

himac APPLICATION

No.22 JULY 1989

題目 CS120形日立分離用小形超遠心機によるプラスミドDNAの迅速分離

機種 小形超遠心機CSシリーズ

1. 緒言

組換えDNAの研究において、塩化セシウムと臭化エチジウムを用いた超遠心機によるプラスミドDNAの単離・精製（密度勾配沈降平衡法）は従来、非常に時間の要するものとされていた。12ml用チューブの使用できるアングルロータであるRP65T相当のものでは、 $45,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ で36時間程度、つまり1日半の遠心が必要とされている。¹⁾その後、小形超遠心機の出現により試料量が2ml程度の少量ながら $100,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ で5時間の遠心でプラスミドDNAの分離が可能であることが報告された。²⁾

そこで、ここでは新しく開発された、最高回転数 $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、最大遠心加速度 $600,000\times G$ まで得られるCS120形小形超遠心機を用い、いくつかの手法を加えることによりプラスミドDNAの分離時間を更に短縮する方法について検討した。

2. 実験及び方法

実験はPR120AT形アングルロータとRP120VT形パーティカルロータに2ml用2PAシールチューブを使用し行った。塩化セシウムの密度勾配の測定は、トリス塩酸緩衝液(pH8.0)により所定濃度に調製した塩化セシウム溶液^{*1}を所定時間遠心後、チューブ底に22Gの注射針を刺し、2滴（約 $75\mu\ell$ ）ずつ滴下により分画し、アッペル屈折率計により行った。プラスミドDNAの分離には大腸菌JM109にプラスミドpUC19DNAを移入し、50～100mlのL-Broth液で37℃一夜培養後アルカリSDS法により抽出した粗プラスミド画分を用いた。塩化セシウムの平均密度は $1.57\text{g}/\text{cm}^3$ となるように調製し行った^{*2}（塩化セシウムの平均濃度：49.5w/w%）。

3. 結果及び考察

3-1. RP120AT形アングルロータによるステップ勾配遠心法

一般に密度勾配沈降平衡法の場合、ステップ密度勾配を用いることにより遠心時間を短縮できることが知られている。³⁾そこで、このステップ勾配遠心法と呼ばれる手法をRP120AT形アングルロータに適用した。

塩化セシウムの密度勾配の形成について測定した結果をFig. 1に示した。2種類の密度液（ $\rho = 1.39$ 、 $\rho = 1.75$ ）を重層したステップ勾配遠心法により $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2時間遠心後の密度勾配（○）と、塩化セシウムの均一濃度の液を $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、12時間遠心後の密度勾配（●）が、ほぼ同様の結果を与えたことから、2種類の密度液を用いたステップ勾配を形成させる時間が短縮されていることが示唆され、短時間での分離が期待される。

