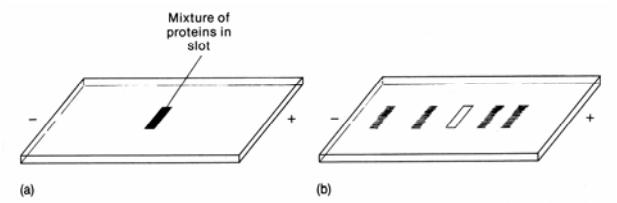
در یک ژل پیوسته (مثل آگارز) یک مولکول بایستی از درون یک شبکه پیوسته عبور کند. در چنین ژلی، مولکول‌های بزرگتر بیشتر از مولکول‌های کوچکتر با مقاومت ژل مواجه می‌شوند زیرا مولکول‌های بزرگتر بیشتر با ساختار ژل برخورد می‌کنند و همچنین در حین برخورد با ساختار ژل و عبور از آن مجبور به چرخش و جهت‌یابی فضایی مناسب برای عبور هستند. این روش به طور معمول برای جداسازی مولکول‌های DNA بر اساس جرم مولکولی‌شان بکار می‌رود (شکل ۱۳-۶):



شکل (۱۳-۶): جداشدن پنج مولکول DNA متفاوت بر اساس جرم مولکولی‌شان توسط الکتروفورز در ژل آگارز. مولکول‌ها به طور عمودی در ژل حرکت کرده‌اند. پس از پایان الکتروفورز، ژل در محلول حاوی رنگ فلوئورسانس اتیدیوم بروماید که به DNA متصل می‌شود، قرار داده شده است. سپس با تاباندن تابش ماوراء بنفش، بندهای جدا شده DNA مشاهده می‌شوند. بندهای سفید نشان‌دهنده فلوئورسانس و از اینرو نشان‌دهنده موقعیت مولکول‌های DNA می‌باشند. جرم مولکول‌های DNA جداشده از بالا به پایین کاهش می‌یابد.

شکل (۱۳-۷) نشان‌دهنده جداسازی پروتئین‌ها به وسیله الکتروفورز در یک ژل صفحه‌ای[۸] است. در یک ژل صفحه‌ای مسطح، یک شیار کوچک ایجاد شده و درون آن مخلوط پروتئین‌ها قرار داده می‌شود. تشکیل ژل در محلول الکترولیت رقیق و در pH معین صورت گرفته است. پس از اعمال ولتاژ، پروتئین‌ها در درون منافذ ژل حرکت کرده و بسته به بار الکتریکی‌شان، به سمت کاتد و یا آند مهاجرت می‌کنند در حالی که پروتئین‌های بدون بار در محل شیار ثابت باقی می‌مانند. پروتئین‌هایی که بیشترین مسافت را از محل شیار طی کرده‌اند الزاما دارای بیشترین بار الکتریکی نیستند بلکه دارای بیشترین تحرک می‌باشند. سرعت مهاجرت مولکول‌ها در محیط ژل الکتروفورز تابع بار الکتریکی و نیز اندازه و شکل مولکول‌های پروتئین است.

[۸] Slab Gel



شکل (۱۳-۷): الکتروفورز در یک ژل صفحه‌ای. در (a) مخلوط پروتئین‌ها در شکافی در درون ژل قرار داده شده‌اند و سپس میدان الکتریکی برقرار می‌شود. (b) با گذشت زمان چهار پروتئین موجود در مخلوط به موقعیت‌های متفاوتی در ژل مهاجرت می‌کنند.

۱۳-۴. ایزوالکتریک فوکوسینگ[۹]:

در تکنیک ایزوالکتریک فوکوسینگ در ابتدا یک شیب pH بین دو الکترود بوجود می‌آید به طوری که پروتئین‌های مختلف بندهای ثابتی را در امتداد شیب pH، در نقاطی که در آنها pH معادل با نقاط ایزو الکتریکشان است، تشکیل می‌دهند. طرز تهیه شیب pH به صورت زیر است:
ابتدا پلی‌آمفولیت‌های با جرم مولکولی پایین را (که محدوده وسیعی از نقاط ایزوالکتریک را می‌پوشانند) در آب حل می‌کنند. قبل از اعمال میدان الکتریکی، pH محلول در تمام محیط یکسان است (pH محلول، میانگین pH تمام پلی‌آمفولیت‌های موجود در محلول است). پس از اعمال میدان الکتریکی، پلی‌آمفولیت‌ها به سمت الکترودها مهاجرت می‌کنند. به واسطه ظرفیت بافری پلی‌آمفولیت‌ها، به تدریج یک شیب pH بین الکترودها بوجود می‌آید و نهایتا هر یک از انواع آمفولیت‌ها بسته به pH ایزو الکتریکشان در یک pH خاص مستقر خواهند شد. اگر مخلوطی از پروتئین‌ها به این محیط اضافه شود، هر نوع پروتئین به موقعیتی که pH آن برابر با pH ایزوالکتریکش است مهاجرت خواهد نمود و در نتیجه تعدادی بند تشکیل خواهد شد که می‌توان آنها را برای شناسایی جدا کرد. تکنیک ایزوالکتریک فوکوسینگ در اصول شبیه به تکنیک ته‌نشین‌سازی شیب کلرید سزیم است.

