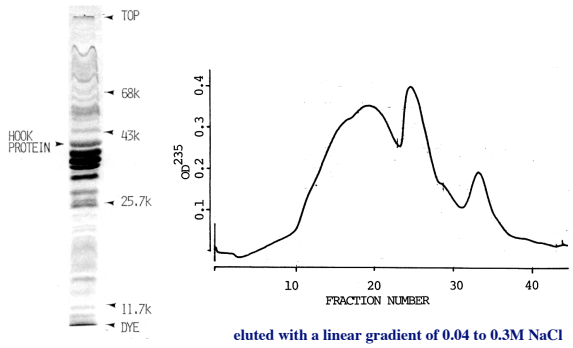


サルモネラ菌べん毛のフック付随蛋白質に関する研究

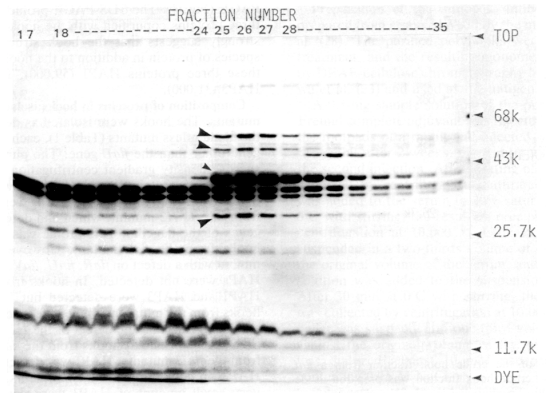
Protocol for the isolation of hook

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



SDS-PAGE of the DEAE fractions from the *flaL* mutant hook



ペーパークロマトグラフィー1

探究 D 同化色素の分離 ペーパークロマトグラフィーを使って同化色素を分離する。

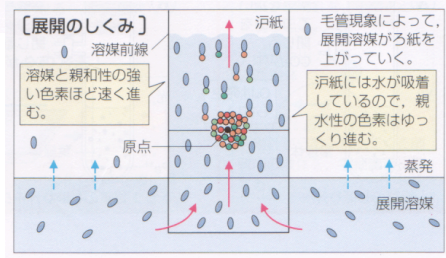
1. ホウレンソウ、ヨモギなどの柔らかい葉を小さく切った紙に入れ、研ぎ出し液を加えて押しつぶし、色素を抽出する。
 2. 抽出液を濾過し濃縮する。毛細管で抽出液を濾紙の原点(原点より下)に滴下する。
 3. 大形試験管にトルエンなどの展開溶媒を入れ、濾紙の下端(原点より下)が溶媒に浸るようにつくす。
 4. ゴム栓で密閉して展開させる。
 5. 展開溶媒が十分上昇したら濾紙をとり出し、溶媒の先端(溶媒前線)に鉛筆で印をつけて乾かす。原点から溶媒前線までの距離(a)と各色素の中心までの距離(b)を測る。

R_f値と色素の判別

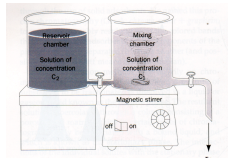
$$R_f \text{ 値} = \frac{\text{原点から各色素の中心までの距離}}{\text{原点から溶媒前線までの距離}} = \frac{b}{a}$$

色素が濾紙に吸着される強さと、展開溶媒がその色素を溶かし出そうとする強さの差によってR_f値が決まる。
 濾紙・展開溶媒・温度など条件が同一であれば、色素のR_f値は一定の値となる。

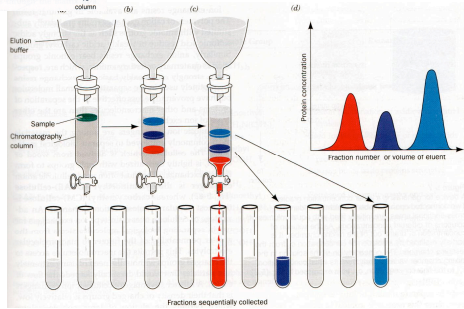
R _f 値の例		展開溶媒: トルエン
色素(色)	R _f 値	
β-カロテン (橙黄)	0.9~1.0	キサントフィル
ルテイン (黄)	0.7~0.8	
シオキサンチン (黄)	0.5~0.6	
クロロフィル a (青緑)	0.2	
クロロフィル b (黄緑)	0.1	



