

電気泳動の原理

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

$$q = \text{電荷}$$

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

$$f = \text{摩擦係数}$$

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

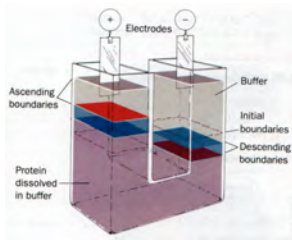
♥**界面移動法**: 管に蛋白質溶液を含む緩衝液を入れ、直流電圧をかけて分離する。

⇒キャピラリー電気泳動法として発展

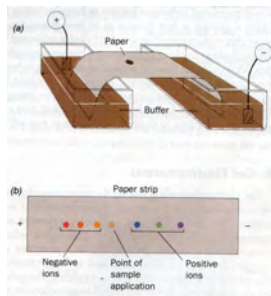
♣**ゾーン電気泳動法**: 濾紙, ゲルなどの支持体中で試料を移動する。

- 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

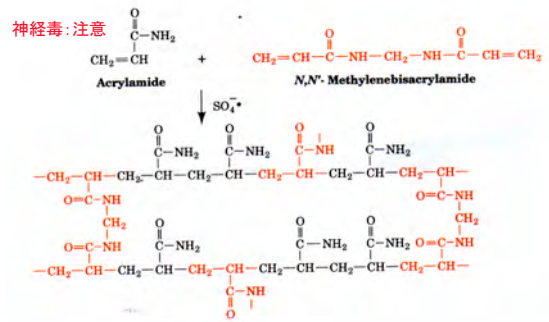


界面移動法



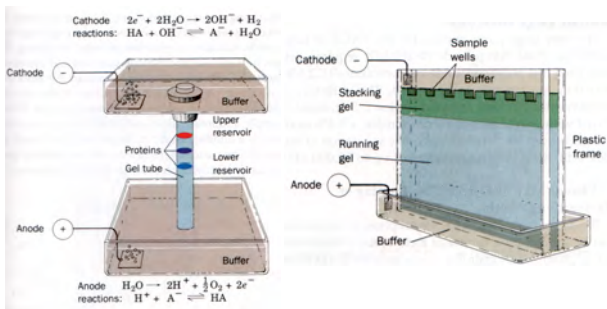
濾紙電気泳動法

電気泳動の実際 III

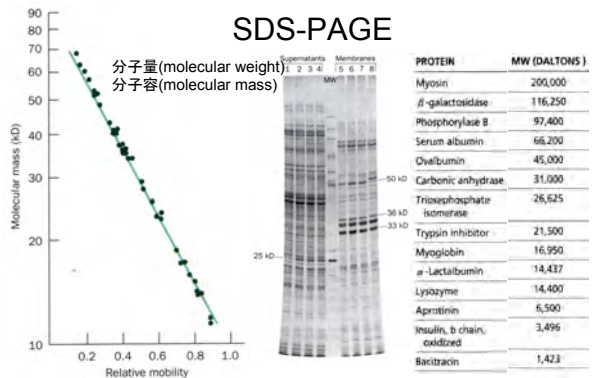


Ammonium persulfate (S₂O₈²⁻ ⇌ 2SO₄⁻) + N,N',N'-tetramethylethylenediamin
 によって遊離ラジカルで重合反応開始

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

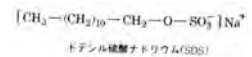
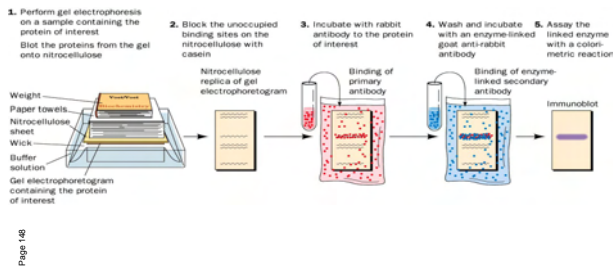


Figure 6-23 Detection of proteins by immunoblotting.