۱۳-۵. الکتروفورز در شرایط غیرطبیعی‌کنندگی[۱۰]:

بیوپلی‌مرهایی از قبیل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به ساختمان‌های فشرده‌ای تامی‌خورند که توسط تنوعی از میان‌کنش‌های غیرکووالان، یونی، پیوندهای هیدروژنی و غیره پایدار می‌شوند. وقتی که

[۹] Isoelectric Focusing
[۱۰] Denaturing Conditions

این بیوپلی‌مرها در ساختمان طبیعی فشرده خود الکتروفورز می‌شوند، عمدتا حرکت آنان بر اساس بار الکتریکی شان صورت می گیرد. الکتروفورز در شرایط غیرطبیعی کنندگی اشاره به الکتروفورز بیوپلی‌مرهایی دارد که به حالت غیرطبیعی‌شده درآمده و در میدان الکتریکی قرار داده شده‌اند. چنین آزمایش‌هایی به ویژه در مطالعه پروتئین‌ها بسیار ارزشمند است چون پروتئین‌ها تنوع بسیار بیشتری از نظر ساختمان سوم نسبت به اسیدهای نوکلئیک دارند. تحرک الکتروفورتیک یک مولکول غیرطبیعی شده نسبت به همان مولکول با ساختار طبیعی متفاوت است زیرا بار الکتریکی و شکل آن تغییر یافته و به عنوان یک مونومر فاقد ساختار در میدان الکتریکی حرکت می کند. در چنین شرایطی، بیوپلی‌مر فاقد هر گونه فعالیت بیولوژیک و ساختار چهارم است.

۱۳-۶. الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید-SDS[11] (SDS-PAGE):

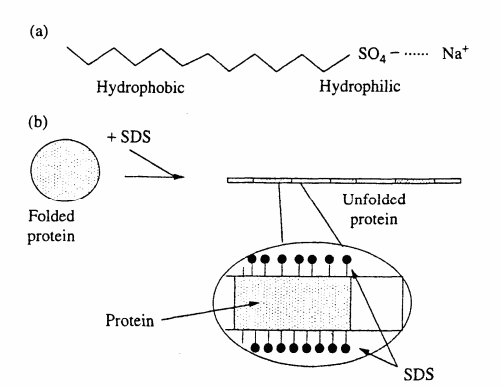
جرم مولکولی یک پروتئین را می توان به وسیله اندازه‌گیری تحرک الکتروفورزی آن در یک ژل پلی آکریل آمید به طور معتبری تخمین زد. ژل پلی آکریل آمید از وینیل پلی مریزاسیون مونومرهای آکریل‌آمید به زنجیرهای طویل پلی‌آکریل‌آمید و اتصال عرضی این زنجیرها توسط متیلن- بیس‌آکریل آمید[12] تشکیل می‌شود. غلظت آکریل‌آمید استفاده‌شده تعیین کننده طول میانگین زنجیر پلی‌مر است در حالی که غلظت متیلن- بیس آکریل‌آمید تعیین کننده وسعت تشکیل اتصال‌های عرضی است. از اینرو، هر دوی این غلظت‌ها در تعیین خواص فیزیکی ژل از قبیل چگالی، الاستیسیته[13]، قدرت مکانیکی و اندازه منافذ اهمیت دارند. یکی از مزایای ژل پلی‌آکریل‌آمید، سهولت تعیین اندازه منافذ آن است که با تغییر غلظت آکریل آمید و یا سهم عامل اتصال عرضی دهنده امکان پذیر است. در واکنش پلی مریزاسیون تشکیل ژل، پر سولفات آمونیوم نقش شروع کننده رادیکالی و تترا متیلن دای آمین[14] (TEMED) نقش کاتالیست را ایفاء می کند. برای شکستن پل‌های دی‌سولفیدی موجود در ساختمان پروتئین‌ها هم اغلب از ترکیب احیاءکننده بتا- مرکاپتواتانول ($HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH$) استفاده می‌شود.