*1:参考資料1, *2:参考資料2

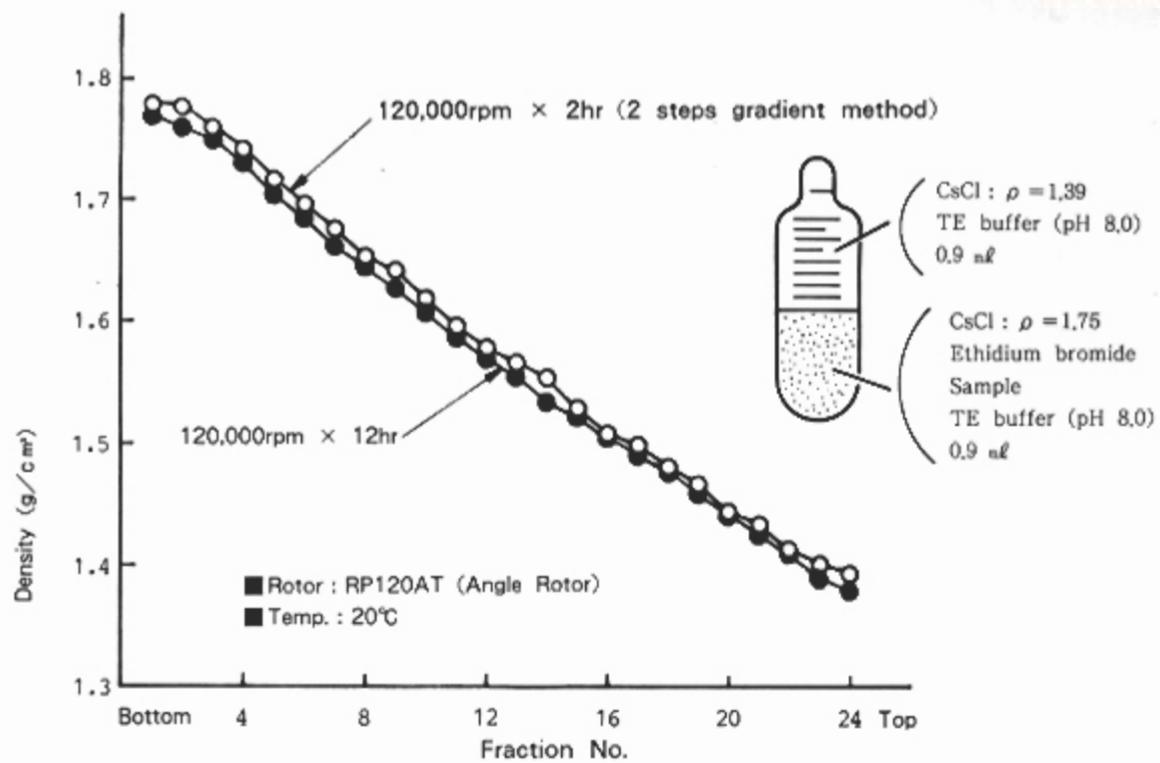


Fig. 1 ステップ勾配遠心後の密度勾配の比較

そこで、この条件で分離した例を Fig. 2 に示した。2 本の分離層が認められ、下部層がプラスミド DNA (pUC19) であり、上部層は染色体 DNA などに由来する直鎖状 DNA であることが知られている。また、チューブ底には RNA の沈殿が認められた。以上のことから RP120AT 形アングルローターを用い、ステップ勾配遠心法によると、 $120,000 \text{ min}^{-1}$ (rpm)、2 時間という非常に短い時間でのプラスミド DNA の分離が可能であると考えられる。

これは、2 種類の密度液を用いることにより密度勾配形成時間が短縮され、また、最大 $600,000 \times g$ という大きな遠心力によって迅速な DNA 層の形成と RNA の沈降が可能となり、短時間での分離ができたものと考えられる。

