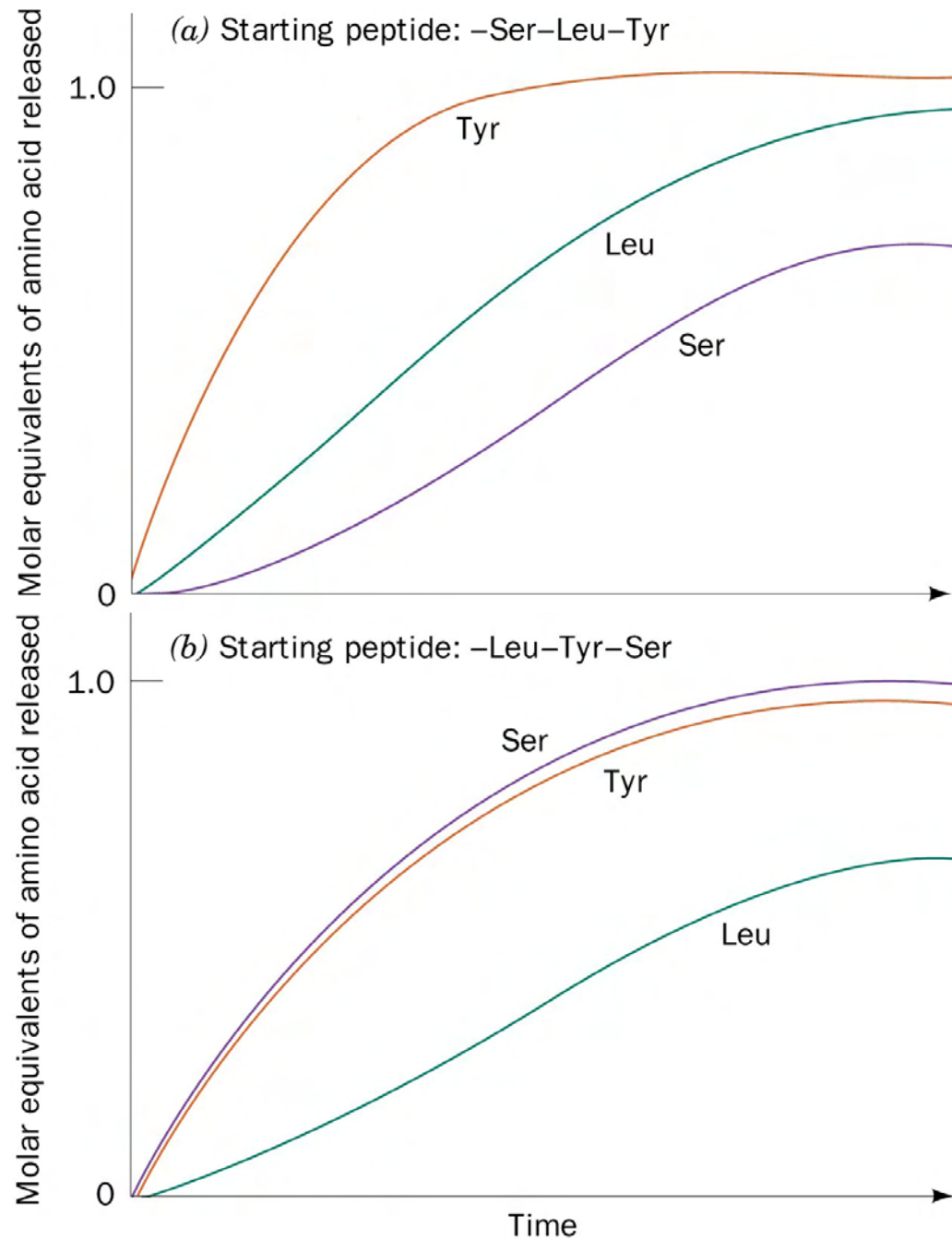


タンパク質のアミノ酸配列決定

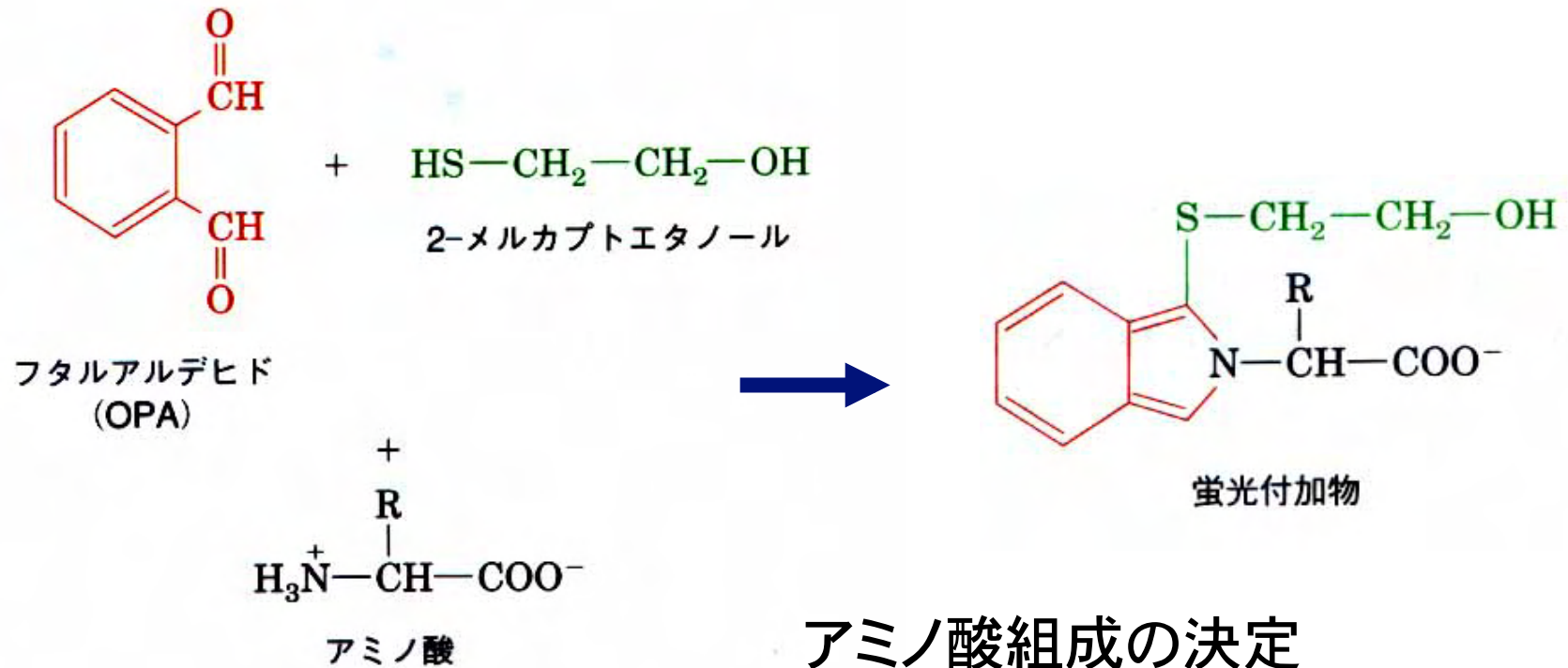
Figure 7-4 The Edman degradation.



The hypothetical rate of the carboxypeptidase-catalyzed release of amino acids.

(a) All bonds cleaved at the same rate. (b) Ser slow, Tyr fast, and Leu intermediate.

蛍光付加物の作成



アミノ酸組成の決定

加水分解後、蛍光付加物にして分析

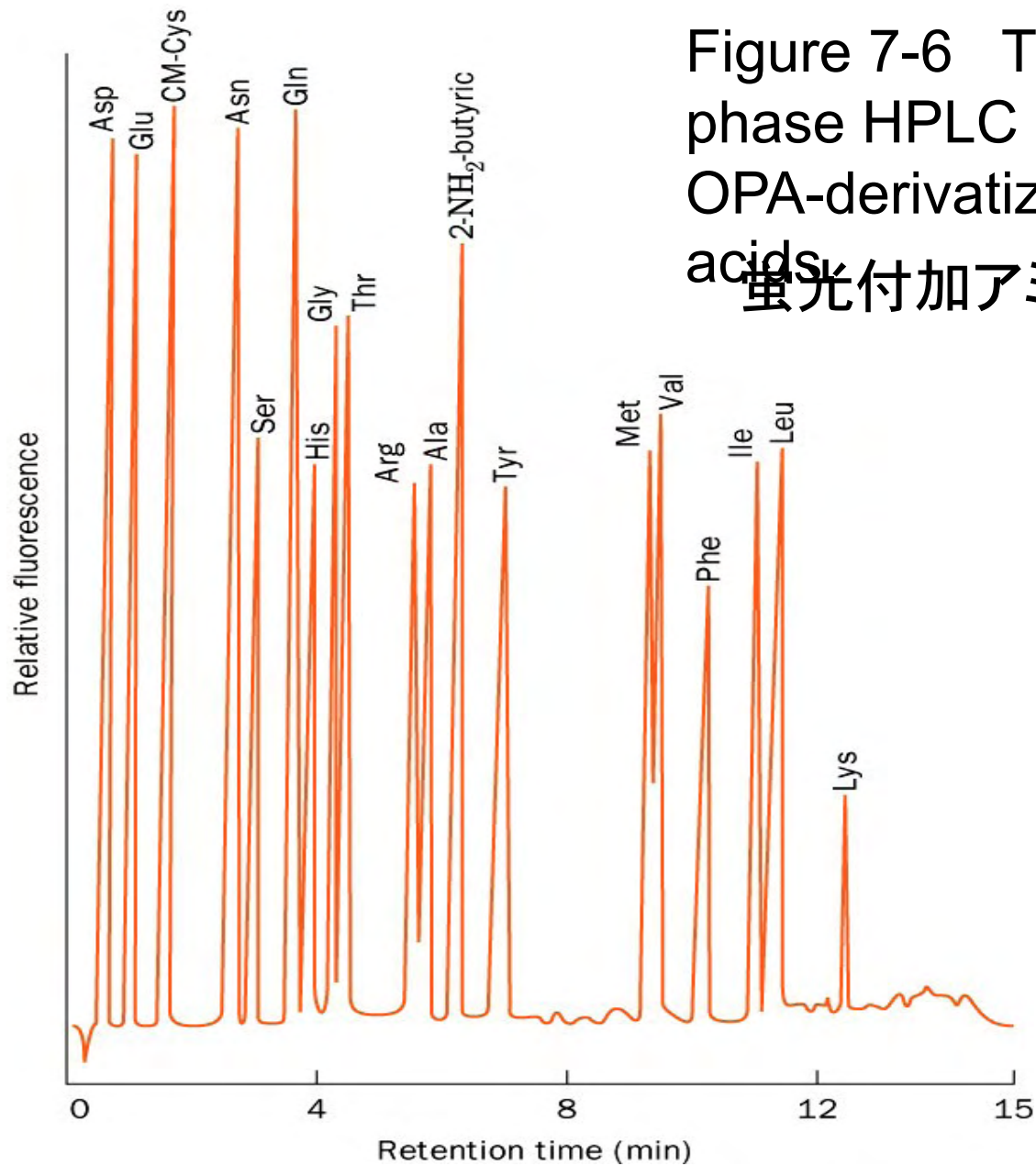


Figure 7-6 The reverse-phase HPLC separation of OPA-derivatized amino acids.
蛍光付加アミノ酸の分析

Figure 7-6

Figure 7-7 The amino acid sequence of a polypeptide chain.