پاک کننده آنیونی SDS از یک زنجیر ۱۲ کربنه و یک سر سولفاته باردار تشکیل شده است. SDS در غلظت‌های پایین به طور ویژه با میان کنش الکترواستاتیک به بارهای الکتریکی غیرهمنام سطحی

---

[11] SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
[12] N, N′-methylene-bis-acrylamide
[13] Elasticity
[14] Tetramethylenediamine

پروتئین‌ها متصل می‌شود ولی در غلظت‌های بالا (که در SDS-PAGE نیز چنین است) با استفاده از دنباله آب‌گریزش به بخش‌های آب‌گریز درونی پروتئین‌ها متصل شده و موجب گسسته‌شدن ساختمان فشرده آنان و بازشدگی‌شان می‌گردد (شکل ۱۳-۸):

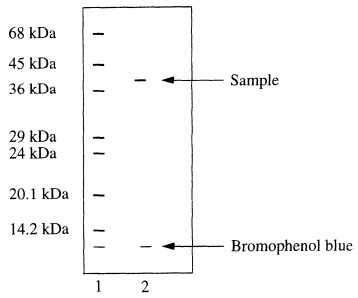


شکل(۱۳-۸) : میان‌کنش پروتئین‌ها با سدیم دودسیل سولفات. (a) سدیم دودسیل سولفات دارای یک سر آب‌دوست و یک دنباله آب‌گریز است. (b) پاک‌کننده آنیونی با اتصال به پروتئین‌های تاخورده موجب باز شدن آنها شده و کمپلکس حاصله دارای بار منفی خواهد بود. اتصال SDS موجب تفکیک پروتئین‌های اولیگومری به زیرواحدهای سازنده‌شان نیز می‌شود.

بخش سولفاته پاک‌کننده در تماس با آب است و در نتیجه کمپلکس پاک‌کننده-پروتئین به صورت محلول در آب باقی می‌ماند. این میان‌کنش موجب گسسته‌شدن ساختار فشرده یک پلی‌پپتید منفرد شده و اگر پروتئین دارای چندین زیرواحد باشد به زیرواحدهای سازنده‌اش تفکیک می‌شود. پروتئین‌های پوشیده شده توسط SDS تولید ساختاری موسوم به ساختمان یا ذرات شبه‌میله‌ای شکل[۱۵] می‌کنند که دارای بار منفی می‌باشند و وقتی در یک میدان الکتریکی قرار داده می‌شوند، صرف نظر از بار الکتریکی ذاتی پروتئین‌ها (قبل از ایجاد کمپلکس)، به سمت آند حرکت می‌کنند. SDS به طور استویکیومتریک به پروتئین‌ها متصل می‌شود (۱/۴ گرم SDS به گرم پروتئین) به نحوی که کمپلکس SDS و پروتئین‌های متفاوت دارای نسبت بار به جرم (e/m) یکسانی می‌باشد. وقتی که مخلوط کمپلکس‌های SDS و پروتئین‌های مختلف بر روی ژل قرار داده می‌شوند و میدان الکتریکی برقرار

[۱۵] Rod-Like Particles

می‌گردد، پروتئین‌ها بر اساس نسبت بار به جرمشان در درون ژل حرکت می‌کنند. از آنجایی که نسبت بار به جرم برای تمامی کمپلکس های SDS–پروتئین یکسان است (هرچه پروتئین جرم بیشتری داشته باشد، تعداد مولکول‌های SDS بیشتری به آن متصل شده و در نتیجه نسبت e/m یکسان خواهد بود)، سرعت مهاجرت کمپلکس‌های مختلف در درون ژل پلی‌آکریل‌آمید به طور معکوس با مقاومت ژل در برابر حرکت کمپلکس‌ها متناسب خواهد بود. در نتیجه، پروتئین‌های بزرگتر کندتر در ژل مهاجرت می‌کنند در حالی که پلی‌پپتیدهای کوچکتر سریع‌تر جابجا می‌شوند. به همین دلیل، یک رابطه خطی بین تحرک کمپلکس‌های SDS–پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید و جرم مولکولی پروتئین‌ها وجود دارد (شکل ۱۳-۹):

