

himac APPLICATION

No.53 APRIL 1993

題目 ネオアングルロータによるRNAの迅速分離

機種 分離用超遠心機用P90NTネオアングルロータ
チューブ容量5mlのP90NTネオアングルロータを用いて
大腸菌のRNAを2時間で分離した例

従来RNAの分離はRPS40Tなどのシングロータを用い、オーバーナイト（約22時間）の遠心で行って来ました。この時の5.7M塩化セシウムの溶液量（CsCl量）とRNAを含む試料量（サンプル量）との比はシングロータの場合、CsCl量が1に対しサンプル量が2で行われるのが一般的です。またアングルロータを用いたときには、5～6時間程度の遠心操作で分離が可能となります。ここではアングルロータよりも更に分離時間の短縮が期待できるネオアングルロータを用いたRNAの分離について、CsCl量とサンプル量の最適比と分離時間について検討しました。

その結果、ネオアングルロータを用いた場合にはCsCl量が1に対して、サンプル量が1ではRNAの回収段階でDNAの混入をきたす恐れが大きくなることがわかりました（Fig.1）。これに対し、CsCl量が1.5に対してサンプル量が1の時にはペレット状になっているRNAと、バンド状になっているDNAとの距離が大きく、RNAの回収操作が容易になりました（Fig.2）。また、分離時間も2時間と、従来のロータに比べ極めて短時間で分離できることがわかりました。

分離結果



Fig. 1
CsCl量：サンプル量
1：1

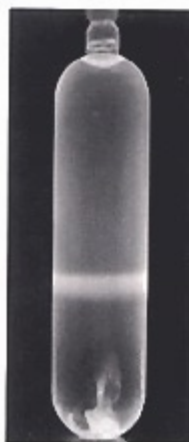
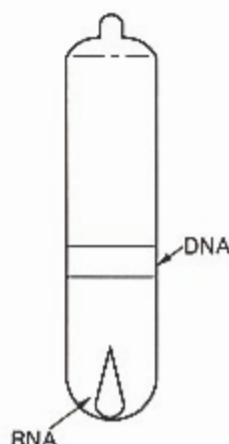


Fig. 2
CsCl量：サンプル量
1.5：1



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
P90NT ネオアングルロータ	85,000	2	15	α , β シリーズ 「5」 SCP シリーズ 「4」	α , β シリーズ 「7」 SCP シリーズ 「3」

(2) 使用チューブ

5PA シールチューブ

(3) 操作と調製法

大腸菌 C600

↓ 10ml の 2 × TY 培地で 37°C、一晩培養する。

1ml を 40ml の 2 × TY 培地に接種し、37°C、約 3 時間培養する。(OD₆₀₀ = 0.5~0.8)

↓ CR22 形高速冷却遠心機、R22A2 アングルロータ (50ml × 6 本)

↓ 9,200rpm、20min、4°C

沈澱

← 1ml の溶液 A¹⁾ を加え、菌体ペレットをよく懸濁する。

← 1ml の飽和フェノールを加え、よく混ぜる。

振盪 (60°C、5分)

↓ CR22 形高速冷却遠心機、R22A アングルロータ (7ml × 18 本)

↓ 9,400rpm、5min、4°C

上層 (水層) 約 800 μ l を新しいチューブにとる。

エタノール沈澱 (2.5 倍量のエタノールを加える。)

↓ ←最後の液量が 4.0ml となるように溶液 B²⁾ を加える。

2本の 5PA シールチューブに 2ml ずつ入れる。

↓ ←それぞれに約 3.0ml の溶液 C³⁾ をチューブの底から加える。⁴⁾

↓ 液が足りなく、チューブが満たされない時には、上から溶液 B²⁾ を加えチューブを満たす。

P90NT ロータで 85,000rpm、15°C、2 時間遠心する。

(なお、設定回転数は 85,000rpm を越えないようにご注意ください。塩化セシウムの結晶析出をきたすことがあります。)



1) 0.5% SDS, 20mM 酢酸ナトリウム、10mM EDTA (pH5.5)

2) 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、20mM 酢酸ナトリウム、10mM EDTA (pH5.5)

3) 5.7M CsCl, 0.1M EDTA (pH5.5)

4) テルモカテラン針 NN-2070C などの長い注射針を装着したシリンジを用いる。(上図参照)

本実験法は、「実験操作プロット法」(ソフトサイエンス社) P.169~175 を参考にしました。

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