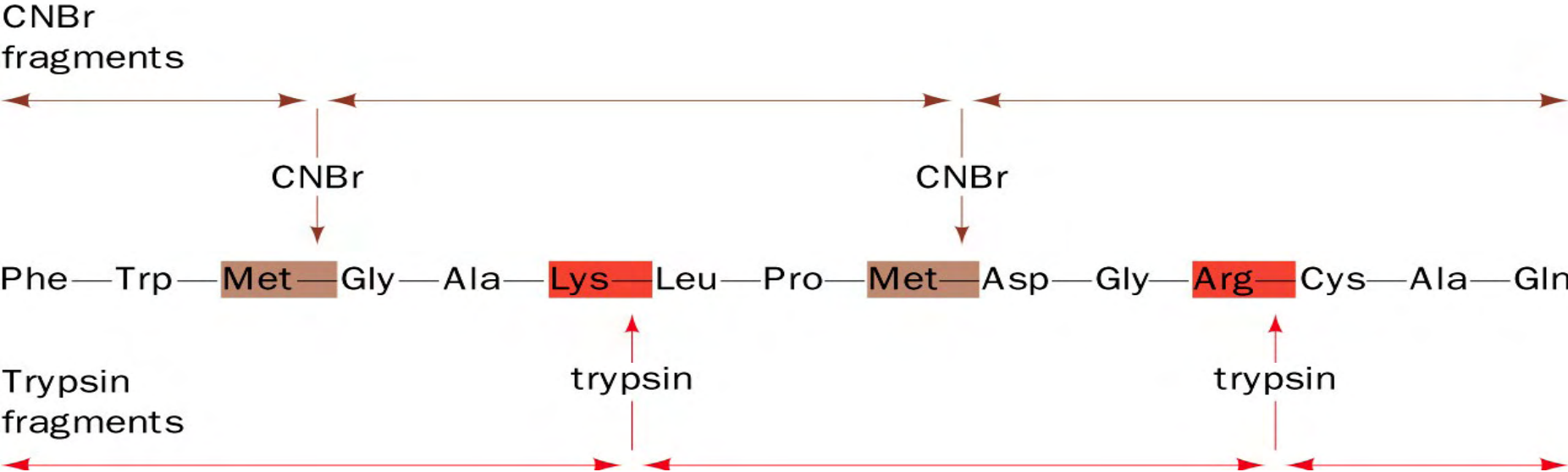


Figure 7-8a The generation of the gas phase ions required for the mass spectrometric analysis of proteins. (a) By electrospray ionization (ESI).

LysやArgに**プロトン**化した電荷により分離(0.5~2電荷/kD)

(a) Electrospray ionization (ESI)

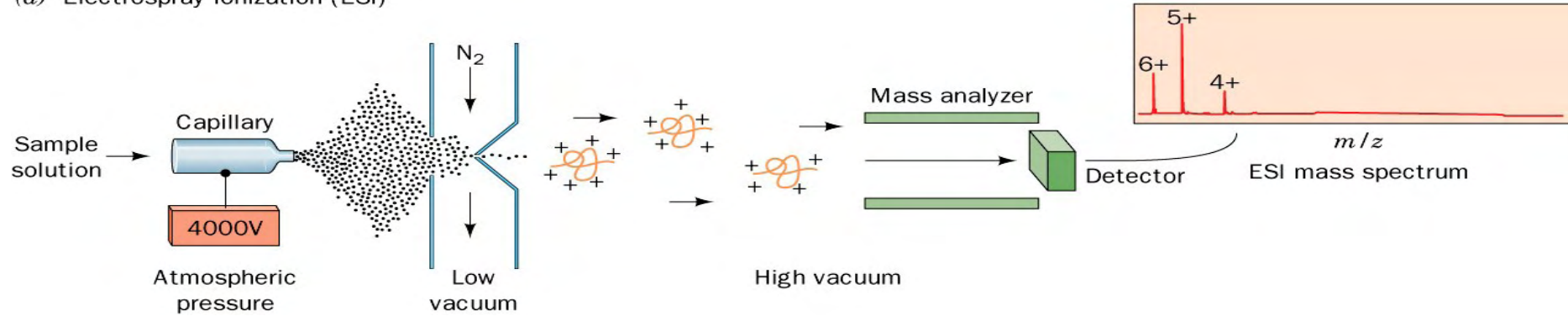


Figure 7-8b The generation of the gas phase ions required for the mass spectrometric analysis of proteins. (b) By matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI).

(b) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

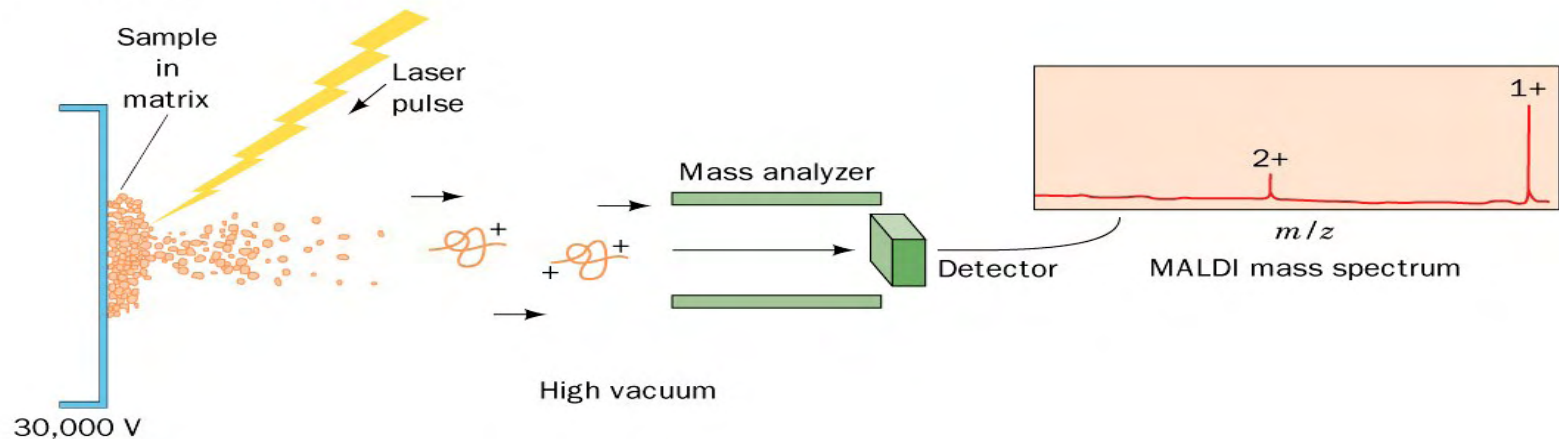


Figure 7-8c The generation of the gas phase ions required for the mass spectrometric analysis of proteins. (c) By fast atom bombardment (FAB).

