

ナイコデンツを用いた簡便密度勾配作成法

CP-MX シリーズ分離用超遠心機、スイングロータ

密度勾配作成装置を使用しないで連続密度勾配を簡便に作成する方法

超遠心機を用いて肝臓などのホモジネートを密度勾配遠心することによってオルガネラの分離ができます。しかし、これまでは連続密度勾配の作成装置が必要であり、その煩雑さにより密度勾配分離が敬遠される傾向にありました。

ここでは、その煩雑さを取り除き簡便に密度勾配分離が行える方法を検討しました。

密度勾配液としてナイコデンツ (Nycodenz[®]) を用い、これを所定の濃度に溶解し、 -20°C もしくは -80°C で凍結し、その後室温に放置し融解するだけの簡便操作で連続密度勾配ができることを明らかにしました。所定濃度のナイコデンツを遠心チューブ内に入れ、それを凍結保存しておき、使用する時に冷凍庫から取り出し、室温放置での融解が終わるとナイコデンツの連続密度勾配が遠心チューブ内に出来上がっている、というものです。

1. 使用機種

密度勾配用媒体：ナイコデンツ (Nycodenz[®] : Nycomed Pharma AS 社(Oslo, Norway)製、第一化学薬品扱い)

遠心チューブ：5PA チューブおよび 40PA チューブ

冷凍庫 (-20°C もしくは -80°C)

2. ナイコデンツの初濃度

10%(w/v)、20%(w/v)、30%(w/v)

3. 密度勾配結果

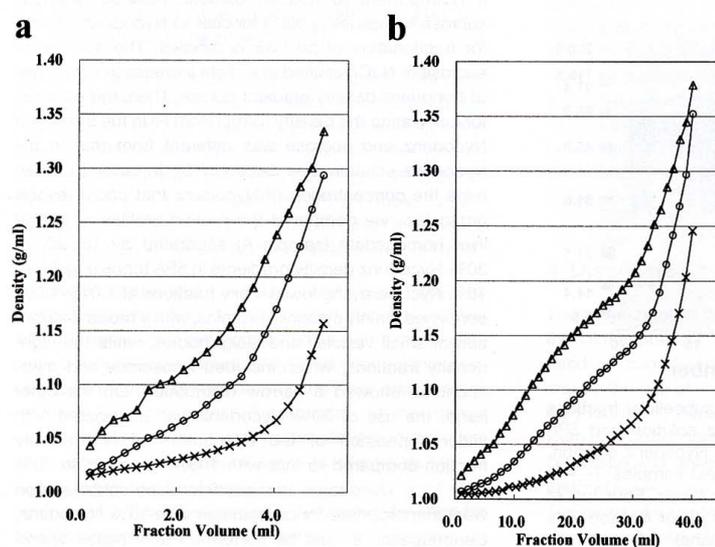


Fig. 1

Effects of Nycodenz concentration and tube size on the density gradient curves. (a) 5PA tube (polyaromer, Hitachi 5 mL), fractionation at 0.25 mL/tube. (b) 40PA tube (polyaromer, Hitachi 40 mL), fractionation at 0.75 mL/tube. Nycodenz concentrations of (x) 10%, (O) 20%, and (Δ) 30%.

4. 形成した密度勾配の範囲 (密度はいずれも 20℃での値です。)

(1) 5 PA チューブ (実用量 : 4.9ml) (ロータ : P65ST, P55ST2, P50S2)

初濃度 10%(1.052g/ml) : 1.015~1.157g/ml

初濃度 20%(1.105g/ml) : 1.018~1.294g/ml

初濃度 30%(1.159g/ml) : 1.043~1.334g/ml

(2) 40 PA チューブ (実用量 : 35.5ml) (ロータ : P28S)

初濃度 10%(1.052g/ml) : 1.005~1.246g/ml

初濃度 20%(1.105g/ml) : 1.007~1.352g/ml

初濃度 30%(1.159g/ml) : 1.021~1.379g/ml

5. 実際の分離例

遠心機 : CP-MX 形分離用超遠心機

ロータ : P55ST2 形スイングロータ

チューブ : 5 PA チューブ

回転数 : 28,000rpm

時間 : 20 分

温度 : 4℃

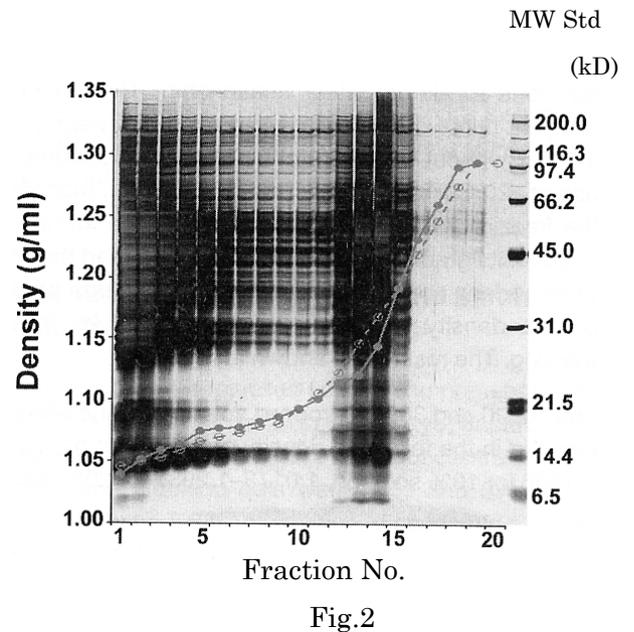
試料 : ラット肝ホモジネート

試料量 : 0.4ml (濃度 : 10mg/ml)

ナイコデンツの初濃度 : 20%(w/v)

ナイコデンツの量 : 4.5ml

分画量 : 0.25ml/Fraction



(注意)

本手法は 13PA チューブでも可能ですが、密度の形成範囲が 1.0444~1.2467g/ml (初濃度 20%) と他チューブに比較して狭く有用性に欠けます (16PA チューブも同様と考えられます。)。このため、本手法には 5PA チューブもしくは 40PA チューブの使用をお勧めします。

本結果は、順天堂大学医学部中央機器室 村山季美枝助教授からご提供いただきました。

(参考文献)

Kimie Murayama, Tsutomu Fujimura, Masataka Morita and Noriko Shindo, Electrophoresis, 2001, 22, 2872-2880.

なお、本資料に関するお問い合わせは日立工機(株)ライフサイエンス機器事業部アプリケーション担当 (Tel 029-276-9605)までお願いいたします。

株式会社日立ハイテクノロジーズ

本社 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目 24 番 14 号 電話(03)3504-7211(ダイヤルイン)

事業所

北海道(011)221-7241 中部(052)583-5851 四国(087)-862-3391

東北(022)264-2211 京都(075)241-1591 九州(092)721-3501

筑波(0298)25-4811 関西(06)4807-2551

北陸(076)263-3480 中国(082)221-4514

日立工機株式会社

本社工場 〒312-8502 茨城県ひたちなか市武田 1060 番地 電話(029)276-7384(ダイヤルイン)

インターネット <http://www.hitachi-koki.co.jp/himac>
最新情報にアクセスして下さい。

日立遠心機お客様相談センター(フリーダイヤル)0120-02-4125