

多段ステップモードを利用したアデノウイルスの迅速分離

分離用小形超遠心機 CS-GX シリーズ & CS150NX / S110AT 形アングルロータ

アデノウイルスは 1953 年に発見され、1956 年に「アデノウイルス」という名称が提唱され、一般に用いられるようになりました。ウイルス粒子はエンベロープのない、直径 70 ~ 80nm の正二十面体で、内部には $20 \sim 25 \times 10^6$ ダルトンの線状二本鎖DNAが存在することが知られています。近年このウイルスを用いて動物細胞の機能を分析する手法が開発され広く用いられるようになりました。

アデノウイルス粒子の精製にはスイングロータを用いた塩化セシウムによる密度勾配沈降平衡法が用いられます。この方法はウイルス懸濁液に塩化セシウムを溶解し均一濃度にしたものをお遠心し、その遠心力により密度勾配を作らせる「Self-Forming」と呼ばれる方法です。この手法によりウイルス懸濁液に含まれるウイルス空粒子をその密度の違いを利用して分離し除去します。ウイルス粒子の塩化セシウム溶液中での浮遊密度は 1.34g/ml、空粒子の場合は 1.30g/ml であることが知られています。

この分離法におけるポイントは次の 2 点です。

密度勾配液を平衡状態にすること。(通常の方法では長時間をする。)

ウイルス粒子の分離帯と空粒子の分離帯の距離をはなすこと。(比較的低速で遠心する。)

このため、従来法は下記のようにスイングロータを用い比較的低速で長時間遠心する方法がとられています。

ロータ:P55ST2 形スイングロータ(5ml x 6 本)相当

回転速度:35,000rpm (最大遠心加速度:148,000 xg)

遠心時間:20 時間

そこで、ここでは小形超遠心機用アングルロータを用い多段ステップモードを使用することで、高速条件下でもウイルス粒子と空粒子の分離帯の距離を保ちながら、遠心時間の短縮化を計算により検討しました。

その結果、従来法の約 1/3 の時間での分離が期待されることがわかりました。

内 容

ロータ:S110AT 形アングルロータ(5ml x 8 本)

回転速度と遠心時間

110,000rpm: 2.5 時間

90,000rpm: 1 時間

80,000rpm: 1 時間

52,000rpm: 2.5 時間

温度: 4

加速: 「9」(最大加速)

減速: 「7」(ややゆっくり)

遠心管: 5PA シールチューブ

試料調製法

遠心管(5PA シールチューブ)1本あたり

試料懸濁液: 4.47ml (懸濁緩衝液: 10mM Tris-HCl, pH 8.1)

塩化セシウム: 2.36g

を完全に溶解し 5PA シールチューブに入れます。

シールチューブが完全に満たされない場合には、上記の懸濁緩衝液 1.9ml に塩化セシウムを 1g 溶解した液で満たします。

なお、小形超遠心機は、床置きタイプ CS-GX シリーズ(CS150GX、CS120GX)と卓上タイプ CS150NX の2タイプあり、どちらもご使用いただけます。

参考: ウィルス実験学(各論)、国立予防衛生研究所学友会編、丸善 (1982年)

装置



CS150GX 形小形超遠心機



S110AT 形アングルロータ



CS150NX 形卓上超遠心機

本資料に関するお問い合わせは日立工機(株)のホームページ
(<http://www.hitachi-koki.co.jp/contact/>) からお願い致します。

【製造・販売・保守】

日立工機株式会社

URL <http://www.hitachi-koki.co.jp/himac/>

首都圏地区(甲信越を含む) 〒108-6020 東京都港区港南2-15-1(品川インターシティA棟) 03-5783-0614

北海道地区 〒004-0053 札幌市厚別区厚別中央三条1-2-20 011-896-1748

東北地区 〒984-0002 仙台市若林区卸町東3-3-36 022-288-0435

中部地区 〒451-0051 名古屋市西区則武新町1-32-16 052-533-0522

関西地区(中国・四国・京都を含む) 〒663-8243 西宮市津門大箇町10-20 0798-23-4125

九州地区 〒813-0062 福岡市東区松島4-8-5 092-622-4025