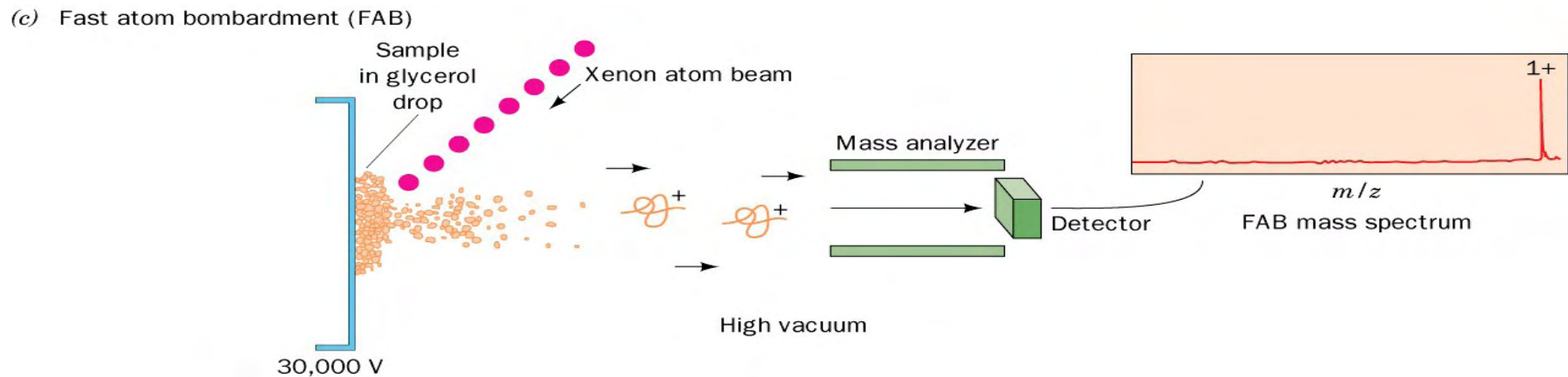
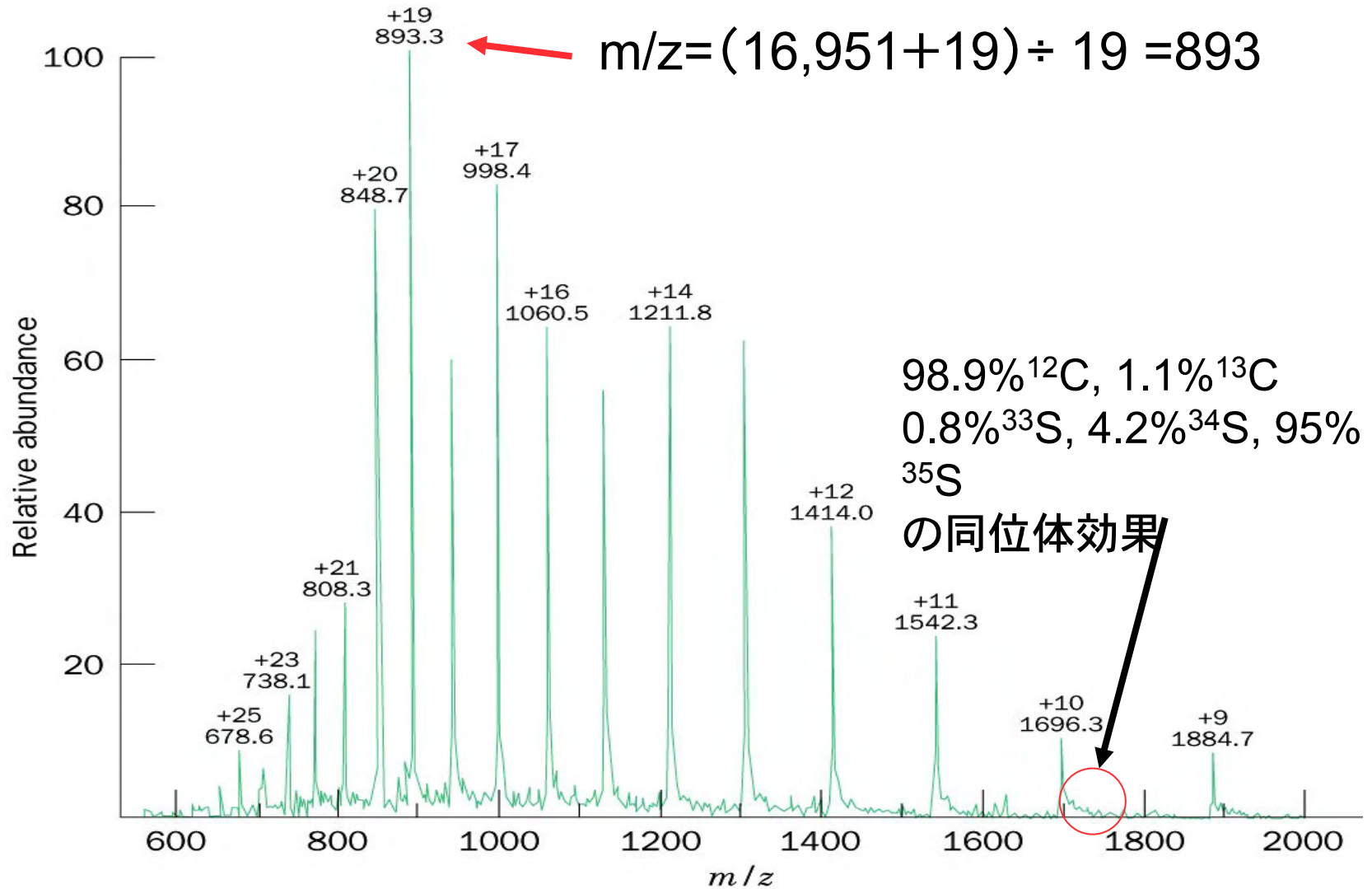
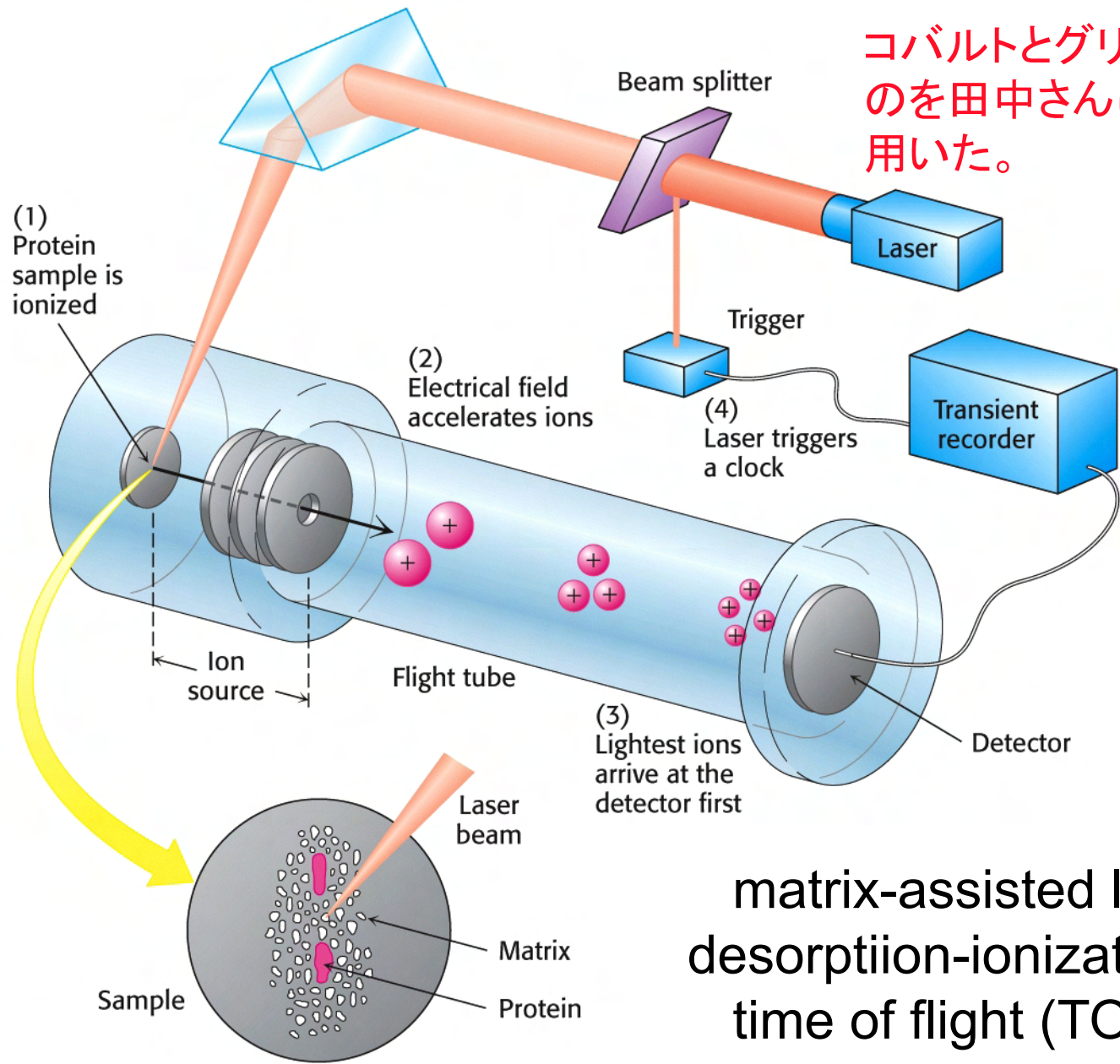


Figure 7-9 The ESI-MS spectrum of the 16,951-D horse heart protein apomyoglobin.



MALDI-TOF mass spectrometry



コバルトとグリセリンを混ぜたものを田中さんはマトリックスとして用いた。

matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) time of flight (TOF)

MALDI-TOF mass spectrum of insulin and β -lactoglobulin

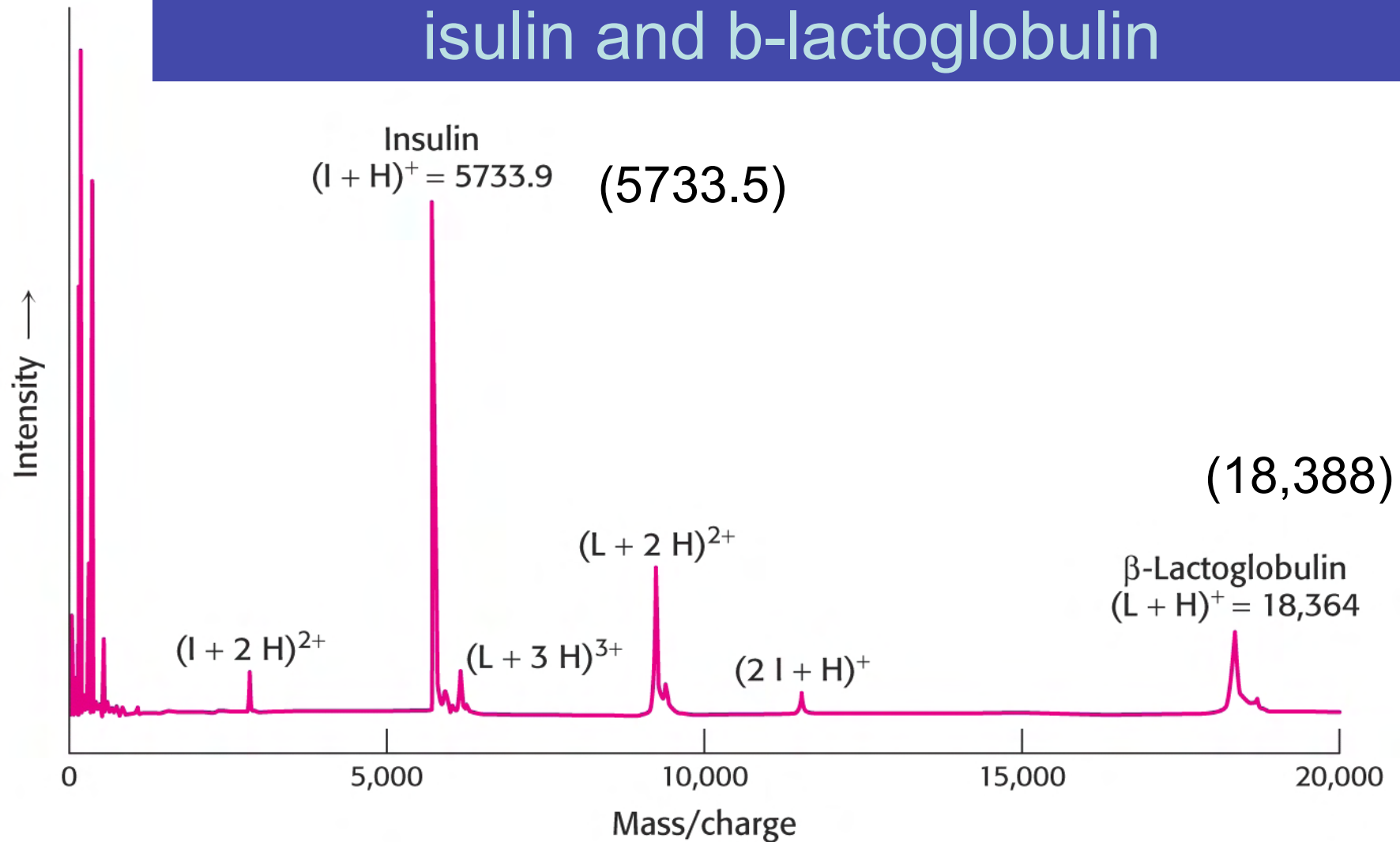


Figure 7-10 The use of a tandem mass spectrometer (MS/MS) in amino acid sequencing.