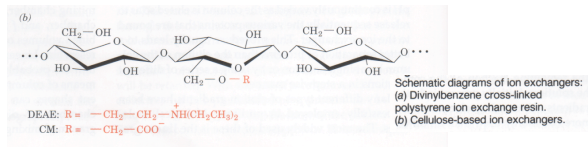
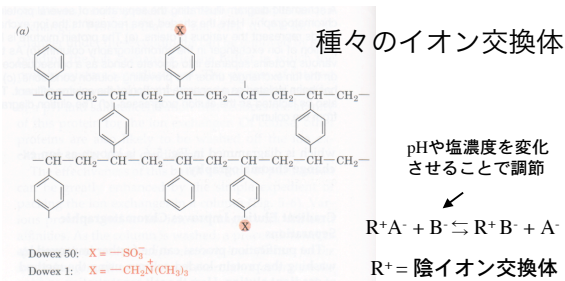
ペーパークロマトグラフィー2



液体クロマトグラフィー



液体クロマトグラフィー AKTAシステム

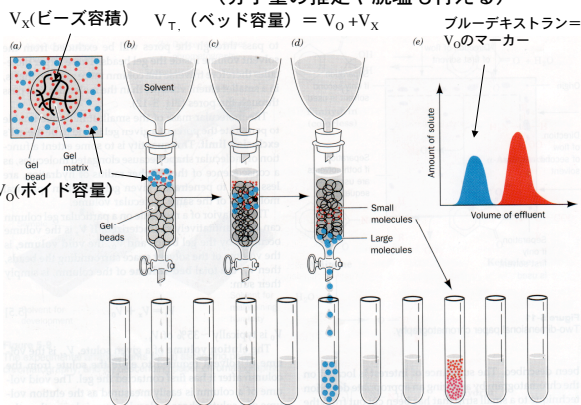


Name ^a	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO ₃ H ₂	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid —COOH	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sephadex	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate —CH ₂ SO ₃ H	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins
CM Bio-Gel A	Weakly acidic cross-linked agarose gel	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins

^aSephadex and Sepharose gels are manufactured by Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey; Bio-Rex resins and Bio-Gels are manufactured by BioRad Laboratories, Hercules, California.

Table 6-2 Some Biochemically Useful Ion Exchangers.

ゲル濾過クロマトグラフィー (分子量の推定や脱塩も行える)

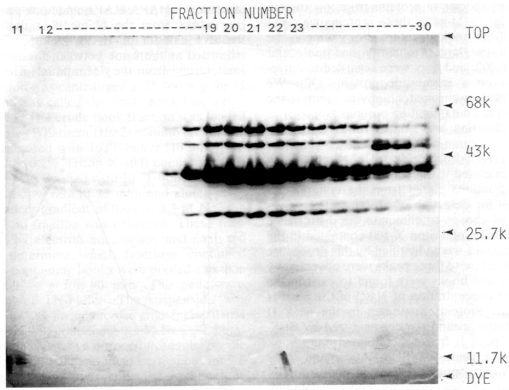


よく使われるゲル濾過剤

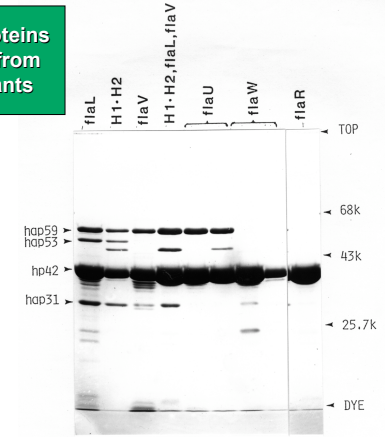
ゲル濾過剤†	型	濾過範囲 (kD)
Sephadex G-10	デキストラン	0.05~0.7
Sephadex G-25	デキストラン	1~5
Sephadex G-50	デキストラン	1~30
Sephadex G-100	デキストラン	4~150
Sephadex G-200	デキストラン	5~600
Bio-Gel P-2	ポリアクリルアミド	0.1~1.8
Bio-Gel P-6	ポリアクリルアミド	1~6
Bio-Gel P-10	ポリアクリルアミド	1.5~20
Bio-Gel P-30	ポリアクリルアミド	2.4~40
Bio-Gel P-100	ポリアクリルアミド	5~100
Bio-Gel P-300	ポリアクリルアミド	60~400
Sephadex 6B	アガロース	10~4,000
Sephadex 4B	アガロース	60~20,000
Sephadex 2B	アガロース	70~40,000

† Sephadex, Sepharose は Pharmacia Fine Chemicals AB の商品名; Bio-Gel は BioRad Laboratories の商品名.

