

himac APPLICATION

No.52 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 小形超遠心機用ネオアングルロータ RP100NT

チューブ容量4mlのネオアングルロータ RP100NT 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

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。^{1), 2), 3), 4)} 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⁵⁾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。⁶⁾ 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、 1.60^0 、 1.65^0 、 1.8^0 となり、RNAもバンドニ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。⁶⁾

分離結果



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
RP100NT ネオアングルロータ	100,000	5.5	20	「9」	「7」

(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。

4PA シールチューブ1本あたり

試料: 1.5ml

トリフルオロ酢酸セシウム溶液 ($d = 2.0 \pm 0.05g/ml$): 2.3ml

臭化エチジウム (0.1mg/ml): 40 μ 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形チューブシーラ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) ファルマシア(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) 24-3396 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)
日立通心機アンサーセンター 0120-02-4125