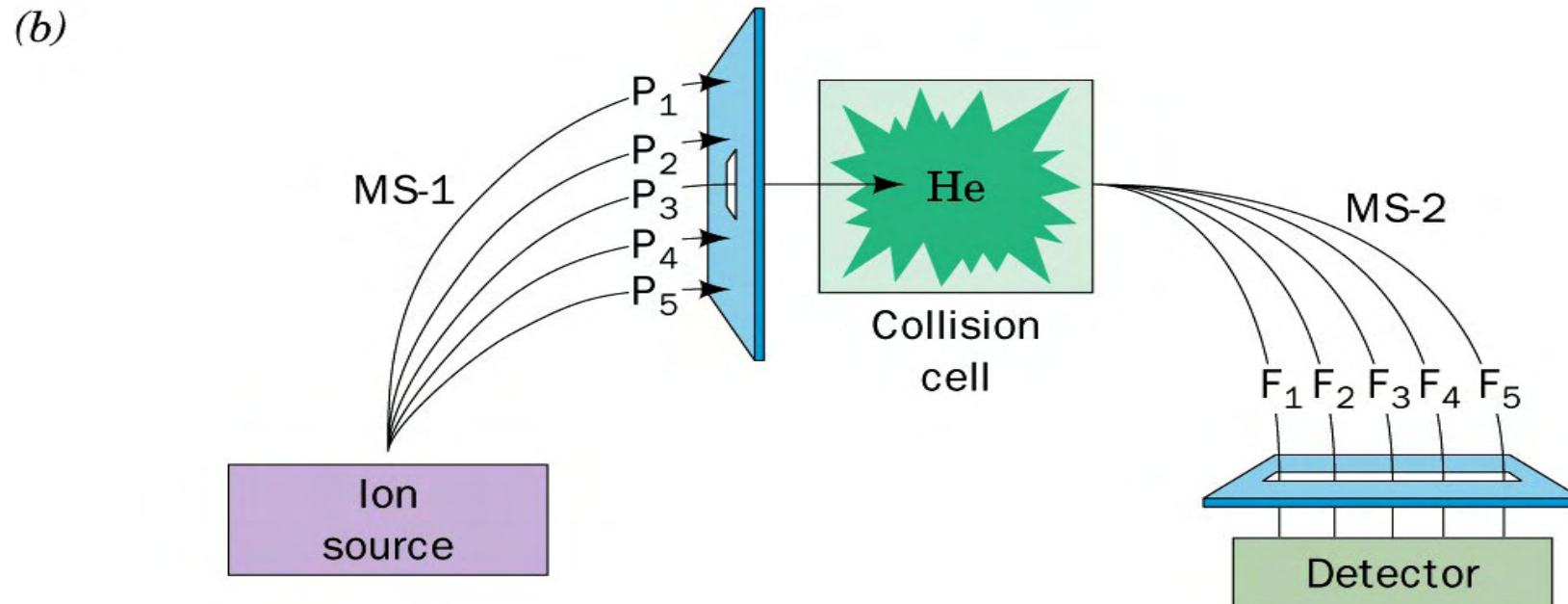
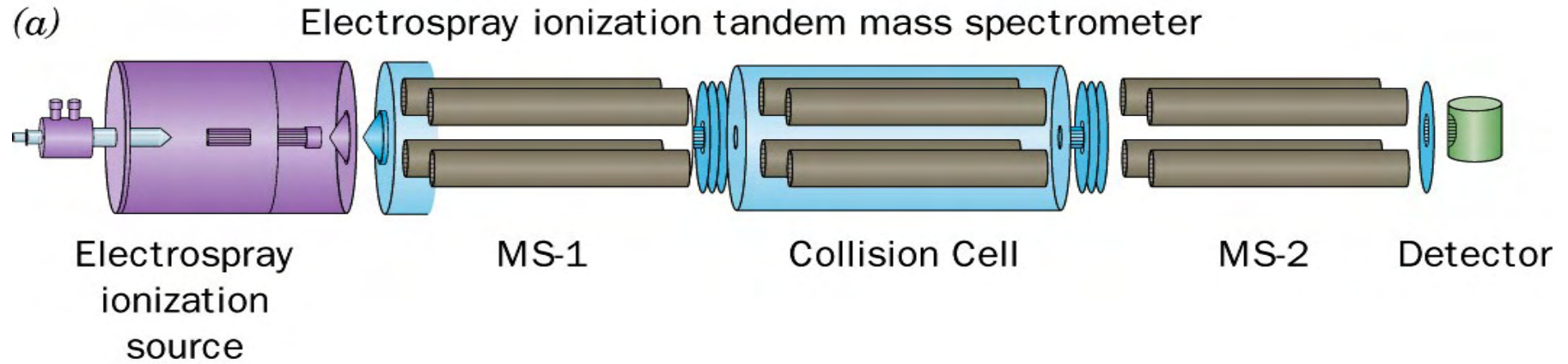
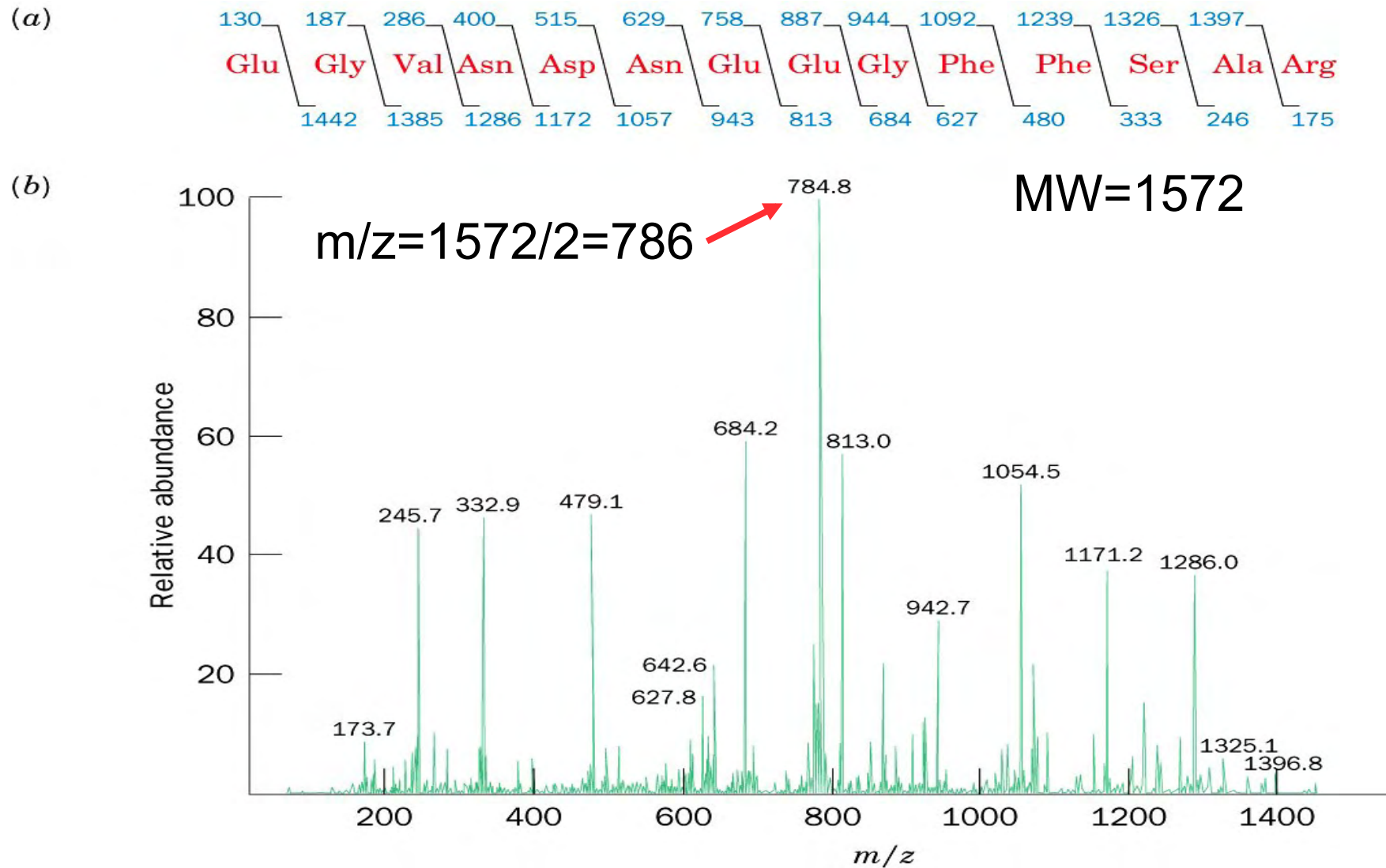


Figure 7-11 The tandem mass spectrum of the doubly charged ion of the 14-residue human [Glu¹]fibrinopeptide B ($m/z = 786$).



熱力学の法則

1) エンタルピーの定義: $H = U + PV$

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V, \quad \Delta U = \Delta Q - \Delta W$$

(第一法則)

$$\Delta H = \Delta Q - \Delta W + P\Delta V = \Delta Q - \Delta W'$$

2) エントロピー: $S \quad dS = dQ/T$ (可逆過程)

水の蒸発の $\Delta H_{\text{vap}} = 40.7 \text{ kJmol}^{-1}$ で
 $T = 373 \text{ °K}$ であるから

$$\Delta S_{\text{vap}} = 109.1 \text{ JK}^{-1}$$

蒸気になるときの
エンタルピー変化

3) ギブスの自由エネルギー: $G = H - TS$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \text{ (等温条件)}$$

$$1/2 \cdot mv^2 = 1/2 \cdot (2 \text{ kg}) \cdot (1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1})^2 = 1 \text{ Kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2} = 1 \text{ Nm}$$

質量 2 kg が $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ の速さで動いているものの
運動エネルギーに 1J が対応

U: エネルギー

P: 圧力

V: 体積

Q: 熱

W: 仕事

$$1 \text{ N} = 1 \text{ Kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-2}$$

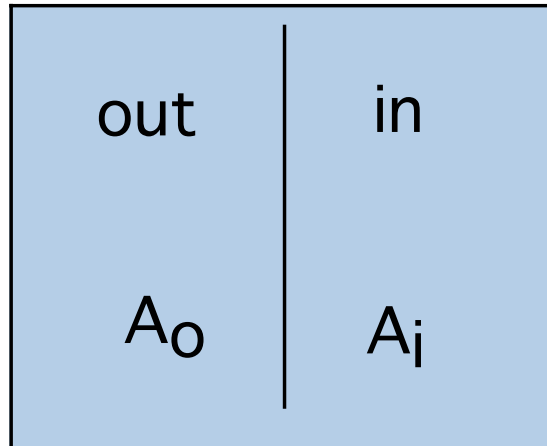
$$[\text{N} \cdot \text{m}] = [\text{J}]$$

$$0.24 \text{ cal} = 1 \text{ J} = 1 \text{ Kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-2}$$

化学ポテンシャル

化学ポテンシャル

(部分モル自由エネルギー)



$$\mu_0 = \mu^\circ + RT \cdot \ln A_0$$

$$\mu_i = \mu^\circ + RT \cdot \ln A_i$$

$$\Delta\mu = \mu_i - \mu_0 = RT \cdot \ln(A_0/A_i)$$

T: Kelvin 温度

R: ガス定数(2cal · mol⁻¹ · K⁻¹)

電気ポテンシャル

電気ポテンシャル---電荷を分子がもっていれば電位ができる

out	in
A_0^+	A_i^+
V_0	V_i

$$G_0 = zFV_0 + G^\circ$$

$$G_i = zFV_i + G^\circ$$

$$\Delta G = G_0 - G_i = zF(V_0 - V_i)$$

V: 電位

F: ファラデー定数 ($2.3 \times 10^4 \text{ cal} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
($96500 \text{ クーロン} \cdot \text{mol}^{-1}$)

z: 電荷数

電荷をもった物質の濃度差の持つエネルギー

$$\Delta\mu_A^{+z} = \Delta\mu + \Delta G = RT \cdot \ln(A_O/A_i) + zF(V_O - V_i)$$

