

# himac APPLICATION

No.25 OCTOBER 1989

- 題目** ステップ勾配遠心法によるプラスミドDNAの迅速分離  
**機種** SCP85H2形日立分離用超遠心機  
 SRP83VTパーティカルロータ  
**概要** チューブ容量5mlのSRP83VTパーティカルロータを用いて、ステップ勾配遠心法により、プラスミドDNAの分離を1時間で行った例

プラスミドDNAは、大腸菌を宿主とする組換えDNA実験のベクターとして広く用いられています。このプラスミドDNAであるpUC19を移入された大腸菌より得られた粗プラスミド画分から、下記条件を用いてプラスミドDNAの分離を行いました。

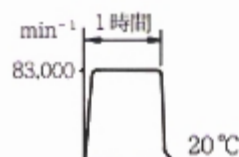
## 1. 使用機種

本体 : SCP85H2形日立分離用超遠心機  
 ロータ : SRP83VTパーティカルロータ  
 チューブ : 5PA シールチューブ

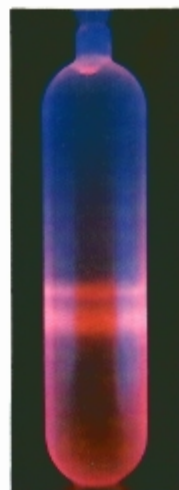
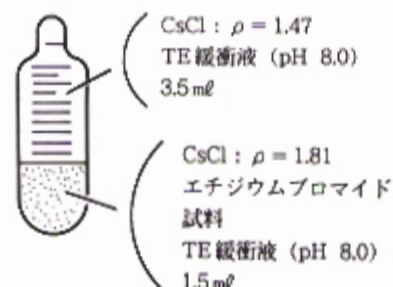
## 2. 分離条件

回転数 (min <sup>-1</sup> )	遠心時間	温度	加速モード	減速モード
83,000	1時間	20℃	5	3

## 3. 分離結果



分離前



#### 4. 試料調製法

大腸菌 JM109 株にプラスミド pUC19DNA を移入し、その一晚培養液 1 ℓ より得た菌体から、アルカリ SDS 法を用いて、TE 緩衝液に溶解した粗プラスミド画分 10 ml を得ました。この粗プラスミド画分 1.02 ml に塩化セシウム 1.689 g、エチジウムブロマイド溶液 (10 mg/ml) 50 μℓ を加え、密度を 1.81 に調整しました。この試料 1.5 ml を、あらかじめ密度 1.47 に調整した塩化セシウム溶液 3.5 ml の入った 5PA シールチューブの底より長針\*1 を装着したシリンジを用いて静かに注入した後、STF-1 形チューブシーラにて溶着密封しました。

#### 5. 解説

従来、分離用超遠心機に塩化セシウムによる密度勾配沈降平衡法を用いたプラスミド DNA の分離には、アングルロータを用いた場合で 24 時間程度と、非常に長時間の遠心操作を必要としました。この分離時間を短縮するために、様々な方法が開発されています。例えば、アングルロータにステップモード運転法を用いた場合では、17 時間 (himac APPLICATION No. 15)、沈降距離の小さなパーティカルロータを用いた場合では、16 時間 (himac APPLICATION No. 16) と、オーバーナイト程度の遠心時間で分離を行うことができます。

ここでは、パーティカルロータにステップ勾配遠心法を用いた分離結果を示します。沈降距離の短いパーティカルロータに、ステップ勾配遠心法を用いますと、従来より大幅に短い 1 時間の遠心操作でプラスミド DNA とリニア DNA のバンドを分離することができました。

\*1) 例えば、テルモカテラン針 NN-2070C (テルモ株式会社) など

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 四柳宛御連絡ください。

## 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)

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

## 日立工機株式会社

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