

himac APPLICATION

No.46 SEPTEMBER 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 RP120NT ネオアングルロータ

チューブ容量 2ml の RP120NT ネオアングルロータを用いて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殿させることができ、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をチューブ底に沈殿させながら、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を分離するには、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、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)などの界面活性剤を添加すると、チューブ底部にRNAを確実に沈殿させることができることをhimac APPLICATION No.42, 43, 45に示しました。ところが本実験では、Fig.1に示すように界面活性剤を添加しなくてもRNAの沈殿がチューブ底部に認められました。このことは、RP120NTネオアングルロータの大きな遠心加速度による効果と考えられます。しかし、前処理の条件、試料に含まれるRNAの量などの違いにより、沈殿のでき方に変化を来す可能性があります。沈殿がチューブ内壁に縦の帯状に付着する場合には、塩化セシウムを溶解し臭化エチジウムを加えた試料に、上記の界面活性剤のうちいずれかを0.05% (W/V)添加して下さい。

分離結果

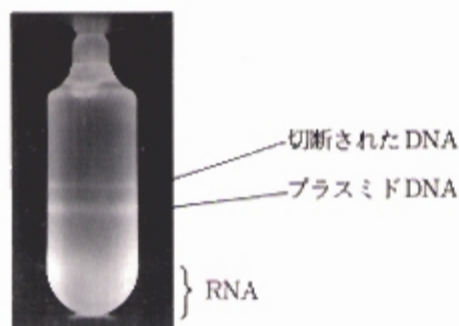


Fig. 1
無添加

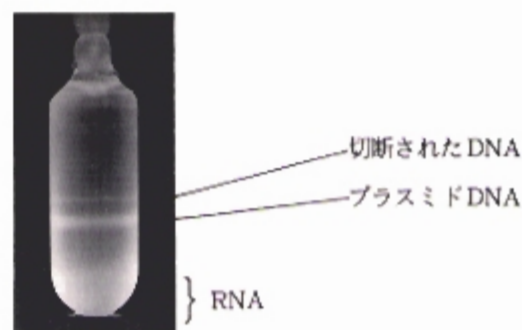


Fig. 2
0.05%
N-ラウロイル
サルコシン酸
ナトリウム添加

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
RP120NT ネオアングルロータ	120,000	3.0	20	9	7

(2) 使用チューブ

2PA 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。

2PA シールチューブ1本あたり

試料: 1.48ml

塩化セシウム: 1.52g

エチジウムブロマイド (10mg/ml): 50 μ l

界面活性剤を添加する場合

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): 1~2 μ l

あるいは

10% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム: 10~20 μ l

あるいは

10% ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij35): 10~20 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

北海道 (011) 221-7241	東北 (022) 264-2211	筑波 (0296) 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