$V_O = 0 \text{ mV}$ とすると

$$\Delta\mu_A^{+z} = -zF \cdot V_i + RT \cdot \ln(A_O/A_i)$$

ここで平衡時を考えると $\Delta\mu_A^{+z} = 0$

$$zF \cdot V_i = RT \cdot \ln(A_O/A_i)$$

$$V_i = RT/zF \cdot \ln(A_O/A_i) \text{ -----ネルンストの式}$$

$V_O = 0 \text{ mV}$ としたときの平衡時の電気化学ポテンシャル

平衡電位を求める

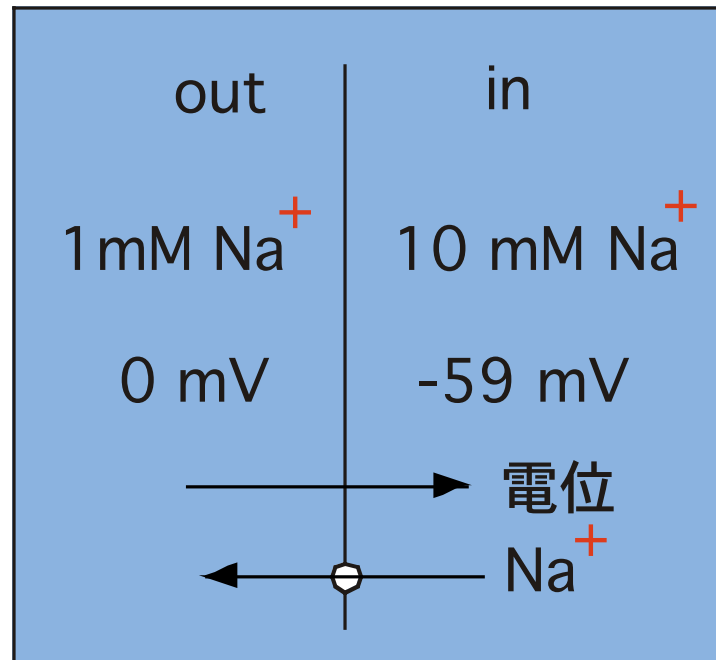
$$RT/zF = \frac{\frac{\text{ジュール}}{\text{mol} \cdot \text{K}^\circ} \text{K}^\circ}{(z) \frac{\text{ジュール}}{\text{ボルト} \cdot \text{mol}}} = \text{ボルト}$$

$$\begin{aligned} \text{平衡電位 } (\Delta \psi) &= RT/zF \cdot \ln(A_o/A_i) \\ &= \frac{8.314 \times 298}{1 \times 96500} \times 2.303 \cdot \log(A_o/A_i) \\ &= 0.059 \cdot \log(A_o/A_i) \text{---volt} \end{aligned}$$

平衡膜電位の実際例

$$\text{平衡電位 } (\Delta \Psi) = 0.059 \cdot \log(1 / 10)$$

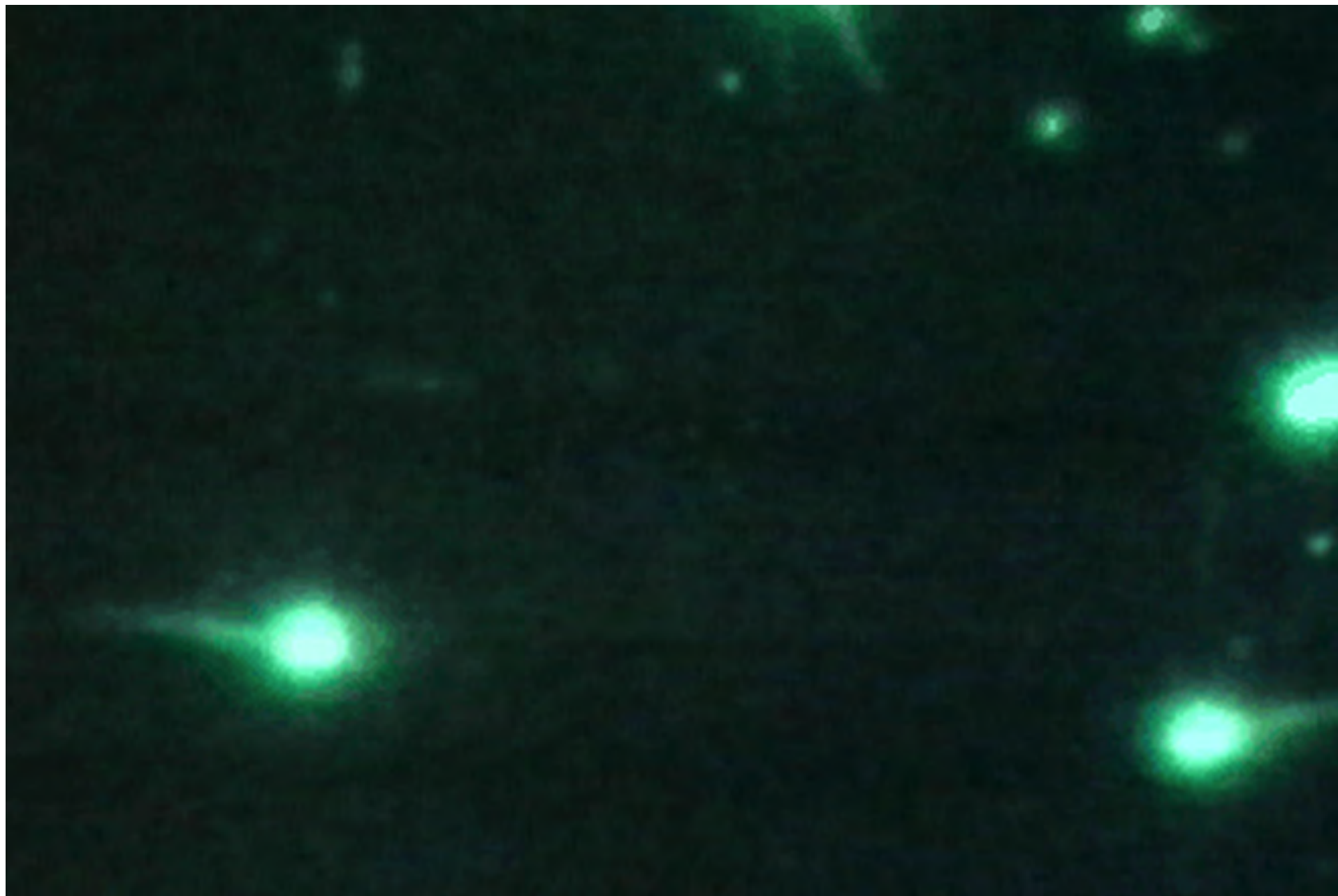
$$= -59 \text{ mV} \text{ ----拡散電位}$$



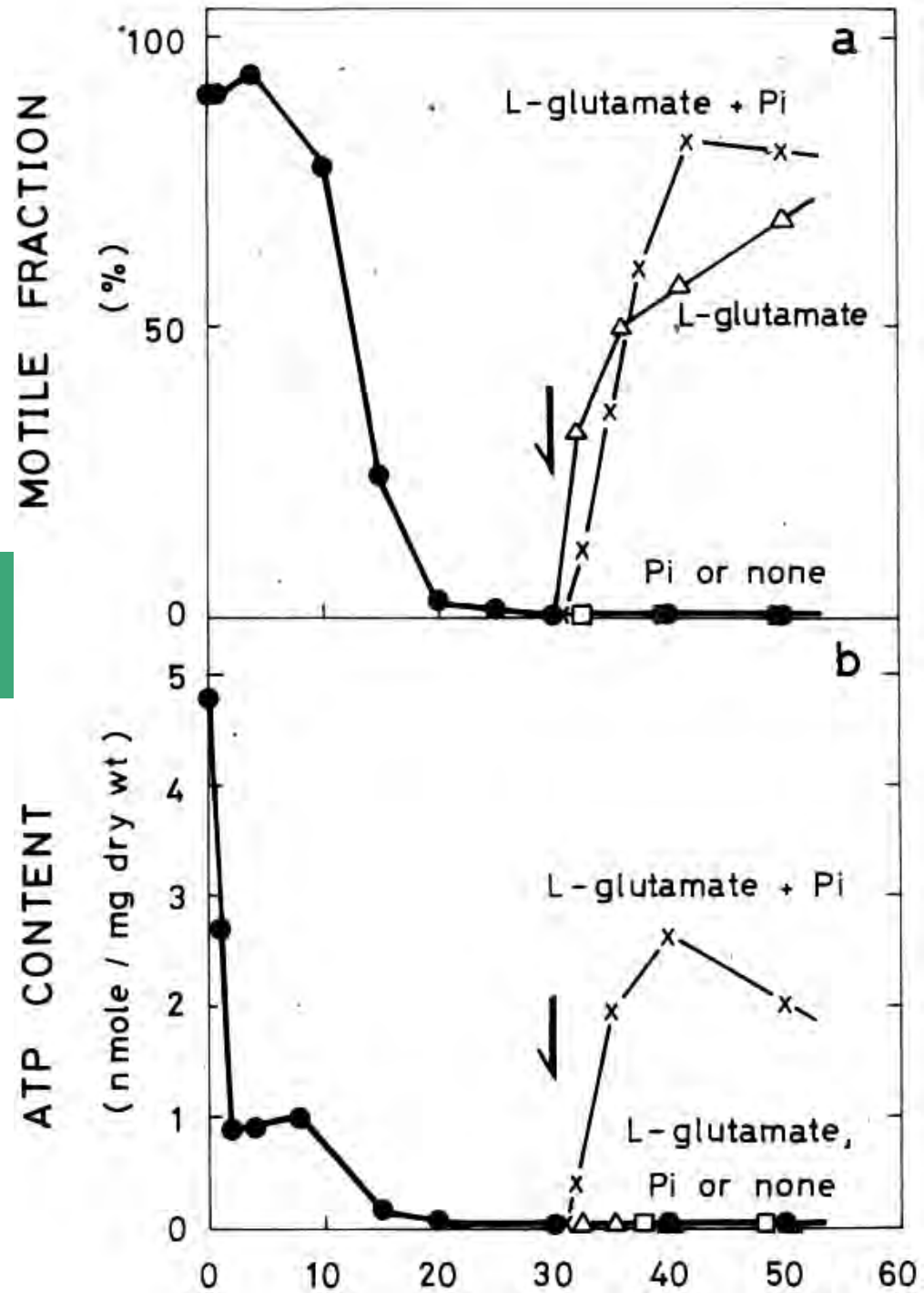
$$1 \Delta \text{pH} = -59 \text{ mV}$$

釣り合った状態 (平衡電位)

