

超遠心機

型式: CP100MX
 最高回転速度 (rpm): 100,000
 最大遠心加速度 (×g): 803,000
 回転制御精度 (rpm): ±10
 加減速時間: 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

スウィングングバケットローター
 角度ローター

70万円
 210万円
 350万円
 700万円
 1000万円
 1800万円

遠心分離 I

遠心力

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

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

摩擦係数 $F_f = v f$ $v =$ 粒子の沈降速度
 $f =$ 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
 $m = M(\text{分子量}) / N(\text{アボガドロ数})$
 $V =$ 偏比容と密度の逆数
 従って $m\omega^2 r - V_p \rho \omega^2 r = v f$
 $V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$ 1gの粒子を無限大溶解媒に溶かしたときの溶液増加
 20°CのDWIに蛋白質を溶かしたとき \Rightarrow 約0.73cm³g⁻¹

遠心分離 II

$V_p = \bar{V} m$; $\bar{V} =$ 偏比容 = 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 $10^{-13} \text{ s} = 1 \text{ S}(\text{スドベリ})$ として表す

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

↑
 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) はストークの式で計算される
 $f = 6\pi\eta r_p$ $\eta =$ 粘度

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

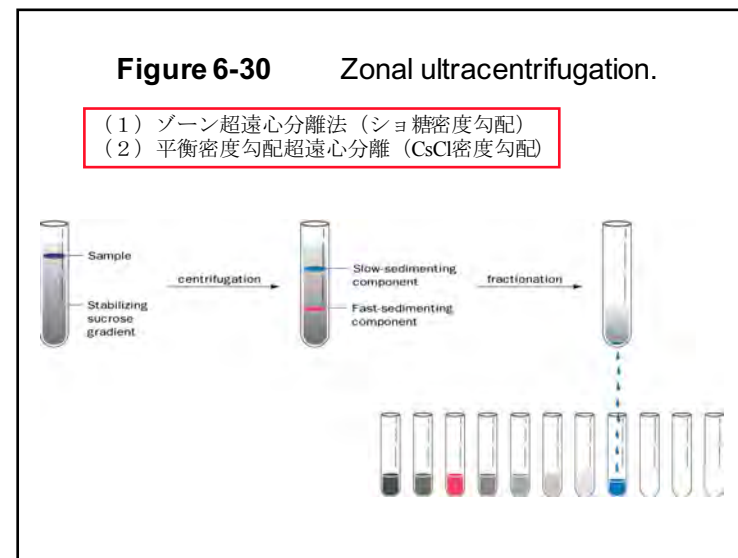
Physical Constants of Some Proteins.