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。

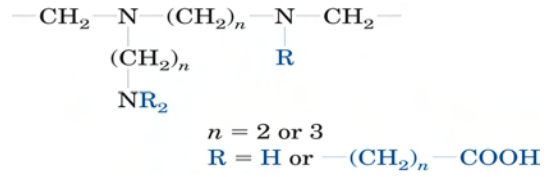


Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.

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。

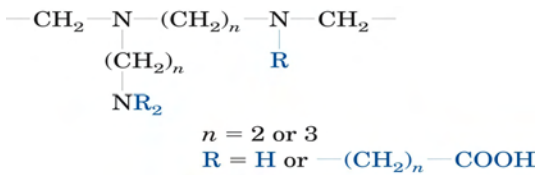
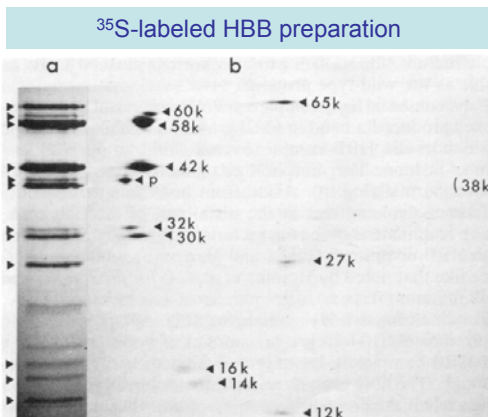
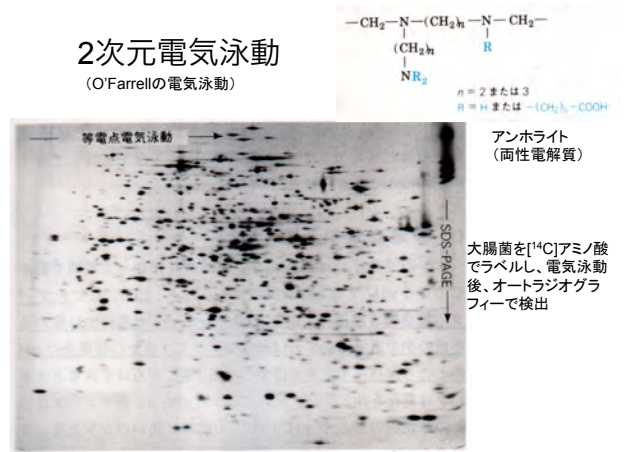


Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.

2次元電気泳動

(O'Farrellの電気泳動)



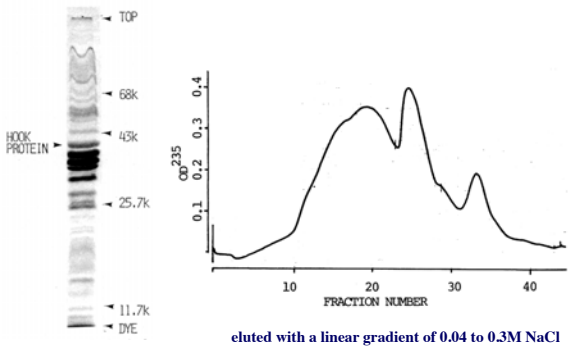
Aizawa et al., J. Bacteriol. (1985)

Protocol for the isolation of hook

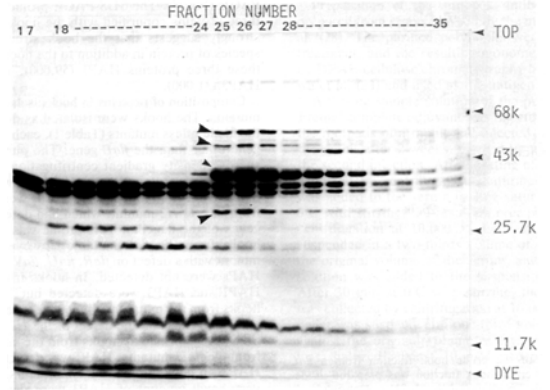
Bacterial pellet (late log phase)