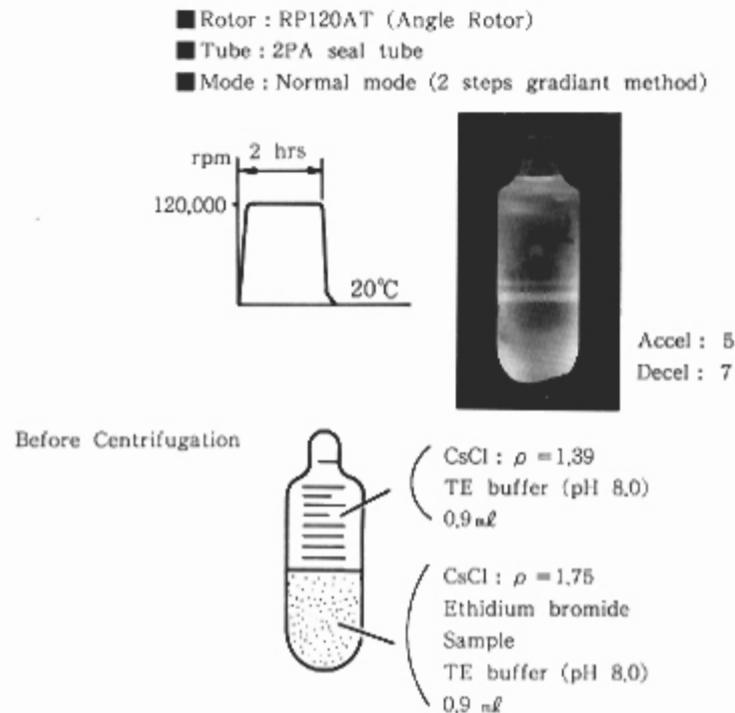


Fig. 2 ステップ勾配遠心法によるプラスミド DNA の分離例

3-2. RP120VT形パーティカルロータによる場合

RP120VT形パーティカルロータによる場合の密度勾配の形成について測定した結果をFig. 3に示した。120,000min⁻¹{rpm}、2.5時間遠心後の結果(●)と、120,000min⁻¹{rpm}、2.5時間遠心後の結果(○)が、ほぼ同様の勾配を示していることから、パーティカルロータの場合は密度勾配の到達距離が短いため、ステップ勾配などの密度勾配液に対する調製を行わない、均一濃度の液であっても、短時間で密度勾配が形成されたものと考えられる。このため、パーティカルロータを用いた場合にも分離時間の短縮化が期待される。

この条件で分離した例をFig. 4に示した。プラスミドDNA層と染色体DNAなどに由来する直鎖状DNA層の2本の分離層が認められ、チューブの底にはRNAの沈殿が認められた。また、チューブ壁面の一部にはRNAに由来すると思われる付着物が認められた。

これらのことから、CS120形分離用小形超遠心機による120,000min⁻¹{rpm}という高い回転数のもたらす大きな遠心力により、均一濃度での試料であっても2.5時間での分離が可能となったものと考えられる。また、パーティカルロータによる場合、沈殿となるRNAがチューブ壁に付着することがあり、DNA層へのRNAの混入を防止するため、予めRNAを除去しておく事が望ましいものと考えられる。^{*3}

