

## himac APPLICATION

No.51 APRIL 1993

題目 トリフルオロ酢酸セシウムを用いたプラスミドDNAの分離

機種 分離用超遠心機用ネオアングルロータ P90NT

チューブ容量5mlのネオアングルロータ P90NT を用いて  
大腸菌のプラスミドDNAを4時間で分離した例

ネオアングルロータを使用して、塩化セシウムと臭化エチジウムを用いてプラスミドDNAの分離を行う場合、沈澱となるRNAがチューブ壁に付着し回収操作の妨げとなることがあります。この対策として、これまでに試料中にサルコシンなどの界面活性剤を少量加えることをこれまでに報告しました。<sup>1), 2), 3), 4)</sup>ここでは、勾配液として塩化セシウムのかわりにトリフルオロ酢酸セシウム<sup>5)</sup>を用いることにより、界面活性剤を添加しなくても、ネオアングルロータを使用してプラスミドDNAの分離が良好にできることを示しました。

トリフルオロ酢酸セシウムによるプラスミドDNAの分離は、Anderssonらの手法に従い行いました。<sup>6)</sup>トリフルオロ酢酸セシウム中では、閉環状のDNA、鎖状のDNA、RNAの浮遊密度はそれぞれ、 $1.60^6)$ 、 $1.65^6)$ 、 $1.8^7)$ となり、RNAもバンディングすることが可能になりチューブ壁への付着を防止できました。また、トリフルオロ酢酸セシウムを用いた場合、臭化エチジウムの添加は、遠心終了後、回収操作のため遠心チューブにUVランプを照射した時にそれぞれのバンドが識別できる程度であれば良く、従来の $1/100 \sim 1/1000$ である $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ としても十分です。<sup>8)</sup>

## 分離結果



## 分離条件

### (1) 遠心分離条件

| ロータ                | 回転数<br>(rpm) | 遠心時間<br>(h) | 温度<br>(°C) | 加速モード  | 減速モード   |
|--------------------|--------------|-------------|------------|--|---|
| P90NT<br>ネオアングルロータ | 85,000       | 4           | 20         | $\alpha$ , $\beta$ シリーズ<br>「9」<br>SCP シリーズ<br>「--」 | $\alpha$ , $\beta$ シリーズ<br>「7」<br>SCP シリーズ<br>「3」 |

### (2) 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 法により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 : 1.9ml
- トリフルオロ酢酸セシウム溶液 ( $d = 2.0 \pm 0.05\text{g/ml}$ ) : 2.9ml
- 臭化エチジウム (0.1mg/ml) : 50  $\mu\text{l}$

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、トリフルオロ酢酸セシウム溶液 1.5ml の割合で混合した液) を加えチューブを満たします。その後、STF-1 形チューブシールにて溶着し密封します。

なお、回収後のプラスミド画分から臭化エチジウムを除去する時には、C-5 以上のアルコール (例: 1-ペンタノールなど) を使用してください。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。

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。

### (参考)

- 1) himac APPLICATION No.42.
- 2) himac APPLICATION No.43.
- 3) himac APPLICATION No.45.
- 4) himac APPLICATION No.46.
- 5) フェルマシア (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。
- 6) K.Andersson, R.Hjorth, *Plasmid*, **13**, 78-80 (1985).
- 7) D.Rickwood, Ed., "Preparative Centrifugation", p.147, IRS Press (1992).
- 8) himac APPLICATION No.41.

## 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