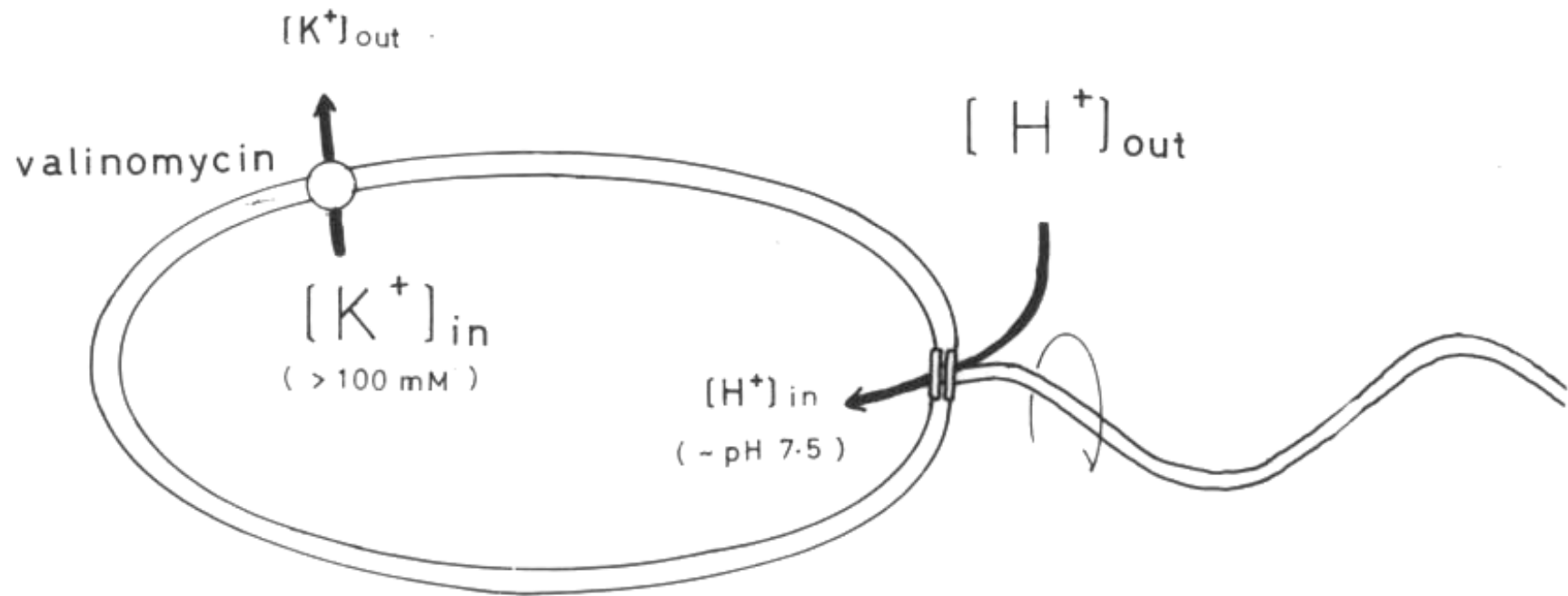
バクテリアの運動



ATP量とべん毛運動



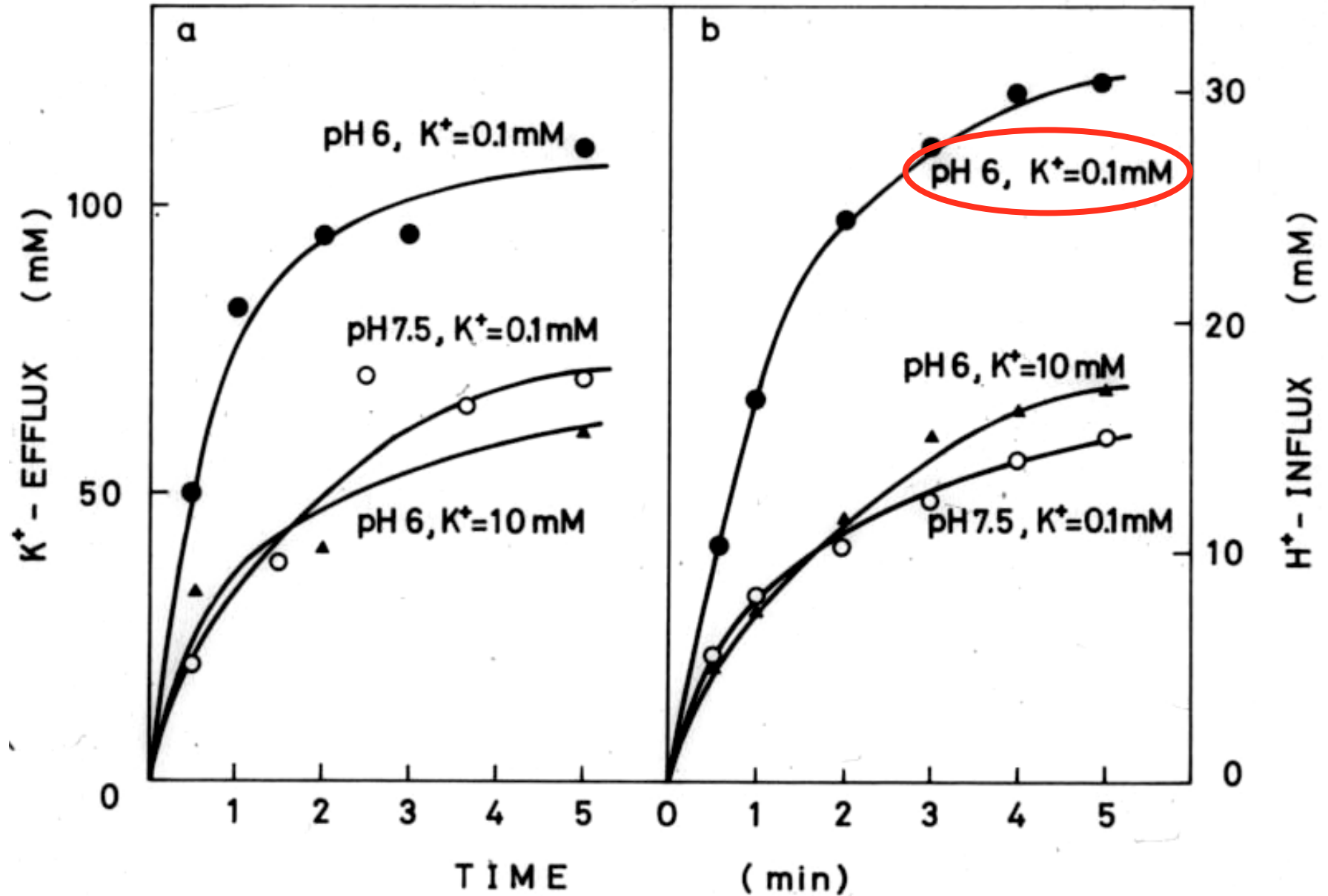
プロトン駆動力と運動



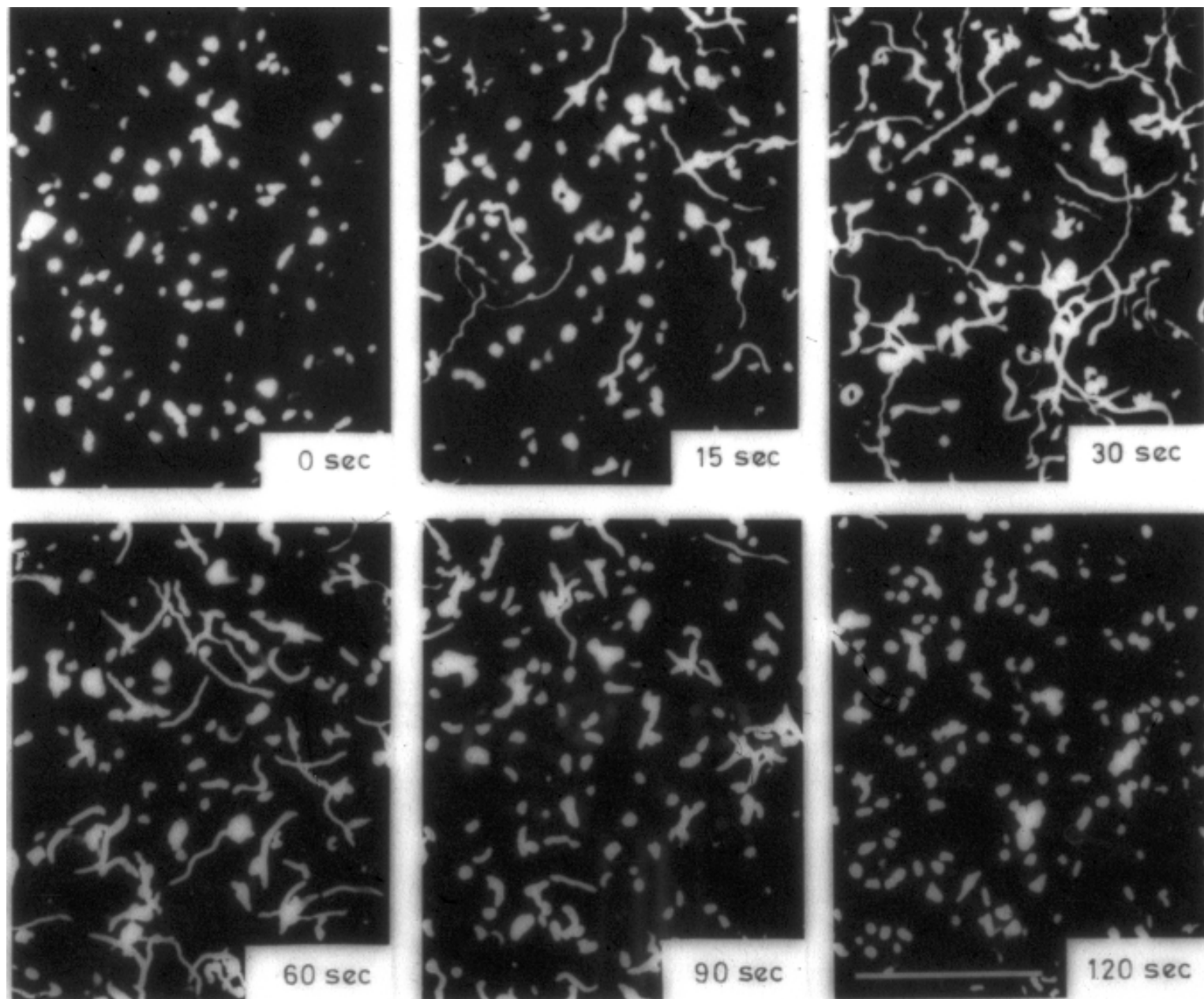
$$\Delta p = \Delta \psi - Z \Delta pH$$