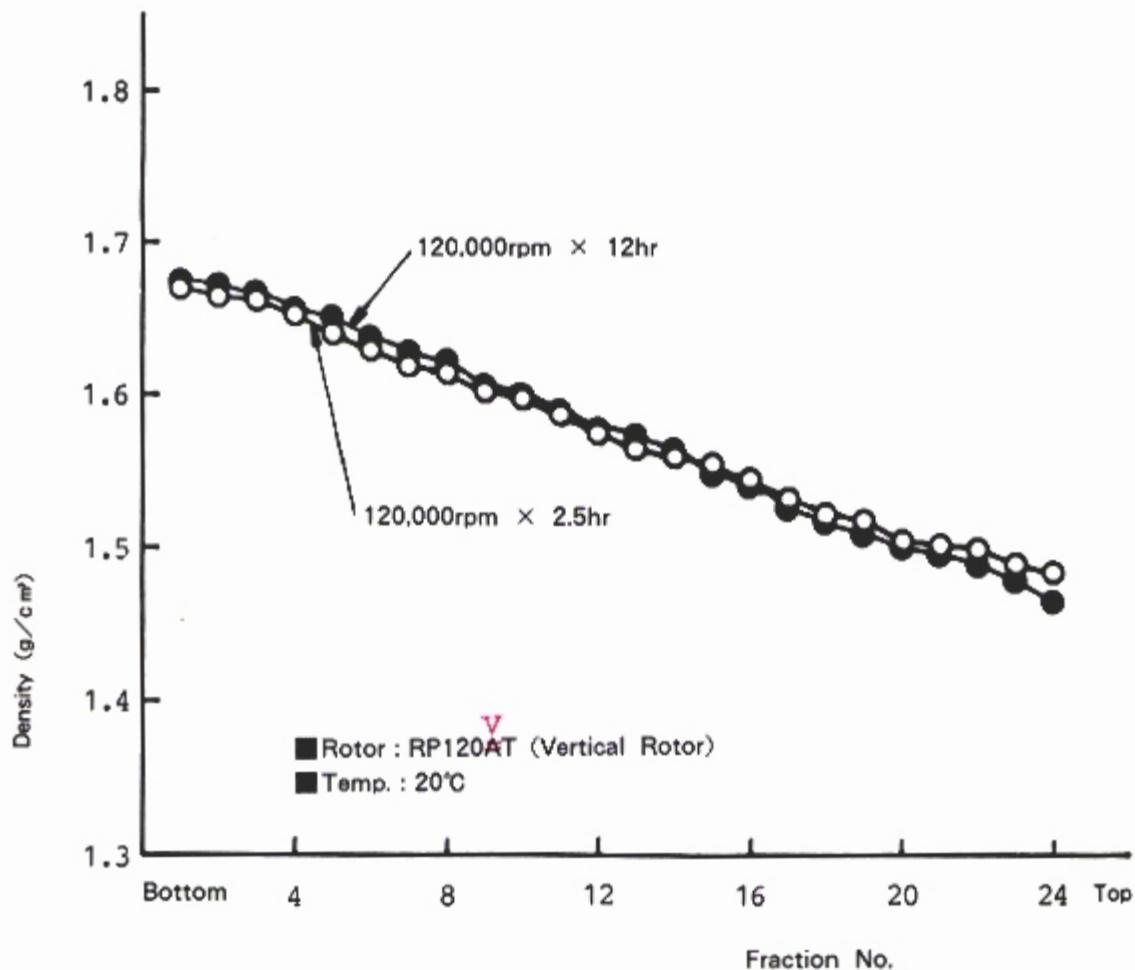


Fig. 3 RP120VT形パーティカルロータによる場合の密度勾配

*3: 参考資料3

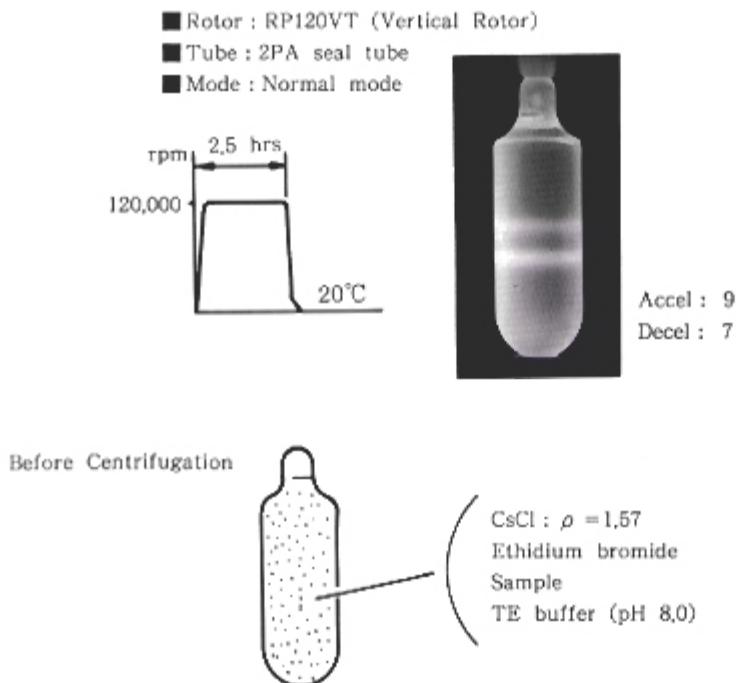


Fig. 4 RP120VT形パーティカルロータによるプラスミドDNAの分離例

3-3. RP120AT形アングルロータによるステップモード運転法

本実験に使用している最大チューブ容量2mℓのアングルロータにより、均一濃度の試料をオーバーナイト運転などの長時間の遠心により分離する場合には、 $100,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 以上の高い回転数よりも $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 程度の回転数のほうがプラスミドDNAの分離層と染色体DNAなどに由来する直鎖状DNAの分離層との間隔が広がり⁴⁾、遠心後の抽出操作が行い易くなる。しかし、この場合は10時間以上、通常12時間程度の長時間の遠心を必要とする。このような場合、密度勾配沈降平衡法による分離においては、最初高い回転数で遠心し、その後低い回転数に変えて遠心するステップモード運転法(Density gradient relaxation)により分離時間を短縮できることが報告されている。⁵⁾

この場合、第一ステップに $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ を選択した時その遠心時間を知る必要がある。そこで $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ の場合、 $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ で12時間遠心した時に形成する密度勾配をたち上げるために必要な遠心時間を調べた。Fig.5にRP120AT形アングルロータを用い $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、12時間遠心後(●)と、 $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間遠心後(○)に形成された密度勾配の測定結果を示した。これらの二つの密度勾配が比較的近い結果を与えたため、第1ステップは $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間とし、第2ステップは $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ とした。

