

製品コード 6025

研究用

TAKARA

DNA Blunting Kit

説明書

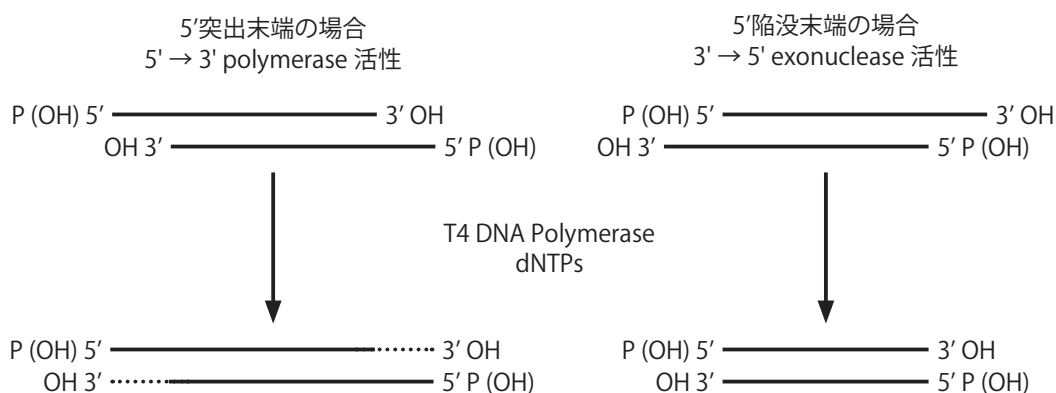
v202001Da

DNA Blunting Kit は、T4 DNA Polymerase の 5' → 3' polymerase 活性と 3' → 5' exonuclease 活性を利用して DNA の末端を平滑化することにより、突出末端の DNA でも簡単に平滑末端のベクターにライゲーションできるシステムです。

DNA が 5' 突出末端の場合は、5' → 3' polymerase 活性により 3' 陥没部分に塩基が付加され、5' 陥没末端の場合は 3' → 5' exonuclease 活性により 3' 突出部分が削られて、平滑末端になります。この末端平滑化反応は同時に起こるので、末端形状が不明の DNA でも DNA Blunting Kit により簡単に平滑化することができます。末端が平滑化された DNA はタカラバイオ独自のライゲーションシステムにより、効率よく平滑末端のベクターなどにライゲーションさせることができます。

本製品は突出末端のベクターを平滑末端ベクターに変更する場合にも有効です。平滑化したベクターは、Alkaline Phosphatase で脱リン酸化して使用します。

また、PCR 法により増幅した DNA 断片は、多くの場合、3' 末端に dA が 1 塩基オーバーハングしており、直接サブクローニングすると効率が悪くなります。このような場合、DNA Blunting Kit を用いて目的 PCR 増幅断片を平滑末端にした後、平滑末端ベクターとライゲーションすると効率よくクローニングできます。



I. 内容 (20 回分)

1. T4 DNA Polymerase	20 μ l
2. 10 × Buffer (dNTP を含む)	30 μ l
3. DNA Dilution Buffer*1	500 μ l
4. Ligation Solution A*2	600 μ l × 2
5. Ligation Solution B*2	150 μ l

* 1 : 【組成】

100 mM Tris-HCl (pH7.6 at 16°C)
5 mM MgCl₂

* 2 : DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021) の組成と同じものです。

II. 保存

− 20°C

III. 操作

A. ベクターの調製

1. 平滑末端を生じる適当な制限酵素でベクター DNA を完全分解後、エタノール沈殿等で精製する。
突出末端ベクターを平滑化する場合は、「B. 末端平滑化反応」に従って反応を行い、フェノール処理、エタノール沈殿後、適当量の滅菌精製水に溶解する。
2. マイクロチューブに以下の脱リン酸化のための反応液を調製し、全量を150 μ lにする。

試薬	使用量
平滑末端ベクター DNA	$\leq 10 \mu\text{g}$
10 \times Alkaline Phosphatase Buffer (500 mM Tris-HCl, pH9.0, 10 mM MgCl ₂)	15 μ l
Alkaline Phosphatase (BAP) (0.3 ~ 0.6 U/ μ l)	2 μ l *3
滅菌精製水	up to 150 μ l

3. 65°Cで30分間保温する。
4. 150 μ lのフェノール/クロロホルム (1 : 1) を加え、よく攪拌する。
5. 遠心して上層を別のチューブに移す。
6. 4、5をもう一度繰返す。
7. 15 μ lの3 M 酢酸ナトリウム (pH4.8 ~ 5.2) を加える。
8. 375 μ lの冷エタノールを加え、-20°Cで30 ~ 60分間保冷する。
9. 遠心して沈殿を回収し、1,000 μ lの70%冷エタノールで洗浄後、脱気乾燥する。
10. 適量のTEバッファーまたはDNA Dilution Bufferに溶解する。*4