$$(\Delta \psi = RT/F \ln([K^+]_{out}/[K^+]_{in}))$$

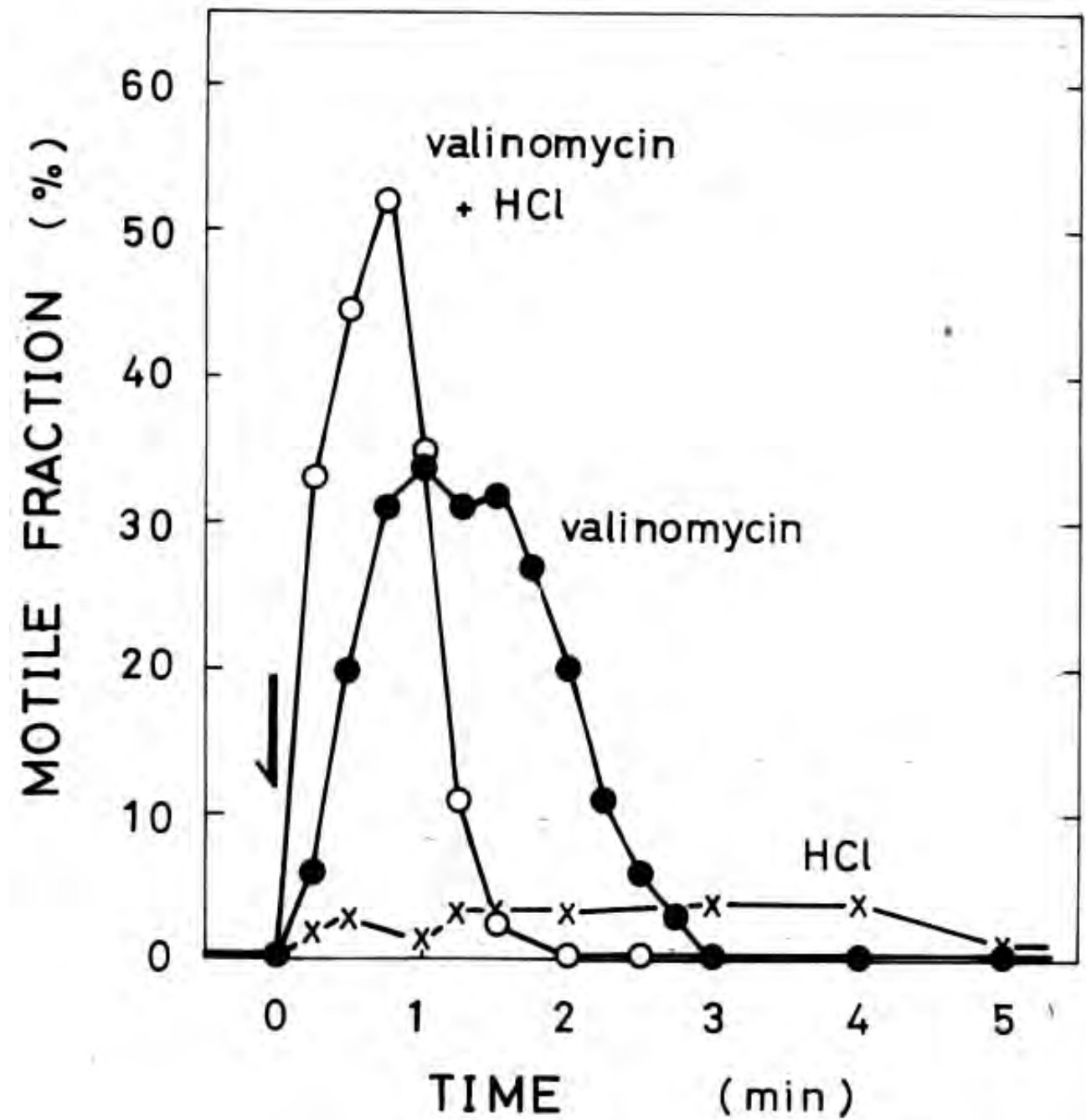
外液条件による K^+ と H^+ の流入出



人工プロトン駆動力による枯草菌の運動を観察



拡散電位による
べん毛運動

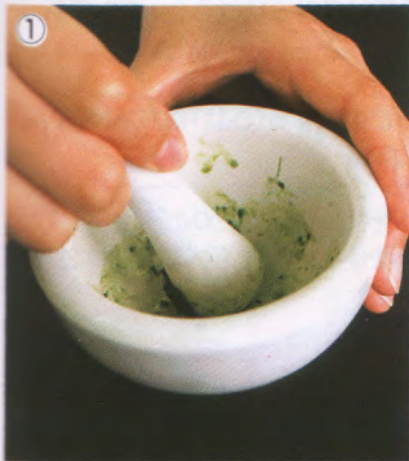


ペーパークロマトグラフィー1

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。

*メタノール：アセトン=3：1(体積比)の混合液



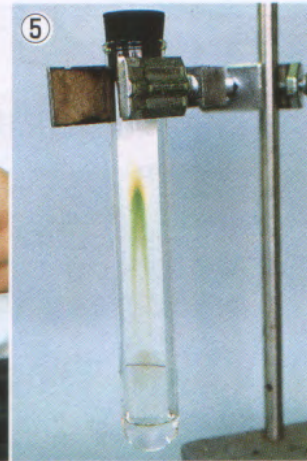
① ホウレンソウ、ヨモギなどの柔らかい葉を小さく切って乳鉢に入れ、抽出液*を加えて押しつぶし、色素を抽出する。



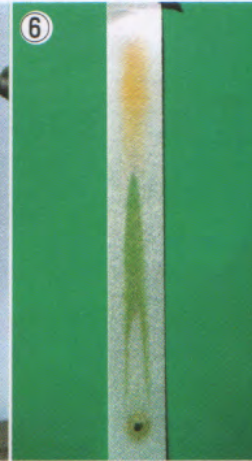
② 抽出液を濾過し濃縮する。毛細管で抽出液を濾紙の原点につける。



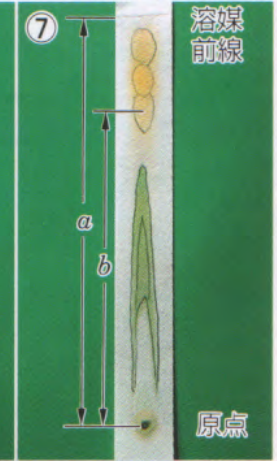
④ 大形試験管にトルエンなどの展開溶媒を入れ、濾紙の下端(原点よりも下)が溶媒に浸るようにする。



⑤ ゴム栓で密閉して展開させる。



⑥ 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。



溶媒前線

原点

R_f 値と色素の判別

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

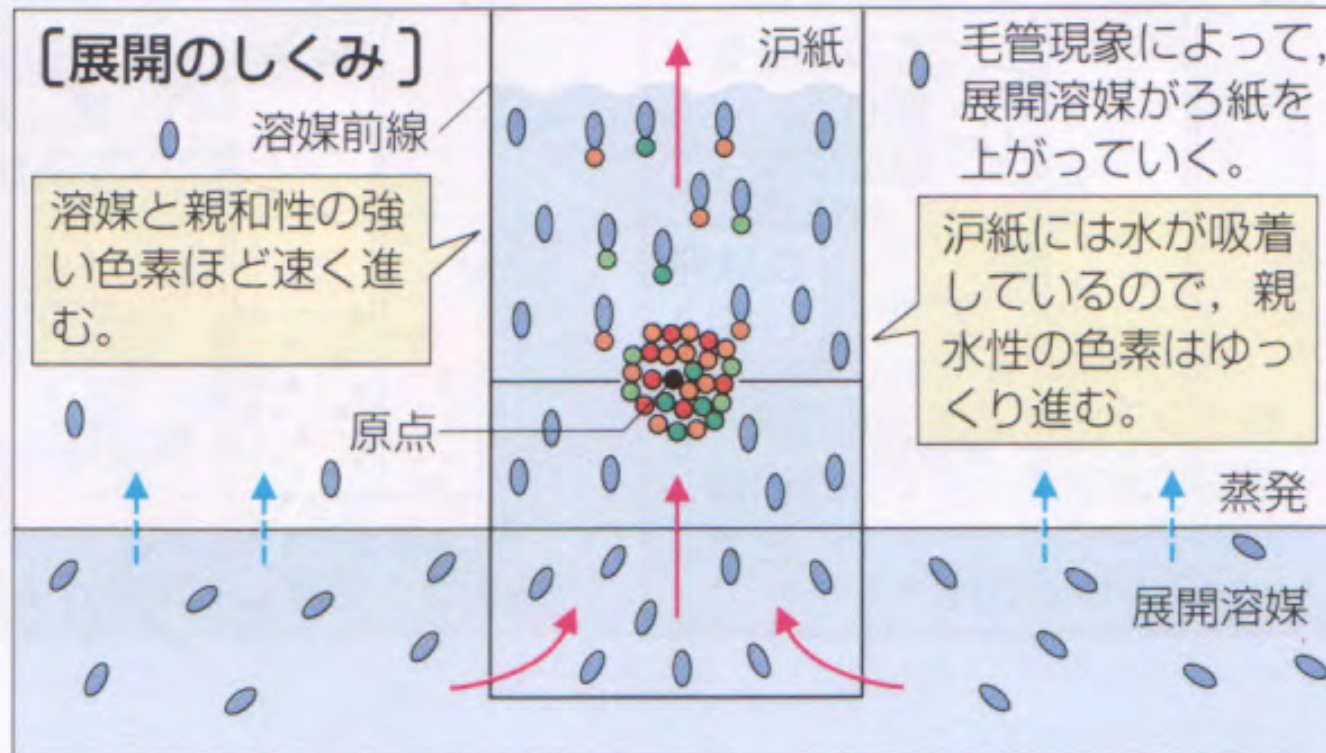
色素が濾紙に吸着される強さと、展開溶媒がその色素を溶かし出そうとする強さの差によって R_f 値が決まる。