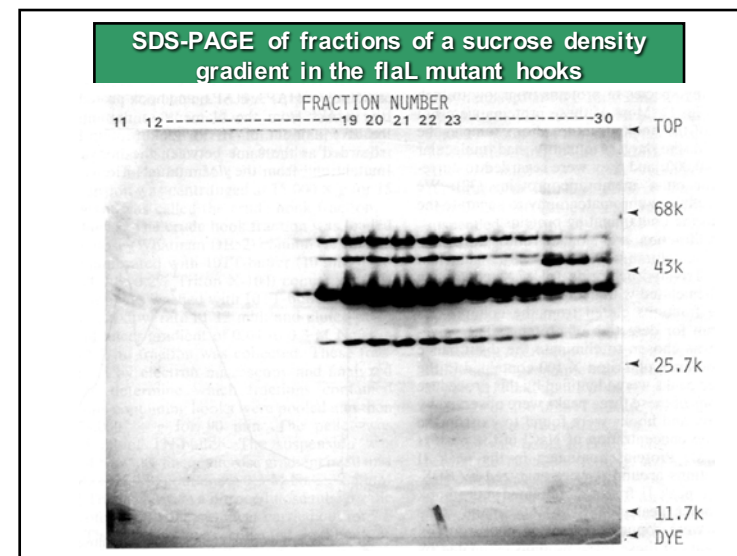
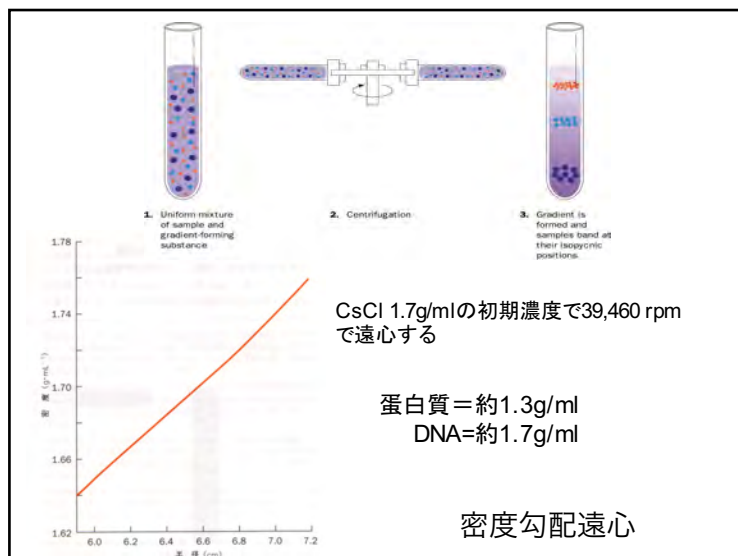
Protein	Molecular Mass (kD)	Partial Specific Volume, $V_{20,0}$ (cm ³ · g ⁻¹)	Sedimentation Coefficient, $s_{20,0}$ (S)	Frictional Ratio, f/f_0
Lipase (milk)	6.7	0.714	1.14	1.190
Ribonuclease A (bovine pancreas)	12.6	0.707	2.00	1.066
Cytochrome c (bovine heart)	13.4	0.728	1.71	1.190
Myoglobin (horse heart)	16.9	0.741	2.04	1.105
α -Chymotrypsin (bovine pancreas)	21.6	0.736	2.40	1.130
Crototoxin (rattlesnake)	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	5.80	1.240
Lactate dehydrogenase H (chicken)	150	0.740	7.31	1.330
Catalase (horse liver)	222	0.715	11.20	1.246
Phenomenon (human)	340	0.725	7.63	2.330
Hemocyanin (squid)	612	0.724	19.50	1.358
Glutamate dehydrogenase (bovine liver)	101.5	0.750	26.60	1.250
Turnip yellow mosaic virus protein	301.3	0.740	48.80	1.470

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

BOVINE PANCREATIC RIBONUCLEASE A VARIANT (106A)

BOVINE CHYMOTRYPSIN COMPLEXED TO BPT1





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。

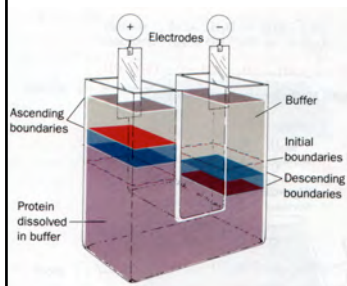
1) 濾紙電気泳動法

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

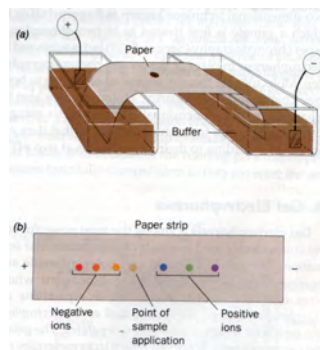
3) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