* 3 : BAP のかわりに CIAP (10 ~ 30 U/ μ l) (製品コード 2250A) を使用する場合は、上記反応液組成に CIAP 2 μ l を加え、3 の操作の代わりに 50°C で 30 分間保温してください。

* 4 : ライゲーション反応に用いる際、DNA を希釈する必要のある場合は、DNA Dilution Buffer で希釈してください。

B. 末端平滑化反応

1. マイクロチューブに以下の反応液を調製し、全量を9 μ lにする。

試薬	使用量
突出末端インサート DNA*5	(0.1 pmol 以上 10 pmol 程度まで)
10 \times Buffer	1 μ l
滅菌精製水	up to 9 μ l

2. DNA の末端のアニーリングを防ぐため、70°Cで5分間保温した後、37°Cの恒温槽に移す。
3. T4 DNA Polymerase を1 μ l加え、ピペッティングにより穏やかに混和する (この時、ボルテックス等による激しい攪拌は避けてください)。
4. 37°Cで5分間保温する (厳守してください)。*6
5. ボルテックス等で激しく攪拌する。(DNA 濃度が高い場合は、DNA Dilution Buffer を最終濃度 1 μ g DNA/50 μ l になるように加えてボルテックス等で激しく攪拌してください。ボルテックスによる攪拌で酵素はほとんど失活しますが、過剰の反応を避けるため氷中に置き、すぐ次のC. ライゲーション反応を行ってください。すぐ次の操作に移らない場合は、フェノール処理、エタノール沈殿してから DNA Dilution Buffer に溶解させ、-20°Cで保存してください。)

* 5 : DNA はエタノール沈殿等で精製したものを使用してください。

* 6 : サンプル DNA の GC 含量が低いと考えられる場合 (ミトコンドリア DNA 等) は反応温度を 25°C で行ってください。

C. ライゲーション反応

【1】プラスミドベクターに外来 DNA を挿入する場合

1. 末端を平滑化したインサート DNA 適当量*7 と脱リン酸化したベクター (50 ~ 100 ng) を含む DNA 溶液 (DNA Dilution Buffer 中、5 ~ 10 μ l*8) を用意する。
2. 1 の 4 ~ 8 倍量の Ligation Solution A*9 を添加する。
3. 1 の DNA 溶液と等量の Ligation Solution B*9 を添加し、よく攪拌する。
4. 16°C で 30 分間保温する。
5. 形質転換*10 を行う。(コンピテントセル 100 μ l あたり、4 の溶液 20 μ l 以下)

*7: ベクターとインサート DNA の混合比 (モル比) は、ベクター 1 に対して、インサート 5 ~ 10 が適当です。

*8: 本キットは DNA 溶液 7.5 μ l \times 20 回分で構成されています。

*9: ライゲーション反应用試薬として、本キットには DNA Ligation Kit Ver.1 を添付しています。DNA Ligation Kit Ver.2.1 で代用することもできますが、効率が下がる場合があります。

*10: 形質転換の効率が悪い場合は、ライゲーション反応後の溶液に終濃度 500 mM になるように NaCl を加えて、形質転換を行ってください。塩を加えることにより、形質転換の効率を上げることができます。エレクトロポレーションにより形質転換を行う場合は、エタノール沈殿により DNA を回収してから行ってください。

【2】直鎖状 DNA の分子内ライゲーション (self circularization) の場合

使用方法は【1】と同じです。ただしライゲーション反応に使用する DNA 濃度は希薄なほど、またコンピテントセルに加える DNA 量が少ないほど、高い形質転換効率が得られます。

【3】プラスミドベクターにリンカーを挿入する場合

使用方法は【1】と同じです。ただしリンカーが不安定な構造 (AT 結合が多い、塩基数が少ない) の場合は、4 ~ 10°C で 1 ~ 2 時間反応してください。

Q & A

Q: 1 回の反応で平滑化できる DNA 量は?

A: 直鎖状にした pUC18 DNA (2,686 bp) で、約 0.1 ~ 10 μ g (DNA 5' 末端濃度に換算すると約 0.1 ~ 10 pmol) が平滑末端化できます。1 ~ 2 μ g が至適量です。

Q: PCR 産物を DNA Blunting Kit で末端平滑化した後ベクターにライゲーションする際に、5' 末端をリン酸化する必要はあるか?

