



# HIMAC APPLICATION

No.11 APRIL 1988

- 題 目** パーティカルロータを用いた大腸菌からのプラスミドDNAの分離
- 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で大腸菌からプラスミドpUC19 DNA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、大腸菌を処理して得た粗プラスミド分画からプラスミドDNAの分離を行いました。分離条件については「HIMAC APPLICATION No.10」で検討した内容を適用し、RP120VTでは120,000rpm $\times$ 2.5時間、15°Cまた、RP100VTでは100,000rpm $\times$ 3.5時間、15°Cで行いました。試料はプラスミドpUC19 DNAを持つ大腸菌JM83を煮沸法<sup>1)</sup>により粗精製し得ました。また、RNAの事前除去を「HIMAC APPLICATION No.10」の中の除去法2により行いました。

分離結果を図1、図2に示します。上層が染色体DNA、下層がプラスミドpUC19 DNA、底部はRNAです。大腸菌などの菌体からプラスミドDNAを抽出する際の処理法としては、アルカリ-SDS法が現在では最も一般的な手法として知られています。しかし、ここでは、アルカリ-SDS法よりも簡便な煮沸法により処理を行いました。一般に煮沸法は他の手法に比べ、プラスミドDNAの収率、またその再現性に乏しいと言われています。しかし、本分離結果からpUC19のようにサイズの比較的小さなプラスミドDNAの場合には、遠心法と組み合わせることにより十分、実用性のある手法として用いることができるものと思われれます。

なお、遠心分離時間は、RP120VTパーティカルロータで2.5時間、RP100VTパーティカルロータで3.5時間としましたが、もう少し長く遠心した方がバンドの密度が高くなり、抽出操作が行い易くなる場合があります。しかし、この場合、RP120VTで4時間、RP100VTでも6時間以内で十分です。オーバーナイト運転でも問題ありませんが、2本のバンドは若干、接近する傾向にあります。

また、一度、分離層の形成された試料をさらに遠心する場合は、加速モードを“5”に設定して下さい。この時、チューブの向きは2回とも同じ向きとなる様に挿入して下さい。これは、一度チューブの壁面に付着したRNAを移動させることにより生ずる分離層の乱れや、RNAの混入を防止するためです。

## 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

いずれも2PAシールチューブ

### (3) 試料調製法

pUC19を含むE.coli JM83の一夜振盪培養液70mlから分離した菌体を煮沸法によって処理し、得られた粗プラスミド画分を2mlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に溶解後、塩化セシウム2.18g、エチジウムブロマイド(10mg/ml)200 $\mu$ lを加えます。0℃、1時間放置後、高速冷却遠心機(例;遠心機:CR20B2、ロータ:RPR20-3アングルロータ、RPRS15スイングロータなど)にて10,000rpm×20分、0℃で遠心します。(CR15B形微量高速冷却遠心機などの場合はアングルロータで13,000rpm×20分、0℃)その後、上清を2本の2PAシールチューブに分け、あらかじめ作成しておいた補充液(TE緩衝液1mlあたり、塩化セシウム1gを溶解したもの)を加えチューブを満たします。(この時にバランス調整も行います。)その後、S TF-1形チューブシーラにて溶着し密封します。

## 分離結果

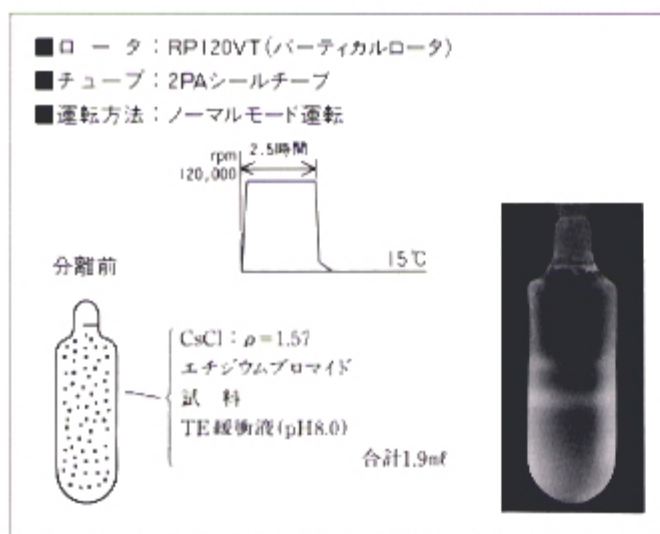


図1 RPI20VTによる分離

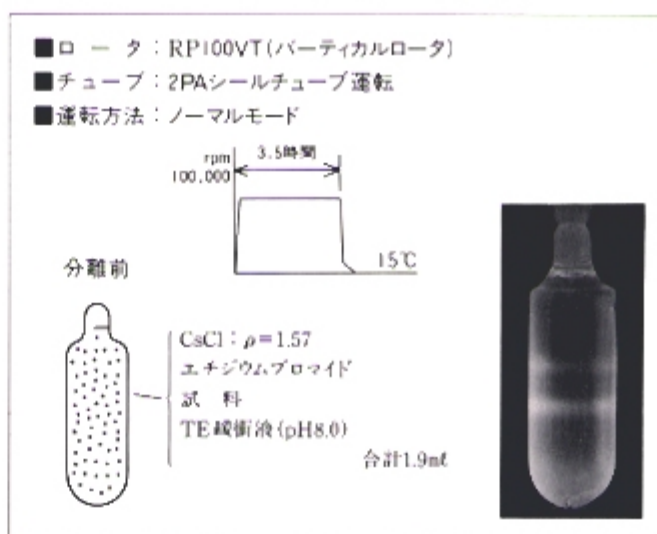


図2 RP100VTによる分離

1) 岡田古美、猪飼雄子訳“組換えDNA実験”東京化学同人(1987)

## 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	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)