

製品コード 6030

研究用

---

**TAKARA**

**Kilo-Sequence 用  
Deletion Kit**

---

説明書

v202103Da

---

Kilo-Sequence 用 Deletion Kit は、M13 mp 系ファージ (mp18/mp19 など) および pUC 系プラスミド (pUC18/pUC19、pUC118/pUC119 など) などのマルチクローニングサイトにクローニングされた数千 base の DNA 塩基配列を一挙に決定するためのキットです。

また、単にある DNA フラグメントをその末端からデレーションさせる目的にも有効です。

本キットは Steven Henikoff の方法 (*Gene* (1984) **28**; 351-359) および Celeste Yanisch-Perron らの方法 (*Gene* (1985) **33**; 103-119) を改良したものです。

## I. キットの内容 (5 回分)

(1) Exonuclease III (180 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
(2) Exo III Buffer* <sup>1</sup>	500 $\mu$ l
(3) Mung Bean Nuclease (25 U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
(4) MB Nuclease Buffer* <sup>2</sup>	500 $\mu$ l
(5) Klenow Fragment (2 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
(6) Klenow Buffer* <sup>3</sup>	250 $\mu$ l
(7) Ligation Solution A* <sup>4</sup>	500 $\mu$ l
(8) Ligation Solution B* <sup>4</sup>	60 $\mu$ l

【組成】 * 1 :	50 mM Tris-HCl, pH8.0	* 3 :	7 mM Tris-HCl, pH7.5
	100 mM NaCl		0.1 mM EDTA
	5 mM MgCl <sub>2</sub>		20 mM NaCl
	1 mM DTT		7 mM MgCl <sub>2</sub>
			各 0.1 mM dNTPs

* 2 :	40 mM Na-acetate, pH4.5	* 4 :	DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021) の組成と同じものです。
	100 mM NaCl		
	2 mM ZnCl <sub>2</sub>		
	10% Glycerol		

## II. 保存

− 20°C

## III. 使用方法および使用例

### III-1. キットを用いる前に

M13 mp 系ベクターおよび pUC 系プラスミドなどのマルチクローニングサイトに塩基配列を決定したい DNA をクローニングし、その cccDNA を調製します。そしてインサート DNA のプライマーをアニーリングさせる側の末端から順次デレーションをかけたミュータントを取るために、プライマーのアニーリングサイトとインサート DNA との間を 2 つの制限酵素 (仮にインサート DNA 側を a、プライマーのアニーリング側を b とする) で切断します。このとき a、b 両酵素ともインサート DNA にその制限酵素サイトがないものを選びます。

また a の酵素 (インサート DNA 側) は DNA を切断したあと 5' 末端が突出するものか、または平滑末端になるもの (*Eco*R I、*Sma* I、*Xma* I、*Bam*H I、*Xba* I、*Sal* I、*Acc* I、*Hinc* II、*Hind* III など)、そして b の酵素は 3' 末端が突出するもの (*Sac* I、*Kpn* I、*Pst* I、*Sph* I など) を選択して切断します。

8 塩基認識制限酵素 *Sse*8387 I は、pUC18/pUC19、pUC118/pUC119、M13 mp18/mp19 の *Pst* I site を切断できるので有用です。

ocDNA を用いてデレーションミュータントの作製を行うと Exonuclease III がニックの入った場所から作用して非特異的なデレーションを起こしたミュータントができますので、ocDNA の含量が低いプラスミド (あるいはファージ) DNA を用いてください。ocDNA の含量が高い場合には、CsCl 密度勾配超遠心分離などで cccDNA を精製してから使用することをお勧めします。

また、*Sac* Iなどの制限酵素を使用する場合、Star 活性の出現しやすい条件で反応させると DNA にニックが入り、その部分からプライマーのアニーリング部位方向へも Exonuclease III による消化を受けることがありますので充分注意してください。

本キットに含まれる Exonuclease III は、その酵素の性質上、DNA 末端が 3' 突出であっても、その末端の形状、および配列によっては基質として消化する場合があります。例えば、2 塩基突出型 (*Sac* II、*Pvu* I 等)、3 塩基突出型 (*Sfi* I 等) により生じた末端は Exonuclease III の基質となり得ます。さらに、4 塩基突出末端であっても、*Apa* I 等を使用した場合には消化されますので注意してください。

(通常、3' 末端突出形成酵素で先に切断し、必ずリア型になったことを確認してください。ただし、マルチクローニングサイトなどの隣接する 2 つのサイトを利用する場合は各制限酵素の必要認識塩基数での活性に応じて切断順序を決めてください)。

[例]

目的 DNA フラグメントを M13 mp18 の *Bam*HI サイトにクローニングした場合、a の酵素としては *Xba* I、*Sal* I、*Acc* I、*Hinc* II があげられ、b の酵素としては *Pst* I、*Sph* I があげられる (図 1 参照)。