A: 予め 5' 末端がリン酸化されたプライマーを使わないかぎり PCR 産物の 5' 末端にはリン酸が付加していません。脱リン酸化されたベクターとライゲーションする際には T4 Polynucleotide Kinase でリン酸化する必要があります。

DNA Blunting Kit にて末端平滑化反応後、フェノール/クロロホルム抽出にて完全に酵素を除去します。その後 T4 Polynucleotide Kinase でリン酸化し、65°C、10 分間で熱失活させた後の反応液を、そのままライゲーションに使用することができます。

V. 実験例

1. 形質転換による末端平滑化の確認

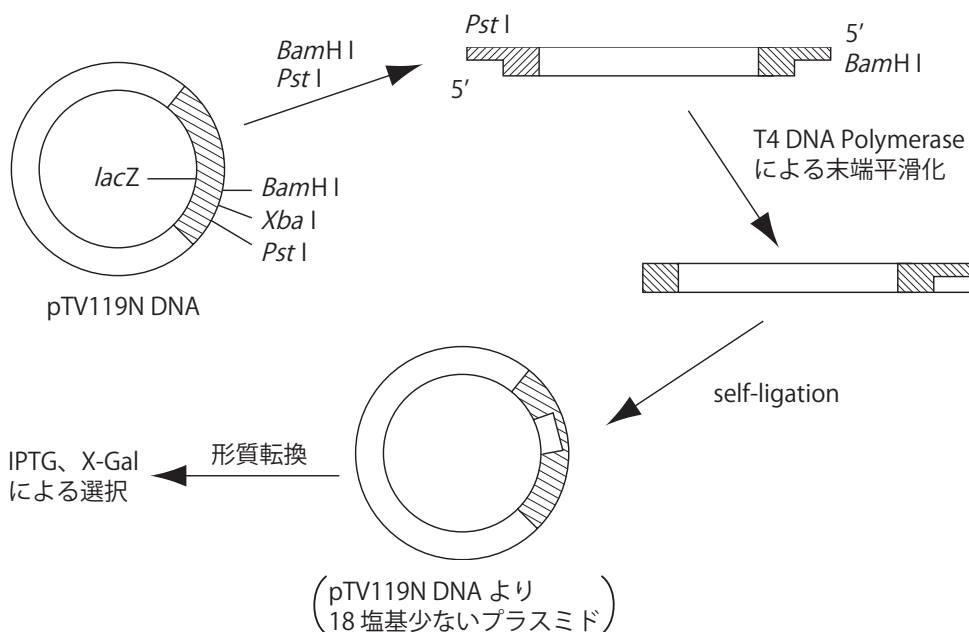
pTV119N DNA を、*Bam*HI、*Pst*I で切断したあと、アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルより切り出して精製した。この DNA 500 ng について、III-B. の操作に従い末端平滑化を行い、III-C. の操作に従い self circularization を行った。制限酵素の不完全分解によるブランクを下げるために、ライゲーション後、DNA を *Xba*I で切断した。末端平滑化+/-で、ライゲーション前、ライゲーション後および *Xba*I で切断後の DNA それぞれを用いて、*E. coli* JM109 コンピテントセルを形質転換し、X-Gal、IPTG を含むプレート上でコロニーを形成させた。

末端平滑化を行うと、*Bam*HI で切断された DNA (5' 突出末端) は 3' 陥没部分に塩基が付加され、*Pst*I で切断された DNA (5' 陥没末端) は 3' 突出部分の塩基が削られる。その両末端がライゲーションすると、もとの pTV119N DNA より 18 塩基 (6 アミノ酸) 削られるが、*lacZ* のリーディングフレームの枠はあっているので、青色コロニーを生じる。

下記の結果より、ライゲーション後、*Xba*I で切断した時には末端平滑化を行った場合のみ青色コロニーが生じており、DNA Blunting Kit により正しく末端平滑化が行われていることがわかる。

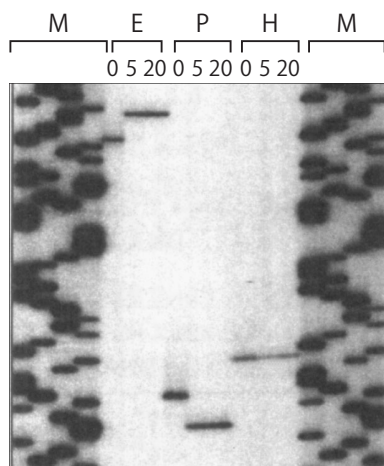
末端平滑化		青色コロニー / μg DNA	白色コロニー / μg DNA
-	ライゲーション前	4.2×10^4	0
	ライゲーション後	1.7×10^4	7.0×10^2
	<i>Xba</i> I 切断後	0	0
+	ライゲーション前	1.2×10^4	0
	ライゲーション後	1.0×10^6	3.0×10^4
	<i>Xba</i> I 切断後	8.7×10^5	2.0×10^4

