

# himac APPLICATION

Mar. 2004

## 50ml コニカルチューブ を用いた Percoll による密度勾配分離の検討

### R18A 形高速冷却遠心機用アングルロータ

#### Percoll<sup>®</sup>によるオルガネラ分離の可能性

Amersham Biocsciences 社から発売されている遠心分離用密度勾配媒体である Percoll<sup>®</sup>は、遠心前に密度勾配をあらかじめ作成しなくても密度勾配分離のできる、非常に便利な密度勾配媒体です。しかし、このような自己密度勾配形成 (Self-forming) による分離は最低 30,000xg 程度の遠心加速度を必要とするため、この手法には主に超遠心機が使用されてきました。このため、バイオ分野で非常によく用いられている 50ml コニカルチューブでは耐遠心加速度の問題で、この分離手法には使用することができませんでした。

しかしこの度、超遠心機用チューブよりも安価で使いやすい、最高回転数 18,000rpm、最大遠心加速度 42,200xg で使用できる 50ml コニカルチューブと専用アングルロータを開発しましたので、この Percoll<sup>®</sup>を用いたオルガネラ分離の可能性について調べました。市販されている Percoll<sup>®</sup>原液に 0.15M NaCl (生理的食塩水)を加えた後、浮遊密度が 1.017g/ml から 1.119g/ml までの5種類の密度勾配マーカを添加し、混和後均一液の状態では遠心しました。従来の 50ml コニカルチューブでの最高回転数である 12,000rpm の場合と密度勾配の形成状態について比較、検討しました。

#### 1. 使用機器と実験条件

遠心機: CR-G シリーズ高速冷却遠心機

ロータ: R18A 形アングルロータ

チューブ: himac 50TC チューブ

時間: 30 分

温度: 20

加減速: 加速モード「9」、減速モード「5」

密度勾配媒体: 67%(v/v) Percoll<sup>®</sup> (in 0.15M NaCl)

密度勾配マーカの浮遊密度: 1.017, 1.034, 1.074, 1.088, 1.119g/ml の5種類

#### 2. 結果および比較

##### (1) 回転数 18,000rpm

最大遠心加速度: 42,200xg

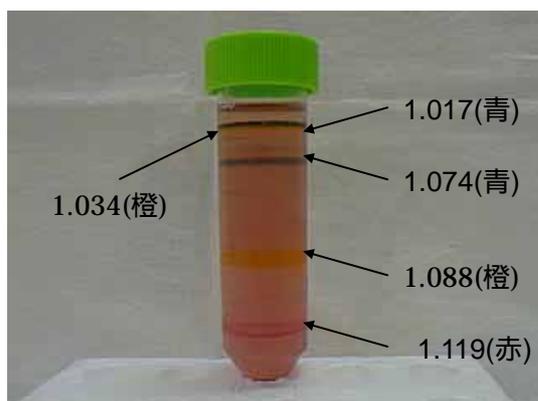


Fig.1

##### (2) 回転数 12,000rpm

最大遠心加速度: 18,800xg

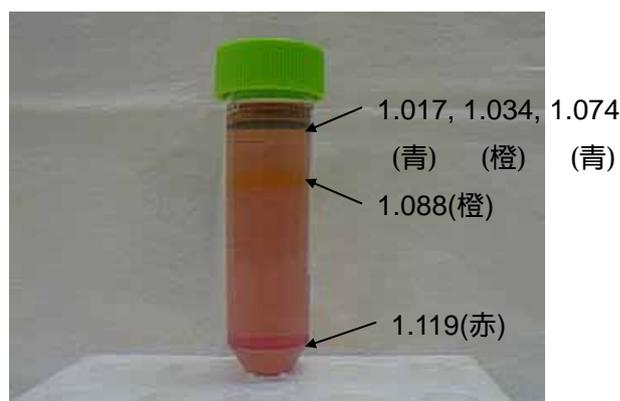


Fig.2

(Fig.1, Fig.2 とも、上から 1.017(青)、1.034(橙)、1.074(青)、1.088(橙)、1.119g/ml(赤)の5層)

### 3. 解説

R18A 形アングルロータに himac 50TC チューブを用い、0.15M NaCl で約 67%(v/v)に調製した Percoll<sup>®</sup> に5種類の密度勾配マーカを適量加え、よく混和して均一液状態で遠心しました。18,000rpm、30 分の遠心操作後の結果を Fig.1 に示します。写真にありますように最上層の 1.017g/ml(青)と 1.034g/ml(橙)の分離は不十分ながら、1.074g/ml(青)、1.088g/ml(橙)、1.119g/ml(赤)の3層の分離は十分であり、十分な密度勾配の形成が認められました。

これに対し、従来の回転数である 12,000rpm で、同じく 30 分の結果を Fig.2 に示します。1.017(青)、1.034(橙)、1.074g/ml(青)の3層が分離せず、1.088g/ml(橙)はチューブの中間よりも上部に位置し、1.119g/ml(赤)はチューブの最下部に近い位置になりました。このようにチューブ上部と下部に密度勾配マーカが分散してしまい、密度勾配の形成が不十分であることが示されました。

これらの結果から、R18A 形アングルロータと himac 50TC チューブの組み合わせにより、Percoll<sup>®</sup>による下記オルガネラの分離ができるものと期待されます。

核(1.09)、ミトコンドリア(1.10)、リソソーム(1.06)、ペルオキシソーム(1.06)、原形質膜(1.03)  
( ( ) 内に Percoll<sup>®</sup>中での各オルガネラの浮遊密度を示します。単位:g/ml)

また、1.017g/mlと1.034g/mlを分離する時にはPercoll<sup>®</sup>の初濃度を下げることで対応することが可能です。

### 4. Percoll<sup>®</sup>について(Amersham Biosciences 社のカタログより)

Percoll<sup>®</sup>は Amersham Biosciences 社から販売されている密度勾配遠心分離用媒体の一つで、ポリビニルピロリドン(PVP)でコーティングされたコロイド状シリカです。細胞、細胞内顆粒(オルガネラ)、大型ウイルス分離用として使用することができ、最高 1.3g/ml までの密度勾配を作成することが可能です。細胞毒性はありません。

物理的性質は下記の通りです。

Desity(g/ml) : 1.130 ± 0.005  
Conductivity (mS/cm) : < 1.0  
Osmolality (mOs/kgH<sub>2</sub>O) : < 25  
Viscosity (cP) : 15 at 20  
pH 9.0 ± 0.5 at 25

Percoll<sup>®</sup>は Amersham Biosciences 社の登録商標です。

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 森田  
(e-mail アドレス: [mmorita@hitachi-koki.co.jp](mailto:mmorita@hitachi-koki.co.jp))までお願いいたします。

(販売)

## 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	

(製造・保守)

## 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