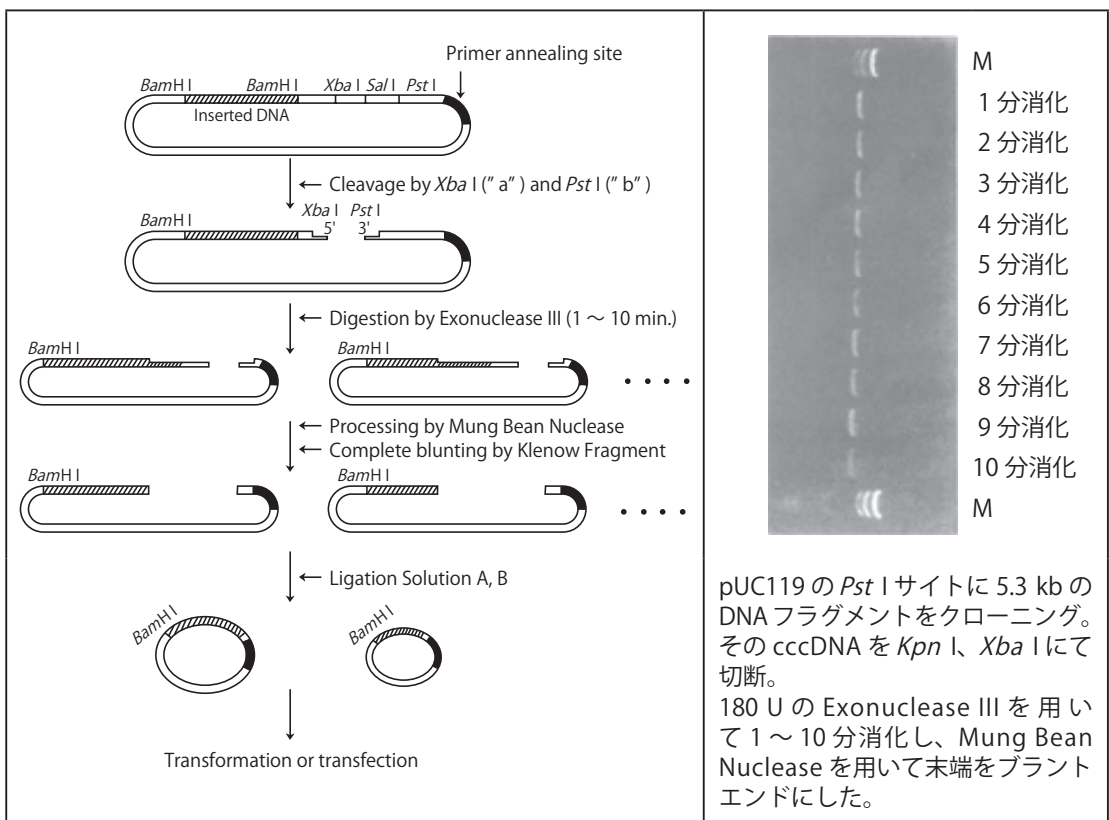


図 1. M13 mp18 の *Bam*HI サイトにクローニングされた DNA 断片をデレージョンさせる場合

図 2. pUC119 の *Pst* I サイトにクローニングした DNA 断片のデレージョン例 (M:  $\lambda$ -*Hind* III digest)

## III-2. 操作方法

### A. キロシーケンス用デレーションミュータント作製の手順

- (1) 塩基配列を決定したい（または単にデレーションをかけたい）DNA がクローン化された M13 RF DNA または pUC 系プラスミド(cccDNA)などを 1~2 pmol(5~10 µg) 用意する。
- (2) III-1 で述べた a、b の両制限酵素で切断する。
- (3) 等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1、v/v/v) で 1 回抽出する。遠心して上層を別のチューブに移し、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1、v/v) を加え 1 回抽出する。
- (4) 遠心して上層を別のチューブに移し、1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え、-20°C で 1 時間以上放置後遠心して沈殿を回収する。70%エタノールで洗浄後、真空乾燥する。
- (5) (4) で得られた DNA を 100 µl の Exo III Buffer に溶解する。
- (6) 別のチューブに MB Nuclease Buffer を 100 µl 入れておく。
- (7) (5) の DNA 溶液に 1 µl (180 U) の Exonuclease III を加えボルテックスにて攪拌し、37°C にてインキュベートする。そして 1 分毎に 10 µl ずつサンプリングし、反応を止めるために (6) で用意した 100 µl の MB Nuclease Buffer の中へ順次入れていく。

Exonuclease III は 2 本鎖 DNA 部分を認識し、その 3' 側から 5' 方向へ分解する特性を持っています。つまり 5' 側が突出した末端あるいはプラントに切断された末端の 3' 側からの分解が進みますが、3' 側が突出した末端の分解は起こりません。

