

遠心分離 I

遠心力

角速度 (rad·s<sup>-1</sup>) =  $\omega = d\theta/dt$   
 加速度 =  $\alpha = \omega^2 r$  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  
 $F_s = m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r$   
 $V_p =$  体積  
 $\rho =$  溶液の密度  
 $m =$  質量

摩擦力  $F_r = v f$   
 $v =$  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  
 $m = M(\text{分子量}) / N(\text{アボガドロ数})$

従って  $m\omega^2 r - V\rho\omega^2 r = v f$

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

$\bar{V} =$  偏比容と密度の逆数

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  $0.73 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$

遠心分離 II

$V_p = \bar{V} m$ ;  $\bar{V} =$  偏比容と密度の逆数

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N} \rightarrow v f = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{N}$$

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

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

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

$$f = 6\pi\eta r_p \quad \eta = \text{粘度}$$

$f$  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

Table 6-5 Physical Constants of Some Proteins.

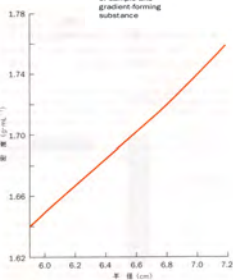
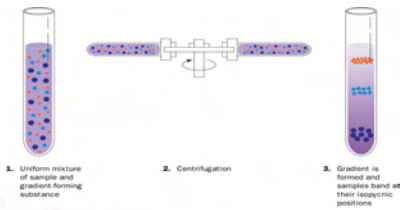
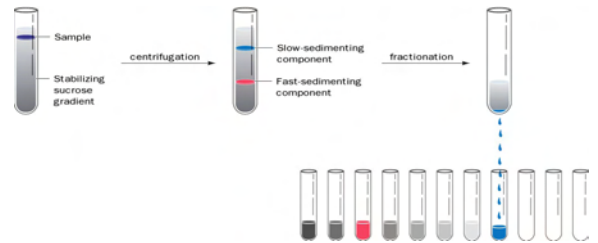
Protein	Molecular Mass (kD)	Partial Specific Volume, $V_{20,0}$ ( $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ )	Sedimentation Coefficient, $s_{20,0}$ (S)	Frictional Ratio, $f/f_0$
Lipase (milk)	6.7	0.714	1.14	1.190
Ribonuclease A (bovine pancreas)	12.6	0.707	2.00	1.066
Cytochrome c (bovine heart)	13.4	0.728	1.71	1.190
Myoglobin (horse heart)	16.9	0.741	2.04	1.105
$\alpha$ -Chymotrypsin (bovine pancreas)	21.6	0.736	2.40	1.130
Crotosin (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
<b>Fibrinogen (human)</b>	<b>340</b>	<b>0.725</b>	<b>7.63</b>	<b>2.336</b>
Hemocyanin (squid)	612	0.724	19.50	1.358
Glutamate dehydrogenase (bovine liver)	1015	0.750	26.60	1.250
Turnip yellow mosaic virus protein	3013	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).

Voet Biochemistry 3e  
 © 2004 John Wiley & Sons, Inc.

Figure 6-30 Zonal ultracentrifugation.

- (1) ゾーン超遠心分離法 (シヨ糖密度勾配)
- (2) 平衡密度勾配超遠心分離 (CsCl密度勾配)