本実験で使用したコンピテントセルは、 2.7×10^6 コロニー / μg pTV119N DNA の形質転換効率を持つ。



2. 電気泳動による末端平滑化の確認

M13 mp18 ssDNA と 5' 末端を [³²P] で標識した M4 プライマーをアニーリングした後、Klenow Fragment で相補鎖を合成する。合成した 2 本鎖を制限酵素 *Eco*R I、*Pst* I、*Hinc* II でそれぞれ切断する。それらを、それぞれ III-B. の操作に従い末端平滑化 (5 分、20 分) を行い、行っていないものと両方を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して鎖長の長さを比較した。



M : M13 mp18 ssDNA
(dideoxy 法によるシーケンス)
E : *Eco*R I 0 : 末端平滑化 (-)
P : *Pst* I 5 : 5 分反応
H : *Hinc* II 20 : 20 分反応

上記の通り、末端平滑化を行うと、*Eco*R I で切断した DNA (5' 突出末端) は 3' 陥没部分に塩基が付加され、*Hinc* II で切断した DNA (平滑末端) はそのまま、*Pst* I で切断した DNA (5' 陥没末端) は 3' 突出部分の 4 塩基が削られている事が、電気泳動の結果により確認された。

3. PCR 産物のサブクローニング

pUC118 DNA マルチクローニングサイト中にあらかじめ挿入してあるカナマイシン耐性遺伝子 (約 1.5 kb) を、M4、RV プライマーを用いて *TaKaRa Taq*[™] で PCR 増幅した。反応後、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い、ゲルより切り出して目的 DNA 断片を精製した。この DNA 断片を基質としてカナマイシン耐性遺伝子のサブクローニングを試みた。以下にその手順と結果を示す。

この DNA 断片 (約 500 ng、0.5 pmol) を実験操作 III-B. に従って末端平滑化した後、pUC118/*Hinc* II 分解物 (約 100 ng、0.05 pmol) とライゲーションした (末端平滑化反応液 10 μ l, vector DNA 1 μ l, Ligation Solution A 40 μ l, Ligation Solution B 10 μ l, 16°C、30 分)。このライゲーション産物 20 μ l で *E. coli* JM109 Competent Cells 100 μ l を形質転換し、X-Gal、IPTG、アンピシリンを含むプレート上でコロニーを形成させた。プレート上の白色のコロニーの一部をカナマイシンプレートに移し実際のクローニング効率を調べた。

さらにベクターの self-ligation によるバックグラウンドをさけるために末端平滑反応後の DNA の 5' 末端を T4 Polynucleotide Kinase を用いてリン酸化し、脱リン酸化処理済みの pUC118/*Hinc* II とのライゲーションを行い、形質転換した。この場合、末端平滑反応後の DNA の 5' 末端のリン酸化は、5 μ l 末端平滑化反応液、10 \times リン酸化 Buffer (500 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM MgCl₂、50 mM DTT) 2.5 μ l、10 mM ATP 1 μ l、滅菌精製水 15.5 μ l、T4 Polynucleotide Kinase 1 μ l (Total 25 μ l) を 37°C で 30 分間保温した後、65°C、10 分間で酵素を熱失活させた。

以上の結果を下表に示す。

インサート		ベクター 脱リン酸化	形質転換効率 青色コロニー / 白色コロニー (コロニー / μg vector DNA)	カナマイシン 耐性コロニー / 白色コロニー (%)
末端平滑化	末端平滑後の 5'末端リン酸化			
—	—	—	$1.4 \times 10^6 / 1.8 \times 10^4$	0
+	—	—	$1.2 \times 10^6 / 3.2 \times 10^4$	64
+	+	+	$6.0 \times 10^2 / 2.1 \times 10^4$	71

本実験に使用したコンピテントセルの形質転換効率は $1.5 \times 10^7 / \mu\text{g}$ pUC118 DNA であった。末端平滑反応に用いる基質は精製度が高いほど高いクローニング効率が得られる。5'末端リン酸化の際、末端平滑反応液の持ち込みが少ないほど高いクローニング効率が得られる。

V. 製品に関する注意

- 本製品は、5'突出末端が脱リン酸化された DNA でも平滑化できますが、3'陥没末端にリン酸基をもつ DNA は平滑化できません。ショットガンクローニングの際、超音波処理で DNA を分解すると、3'陥没 P 末端の DNA が含まれる可能性がありますので注意してください。
- Ligation Solution A、B は氷冷水中でボルテックス等により攪拌しながら融解させ、使用する直前に、もう一度攪拌してください。凍結融解による失活はありません。
- 形質転換の際、フェノール処理、エタノール沈殿の操作は必要ありません。ライゲーション後の全 DNA を回収する場合は、直接エタノール沈殿を行ってください。

VI. 関連製品

DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
E. coli DH5 α Competent Cells (製品コード 9057)
Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (製品コード 2120A/B)
Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (製品コード 2250A/B)
T4 Polynucleotide Kinase (製品コード 2021A/B)
T4 DNA Polymerase (製品コード 2040A/B)
pUC118 *Hinc* II/BAP (製品コード 3322)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社