

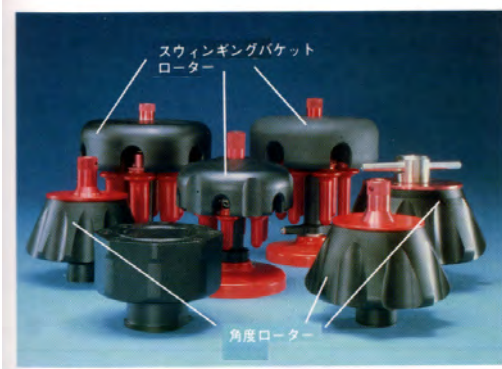
## 超遠心機



型式: CP100MX  
 最高回転速度(rpm): 100,000  
 最大遠心加速度(xg): 803,000  
 回転制御精度(rpm): ±10  
 加速時間: 0~100,000rpm: 5分  
 温度制御精度: 表示: ±0.5℃  
 真空方式:  
 油回転真空ポンプ+油拡散真空ポンプ  
 到達圧力: 0.13Pa以下  
 駆動部保証: 完全10年間  
 冷却方式:  
 フロンレス、サーモモジュール冷却システム  
 表示:  
 大きさ(mm): (W)790×(D)690×(H)1,000  
 質量(Kg): 400  
 標準価格(円):

定価 800万円

## 超遠心ローター



50万円  
 100万円  
 300万円  
 500万円  
 800万円  
 1100万円  
 1500万円  
 1800万円

### 遠心分離 I

#### 遠心力

角速度 (rad·s<sup>-1</sup>) =  $\omega = d\theta/dt$   
 加速度 =  $a = r\omega^2$  半径 =  $r$   
 加速度  $g = 9.8 \text{ m/s}^2$   
 $r = 10 \text{ cm}$      $6,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 100)^2 = 39,438 \text{ m/s}^2 = 4,024 \text{ g}$   
 $30,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 500)^2 = 985,960 \text{ m/s}^2 = 100,608 \text{ g}$

沈降力  $F_s$  は 遠心力から 浮力を引いたもの  
 $F_s = m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r$      $V_p = \text{体積}$   
 $\rho = \text{溶液の密度}$   
 $m = \text{質量}$

摩擦力  $F_f = v f$      $v = \text{粒子の沈降速度}$   
 $f = \text{摩擦係数}$

粒子の沈降速度は沈降力と摩擦力が釣り合うまで加速する  
 $m = M(\text{分子量}) / N(\text{アボガド数})$

従って  $m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r = v f$

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

1gの粒子を無限大溶液媒に溶かしたときの溶液増加

20℃のDWIに蛋白質を溶かしたとき⇒約0.73cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>

### 遠心分離 I

#### 遠心力

角速度 (rad·s<sup>-1</sup>) =  $\omega = d\theta/dt$   
 加速度 =  $a = r\omega^2$  半径 =  $r$   
 加速度  $g = 9.8 \text{ m/s}^2$   
 $r = 10 \text{ cm}$      $6,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 100)^2 = 39,438 \text{ m/s}^2 = 4,024 \text{ g}$   
 $30,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 500)^2 = 985,960 \text{ m/s}^2 = 100,608 \text{ g}$

沈降力  $F_s$  は 遠心力から 浮力を引いたもの  
 $F_s = m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r$      $V_p = \text{体積}$   
 $\rho = \text{溶液の密度}$   
 $m = \text{質量}$

摩擦力  $F_f = v f$      $v = \text{粒子の沈降速度}$   
 $f = \text{摩擦係数}$

粒子の沈降速度は沈降力と摩擦力が釣り合うまで加速する  
 $m = M(\text{分子量}) / N(\text{アボガド数})$

従って  $m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r = v f$

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

$\bar{V} = \text{偏比容} \div \text{密度の逆数}$

1gの粒子を無限大溶液媒に溶かしたときの溶液増加

20℃のDWIに蛋白質を溶かしたとき⇒約0.73cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>

### 遠心分離 II

$V_p = \bar{V} m$ ;  $\bar{V} = \text{偏比容} \div \text{密度の逆数}$

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N} \rightarrow v f = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{N}$$

沈降係数  $s$  を定義する  $10^{-13} \text{ s} = 1 \text{ S}(\text{ストベリ})$  として表す

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{1}{\omega^2} \left( \frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{N f}$$

加速度に対する粒子の沈降速度

半径  $r$  の粒子の  $f$  (摩擦係数) はストークスの式で計算される

$$f = 6\pi\eta r_p \quad \eta = \text{粘度}$$

$f$  と  $f_0$  (最小摩擦係数: 水と和していない球体) を求めることで分子形が推定出来る

Physical Constants of Some Proteins.