次に、Fig. 6に第2ステップの時間を1時間とした場合、つまり $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間遠心し、その後、回転数を下げ $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ で1時間遠心した後の密度勾配の測定結果(▲)と、 $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、12時間(●)、 $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間(△)、 $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、12時間(○)の場合との比較を示した。これらの結果から、第1ステップである $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間の遠心により形成した勾配が第2ステップの $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、1時間の遠心により若干緩和され、 $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ で12時間の遠心によって形成する密度勾配に、より近付いていることが認められる。

以上より、第1ステップを $120,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、2.5時間、第2ステップを $85,000\text{min}^{-1}\{\text{rpm}\}$ 、1時間、合計3.5時間のステップモード運転法により分離できることが期待される。

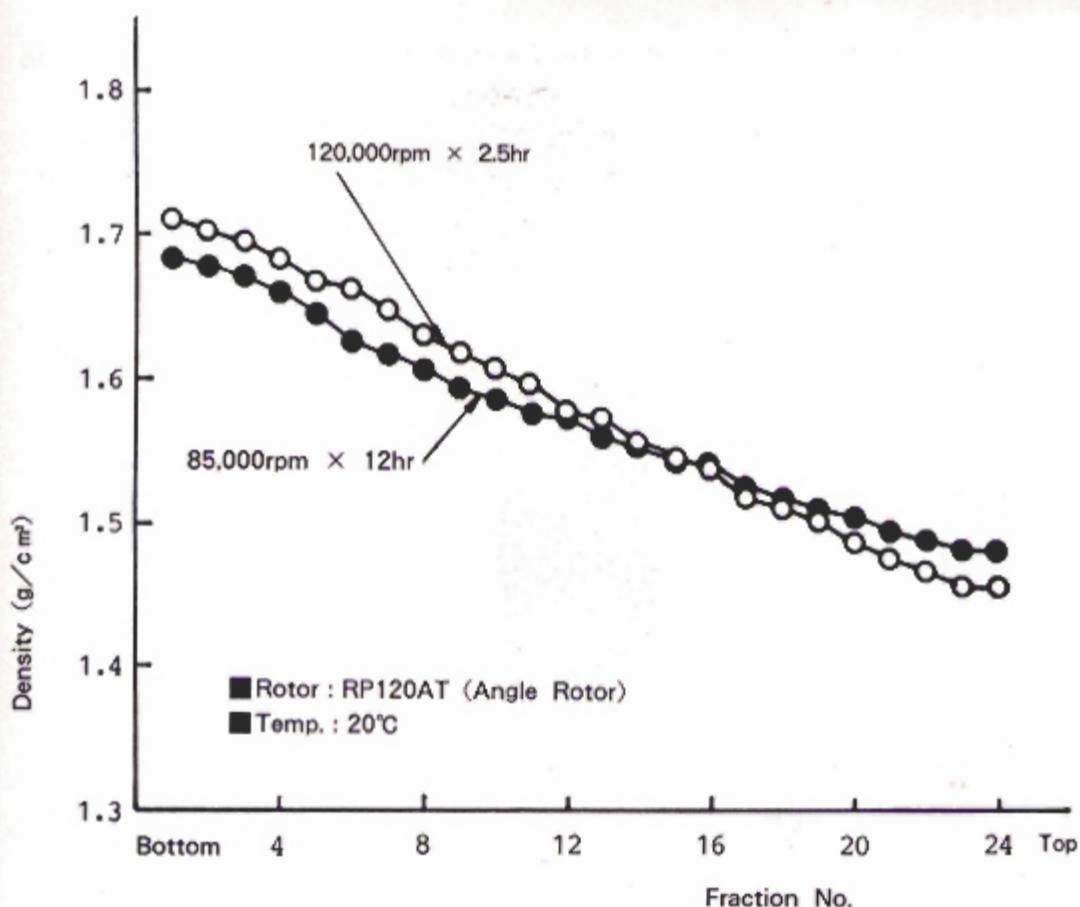


Fig. 5 RP120AT形アングルロータによる場合の密度勾配

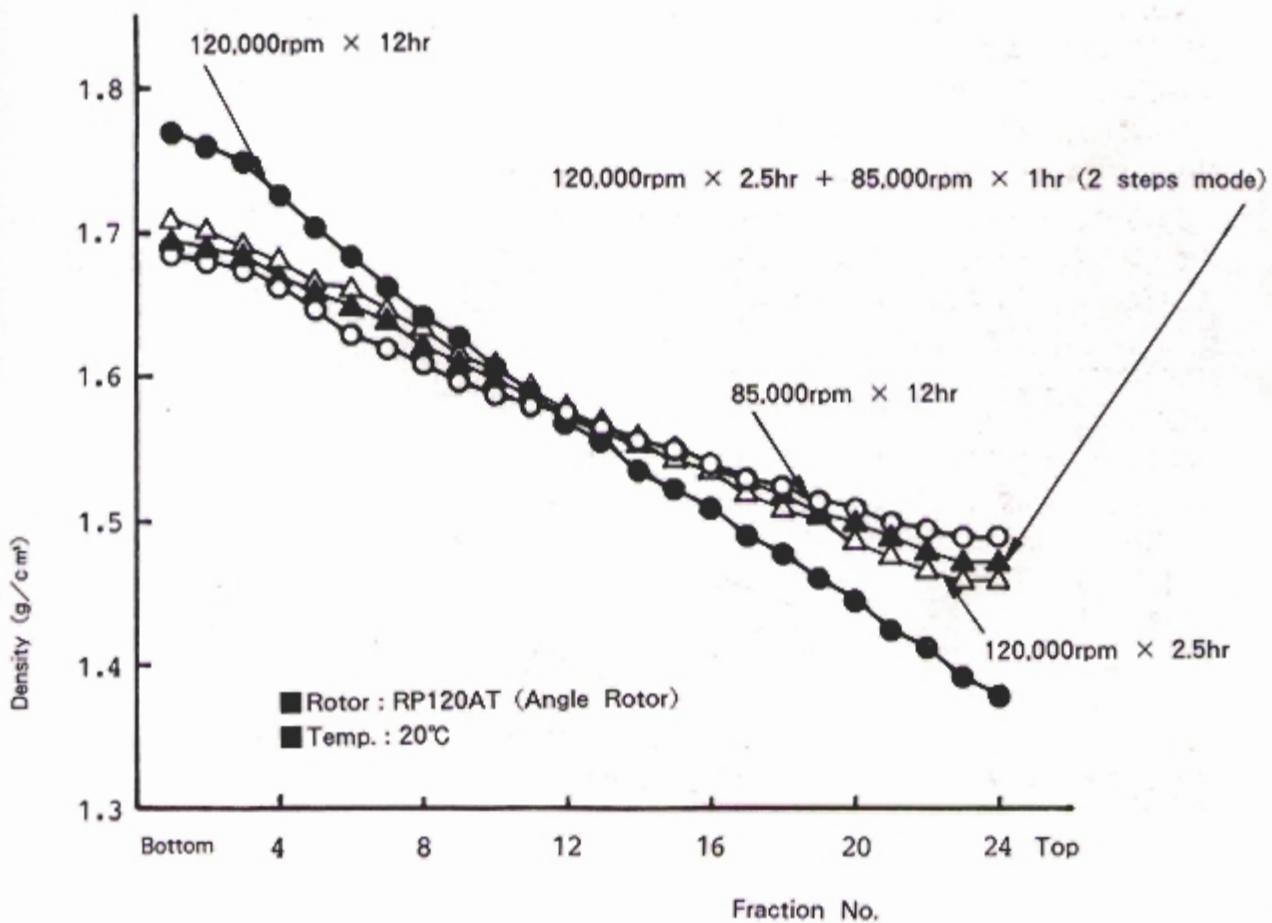


Fig. 6 ステップモード運転法による場合の密度勾配の比較

この条件により分離した例をFig. 7に示した。プラスミドDNAの分離層と、染色体DNAなどに由来する直鎖状DNAの分離層の形成が認められ、チューブ底にはRNAの沈殿が認められた。