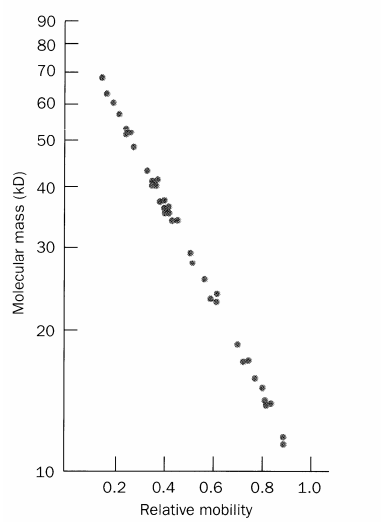


شکل (۱۳-۹): الکتروفورز یک پروتئین با جرم مولکولی نامعلوم در ژل پلی‌آکریل‌آمید–SDS. (۱) پروتئین‌های استاندارد با جرم‌های مولکولی معلوم در ژل ۱۵٪ SDS–PAGE: آلبومین سرم گاوی (۶۸ kDa)، اوآلبومین (۴۵ kDa)، گلیسرآلدئید–۳- فسفات دهیدروژناز (۳۶ kDa)، کربونیک انهیدراز (۲۹ kDa)، تریپسینوژن (۲۴ kDa)، مهارکننده تریپسین دانه سویا (۲۰/۱ kDa) و آلفا– لاکتآلبومین (۱۴/۲ kDa). (۲) نمونه پروتئین با جرم مولکولی نامعلوم همزمان با مخلوط پروتئین‌های استاندارد الکتروفورز می‌شود.

پس از الکتروفورز، ژل توسط کوماسی بلو[۱۶] رنگ‌آمیزی می‌شود و بندهای پروتئینی قابل مشاهده می‌گردند. از بروموفنل‌بلو[۱۷] به عنوان رنگ ردیاب[۱۸] استفاده می‌شود که جلوتر از همه بندهای پروتئینی حرکت می‌کند. فاصله پیموده‌شده توسط هر پروتئین در ژل اندازه‌گیری‌شده و جرم مولکولی نمونه

[۱۶] Coomassie Blue
[۱۷] Bromophenol Blue
[۱۸] Tracker Dye

پروتئین نامعلوم با استفاده از رسم نمودار $\log M$ نمونه‌های استاندارد در مقابل مسافت پیموده‌شده تعیین می‌شود (شکل ۱۳-۱۰). چنین الکتروفورزی را SDS-PAGE می‌نامند که به‌طور گسترده برای تعیین جرم مولکولی و تایید خلوص پلی‌پپتیدها بکار می‌رود.



شکل (۱۳-۱۰): نمودار لگاریتمی جرم‌های مولکولی ۳۷ زنجیره پلی‌پپتیدی مختلف در محدوده ۱۱ تا ۷۰ کیلو دالتون در مقابل تحرک الکتروفورزی نسبی آنان در یک ژل پلی‌آکریل‌آمید-SDS.

همان طور که گفته شد، یک امتیاز مهم این تکنیک آن است که SDSپروتئین‌های الیگومری را به زنجیرهای پلی‌پپتیدی سازنده آنها تفکیک می‌کند. از اینرو، با تعیین جرم مولکولی غالبا می‌توان تعداد زیرواحدهای موجود در ساختمان یک پروتئین الیگومری را تعیین نمود. برای مثال، جرم مولکولی گلسیرآلدیید ۳-فسفات‌دهیدروژناز به وسیله تکنیک اولتراسانتریفوگاسیون ۱۴۰۰۰۰ تعیین شده است در حالی که جرم مولکولی بدست آمده از الکتروفورز ژل –SDS، ۳۶۵۰۰ می‌باشد. از مقایسه ایـن دو جرم مولکولی می توان نتیجه گرفت که این آنزیم دارای چهار زیر واحد می باشد. جدول (۱۳-۲) تکنیک‌های متنوعی که برای تعیین جرم مولی مورد استفاده قرار می‌گیرند را نشان می‌دهد.

جدول (۱۳-۲): تکنیک‌های متفاوتی که برای تعیین جرم مولی (میانگین عددی و وزنی جرم مولی) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

روش	محدوده تقریبی جرم مولی	نوع جرم مولی تعیین شده
کاهش نقطه ذوب	≤۵۰۰۰	$\overline{M}_n$
فشار اسمزی	≤ ۱۰۰۰۰۰	$\overline{M}_n$
ویسکوزیته	نامحدود	$\overline{M}_w$
اولتراسانتریفوگاسیون	≥ ۵۰۰۰	$\overline{M}_w$
پراش تابش ایکس	نامحدود	$\overline{M}_n$
ژل الکتروفورز	≥ ۵۰۰۰	$\overline{M}_w$
میکروسکوپ الکترونی	≥ ۱۰۰۰۰۰	$\overline{M}_n$
تفرق نور	≥ ۵۰۰۰	$\overline{M}_w$