Protein	Molecular Mass (kD)	Partial Specific Volume, $V_{sp}$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Sedimentation Coefficient, $s_{20, w}$ (S)	Fractional Ratio, $f/f_0$
Lipase (milk)	6.7	0.714	1.14	1.190
Ribonuclease A (bovine pancreas)	12.6	0.707	2.00	1.066
Cytochrome c (bovine heart)	13.4	0.728	1.71	1.190
Myoglobin (horse heart)	16.9	0.741	2.04	1.105
$\alpha$ -Chymotrypsin (bovine pancreas)	23.6	0.736	2.40	1.130
Crotinin (antileech)	29.9	0.704	3.14	1.221
Concanavalin B (jack bean)	42.5	0.730	3.50	1.247
Diphtheria toxin	70.4	0.736	4.60	1.296
Cytochrome oxidase ( <i>P. aeruginosa</i> )	89.8	0.730	5.30	1.240
Lactate dehydrogenase H (chicken)	150	0.740	7.31	1.330
Catalase (horse liver)	222	0.715	11.20	1.346
Erythrogen (human)	340	0.725	17.5	2.336
Hemocyanin (squid)	612	0.724	19.50	1.358
Glutamate dehydrogenase (bovine liver)	1015	0.750	26.60	1.250
Tarney yellow mosaic virus protein	3013	0.740	48.80	1.470

Source: Smith, M.H., in Sobot, H.A. (Ed.), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (2nd ed.), p. C-10, CRC Press (1970).

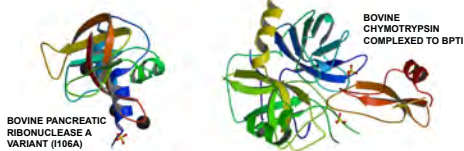
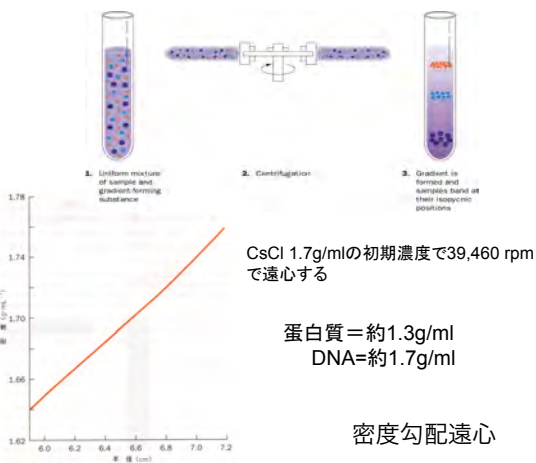
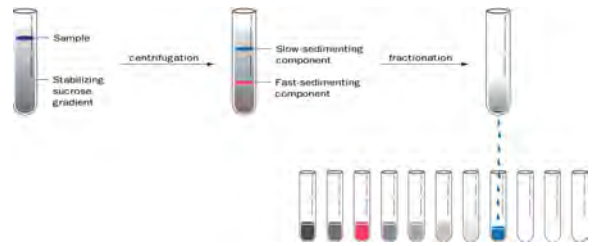
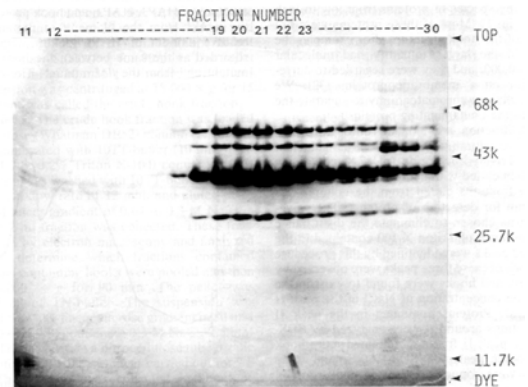


Figure 6-30 Zonal ultracentrifugation.

- (1) ゾーン超遠心分離法 (シヨ糖密度勾配)
- (2) 平衡密度勾配超遠心分離 (CsCl密度勾配)



SDS-PAGE of fractions of a sucrose density gradient in the *flaL* mutant hooks



Preparation of the antibody against each HAP

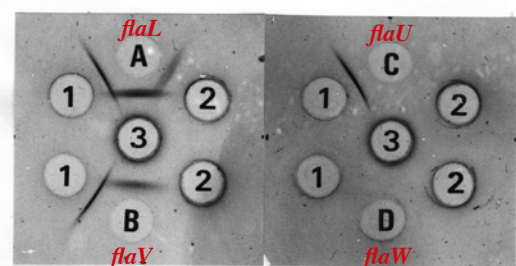
a 100-liter culture of the *flaL* mutant

