



HIMAC APPLICATION

No.14 APRIL 1988

- 題目 5mlチューブによるプラスミドDNAの分離実験
機種 分離用小形超遠心機CSシリーズ用RP80ATアングルロータ
概要 RP80ATアングルロータによりclosed circular DNA(プラスミドDNA)とlinear DNA(DNA断片)を分離した例

CS120形分離用小形超遠心機に最高回転数80,000rpm、最大遠心加速度401,000×gのRP80ATアングルロータを用いてプラスミドDNAの分離実験を行い、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。

これまで、分離用小形超遠心機に使用できるチューブ1本あたりの最大容量は約3.5ml(RP100AT4に3.5PAシールチューブを使用した場合)でありました。しかし、本実験に用いましたRP80ATアングルロータには、5ml用5PAシールチューブが使用でき、従来機種の超遠心機(SCPシリーズ、72シリーズなど)に依っていた分離も小形超遠心機で可能となりました。プラスミドDNAの分離を例にとると、培養液量数100mlから処理した粗プラスミド分画を1本の5PAシールチューブで精製することも可能です。しかも分離時間は15時間程度のオーバーナイト運転で十分です。

このように、RP80ATアングルロータは、小形超遠心機と従来機種の超遠心機との間にあったギャップを埋めることができ、小形超遠心機の応用範囲を大きく拡張できる画期的なロータといえます。

図1に、RP80ATアングルロータ、80,000rpm×15時間で分離した結果を示しました。下層がclosed circular DNAであるプラスミドpBR322DNA、上層はlinear DNAであるpBR322/Hind IIIです。

なお、このRP80ATアングルロータにてプラスミドDNAの分離を行う際(塩化セシウムの平均密度が1.57g/cm³の時)には、72,000rpmを越える回転数で24時間以上の遠心は行わないで下さい。塩化セシウムの結晶が析出し、アンバランスを生じる(塩化セシウムの結晶密度：3.98g/cm³)ことによる事故防止のためです。塩化セシウムの平均密度が1.57g/cm³の時には、20℃で72,000rpm以下の回転数であれば何時間遠心しても結晶析出限界には到達しません。

分離条件

(1) 遠心分離条件

回転数(rpm)	遠心時間	温度(℃)	加速モード	減速モード	結果
80,000	オーバーナイト(15時間以上24時間以内)	20	9	7	図1

(2) 使用チューブ

5PAシールチューブ

(3) 試料調製法

約100 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) 1 mlに塩化セシウムを1gの割合となる様に溶解し、50 μ l (10mg/ml)のエチジウムブロマイドを加え、5PA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3.5ml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、5PAシールチューブを満たします。その後、STF-1形チューブシースにて溶着し密封します。

分離結果

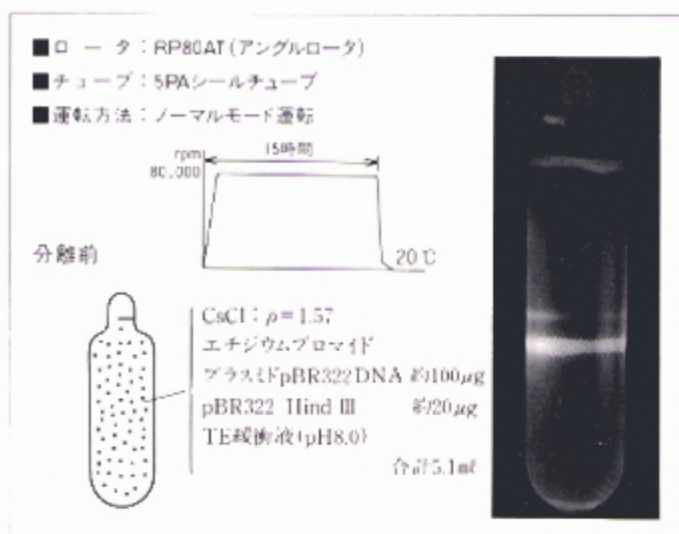


図1 RP80ATアングルロータによる分離

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)

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)