

ナイコデントを用いた簡便密度勾配によるオルガネラの分離

CP-MX シリーズ分離用超遠心機、P28S 形スイングロータ

密度勾配作成装置を使用しない連続密度勾配によるラット肝オルガネラの分離

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、弊社 APPLICATION No.108 に示しました手法を用いましてラット肝ホモジネートのオルガネラの分離を行いました。

密度勾配液としてナイコデント (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ます。つまり、所定濃度のナイコデント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ト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。このようなオルガネラの分離はプロテオーム研究の一環として用いられ、今後益々重要になってくるものと考えられます。

1. 使用機種

遠心機：CP-MX シリーズ分離用超遠心機

ロータ：P28S 形スイングロータ

遠心チューブ：40PA チューブ

2. 分離結果

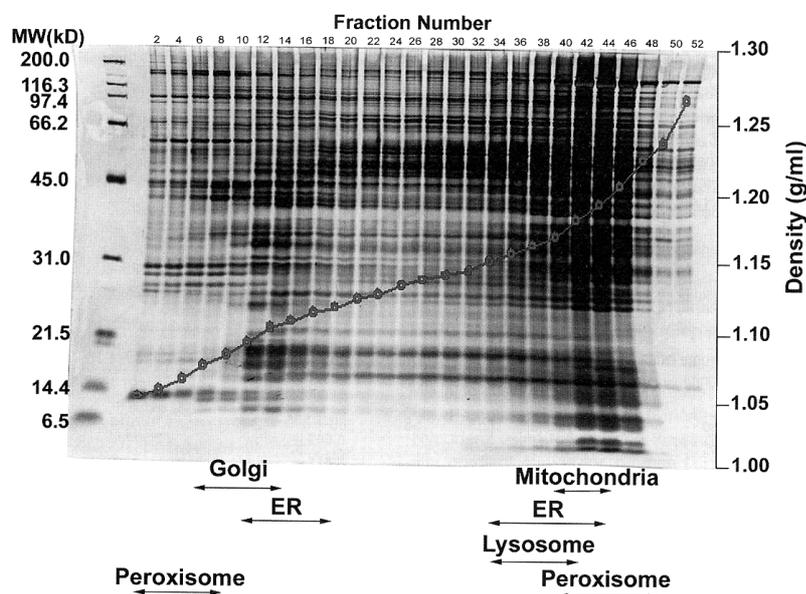


Fig.1 遠心分離後の各フラクションの 1-D SDS-PAGE 電気泳動結果 (試料量: $3\ \mu\text{l}$)

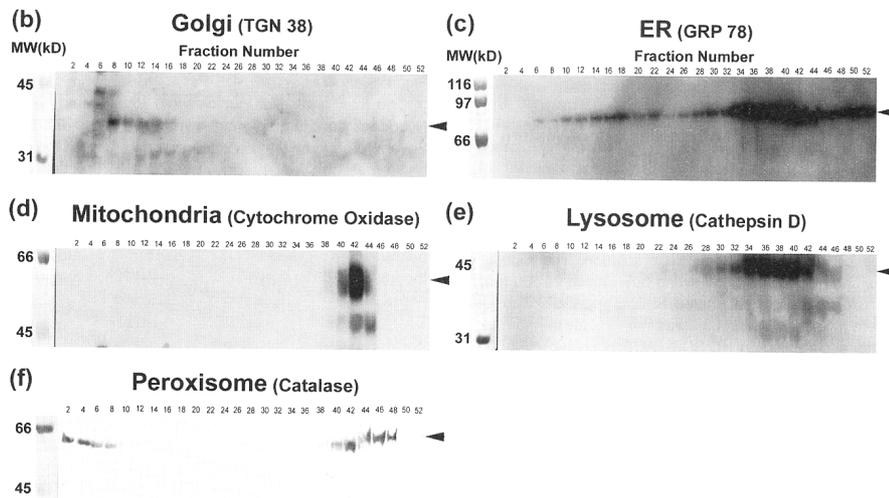


Fig2. 分画された試料と各種オルガネラの指標タンパク質とのウェスタンブロッティング結果

3. 分離条件

回転数：25,000rpm（平均遠心加速度：82,200xg）

時間：180分

温度：4℃

試料：ラット肝ホモジネート

試料量：3.5ml（濃度：約14mg/ml）

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

ナイコデンツの初濃度：20%(w/v)（1.105g/ml）

ナイコデンツの量：32ml

分画量：0.75ml/Fraction

遠心分離後の分画にはフラクショネータが必要ですが、弊社製 DGF-U 形の他に廉価版の ALC-20（アドバンティック東洋社製）もあります。いずれの機種も液面センサーを用い遠心後の遠心管の上面から分画していくものです。

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.

Nycodenz[®]は Nycomed Pharma AS 社（Oslo, Norway）の登録商標です。

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