これらの結果から、ステップモード運転法による場合、第1ステップの高い回転数で第2ステップの回転数で平衡となる勾配まで素早く密度勾配をたち上げ、その後、第2ステップの遠心で分離層を形成させることにより分離時間を短縮できたものと考えられる。

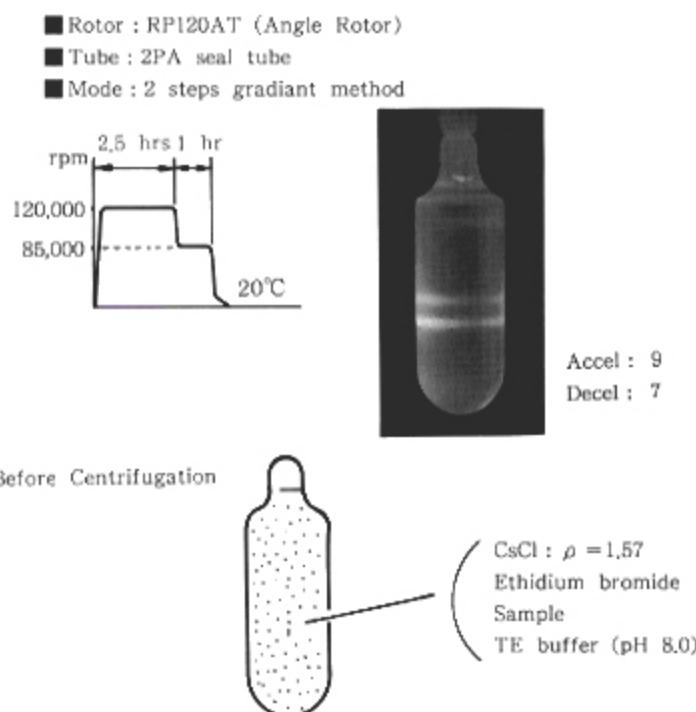


Fig. 7 ステップモード運転法によるプラスミドDNAの分離例

4. 結論

CS120形日立分離用小形超遠心機によるプラスミドDNAの分離時間について検討した。

RP120AT形アングルロータを用いた場合、ステップ勾配遠心法によれば2時間、ステップモード運転法によれば3.5時間での分離が可能であり、一方、RP120VT形パーティカルロータを用いた場合は均一濃度の試料であっても2.5時間での分離が可能であることがわかった。

また、ステップモード運転法による分離の場合、高い回転数で素早く密度勾配をたち上げ、その後、そのたち上がった勾配が平衡状態となるような回転数で、分離層を形成させることにより分離時間の短縮化がはかれたものと考えられる。

参考資料1：塩化セシウム溶液の調製法（TE Buffer 1mℓ当たりの塩化セシウムの量）

密度 (g/cm ³)	塩化セシウム (g)	濃度 (w/w%)
1.39	0.61	37.9
1.57	0.98	49.5
1.75	1.41	58.5

参考資料2：プラスミドDNA分離のための密度液（試料）の調製法

密度 (g/cm ³)	TE Buffer (pH 8.0) (mL)	CsCl (g)	臭化エチジウム (10mg/mL) (μg)	備考
1.57	1.0	1.04	100	注1
1.75	0.55	0.92	100	注2

注1：2PA シールチューブ1本あたりの量を示す。また、不足分は予め作成しておいた補充液（TE Buffer 1mℓあたり塩化セシウム1gを溶解したもの）を加え、十分に攪拌する。

注2：2PA シールチューブ1本あたりの量を示す。また、残りの液はρ = 1.39の塩化セシウム溶液(0.9mL)となり、2種類の密度液は混合しないように注意する。

参考資料3：RNA除去法の一例

塩化セシウムを所定量より約5%多く加え、0℃で約1時間放置する。その後、10,000 min⁻¹{rpm}、20分、0~5℃で遠心し、RNAの多くを沈殿として除去し、上清を超遠心試料とする。⁶⁾

(参考文献)

- 1) T.Maniatis, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 2) Donald P.WEEKS, et al., Anal. Biochm., 152, 376~385 (1986).
- 3) S.J.Garger, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 117, 835~842 (1983).
- 4) HIMAC APPLICATION, No.6, Hitachi Koki Co.,Ltd. (1987).
- 5) Anet R., Strayer D.R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 328~334 (1969).
- 6) HIMAC APPLICATION, No.10, Hitachi Koki Co.,Ltd. (1988).

