



# HIMAC APPLICATION

No.12 APRIL 1988

- 題目 自動ステップモード運転によるプラスミドDNAの迅速分離
- 機種 分離用小形超遠心機CSシリーズ用RP120AT, RP100ATアングルロータ
- 概要 RP120ATアングルロータを用いステップモード運転によりclosed circular DNA(プラスミドDNA)とlinear DNA(DNA断片)を3.5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 $600,000 \times g$ のRP120ATアングルロータ及び最高回転数100,000rpm、最大遠心加速度 $436,000 \times g$ のRP100ATアングルロータを用い、CSシリーズに標準装備された自動ステップモード運転によるプラスミド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。

一般にアングルロータの場合、大きな遠心力でプラスミドDNAの分離を行うと、バンドの密度は高くなるもののclosed circular DNAのバンドとlinear DNAのバンドが接近し、その後の抽出操作の際に不都合を生じる場合があります。このため、ある程度低い回転数で長時間運転することにより比較的バンド密度が高く、2つのバンド間隔が比較的広くなるような分離を行う必要がありました。(HIMAC APPLICATION No.6参照)

しかし、分離用小形超遠心機としては、初めて採用されたステップモード機能と最大遠心加速度 $600,000 \times g$ という大きな遠心力の実現により、塩化セシウム-エチジウムブロマイドの均一液を用いた、アングルロータによる分離においても4時間以内の分離が可能となりました。

図1にRP120ATアングルロータ、120,000rpm $\times$ 2.5時間+85,000rpm $\times$ 1時間、合計3.5時間の結果を示します。図2にはRP100ATアングルロータ、100,000rpm $\times$ 4時間+85,000rpm $\times$ 1時間、合計5時間の結果を示します。図1、図2の結果からはほぼ同等の結果がRP120ATを用いることによりRP100ATの70%の時間で得ることができました。このことは、120,000rpmの超高速回転によって得られる高い遠心加速度により、一層の分離時間の短縮化が実現できることを示しています。このRP120ATでの実験結果を実際の試料に応用した場合、試料条件の違いにより120,000rpmでの遠心時間を3時間と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。一般に最高回転数での遠心時間は長くする方が分離結果は良くなりますが、RP120ATでは、120,000rpmでの遠心時間は3.5時間以内、RP100ATでは100,000rpmでの遠心時間は5時間以内で十分です。また、第2ステップの遠心時間はいずれの場合も85,000rpm、1時間です。ただし、RP120ATの場合、本実験で用いた塩化セシウムの濃度(約50%、 $\rho = 1.57$ )での、120,000rpmで12時間以上の遠心は行わないで下さい。これは塩化セシウム溶液が遠心力により結晶析出限界を越え、アンバランスの原因となることがあるからです。オーバーナイト運転の場合は110,000rpm以下の回転数を設定して下さい。(ただし、プラスミドDNAの分離をオーバーナイト運転で行う時には、85,000rpmが適当です。)

## 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	RP120AT	第1ステップ	120,000	20	9	7	図1
		第2ステップ	85,000				
2	RP100AT	第1ステップ	100,000	20	9	7	図2
		第2ステップ	85,000				

### (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

いずれの実験も下記の通り行いました。

約30 $\mu$ gのpBR322と約20 $\mu$ 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、20 $\mu$ l (10mg/ml)のエチジウムブロマイドを加え、2PAシールチューブに全量を充填しました。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ました。その後、STF-1形チューブシースにて溶着し密封しました。

## 分離結果

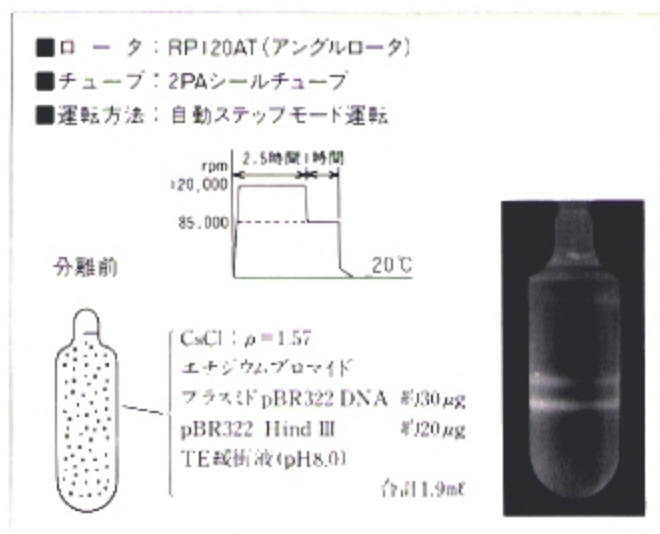


図1 RP120ATによる分離

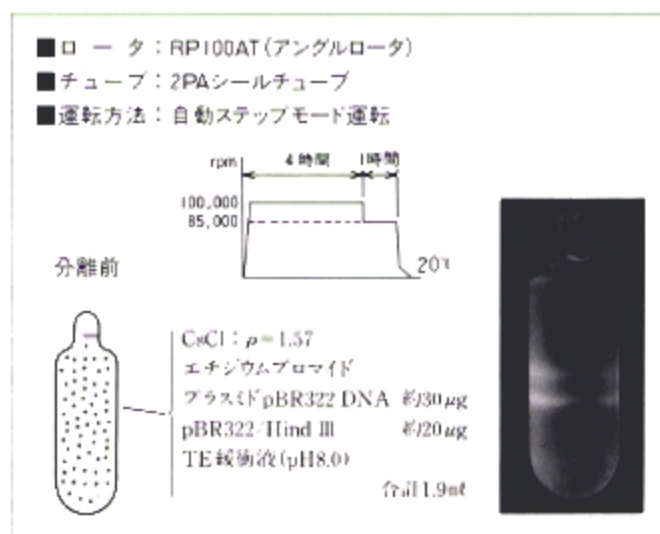


図2 RP100ATによる分離

## 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

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)