



HIMAC APPLICATION

No. 5 JUNE 1987

題 目 プラスミドpBR322DNA及びλファージDNAの回収実験 機 種 分離用小形超遠心機CP100H用RP100ATロータ

CP100H形日立分離用小形超遠心機を用いて、プラスミドpBR322DNA及びλファージDNAの回収率の測定実験を行いました。試料は、プラスミドpBR322DNA(ニッポン・ジーン製 CODE No. 315-00446)及びλファージDNA(ニッポン・ジーン製 CODE No. 314-00416)を用い、回収法はシリンジによるチューブ側面からのパンクチャーで行いました。

分離手法は、塩化セシウムによる均一液を用いた密度勾配沈降平衡法によりした。RP100ATロータは沈降距離が短く、しかも100,000rpm(最大遠心加速度 436,000×g)まで回転できるため、短時間での分離が可能となります。ことに、多くのDNA(約50μg以上)を含む試料に対しては、100,000rpm、4時間でも分離ができます。

分 離 条 件

- (1) 遠心条件……100,000rpm×4hr
- (2) 加減速条件……加速モード「9」、減速モード「F」
- (3) 試料調製法……所定量のDNAを含むTE溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に塩化セシウムを溶解し、最終0.1mg/mlとなるように臭化エチジウム(E.B)を添加して調製しました。(平均密度 $\rho = 1.57 \text{ g/cm}^3$)
- (4) 使用チューブ……2PAシールチューブ
- (5) 回収条件……1mlのツベルクリン用シリンジに22Gの注射針をセットし、チューブ側面からのパンクチャーにより行いました。
- (6) 測定条件……分光光度計により260nmと280nmの吸光度を求め、下式より算出しました。

$$\text{濃 度} = \frac{\text{OD}_{260}}{*0.02} \quad (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{純 度} = \frac{\text{OD}_{260}}{\text{OD}_{280}}$$

*DNA 1μg/ml→O.D.260:0.02

分離結果

(1) プラスミド pBR322 DNA

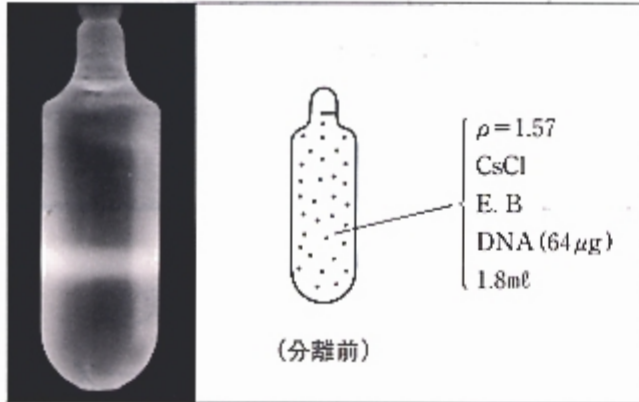


図1 100,000rpm × 4 hr, 20°C

(2) λファージ DNA

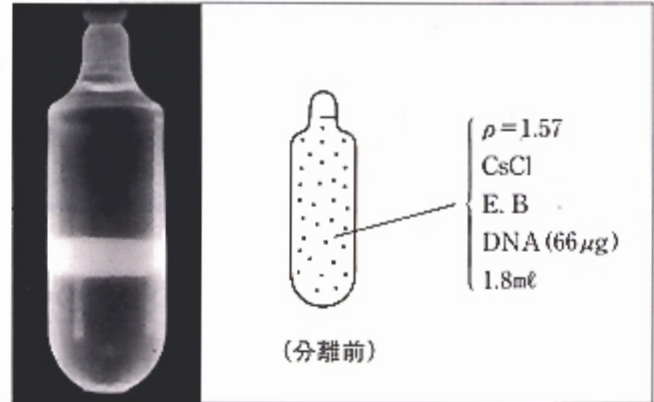


図2 100,000rpm × 4 hr, 20°C

(3) 回収率

DNA	試料量(μg)	回収量(μg)	回収率(%)	純度	加速モード	減速モード
プラスミドpBR322DNA	64	59	92	1.9	9	F
λファージDNA	66	60	91	1.8	9	F

(4) 電気泳動結果(アガロースゲル電気泳動:ゲル濃度 1.0%)

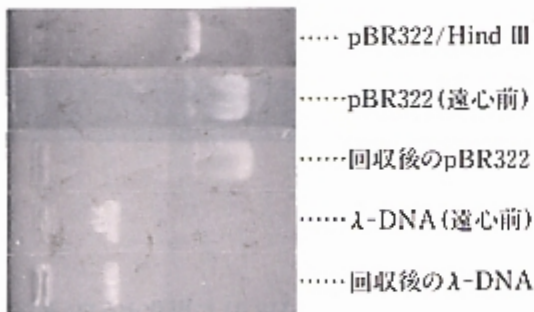


図3 電気泳動結果

日製産業株式会社

本社 東京都港区西新橋1丁目24番14号

〒105 電話 東京 (03)504-7211(ダイヤルイン)

事業所 札幌(011)221-7241

仙台(022)264-2211

水戸(0292)32-0112

筑波(0298)23-7391

横浜(045)671-5421

新潟(0252)41-3011

北陸(0764)24-3386

豊田(0565)28-5191

名古屋(052)583-5841

京都(075)241-1591

大阪(06)366-2551

四国(0878)62-3391

岡山(0864)25-1316

広島(082)221-4514

九州(092)721-3501

沖縄(0988)78-1311

日立互機株式会社

本社工場 〒312 茨城県勝田市武田1060番地 電話 勝田 (0292)73-8111(大代表)