■ロータ仕様

ロータ	材質	最高回転数 (rpm)	最大過心加速度 ($\times g$)	k ファクタ	標準チューブ容量 (mL) ×本数 (本)
アングル	RP120AT	チタン合金	120,000	600,000	9 1.0 × 8
	RP100AT	チタン合金	100,000	436,000	11.7 1.0 × 8
	RP100AT2	チタン合金	100,000	436,000	11.8 0.5 × 14
	RP100AT3	チタン合金	100,000	436,000	6.8 0.2 × 20
	RP100AT4	チタン合金	100,000	541,000	18.5 3.0 × 6
	RP80AT	チタン合金	80,000	401,000	33.5 4.0 × 8
	RP70AT	チタン合金	70,000	307,000	32 0.5 × 20
パーティカル	RP120VT	チタン合金	120,000	500,000	8 2.0 × 8
	RP100VT	チタン合金	100,000	400,000	9 2.0 × 8
スイング	RP55S	ボディ：アルミ合金 パケット：チタン合金	55,000	259,000	49 2.2 × 4

■チューブ仕様

ロータ	チューブ名称	容量	材質	最高回転数	別途注文品
RP120AT	IPCチューブ	1.0mL	ポリカーボネート	120,000 rpm	
	* 2PA シールチューブ	2.0	ポリアロマー	120,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G) スペースキップ (C) × 8
	* 1.5PA シールチューブ	1.5	ポリアロマー	120,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G2) スペースキップ (D) × 8
RP100AT	IPCチューブ	1.0	ポリカーボネート	100,000	
	* 2PA シールチューブ	2.0	ポリアロマー	100,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G) スペースキップ (C) × 8
	* 1.5PA シールチューブ	1.5	ポリアロマー	100,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G2) スペースキップ (D) × 8
RP100AT2	0.5PCチューブ	0.5	ポリカーボネート	100,000	
	0.5PAチューブ	0.5	ポリアロマー	80,000	
RP100AT3	0.23PCチューブ	0.23	ポリカーボネート	100,000	
	0.23PAチューブ	0.23	ポリアロマー	80,000	
RP100AT4	3PCチューブ	3.0	ポリカーボネート	100,000	
	* 3.5PA シールチューブ	3.5	ポリアロマー	100,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (B2) スペースキップ (E) × 5
	* 1.5スピツチューブ (市販品)	1.0	ポリプロピレン	50,000	LDSアダプタ × 5
RP80AT	4PCチューブ	4.0	ポリカーボネート	80,000	
	* 5PA シールチューブ	5.0	ポリアロマー	80,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (B) スペースキップ (B4) × 5
RP70AT	0.5PCチューブ (B)	0.5	ポリカーボネート	70,000	
RP120VT	* 2PA シールチューブ	2.0	ポリアロマー	120,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G) × 1
	* 1.5PA シールチューブ	1.5	ポリアロマー	120,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G2) スペースキップ (B) × 8
RP100VT	* 2PA シールチューブ	2.0	ポリアロマー	100,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G) × 1
	* 1.5PA シールチューブ	1.5	ポリアロマー	100,000	STF - 1形チューブシーラ チューブラック (G2) スペースキップ (B) × 8
RP55S	2.2PAチューブ	2.2	ポリアロマー	55,000	
	2.2CNチューブ	2.2	ニトロセルロース	55,000	
	2.2PETチューブ	2.2	ポリエチレン テレフタレート	55,000	
	1PCチューブ	1.4	ポリカーボネート	55,000	

注意) 1. ■のチューブは各ロータの標準付属チューブです。

2. 印のチューブを使用する場合は「別途注文品」欄に示す付属品が必要です。合せてご注文下さい。

尚、当資料に関する御質問等がございましたら日立工機(株)精機事業部応用開発担当 森田宛ご連絡下さい。

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