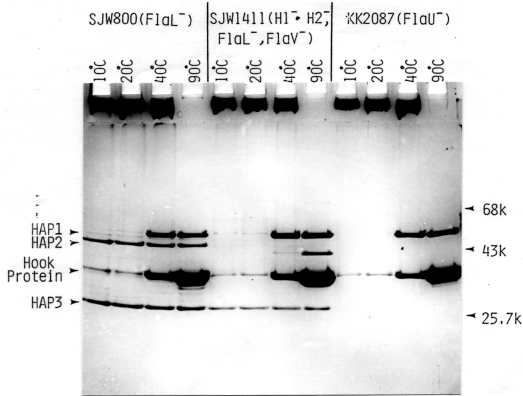
SDS-PAGE of fractions of a sucrose density gradient in the *flaL* mutant hooks



Composition of proteins in hooks isolated from filamentless mutants



Disassembly of HAPs by heat treatment of hooks

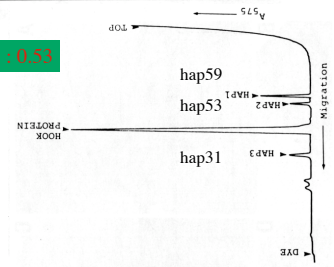


Strain	Relative amount			
	HAP1	HOK PROTEIN	HAP3	HAP2
SJW900 (<i>h1 h2</i>)	1	ND ^a	0.56	0.43
SJW800 (<i>flaL</i>)	1	7.0	0.58	0.49
SJW2149 (<i>flaV</i>)	1	7.1	0.21	
SJW1411 (<i>flaL V</i>)	1	ND	0.23	
MH101 (<i>flaU</i>)	1	7.1		

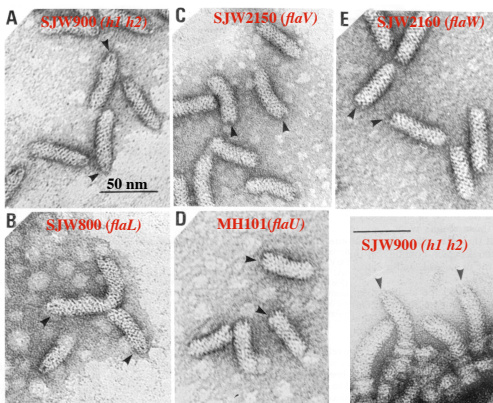
^a ND, Not determined.

The molar ratio = 1 : 10 : 1.1 : 0.53

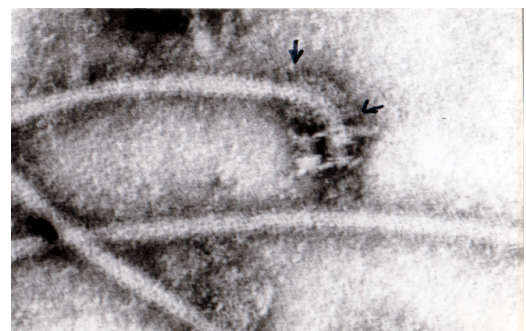
Relative amounts of hook protein and HAPs in the hooks from filamentless mutants



Electron micrographs of hooks from the filamentless



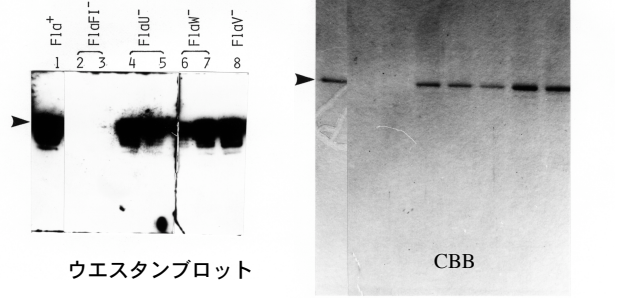
Electron micrographs of intact flagella treated with antihook antibody



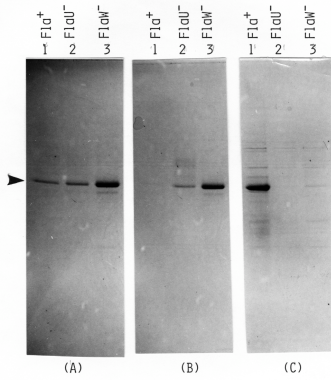
Excretion of unassembled flagellin lby mutant deficient in hook-associated proteins

Excretion of unassembled flagellin lby mutant deficient in hook-associated proteins

Detection of flagellin in culture medium of filamentless mutants by SDS-PAGE.



Detection of unassembled flagellin.



Estimation of the amount of flagellin in culture medium.

