

HITACHI

# himac APPLICATION

No.41 JANUARY 1992

題目 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のエチジウムプ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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のエチジウムプ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プ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プロマイドの濃度を 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>、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プ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プ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プ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

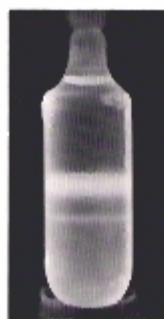


Fig. 1  
トリフルオロ酢酸  
セシウム使用  
エチジウムプロマイド: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
RP120VTパーティカルロータ  
120,000min<sup>-1</sup> (rpm)、3時間、20°C

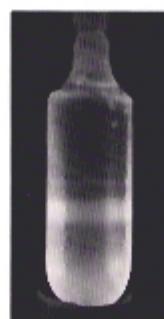


Fig. 2  
塩化セシウム使用  
エチジウムプロマイド: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
RP120VTパーティカルロータ  
120,000min<sup>-1</sup> (rpm)、3時間、20°C

- 1) K. Andersson, R. Hjorth, Plasmid, 13, 78~80 (1985).
- 2) ファルマシア(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 <sup>-1</sup> [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DNA<sup>3)</sup>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( $d = 2.0 \pm 0.05\text{g/mL}$ )を1.06mL加え、更にエチジウムプロマイド溶液(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プ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)  
事業所 札幌(011)221-7241 仙台(022)264-2211 球磨(0298)23-7391 北関東(0486)53-2341  
横浜(045)671-5421 新潟(0252)41-3011 滋賀(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