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。

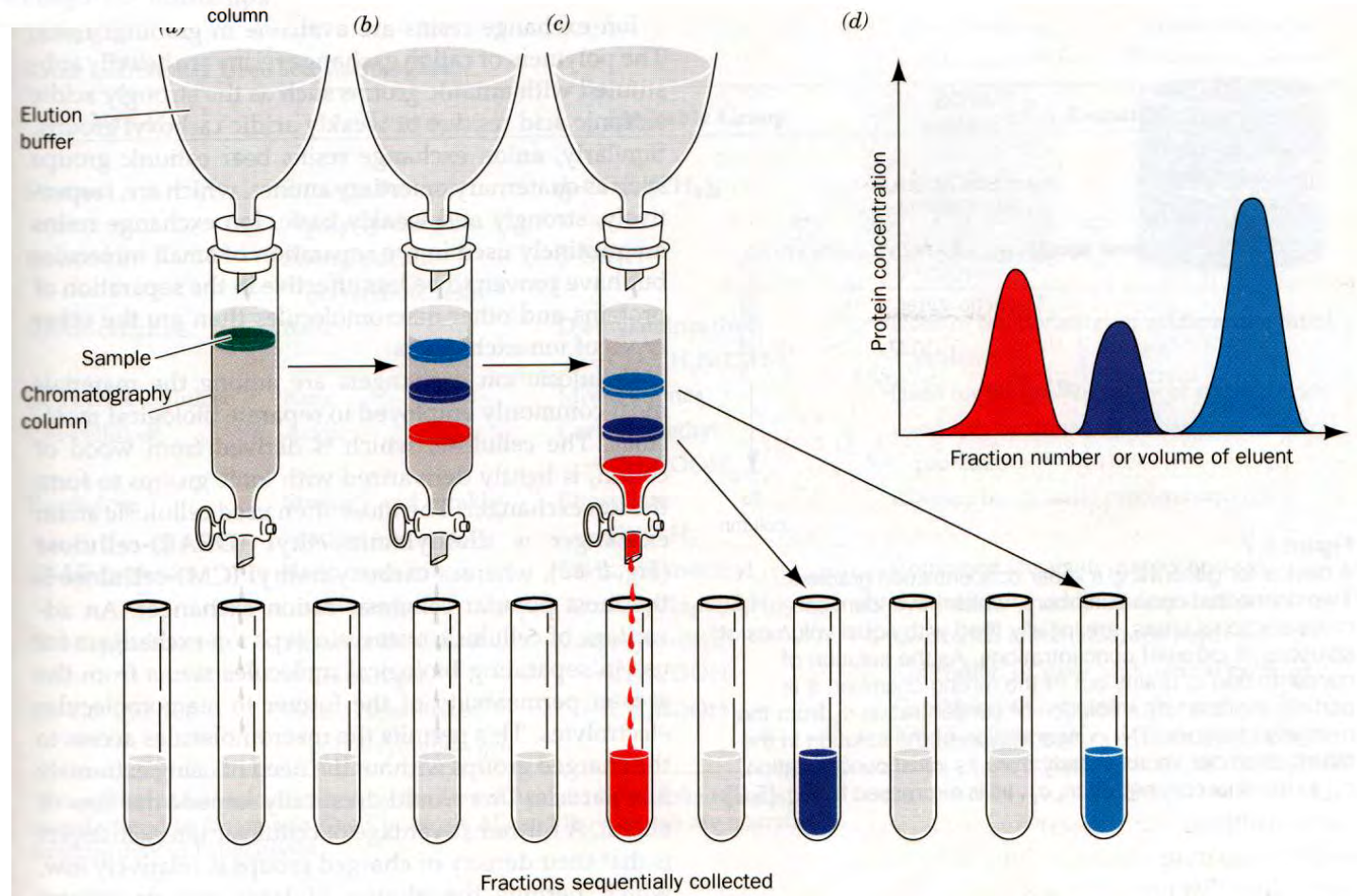
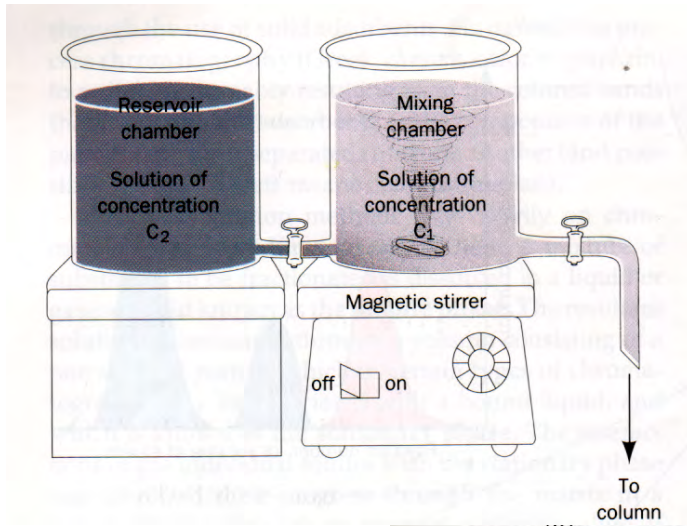
R_f 値の例

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
	ピオラキサンチン (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



液体クロマトグラフィー

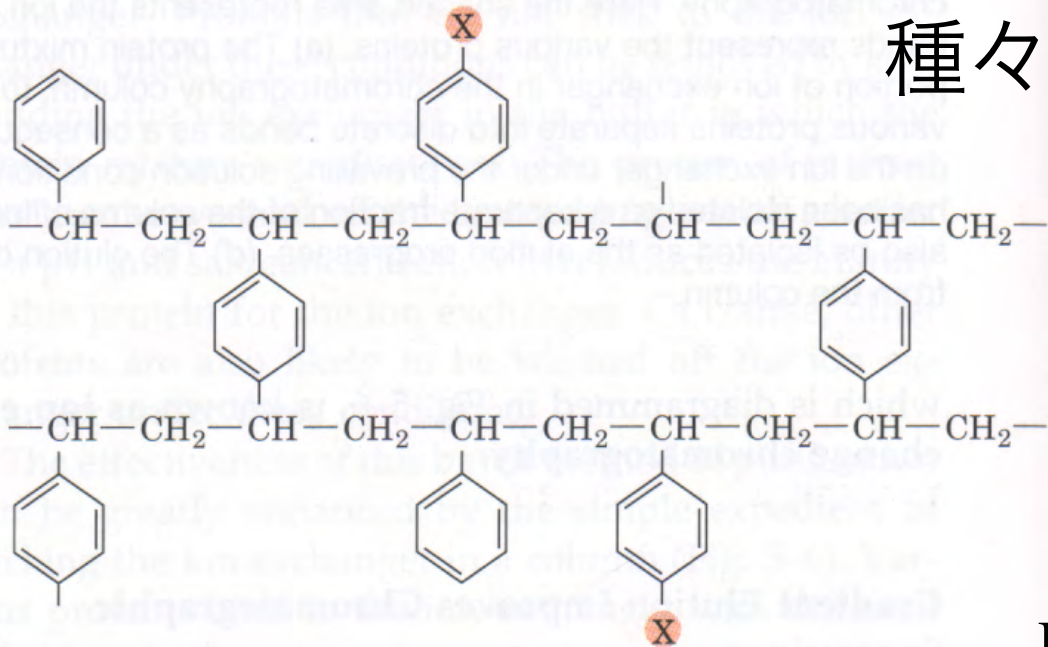


液体クロマトグラフィー AKTAシステム



種々のイオン交換体

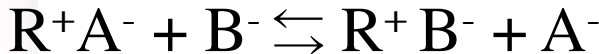
(a)



Dowex 50: $X = -SO_3^-$

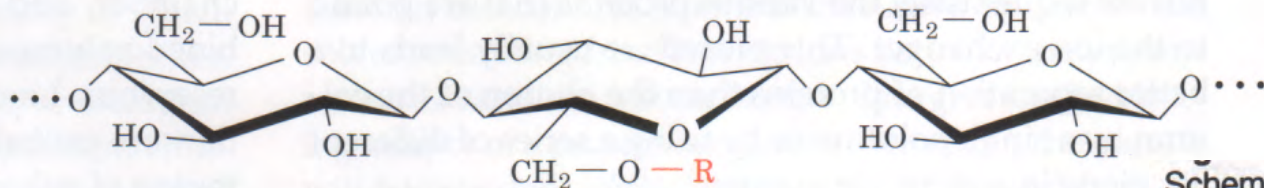
Dowex 1: $X = -CH_2N^+(CH_3)_3$

pHや塩濃度を変化
させることで調節



R^+ = 陰イオン交換体

(b)



DEAE: $R = -CH_2-CH_2-N^+(CH_2CH_3)_2$

CM: $R = -CH_2-COO^-$

Schematic diagrams of ion exchangers:
(a) Divinylbenzene cross-linked polystyrene ion exchange resin.
(b) Cellulose-based ion exchangers.

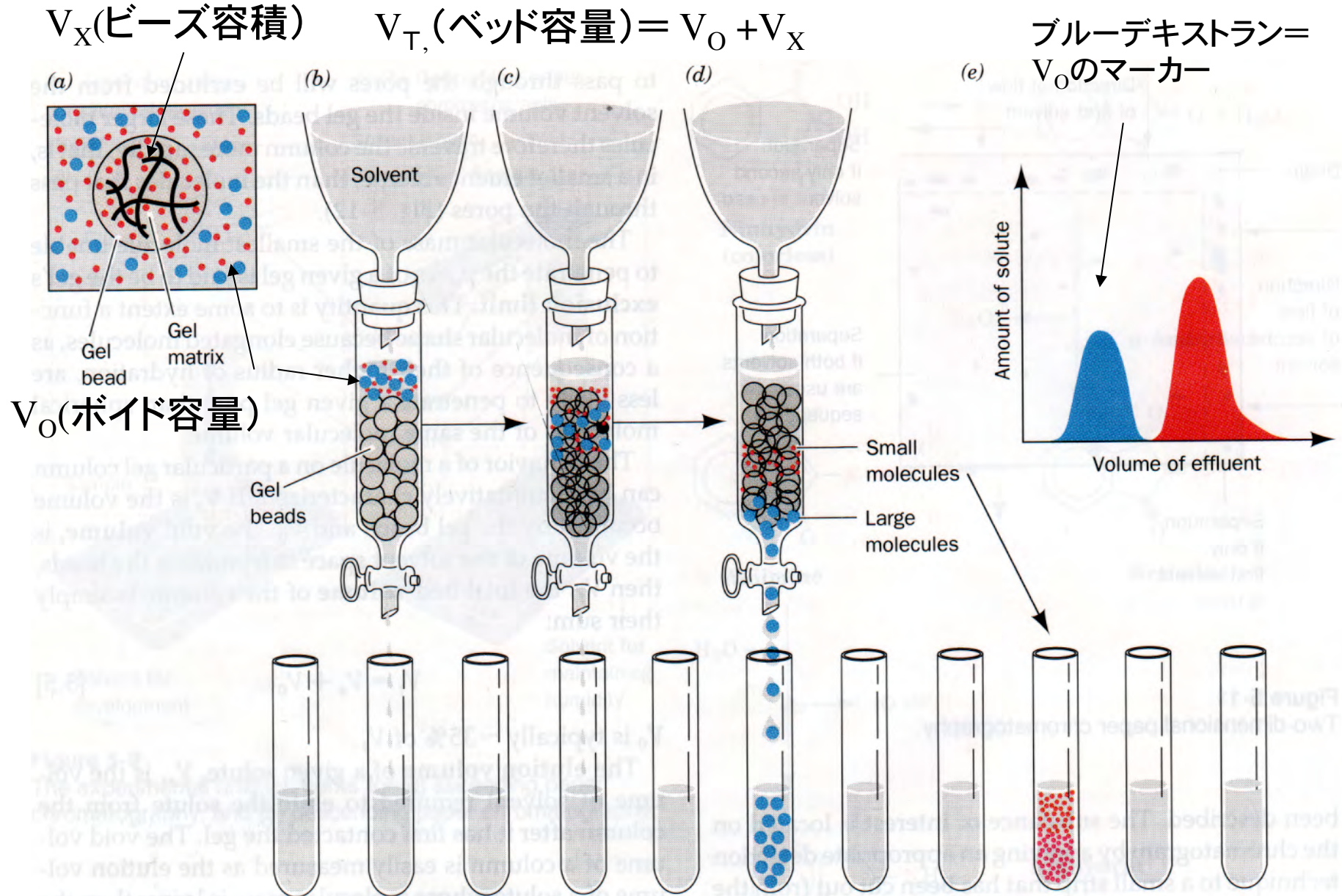
Name ^a	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl —CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl —CH ₂ COOH	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate —OPO 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-Sepharose	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
Sepharose 6B	アガロース	10~4,000
Sepharose 4B	アガロース	60~20,000
Sepharose 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.