

## himac APPLICATION

No.45 SEPTEMBER 1992

題目 ネオアングルロータを用いたプラスミドDNAの分離  
 機種 分離用超遠心機用 P65NT (旧形名 RP65NT) ネオアングルロータ

チューブ容量 12ml の P65NT ネオアングルロータを用いて大腸菌のプラスミドDNAを5.5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アングルロータ使用時に比べ分離時間を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するため、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、短時間での分離を可能にしたものがこのネオアングルロータです。

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、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを0.05% (W/V) 添加するとRNAがチューブ底に確実に沈澱し、RNAの混入を防止する効果があります (Fig.1,2 参照)。このような効果は、ポリオキシ (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij35) などを用いても期待できます。しかし、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムと同じ陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) では塩化セシウム溶液に溶解しないため、このような効果は期待できません。(himac APPLICATION No.42, 43 参照)

## 分離結果

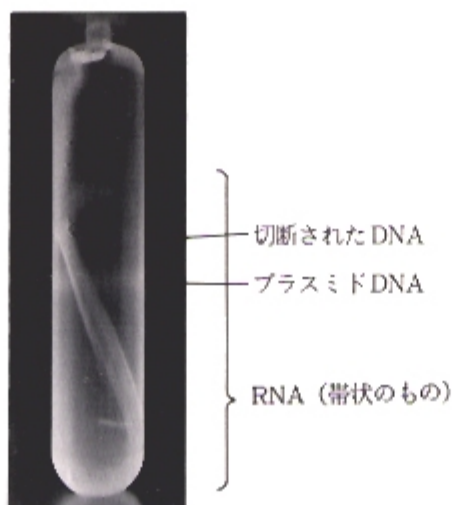


Fig. 1  
無添加

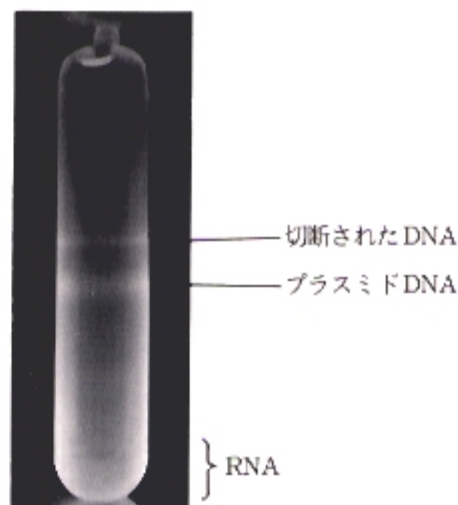


Fig. 2  
0.05%  
N-ラウロイル  
サルコシン酸  
ナトリウム添加

## 分離条件

### (1) 遠心分離条件

ロータ	回転数 (rpm)	遠心時間 (h)	温度 (°C)	加速モード	減速モード
P65NT ネオアングルロータ	65,000	5.5	20	SCPシリーズ「-」 CPシリーズ「9」 $\alpha, \beta$ シリーズ「9」	SCPシリーズ「3」 CPシリーズ「7」 $\alpha, \beta$ シリーズ「7」

### (2) 使用チューブ

12PA シールチューブ

### (3) 操作と調製法

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)を試料としました。

12PA シールチューブ1本あたり

試料 : 8.9ml

塩化セシウム : 9.1g

エチジウムプロマイド (10mg/ml) : 240  $\mu$ 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) : 6~12  $\mu$ l

あるいは

10% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム : 60~120  $\mu$ l

あるいは

10% ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij35) : 60~120  $\mu$ 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形チューブシー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) 3504-7211

事業所	北海道 (011) 221-7241	東北 (022) 264-2211	筑波 (0298) 23-7391	首都圏 (03) 3504-7211
	北関東 (048) 653-2341	千葉 (043) 247-4151	西関東 (0426) 43-0080	厚木 (0462) 27-1391
	横浜 (045) 451-5151	新潟 (025) 241-3011	北陸 (0764) 24-3386	豊田 (0565) 28-5191
	中部 (052) 583-5841	京都 (075) 241-1591	関西 (06) 366-2551	岡山 (0864) 25-1316
	中国 (082) 221-4514	四国 (0878) 62-3391	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) 76-7384 (ダイヤルイン)  
日立遠心機アンサーセンター 0120-02-4125