

himac APPLICATION

No.55 APRIL 1993

題目 ネオアングルロータによるRNAの迅速分離

機種 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RNAを1.5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、チューブ容量2mlのアングルロータを用いたときには、2.5時間の遠心操作で分離が可能となります¹⁾。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1.5に対してサンプル量が1の時にはベ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ることがわかりました（Fig.1）。また、分離時間も1.5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
1.5：1



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
RP120NT ネオアングルロータ	120,000	1.5	15	「5」	「7」

(2) 使用チューブ

2PA 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℃、一晩培養する。

0.5mlを20mlの2×TY培地に接種し、37℃、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℃

沈澱

↓ ← 0.5mlの溶液A¹⁾を加え、菌体ペレットをよく懸濁する。

↓ ← 0.5mlの飽和フェノールを加え、よく混ぜる。

振盪 (60℃、5分)

↓ 混合液を1.5mlのエッペンドルフチューブ (または同等品)に移しかえる。

↓ CF15D形微量高速遠心機、RT15A8アングルロータ (2ml×18本)

↓ 12,000rpm、3min、4℃

上層 (水層) 約400μlを新しい1.5mlのエッペンドルフチューブ (または同等品)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1.6mlとなるように溶液B²⁾を加える。

2本の2PAシールチューブに0.8mlずつ入れる。

↓ ←それぞれに約1.1ml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。

RP120NTロータで120,000rpm、15℃、1.5時間遠心する。



- 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) チューブの底まで届くような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