

himac APPLICATION

No.42 JANUARY 1992

題目 ネオアングルロータを用いたプラスミドDNAの迅速分離
 機種 分離用小形超遠心機用RP100NTネオアングルロータ

チューブ容量4mlのRP100NTネオアングルロータを用いて大腸菌のプラスミドDNAを4時間で分離した例

プラスミドDNAの分離をパーティカルロータで行なうと分離時間をアングルロータ使用時に比べ大幅に短縮できます。しかし、試料中にRNAの含有量の多い時にはRNAのペレットがチューブ内壁に付着し、分離されたプラスミドDNAを抽出する際にRNAの混入を招く恐れがあります。これに対しアングルロータではRNAをチューブ底部に沈澱させることができ、RNAがプラスミドDNAの分離帯に混入することがありません。そこでチューブ穴角度を従来のアングルロータよりも低角度にし、RNAをチューブ底に沈澱させながら、パーティカルロータでの分離時間に近い時間で分離を可能にしたものが、このネオアングルロータです。

なお、ネオアングルロータを用いてプラスミドDNAを分離する際にはポリオキシ(10)オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35) などを0.05~0.1%程度試料に添加すると、RNAをチューブ底に確実に沈澱させる効果があります。

分離結果

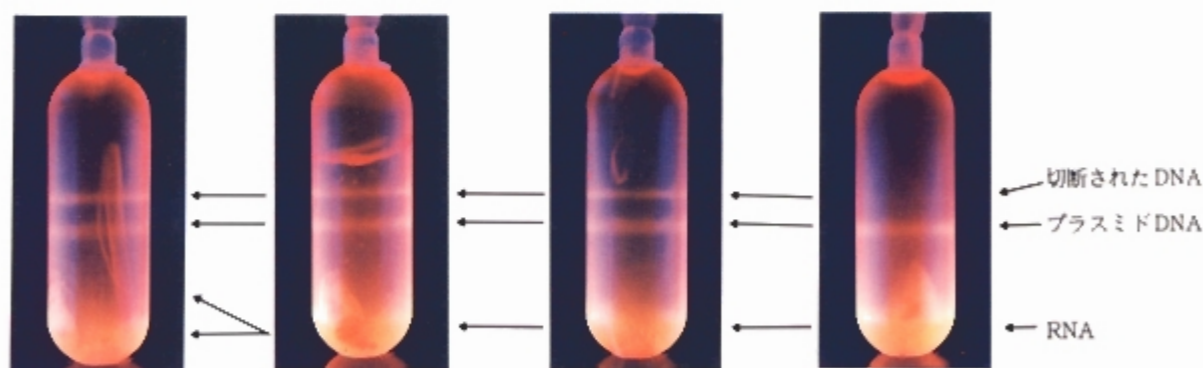


Fig. 1
無添加

Fig. 2
0.05%
ポリオキシ(10)
オクチルフェニル
エーテル
(TritonX-100)

Fig. 3
0.05%
N-ラウロイル
サルコシン酸
ナトリウム

Fig. 4
0.05%
ポリオキシエチレン
ラウリルエーテル
(Brij 35)

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
RP100NT ネオアングルロータ	100,000	4	20	9	7

(2) 使用チューブ

4PA シールチューブ

(3) 試料調製法

プラスミドpUC19DNAを含む大腸菌JM109を一夜振盪培養後、アルカリ-SDS法などによって処理して得られたプラスミドDNAを含むTE溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)を試料とします。

4PA シールチューブ1本あたり

- ・試料: 3.1ml
- ・塩化セシウム: 3.1g
- ・エチジウムブロマイド (10mg/ml): 80 μ l

ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (Triton X-100): 2~4 μ l

あるいは

10% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム: 20~40 μ l

あるいは

10% ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35): 20~40 μ l

以上を混合し、チューブに注入します。チューブが満たされない場合には、あらかじめ作成しておいた補充液 (TE緩衝液1mlあたり、塩化セシウム1gを溶解したもの) を加えチューブを満たします。その後、STF-1形チューブシラにて溶着し密封します。

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)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