

himac APPLICATION

No.16 APRIL 1989

題目 パーティカルロータによるプラスミドDNAの分離条件の
 検討

機種 分離用超遠心機 SCP シリーズ, CP シリーズ

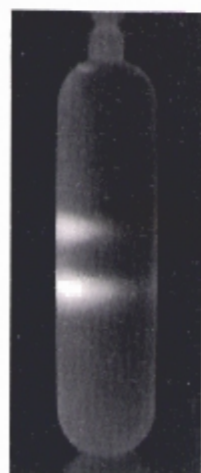
プラスミドDNAを分離する際の回転数と分離層間隔についての
 検討

塩化セシウムとエチジウムブロマイドを用いてプラスミドDNAを分離する際の回転数と直鎖状DNA, プラスミドDNAの2本の分離層間隔について、RP65VFパーティカルロータにチューブ容量5mlの5PAシールチューブを用いた場合を例に検討しました。

回転数が高くなる程、分離層はシャープになりますが2層間の距離は小さくなっていることが認められます(写真1, 2, 3より)。また、平衡状態に到達すると、その後、長時間遠心しても、分離層の状態に変化のないことが認められます(写真3, 4より)。

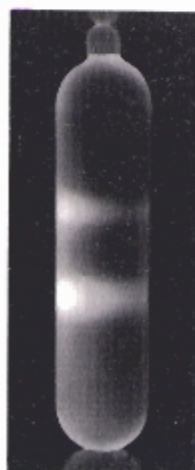
これらのことから、5PAシールチューブを用いてRP65VFパーティカルロータによりプラスミドDNAを分離するには54,000rpm程度の回転数でオーバーナイト運転により行うのが適当と考えられます。

分 離 結 果



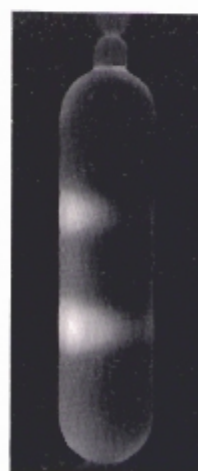
65,000min⁻¹(rpm)
 16時間
 20℃

写真1



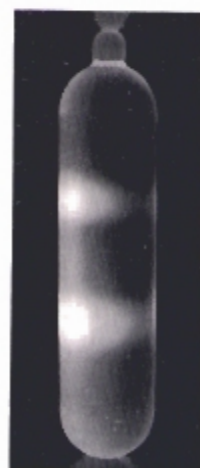
54,000min⁻¹(rpm)
 16時間
 20℃

写真2



45,000min⁻¹(rpm)
 16時間
 20℃

写真3



45,000min⁻¹(rpm)
 52時間
 20℃

写真4

注) いずれの写真も下層がプラスミド pBR322DNA であり、上層は pBR322/Hind III です。

分離条件

(1) 遠心分離条件

ロータ	回転数 (min ⁻¹ {rpm})	遠心時間 (h)	温度 (°C)	Accel.	Decel.	結果
RP65VF パーティカルロータ	65,000	16	20	SCPシリーズ「-」 CPシリーズ「9」	SCPシリーズ「5」 CPシリーズ「6」	写真1
RP65VF パーティカルロータ	54,000	16	20	同上	同上	写真2
RP65VF パーティカルロータ	45,000	16	20	同上	同上	写真3
RP65VF パーティカルロータ	45,000	52	20	同上	同上	写真4

なお、この結果は、

カーボンファイバー製パーティカルロータ：RP55VF2, RP67VF

チタン合金製パーティカルロータ：RP65VT2, RPV65T

にそのまま適用できます。

また、チタン合金製パーティカルロータRP83VTの場合、60,000min⁻¹ {rpm} で上記RP65VFパーティカルロータにおける54,000min⁻¹ {rpm} での分離と同じ結果が得られます。

(2) 使用チューブ

5PA シールチューブ

(3) 試料調製法

チューブ1本につき、DNAを含むTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 3.5mlに塩化セシウム3.56gを溶解し、エチジウムブロマイド(10mg/ml) 0.1ml加えたものを用意します。十分に攪拌後、5PAシールチューブに充填します。次に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。その後、STF-1形チューブシーラにて密封します。

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)
0120-024125