



SEPARATION REPORT

TSKgel G6000PWによるプラスミドの分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. プラスミドの分離	1
3. おわりに	2

1. はじめに

高性能ゲル濾過クロマトグラフィ (GFC) は種々核酸を分離精製する有力な手段の1つです。プラスミドを制限酵素で切断したDNA断片の分離 (1~9)、RNAの分離 (10~14)、オリゴヌクレオチドの分離 (15) について TSKgel を用いて良好な結果が得られています。本文では、核酸の中で、巨大分子であるプラスミドDNAの分離について、排除限界分子量の最も大きい TSKgel G6000 PW を用いた結果をご報告いたします。

2. プラスミドの分離

図-1 に釣本と松原 (16) による大腸菌菌体からプラスミド pBR322 を精製する過程を示します。

図-1

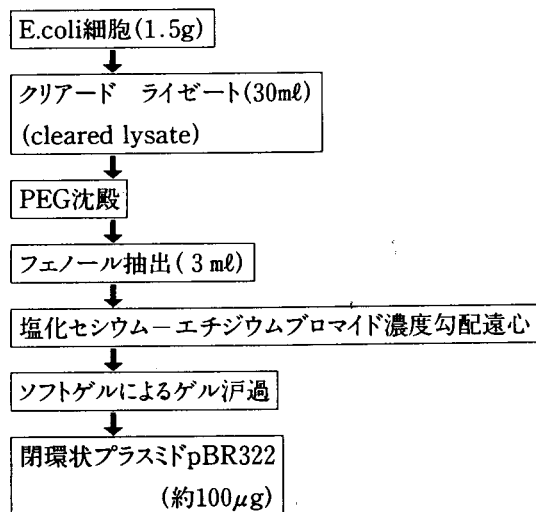


図-2 にクリアードライゼートおよびフェノール抽出液を TSKgel G6000PW (60cmカラム2本連結) で分離したクロマトグラムを示します。プラスミド pBR322 は、27分ないし31分に溶出し、36分以降に溶出する RNA やタンパク質とは完全に分離します。宿主 DNA は22分以降に連続的に溶出するため、かなり除去されていますが、完全ではありません。

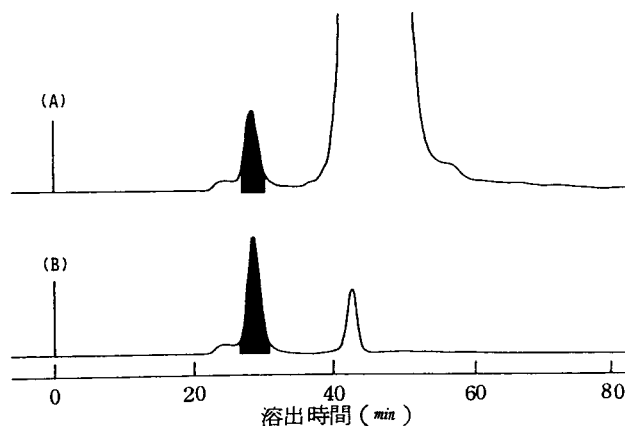


図-2 クリアードライゼート(A)及びフェノール抽出液(B)のクロマトグラム

カラム; TSKgel G6000PW (7.5mmID×60cm×2本)

試料; (A)クリアードライゼート(80μl)

(B)フェノール抽出液(20μl)

溶離液; 0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH7.5)

+0.3M NaCl + 1 mM EDTA

流速; 1 ml/min

温度; 25°C

検出; UV (260nm)

図-3に、図-2に示した、プラスミド画分のアガロースゲル電気泳動パターンを示します。プラスミド画分は、閉環状 (closed circular) および開環状 (open circular) の両方のプラスミドpBR322を含んでいます。

図-4にATP-依存性デオキシリボヌクレアーゼで処理したフェノール抽出物のTSKgel G6000PWによるクロマトグラムを示します。この酵素は宿主DNAなど直鎖状二重鎖DNAだけを分解します。図より宿主DNAがプラスミド画分からほぼ完全に除去されていることがわかります。純度検定のアガロースゲル電気泳動によりRNA、タンパク質および宿主DNAを含まないプラスミドが得られていることがわかります。酵素処理した500 μ lフェノール抽出物を長さ30cmカラムに注入しても、不純物との分離が十分可能でした。この場合、ゲル濾過クロマトグラフィに要する時間は約15分です。(大腸菌菌体から酵素処理フェノール抽出物を得るのに約6時間かかります。)

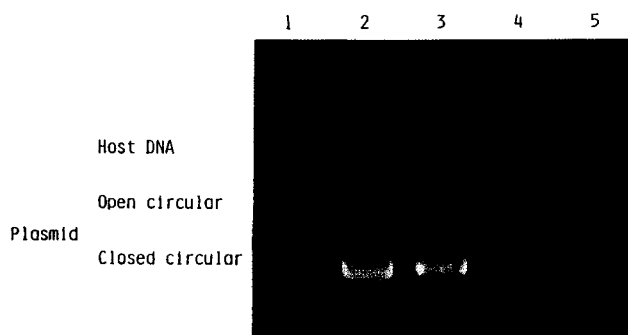


図-3 プラスミドDNA画分のアガロースゲル電気泳動パターン

1. 塩化セシウム-エチジウムブロマイド濃度勾配遠心法に精製した標準pBR322
2. クリアードライゼート
3. フェノール抽出液
4. クリアードライゼートのTSKgel G6000PWによるフラクション
5. フェノール抽出液の " "

