

## himac APPLICATION

No.50 APRIL 1993

題目 多段ステップモード運転によるプラスミドDNAの迅速分離

機種 小形超遠心機用アングルロータ S100AT5

チューブ容量5mlの小形超遠心機用アングルロータ S100AT5 を用いて大腸菌のプラスミドDNAを7時間で分離した例

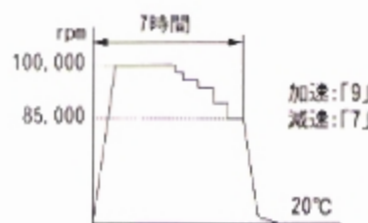
塩化セシウムと臭化エチジウムを用いて大腸菌のプラスミドDNAを分離する場合、チューブ容量5mlのアングルロータでは、15時間以上のオーバーナイト運転が必要でした（当社、RP80AT形アングルロータの場合<sup>1)</sup>。しかし、最近、最高回転数100,000rpm（最大遠心加速度550,000xg）のロータと最大9ステップまでプログラム可能な小形超遠心機CS120/100EXが開発されるに至り、従来の50%以下の時間での分離が可能となりました。

一般に、アングルロータの場合、高速回転すれば分離時間は短くなるものの、塩化セシウムの結晶析出が発生したり、閉環状DNAと鎖状DNAの2本のバンドが接近しすぎるといった問題がありました。そこで、CS120/100EXの多段ステップモード運転機能を用いて、高速回転から回転数を結晶析出する前に徐々に減じるプログラム運転を行なった結果、塩化セシウムの結晶析出もなく、また、回転数を減じることにより、2本のバンドの接近をある程度阻止できる効果<sup>2)</sup>も加わって、プラスミドDNAの迅速分離ができました。

### 分離結果

- ロータ: S100AT5 (アングルロータ)
- チューブ: SPA シールチューブ
- 運転方法: 自動ステップモード運転

回転数 (rpm)	時間 (hr:min)
100,000	4:50
98,000	15
96,000	30
94,000	30
90,000	25
85,000	30
合計	7:00



加速:「9」  
減速:「7」



CsCl:  $\rho = 1.55\text{g/cm}^3$   
臭化エチジウム (0.2mg/ml)  
pUC19を含むTE緩衝液 (pH8.0)  
合計 約5ml

遠心前



← 切断されたDNA

← プラスミドDNA

遠心後

1) himac APPLICATION No.14.

2) himac APPLICATION No.22.

## 分離条件

### (1) 遠心分離条件

ロータ	回転数	遠心時間	温度 (°C)	加速モード	減速モード
S100AT5 アングルロータ	6段ステップ モード運転	合計7時間	20	「9」	「7」

### (2) 使用チューブ

5PA 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。

5PA シールチューブ1本あたり

試料 : 3.91 ml  
塩化セシウム : 3.74g  
臭化エチジウム (10mg/ml) : 100 µl

以上を混合し、シール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0.93g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) 3504-7211

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