Bacterial pellet (late log phase)

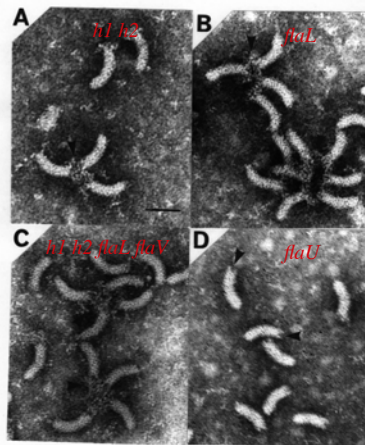
- suspended in 50TN homogenizer
- 10,000 x g for 20 min
- Sup: 78,000 x g for 90 min
- Ppt: suspended in 50TNET, 0°C for 30 min, 15,000 x g for 15 min
- Sup: 78,000 x g for 90 min
- Ppt: suspended in 10T, 15,000 x g for 15 min
- Sup (crude hook): DEAE-cellulose, 0.04 to 0.3 M NaCl
- Hook fraction

バンドを切り出し、ホモジェネート後、アジュバントと混合して、ウサギの皮内・皮下に注射する

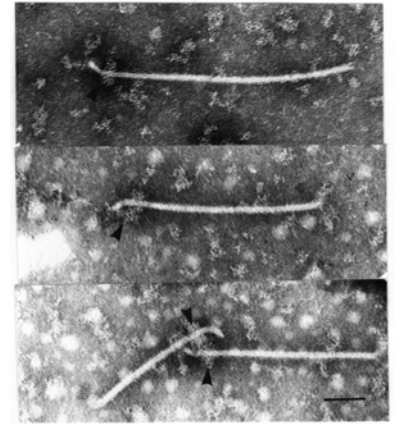
Reaction specificity of antibody against each HAP.



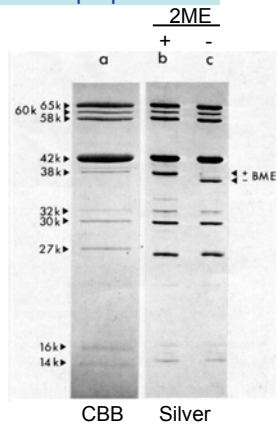
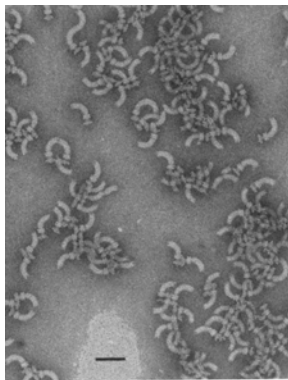
AntiHAP3 antibody binding profiles in hook structures.



Electron micrographs of hook-filament complexes treated with antiHAP1 antibody and the second antibody.



### EM and SDS gels of HBB preparations



### 電気泳動の原理

$$F_C(\text{静電力}) = qE \quad E = \text{電場の強さ(電位)}$$

$$q = \text{電荷}$$

$$F_f(\text{摩擦力}) = vf \quad v = \text{イオンの速度}$$

$$f = \text{摩擦係数}$$

一定の電場では2つの力が釣り合うことになる。

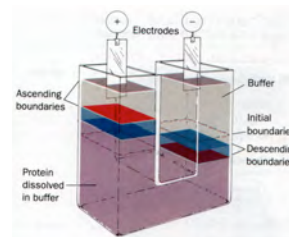
$$qE = vf \quad \mu(\text{移動度}) = -\frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

$v/E$  は電場の強さに対するイオンの速度を表す。理論的な状態での話、蛋白質溶液の現実とは離れている。

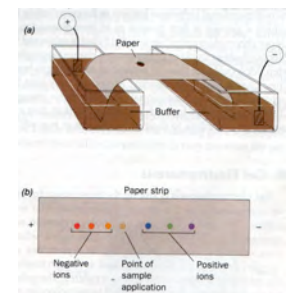
### 電気泳動の実際 I

- ♥**界面移動法**: 管に蛋白質溶液を含む緩衝液を入れ、直流電圧をかけて分離する。
  - ⇨キャピラリー電気泳動法として発展
- ♠**ゾーン電気泳動法**: 濾紙, ゲルなどの支持体中で試料を移動する。
  - 1) 濾紙電気泳動法
  - 2) ゲル電気泳動法: ポリアクリルアミド・アガロース電気泳動
  - 3) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動
  - 4) 等電点電気泳動法

### 電気泳動の実際 II



界面移動法



濾紙電気泳動法