

himac APPLICATION

No.41 JANUARY 1992

題目 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド添加でのプラスミド DNA の分離
機種 分離用小形超遠心機用パーティカルロータ RP120VT

パーティカルロータ RP120VT によりトリフルオロ酢酸セシウムを用いて僅か 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド添加で大腸菌のプラスミド DNA を 3 時間で分離した例

プラスミド DNA の分離用超遠心機を用いた分離には塩化セシウムにエチジウムブロマイドを用いて行なうのが最も一般的な手法です。しかし、強い変異原物質であるエチジウムブロマイドの濃度を 0.1~1.0mg/ml と比較的高濃度にしなければならず、その濃度の低減が求められていました。そこで、Anderssonら¹⁾の手法に従い、塩化セシウムのかわりにトリフルオロ酢酸セシウム²⁾を用いて行ないました。トリフルオロ酢酸セシウム中では環状の DNA と直鎖状の DNA の浮遊密度はそれぞれ、1.60、1.65 となり³⁾、塩化セシウムの場合のように、これらの形状の異なる DNA の浮遊密度に違いを持たせることを目的としてエチジウムブロマイドを添加する必要はありません。このためエチジウムブロマイドは分離終了後、分取操作のため遠心チューブに UV ランプを照射した時それぞれの DNA が識別できれば良く、その添加量は従来の 1/100~1/1000 である 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としても十分であることが認められました。

この場合、プラスミド DNA と鎖状 DNA のバンドの位置関係は、塩化セシウムにエチジウムブロマイドを用いた時とは逆で、密度の低い方、つまり上のバンドがプラスミド DNA となります。また、トリフルオロ酢酸セシウムを使用する場合、塩化セシウムを用いる場合に比べ、20~40% 程度遠心時間を長くした方が分離状態が良くなります。

分離結果



Fig. 1
トリフルオロ酢酸セシウム使用
エチジウムブロマイド: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RP120VT パーティカルロータ
120,000min⁻¹ (rpm)、3時間、20℃



Fig. 2
塩化セシウム使用
エチジウムブロマイド: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RP120VT パーティカルロータ
120,000min⁻¹ (rpm)、3時間、20℃

- 1) K. Andersson, R. Hjorth, *Plasmid*, **13**, 78 - 80 (1985).
- 2) フェルマシア (株) より「Cs-TFA」として、また和光純薬工業 (株) より「トリフルオロ酢酸セシウム」として発売されています。

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)	加速モード	減速モード
RP120VT パーティカルロータ	120.000	3	20	9	7

(2) 使用チューブ

2PA シールチューブ

(3) 試料調製法

チューブ1本につき、アルカリ-SDS法で処理したDNA²⁾を含むTE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) 0.64mlにトリフルオロ酢酸セシウム溶液(d = 2.0 ± 0.05g/ml)を1.06ml加え、更にエチジウムブロマイド溶液(0.1mg/ml)を20μl添加し、よく混和した後、2PAシールチューブに入れます。液が不足している時は、TE緩衝液1.0mlにトリフルオロ酢酸セシウム溶液を1.7mlの割合で混合した液を補充液としてあらかじめ作成しておき、これ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溶着し密封します。

なお、分取後のプラスミド画分からエチジウムブロマイドを除去する時には1-ペンタノールを使用して下さい。1-ブタノールはトリフルオロ酢酸セシウム溶液に溶解するため使用できません。

3) 煮沸法で処理した場合には分離がうまくいかない場合があります。(前ページ 1) より)

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

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