

himac APPLICATION

No.39 JANUARY 1992

題目 分離用小形超遠心機によるRNAの迅速分離
機種 分離用小形超遠心機用RP80ATアングルロータ
 チューブ容量5mlのRP80ATアングルロータを用い
 大腸菌からRNAを5時間で分離した例

従来、RNAの分離はRPS40Tなどのスイングロータを用い、オーバーナイト（約22時間）の遠心で行なっていました。この時の塩化セシウムの溶液量（CsCl量）とRNA含む試料量（サンプル量）との比はスイングロータの場合、CsCl量が1に対し、サンプル量は2で行なわれるのが一般的です。ここではアングルロータを用いた時のこれらの最適比と分離時間について検討しました。

その結果、アングルロータを用いた場合はCsCl量が1に対し、サンプル量が2以上では分取段階でDNAの混入をきたす可能性が大きくなります（Fig. 1, 2）。これに対しFig. 3, 4から、CsCl量が1に対してサンプル量が1.3~1.5の時にはペレット状になっているRNAと、バンド状になっているDNAの距離が大きく、RNAの分取操作が容易になることがわかりました。（CsCl量をこの比率以上にすると遠心後、塩化セシウムが析出する恐れがありますので御注意下さい。）

（応用例：第64回日本生化学会大会（1991年10月2日～5日）にて発表、一般講演2610）

分離結果

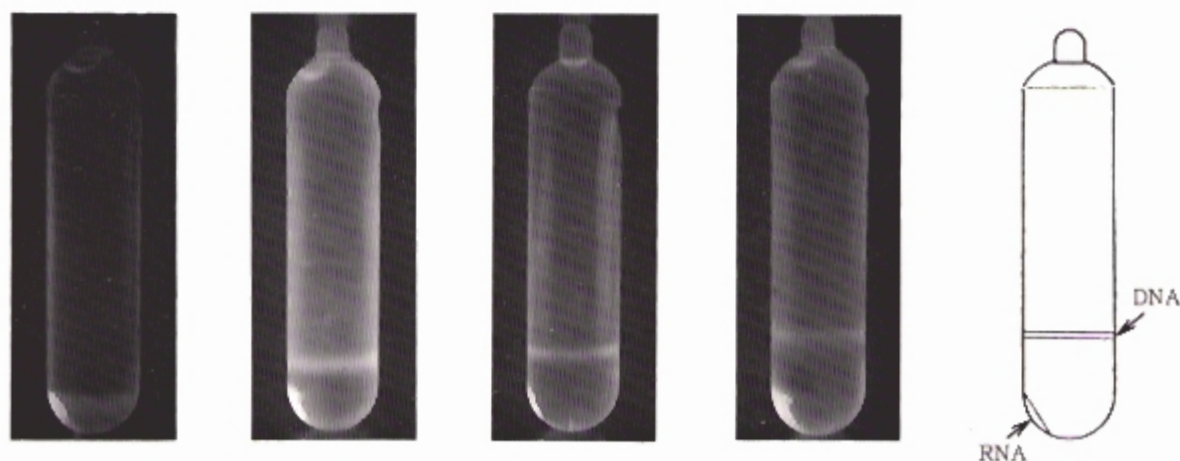


Fig. 1
CsCl量：サンプル量
1：3

Fig. 2
CsCl量：サンプル量
1：2

Fig. 3
CsCl量：サンプル量
1：1.5

Fig. 4
CsCl量：サンプル量
1：1.3

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 |
|-------------------|--------------------------------|-------------|------------|-------|-------|
| RP80AT アングルロータ | 80,000 | 5 | 15 | 5 | 7 |

(2) 使用チューブ

5PA シールチューブ

(3) 操作と調製法

大腸菌 C600

↓ 10mlの2×TY培地で37℃、一晩培養する。

1 mlを40mlの2×TY培地に接種し、37℃、約3時間培養する。(OD₆₀₀ = 0.5~0.8)

↓ CR22形高速冷却遠心機、RR22A2アングルロータ (50ml×6本)
9,200min⁻¹ (rpm), 20min, 4℃

沈澱

↓ ← 1mlの溶液A*を加え、菌体ペレットをよく懸濁する。

↓ ← 1mlの飽和フェノールを加え、よく混ぜる。

振盪 (60℃、5分)

↓ CR22形高速冷却遠心機、RR22Aアングルロータ (7ml×18本)
9,400min⁻¹ (rpm), 5min, 4℃

上清を2本の1.5mlエッペンドルフチューブ (または同等品) に分ける。

↓

エタノール沈澱

↓ ← それぞれ、最終の液量が3.0mlとなるように溶液B**を加える。

2本の5PAシールチューブに入れる。

↓ ← それぞれに2.0mlの溶液C**をチューブの底から加える。*

液が足りなく、チューブが満たされない時には、上から
溶液B**を加えチューブを満たす。

↓ RP80ATで80,000min⁻¹ (rpm)、15℃、5時間遠心する。



* 1: 0.5% SDS, 20mM 酢酸ナトリウム, 10mM EDTA (pH5.5)

* 2: 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 20mM 酢酸ナトリウム, 10mM EDTA (pH5.5)

* 3: 5.7M CsCl, 0.1M EDTA (pH5.5)

* 4: テルモカテラン針NN-2070Cなどの長い注射針を装着したシリンジを用いる。

(上図参照)

本実験手法は、「実験操作プロット法」(ソフトサイエンス社) P.169~175を参考にしました。

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)

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

西国 (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 (代表)

0120-024125