3. おわりに

TSKgel G6000PWにおけるゲル濾過クロマトグラフィは閉環状および開環状プラスミドの分離はできませんがかなり精製されたプラスミドを迅速に得るには、非常に有効です。また従来の遠心法で得られたプラスミド標品からRNAを迅速に除去する方法としても、非常に有効であると考えられます。

このようにして得られたプラスミドを制限酵素を用いて切断した時のフラグメント等の分離には、同じPWタイプの充填カラムでDNAについて、非常に分離の良いTSKgel G-DNA-PWを用いると各々を分離良く得ることができます。従って、細胞よりDNAを得る場合には、TSKgel G6000PW, そして精製したプラスミドのフラグメントを得る場合にTSKgel G-DNA-PWと、両者を組合せて使用することにより高度に精製されたプラスミドDNAフラグメントを得ることができます。

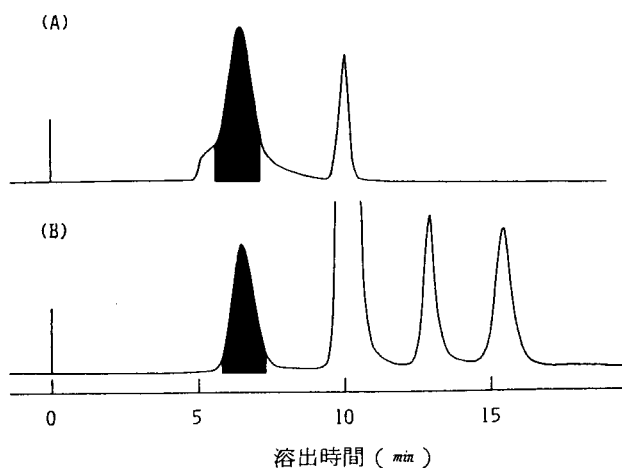


図-4 ATP依存性デオキシリボヌクレアーゼ処理後フェノール抽出物のクロマトグラム

- カラム; TSKgel G6000PW (7.5mmID \times 30cm)
 試料; (A)酵素処理前フェノール抽出液(20 μ l)
 (B)酵素処理後フェノール抽出液(25 μ l)
 溶離液; 0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH7.5)
 +0.3M NaCl+1mM EDTA
 流速; 1ml/min
 温度; 25 $^{\circ}$ C
 検出; UV(260nm)

参考文献

- 1) M. E. Himmel, P. J. Perna, and M. W. McDonell
J. Chromatogr., 240 (1982) 155
- 2) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu,
S. Fukushima and K. Matsubara, J. Chromatogr.,
265 (1983) 342
- 3) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu,
S. Fukushima and K. Matsubara, J. Chromatogr.,
266 (1983) 341
- 4) Y. Kato, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fuku-
shige, and K. Matsubara, HRC&CC1 (1983) 626
- 5) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu,
S. Fukushima and K. Matsubara, J. Biochem.
(Tokyo), 95 (1984) 83
- 6) J. Kruppa, L. Graeve, A. Buche and P. Földi, LC
Magazine, 4 (1984) 848
- 7) Y. Kato, Y. Yamasaki, T. Hashimoto, T. Murot-
su, S. Fukushima and K. Matsubara, J.
Chromatogr., 320 (1985) 440
- 8) R. Dornburg, J. Kruppa and P. Földi, LCMag-
azine, 4 (1986) 22
- 9) J. M. Schmitter, Y. Mechulam and G. Fayat, J.
Chromatogr., 240 (1986) 462
- 10) C. T. Wehr and S. R. Abbott, J. Chromatogr., 185
(1979) 453
- 11) S. Uchiyama, T. Imamura, S. Nagai and K.
Konishi, J. Biochem. (Tokyo), 90 (1981) 648
- 12) L. Graece, W. Goemann, D. Földi and J. Kruppa,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107 (1982) 1559
- 13) L. Graeve, J. Kruppa and P. Földi, J.
Chromatogr., 268 (1983) 506
- 14) T. Ogishima, Y. Okada and T. Omura, Anal.
Biochem., 138 (1984) 309
- 15) D. Molko, R. Derbyshire, A. Guy, A. Roget, R.
Teoule and A. Boucherle, J. Chromatogr., 206
(1981) 493
- 16) T. Tsurimoto and K. Matsubara, Taisha
(Japanese), 17 (1981) 81



TOSOH

東ソー株式会社 科学計測事業部

東京本社	計測販売課	☎(03) 586-9181	〒107 東京都港区赤坂1-11-39
大阪支店	科学計測課	☎(06) 344-3857	〒530 大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店	科学計測課	☎(052)211-5730	〒460 名古屋市中区錦1-17-13
福岡支店		☎(092)781-0481	〒810 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店		☎(022)266-2341	〒980 仙台市青葉区一番町2-4-1
山口営業所		☎(0834)63-0020	〒746 山口県新南陽市開成町4560
科学計測	つくば営業所	☎(0298)55-8166	〒305 つくば市天久保1-16-10
科学計測	徳島営業所	☎(0886)23-8810	〒770 徳島市助任橋1-22
科学計測	静岡営業所	☎(054)273-1581	〒420 静岡市御幸町5-9
科学計測	富山営業所	☎(0764)37-4937	〒931 富山市岩瀬古志町2