



HIMAC APPLICATION

No.13 APRIL 1988

- 題目 自動ステップモード運転による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で大腸菌からプラスミドpUC19 DNA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×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×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り、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.12」で検討した内容を適用しました。RP120ATでは、120,000rpm×2.5時間+85,000rpm×1時間、20℃、またRP100ATでは、100,000rpm×4時間+85,000rpm×1時間、20℃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¹⁾により粗精製し得ました。

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。図1、図2の結果からはほぼ同等の分離がRP120ATを用いることにより、RP100ATの70%の時間で得られました。このように、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ました。しかも、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相まって効率的な分離ができました。

なお、遠心分離時間は、RP120ATが120,000rpmで2.5時間、RP100ATが100,000rpmで4時間としましたが、プラスミドDNAの種類、濃度により、分離時間を長くした方がバンド密度が高くなり、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濃度(約50%、 $\rho=1.57$)での、120,000rpm、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で行う場合は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(℃)	加速モード	減速モード	結果	
1	RP120AT	第1ステップ	120,000	2.5	20	9	7	図1
		第2ステップ	85,000	1				
2	RP100AT	第1ステップ	100,000	4	20	9	7	図2
		第2ステップ	85,000	1				

(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

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分画を2mlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に溶解後、塩化セシウム2.08g、エチジウムブロマイド(10mg/ml)200 μ lを加えますよく、混合し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、STF-1形チューブシールにて溶着し密封します。

分離条件

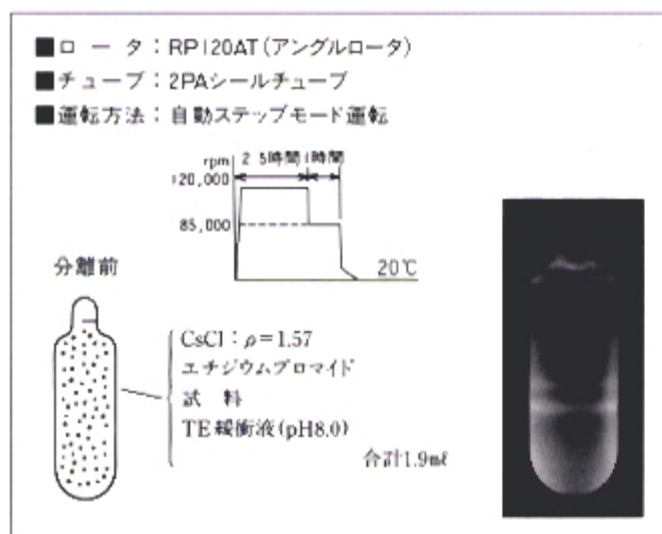


図1 RPI20ATによる分離

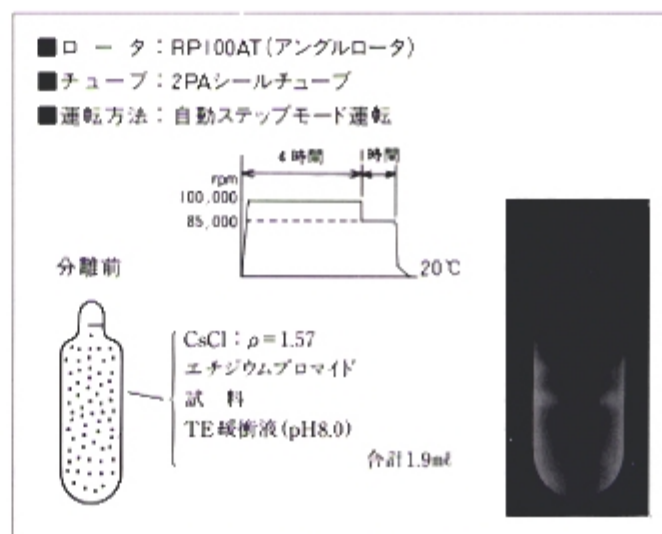


図2 RPI100ATによる分離

1) 岡田吉美, 猪飼輝子 訳 "組換えDNA実験" 東京化学同人 (1987)

日製産業株式會社

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

日立互機株式會社

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)