- 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 ① 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 木のレンゲの、ヨモギなどの葉を、かみ剪を小さく切って乱雑に入れ、抽出液を加えて押しつぶし、色素を抽出する。

② 抽出液をろ過し濃縮する。

③ 大形試験管にトルエンなどの展開溶媒を入れ、試紙の下端(原点より下)が溶媒に浸るようになる。

④ ゴム栓で密封して展開させる。

⑤ 展開溶媒が十分上昇したら試紙をとり出し、溶媒の先端(溶媒前線)に印をつけて乾かす。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

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

色素が試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。
 試紙・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
	ピオキサントニン (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	

【展開のしくみ】

溶媒前線
 溶媒と親和性の強い色素ほど速く進む。
 原点
 試紙
 毛管現象によって、展開溶媒が紙を上っていく。
 試紙には水が吸着しているため、親水性の色素はゆっくり進む。
 蒸発
 展開溶媒

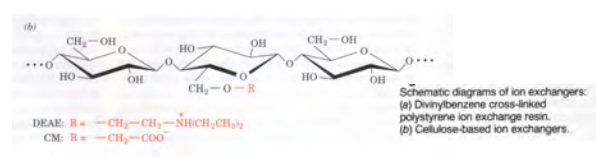
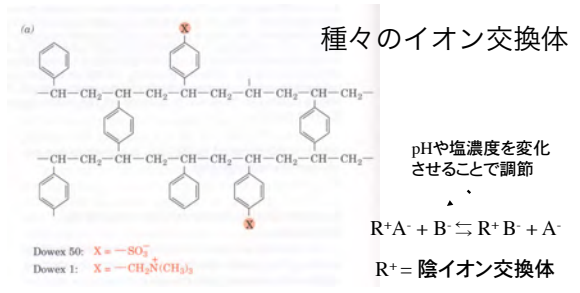
ペーパークロマトグラフィー-2

液体クロマトグラフィー

Elution buffer
 Solution of concentration
 Magnetic stirrer
 Sample
 Chromatography column
 Fractions sequentially collected
 Protein concentration
 Fraction number or volume of eluent

液体クロマトグラフィー AKTAシステム



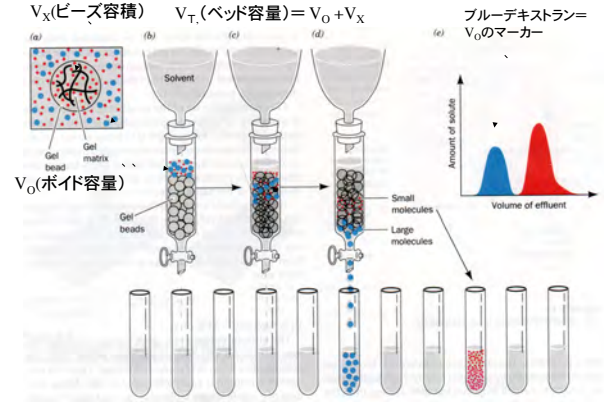


Name*	Type	Ionizable group	Remarks
DEAE-cellulose	Weakly basic	Diethylaminoethyl $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Used to separate acidic and neutral proteins
CM-cellulose	Weakly acidic	Carboxymethyl $-\text{CH}_2\text{COOH}$	Used to separate basic and neutral proteins
P-cellulose	Strongly and weakly acidic	Phosphate $-\text{OPO}_3\text{H}_2$	Dibasic; binds basic proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid $-\text{COOH}$	Used to separate basic proteins and amines
DEAE-Sephadex	Weakly basic cross-linked dextran gel	Diethylaminoethyl $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Combined chromatography and gel filtration of acidic and neutral proteins
SP-Sephacrose	Strongly acidic cross-linked agarose gel	Methyl sulfonate $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	Combined chromatography and gel filtration of basic proteins
CM Bio-Gel A	Weakly acidic cross-linked agarose gel	Carboxymethyl $-\text{CH}_2\text{COOH}$	Combined chromatography and gel filtration of basic and neutral proteins

*Sephadex 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.