

題目 プラスミドpBR322DNAの分離条件の検討
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pBR322 DNAの分離を行う際の条件について検討を行いました。試料はプラスミドpBR322 DNA(ニッポン・ジーン製 CODE No.315-00446)とpBR322/Hind III (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.製、和光純薬 CODE No.562-01013)を混合して用いました。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ました。

RP100ATロータに2PAシールチューブを用い100,000rpmで遠心した場合、下層(pBR322)と上層(pBR322/Hind III)の分離層が接近しています。(図2)そこで、この2つの分離層を離し、分取操作を容易にするための条件を検討しました。このロータに2PAシールチューブを用いた場合、遠心前の平均密度 $\rho = 1.57$ のとき、100,000rpmで遠心後に形成する密度勾配の範囲は $\rho = 1.32 \sim 1.82$ となります。しかし、85,000rpmに回転数を下げると密度勾配の範囲は狭くなり、 $\rho = 1.39 \sim 1.75$ となります。図1に示すように回転数を下げて形成する密度勾配の範囲を狭くすることにより、上層と下層の分離層の距離を大きくすることができます。結果を図3に示します。

しかし、回転数を下げすぎると分離層の密度が低くなり拡散してくるため、適度な回転数を選定する必要があります。本実験からRP100ATロータに2PAシールチューブを用いた、プラスミドpBR322 DNAの分離の場合、85,000rpm程度が至適回転数と考えられます。

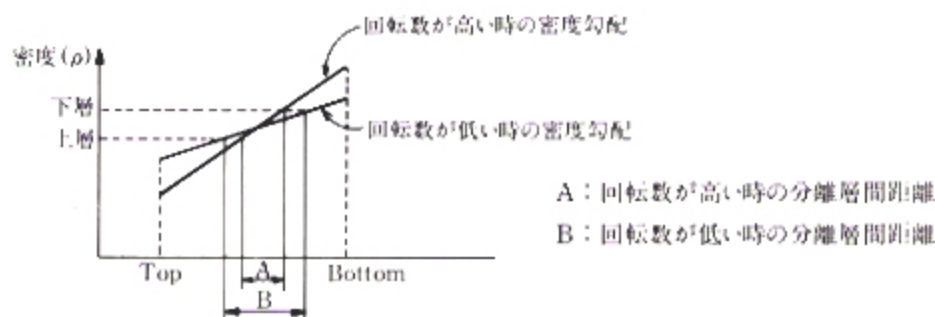


図1 形成する密度勾配の範囲と分離層間距離

分離条件

(1) 試料調製法

約30 μ gのpBR322及び約20 μ gのpBR322/Hind IIIを含むTE緩衝液1.56ml(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に1.57gの塩化セシウムを溶解し、20 μ l(10mg/ml)の臭化エチジウム(E. B)を添加して調製しました。(平均密度 $\rho = 1.57$ g/cm³)

(2) 使用チューブ

2PAシールチューブ

(3) 遠心分離条件

実験No.	回転数 (rpm)	遠心時間	温度(°C)	加速モード	減速モード	結果
1	100,000	オーバーナイト(10時間以上)	20	G	F	図2
2	85,000	オーバーナイト(10時間以上)	20	G	F	図3

分離結果

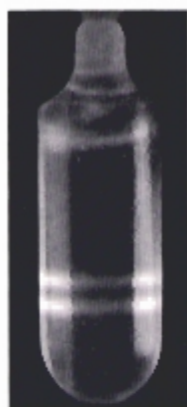


図2 100,000rpm × 13hr. 20°C

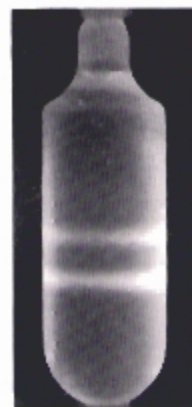


図3 85,000rpm × 13hr. 20°C

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)