4) 等電点電気泳動法

電気泳動の実際 II

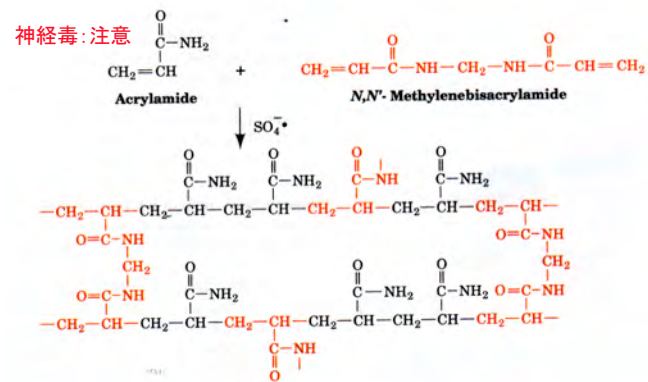


界面移動法



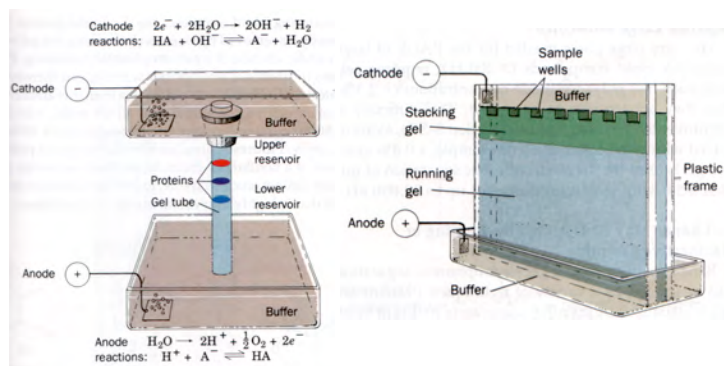
濾紙電気泳動法

電気泳動の実際 III

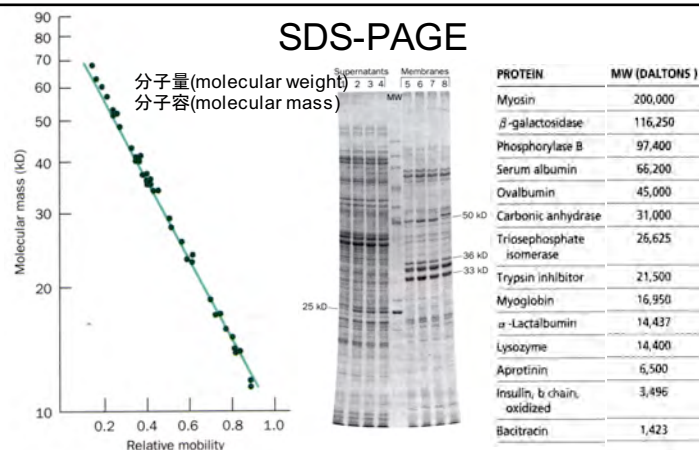


Ammonium persulfate ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightleftharpoons 2\text{SO}_4^{\cdot-}$) + N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
 によって遊離ラジカルで重合反応開始

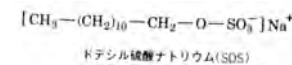
電気泳動の実際 IV



SDS-PAGE



ドデシル硫酸ナトリウム・2MEを加えることで蛋白質を変性させ、分子量に従って分離出来る



等電点電気泳動: 小分子量(300~600D)のオリゴマーで等電点の連続的に異なるものを作り(キャリアーアンフォライト)、電圧をかける。尿素を加えることが多い。

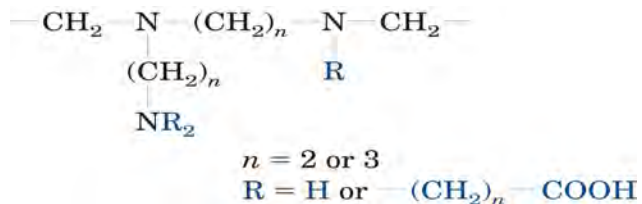
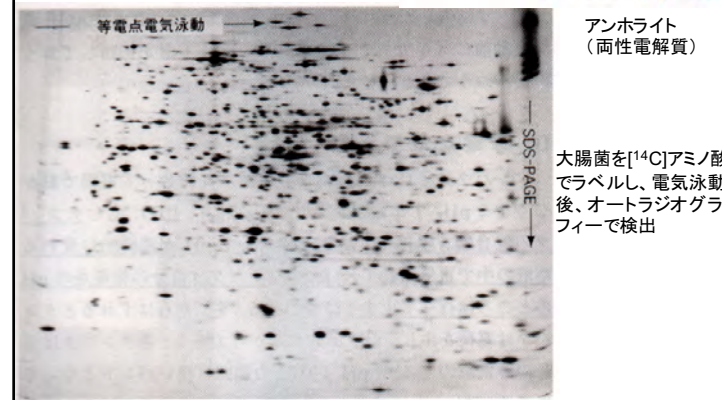
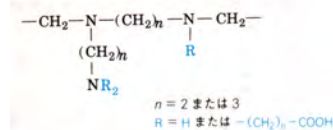


Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.

2次元電気泳動

(O'Farrellの電気泳動)



Protocol for the isolation of hook

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

Crude hook fraction from a flaL mutant and the DEAE chromatography separation of the fraction

