

HITACHI

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

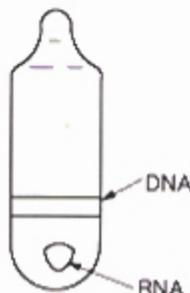
従来RNAの分離はRPS40Tなどのスイングロータを用い、オーバーナイト（約22時間）の遠心で行ってきました。この時の5.7M塩化セシウムの溶液量（CsCl量）とRNAを含む試料量（サンプル量）との比はスイングロータの場合、CsCl量が1に対しサンプル量が2で行われるのが一般的です。また、チューブ容量2mLのアングルロータを用いたときには、2.5時間の遠心操作で分離が可能となります¹⁾。ここではアングルロータよりも更に分離時間の短縮が期待できるネオアングルロータを用いたRNAの分離について、CsCl量とサンプル量の最適比と分離時間について検討しました。

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



1) himac APPLICATION No.40.

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°C、一晩培養する。

0.5mLを20mL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

沈殿

← 0.5mLの溶液 A^① 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°C、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°C

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。

↓ エタノール沈殿 (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 B^② 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 C^③ 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 B^② を加えチューブを満たす。

RP120NT ロータで120,000rpm、15°C、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ジンを用いる。(上図参照)

本実験法は、「実験操作プロッティング法」(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

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) 541-5151	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