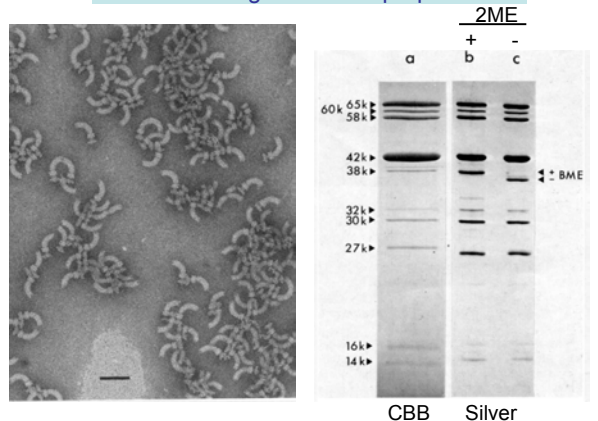


CsCl 1.7g/mlの初期濃度で39,460 rpmで遠心する

蛋白質 = 約 1.3g/ml  
 DNA = 約 1.7g/ml

密度勾配遠心

EM and SDS gels of HBB preparations



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。

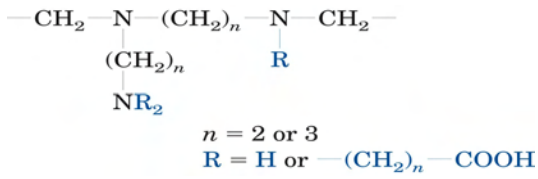
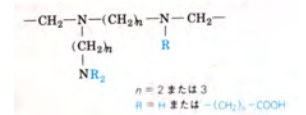


Figure 6-26 General formula of the ampholytes used in isoelectric focusing.

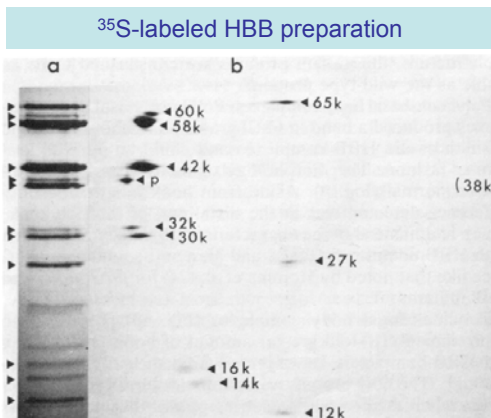
## 二次元電気泳動

(O'Farrellの電気泳動)



アンホライト  
(両性電解質)

大腸菌を [<sup>14</sup>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



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

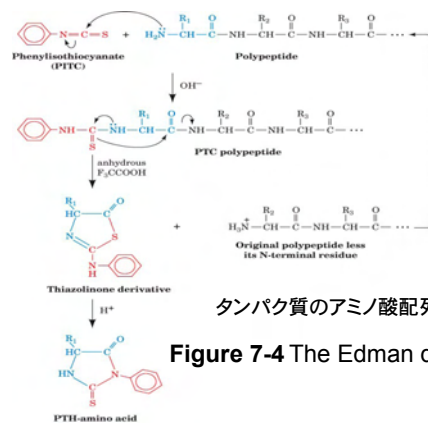
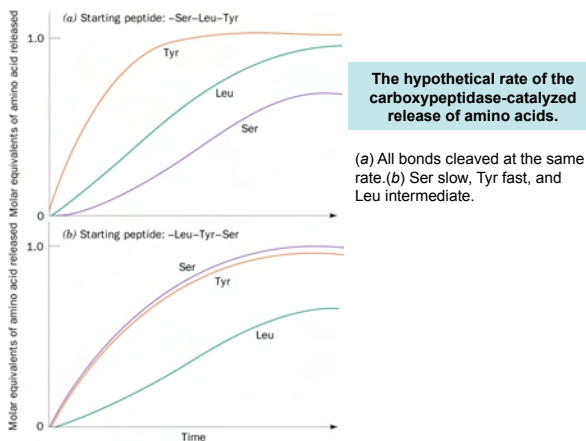
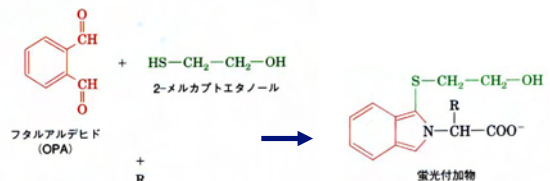


Figure 7-4 The Edman degradation.



## 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

蛍光付加アミノ酸の分析

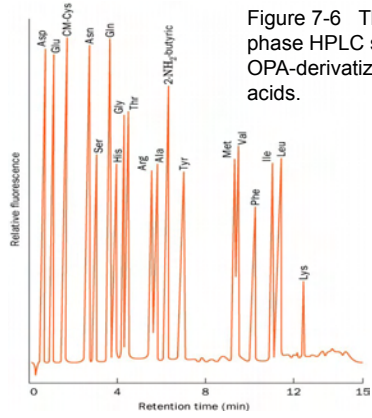


Figure 7-6 The reverse-phase HPLC separation of OPA-derivatized amino acids.

Figure 7-6 Amino acid analysis.

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

