

himac APPLICATION

No.37 JANUARY 1992

題目 バーティカルロータによる2-ステップ勾配でのプラスミドDNAの迅速分離
機種 分離用超遠心機用バーティカルロータ RP65VT3

バーティカルロータ RP65VT3 を用いて2-ステップ勾配法により55,000rpmで大腸菌のプラスミドDNAを5.5時間で分離した例

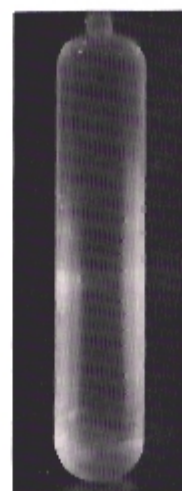
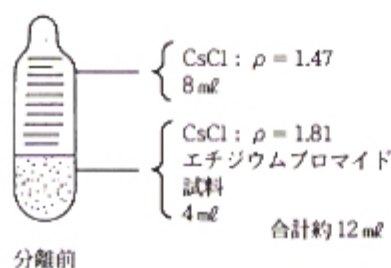
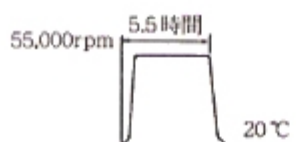
塩化セシウムとエチジウムブロマイドを用いて大腸菌のプラスミドDNAを分離する際、均一液による従来法では8時間以上の遠心が必要でした。そこでここではこの遠心時間の短縮を目的として2-ステップ勾配法を用いた場合について検討しました。

その結果、RP65VT3バーティカルロータ(12ml×12本)では55,000rpm、5.5時間の運転によりプラスミドDNAを分離することができました。

この結果はRP55VFカーボンファイバー製バーティカルロータの場合も、そのまま適用できます。

分離結果

- ロータ: RP65VT3 (バーティカルロータ)
- チューブ: 12PA シールチューブ



分離後

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)	加速モード	減速モード
RP65VT3 パーティカルロータ	55,000	5.5	20	SCP シリーズ「3」 CP シリーズ「6」	SCP シリーズ「3」 CP シリーズ「7」

(2) 使用チューブ

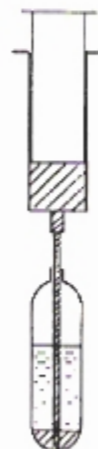
12PA シールチューブ

(3) 試料調製法

2-ステップ勾配法は低密度液 ($\rho = 1.47\text{g/cm}^3$) と高密度液 ($\rho = 1.81\text{g/cm}^3$) を用いて行ないます。

1. 塩化セシウムの低密度液 ($\rho = 1.47\text{g/cm}^3$) をストック液として用意しておきます。この低密度塩化セシウム溶液の調製は、TE緩衝液* 1mlに対し塩化セシウムを770mgの割合で溶解し行ないます (43.5 (W/W)%)。
2. プラスミドDNAを含む試料を用いて高密度液 ($\rho = 1.81\text{g/cm}^3$) を調製します。プラスミドDNAを含む試料2.6mlに塩化セシウム4.5g、エチジウムブロマイド溶液 (10mg/ml) 240 μ lを加え混合すると、密度1.81g/cm³の高密度液約4mlとなります (61 (W/W)%)。
3. 低密度液8mlを注射器を用いて12PA シールチューブに注入します。
4. 次にプラスミドDNAを含む高密度液約4mlをチューブの底より静かに注入します。注入はチューブ底まで届くような十分長いシリンジ (例: NRK (日本理化学機械) 注射針長型) を注射器に装着し行なって下さい (下図参照)。
5. 以上でチューブが満たされない場合には、チューブの上から低密度液を静かに注入し、チューブを満たして下さい。
6. 注入の終わったチューブはSTF-1形チューブシーラを用いて注入口を溶着します。この際には低密度液と高密度液の界面を乱さないよう静かに取扱って下さい。

* TE緩衝液: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)



なお、本資料に関するお問い合わせは日立工機 (株) 精機事業部応用開発グループまでお願い致します。

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)244-1591

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