



HIMAC APPLICATION

No.10 APRIL 1988

- 題目 パーティカルロータを用いたプラスミドDNAの分離実験
- 機種 分離用小形超遠心機CSシリーズ用RP120VT, RP100VTパーティカルロータ
- 概要 RP120VTパーティカルロータ, 120,000rpmでclosed circular DNA(プラスミドDNA)とlinear DNA(DNA断片)を2.5時間で分離した例

CS120形分離用小形超遠心機に最高回転数120,000rpm、最大遠心加速度 $500,000 \times g$ のRP120VTパーティカルロータ及び最高回転数100,000rpm、最大遠心加速度 $400,000 \times g$ のRP100VTパーティカルロータを用いてプラスミドDNAの分離実験を行い、それぞれのロータによるclosed circular DNAとlinear DNAの分離状況について検討しました。試料として、プラスミドpBR322 DNA(ニッポン・ジーン製 CODE No.314-00416)とpBR322/Hind IIIを用い、塩化セシウム-エチジウムブロマイドの均一液による密度勾配沈降平衡法(Isopycnic centrifugation)により行いました。

パーティカルロータは沈降距離が他のロータに比較して短く、しかも、 $500,000 \times g$ (RP120VT)あるいは $400,000 \times g$ (RP100VT)の遠心力が得られるため、短時間での分離が可能となります。最高回転数120,000rpmのRP120VTで2.5時間、最高回転数100,000rpmのRP100VTで3.5時間で分離ができました。

分離結果を図1、図2に示します。これらの結果から、RP120VTパーティカルロータによる120,000rpmでの場合の方がRP100VT、100,000rpmの場合より約1mmバンド間距離の接近が認められます(約5mm→約4mm)。しかし、この距離はRP100ATアングルロータを用いた場合の85,000rpmでの分離時の距離とはほぼ同じであることから、その後の抽出操作の防げとなるものではありません。

また、パーティカルロータを用いた場合、RNAがチューブの内壁に付着し抽出操作の防げとなることがあります。これを防ぐために、パーティカルロータでの遠心前にあらかじめRNAの含有量を低下させておくことが必要となる場合があります。RNAの除去法としては、次の2つの方法が知られています。

1. RNaseを用いRNAを分解し除去する。
2. 塩化セシウムを所定量よりも5%程多く加え、0°Cに1時間放置する。その後10,000rpm20分、0~5°Cで遠心し、RNAの多くを沈澱として除去し、上清を超遠心試料とする。

さらに、設定温度を10~15°Cとします。(設定温度を下げるとバンドの形成位置が上方へシフトします。)これは、温度を下げることにより、塩化セシウムの平均密度が上がり、それにともないプラスミドDNAのバンド形成位置も上方にシフトし、チューブ内壁に付着したRNAが剥離してプラスミドDNA中に混入することを防止できるからです。

このようにして、上記RNA除去法では"2"、設定温度15°Cにてパーティカルロータにより分離した例を「HIMAC APPLICATION No.11」に示します。これは、試料としてプラスミドpUC19DNAを持つ大腸菌JM83から煮沸法により得られた粗プラスミド分画を用いた例です。

分離条件

(1) 遠心分離条件

実験No.	ロータ	回転数(rpm)	遠心時間(hr)	温度(°C)	加速モード	減速モード	結果
1	RP120VT	120,000	2.5	15	9	7	図1
2	RP100VT	100,000	3.5	15	9	7	図2

(2) 使用チューブ

いずれの実験も2PAシールチューブ

(3) 試料調製法

約30 μ gのpBR322と約20 μ gのpBR322/Hind IIIを含むTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)1mlに塩化セシウムを1gの割合となるように溶解し、エチジウムブロマイド(10mg/ml)を20 μ l加え、2PAシールチューブに全量を充填します。(この場合、DNAを含むTE緩衝液の量は1.4ml程度が適当です。)次にあらかじめTE緩衝液1mlあたり1gの塩化セシウムを溶解し作成しておいた補充液を加え、2PAシールチューブを満たします。その後、STF-1形チューブシラにて溶着し密封します。

分離結果

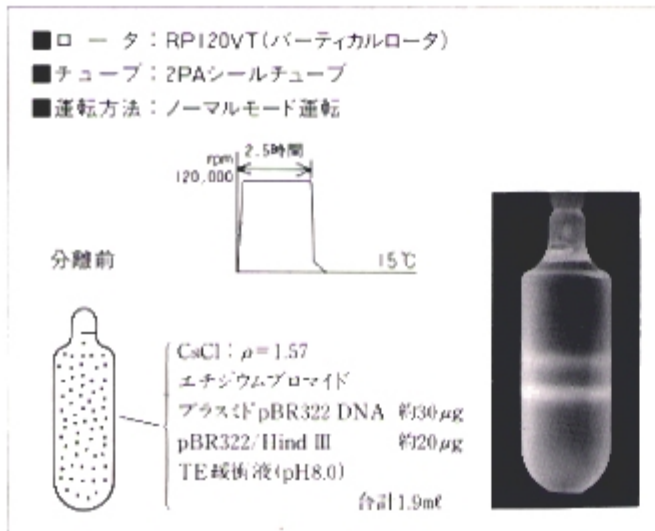


図1 RP120VTによる分離

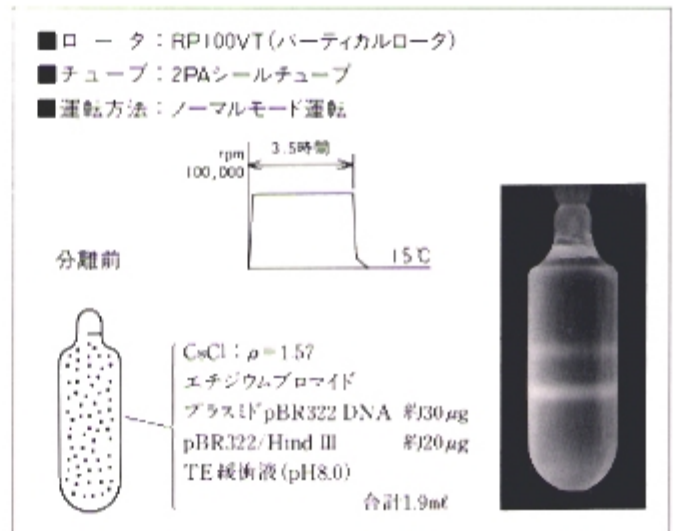


図2 RP100VTによる分離

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

筑波(0298)23-7391

北関東(0486)53-2341

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

西国(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)