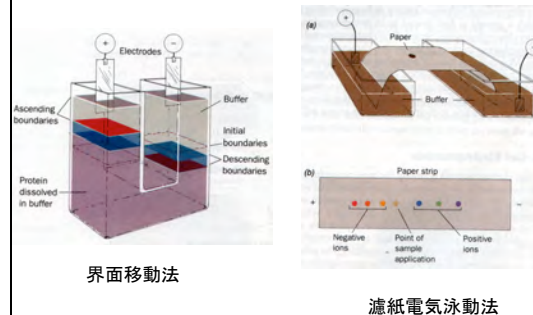


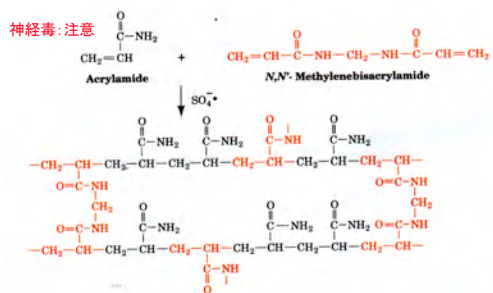
電気泳動の実際 I

- ▼**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

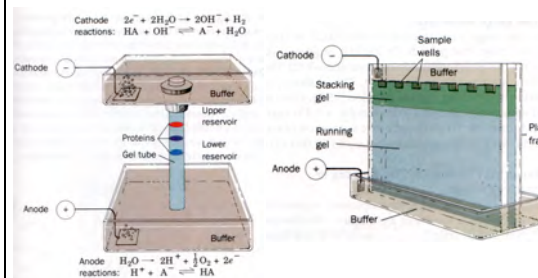


電気泳動の実際 III

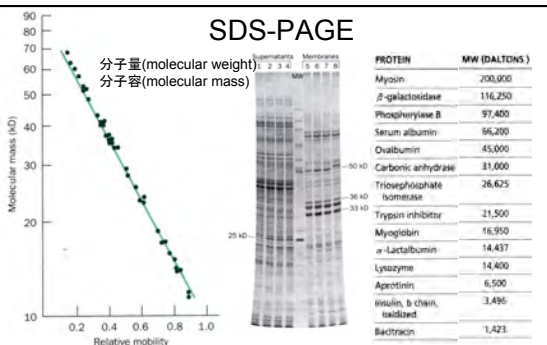


Ammonium persulfate (S₂O₈²⁻ ⇌ 2SO₄⁻) + N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
 によって遊離ラジカルで重合反応開始

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

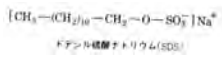
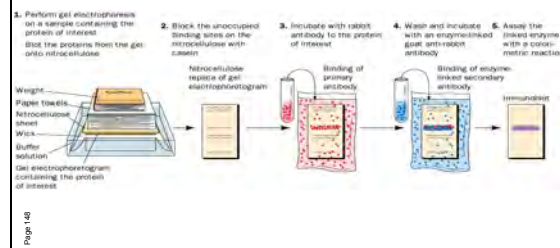


Figure 6-23 Detection of proteins by immunoblotting.



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。

$$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---N---(CH}_2\text{)}_n\text{---N---CH}_2\text{---} \\ | \qquad \qquad | \\ \text{(CH}_2\text{)}_n \qquad \text{R} \\ | \\ \text{NR}_2 \end{array}$$

$n = 2 \text{ or } 3$
 $\text{R} = \text{H or } \text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---COOH}$

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。

$$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---N---(CH}_2\text{)}_n\text{---N---CH}_2\text{---} \\ | \qquad \qquad | \\ \text{(CH}_2\text{)}_n \qquad \text{R} \\ | \\ \text{NR}_2 \end{array}$$

$n = 2 \text{ or } 3$
 $\text{R} = \text{H or } \text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---COOH}$

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)

等電点電気泳動

アンホライト (両性電解質)

大腸菌を ^{14}C アミノ酸でラベルし、電気泳動後、オートラジオグラフィで検出

SDS-PAGE

$$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---N---(CH}_2\text{)}_n\text{---N---CH}_2\text{---} \\ | \qquad \qquad | \\ \text{(CH}_2\text{)}_n \qquad \text{R} \\ | \\ \text{NR}_2 \end{array}$$

$n = 2 \text{ または } 3$
 $\text{R} = \text{H または } \text{---(CH}_2\text{)}_n\text{---COOH}$

^{35}S -labeled HBB preparation

a

b

60k, 58k, 42k, 32k, 30k, 27k, 16k, 14k, 12k

(38k)

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

HOOK PROTEIN

TOP

68k

43k

25.7k

11.7k

DYE

0.1 0.2 0.3 0.4

10 20 30 40

FRACTION NUMBER

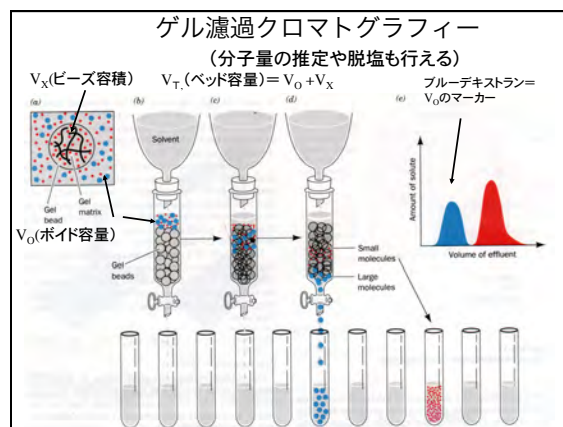
eluted with a linear gradient of 0.04 to 0.3M NaCl

Name*	Type	Ionic 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
Phathem	Strongly and weakly acidic	Phosphate -OPO ₃ H ₂	Edbasic; binds bases proteins strongly
Bio-Rex 70	Weakly acidic, polystyrene-based	Carboxylic acid -COOH	Used to separate basic proteins and amino
DEAE-Sephacel	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-Sephacse	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.

*Sephacel and Sephacse gels are manufactured by Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, New Jersey; Bio-Rex (cross-linked) and Bio-Gel (cross-linked) are manufactured by BioRad Laboratories, Hercules, California.

Page 130

Table 6-2 Some Biochemically Useful Ion Exchangers.



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
Sephacrose 6B	アガロース	10~4,000
Sephacrose 4B	アガロース	60~20,000
Sephacrose 2B	アガロース	70~40,000

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