上記の条件で 1 分間に約 300 bp 程削られます。300 bp 以下のデレーションミュータントを作製するには反応温度を 25°C にして 30 秒ごとにサンプリングを行います。

この温度では 1 分間に約 100 ~ 150 bp 程削られます。

MB Nuclease Buffer 容量は 1 分毎に 10 分間、10 µl ずつ Exonuclease III 反応液を加えることにより 200 µl になります。

- (8) 65°C、5 分間インキュベートして Exonuclease III を失活させ、37°C にもどす。
- (9) 2 µl (50 U) の Mung Bean Nuclease を加える。
- (10) 37°C、15 ~ 30 分間インキュベートする。
- (11) (3) (4) の操作を行う。
- (12) (11) で得られた DNA を 50 µl の Klenow Buffer にて溶解させる。<sup>\*1</sup>
- (13) 1 µl (2 U) の Klenow Fragment を加え 37°C、15 分間インキュベートする。<sup>\*2</sup>
- (14) 上記 DNA 溶液 5 ~ 10 µl を 100 µl の Ligation Solution A に加える。
- (15) 12 µl の Ligation Solution B を加えボルテックスにより攪拌する。
- (16) 16°C、1 時間 ~ 1 晩反応させる。<sup>\*3</sup>
- (17) 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え、-20°C で 1 時間以上放置後遠心して沈殿を回収する。70%エタノールで洗浄後、真空乾燥する。
- (18) (17) で得られた DNA 沈殿を数 U の制限酵素 a で切断し<sup>\*4</sup>、そのままコンピテントセル (200 µl 以上) に形質転換させる。

\* 1 : この段階で一部を電気泳動し、DNA が目的とするサイズ間でラダーとなっていることを確認することをお勧めします。電気泳動に使用した量によって、ステップ(13)での Klenow Fragment の添加量を調整してください。

\* 2 : Mung Bean Nuclease によって DNA の末端は、ほぼプラントエンドになっていますが Klenow Fragment による完全な末端修復によって後の Ligation 効率をさらに上げることができます。

\* 3 : Ligation Solution A、B の反応時間は 1 時間でもよいのですが、1 晩反応させることにより Ligation 効率をさらに上げることができます。

\* 4 : ここで制限酵素 a を作用させるのは (2) の過程で完全に切断しきれなかったプラスミドを直鎖型にして形質転換の際のバックグラウンドを下げるため、必須な操作です。

## B. デレーションミュータントのスクリーニング

A. の一連の操作にて数十から数百個のコロニーまたはプラークが得られますが、そのうち 50 個程度 (長いインサート DNA の場合は 100 個程度) を拾い、2 ml の small scale にて培養し、プラスミドを精製します。そして適当な制限酵素で切断し、アガロースゲルにて電気泳動し、DNA のサイズを調べます。約 300 bp ごとにデレーションのかかったクローンを選択し、そのクローンからテンプレート DNA を調製し、シーケンス解析を行います。

## C. サイズセレクション

操作 A- (13) で得られた DNA は、アガロースゲル電気泳動によるサイズセレクションを行うことにより、「B. デレーションミュータントのスクリーニング」での DNA サイズのコントロールができます。

- (1) 操作 A- (13) で得られた DNA を用い、アガロースゲル電気泳動を行う。<sup>\*5</sup>
- (2) 適当なサイズの部分を切り出し、ゲルより DNA を抽出する。<sup>\*6</sup>
- (3) 以後、操作 A- (14) の DNA 溶液のかわりに、上記の DNA を用いて A- (14) 以降の操作を行う。  
ただし、操作 A- (18) の制限酵素 a による切断は省略できる。

\* 5 : この場合、アガロースは PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A) が適しています。

\* 6 : この時、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いると、簡単に目的の DNA を回収することができます。

## IV. 実験例

pUC118 の *Eco*R I -*Bam*H I サイトに約 5.3 kb の大腸菌染色体 DNA 切断を組み込んだ cccDNA を、*Bam*H I (5' 突出) と *Pst*I (3' 突出) で切断し、デレーションミュータントを作製した。

本製品を用いて操作を行い、Klenow Fragment による末端修復後、アガロースゲル電気泳動を行った。そのゲルより、8.3 ~ 3.1 kb の間を大きさの順に 4 つの部分に切り分け (大きい順に fr.1 ~ 4)、それぞれゲルから DNA を抽出し、ライゲーション、トランスフォーメーションを行った。

精製した DNA を *Eco*R I、*Hind* III で切断して、挿入断片の大きさを確認した (図 3)。このように、確実にサイズの異なるクローンが得られるので、特定のサイズのクローンを得たい場合に適している。

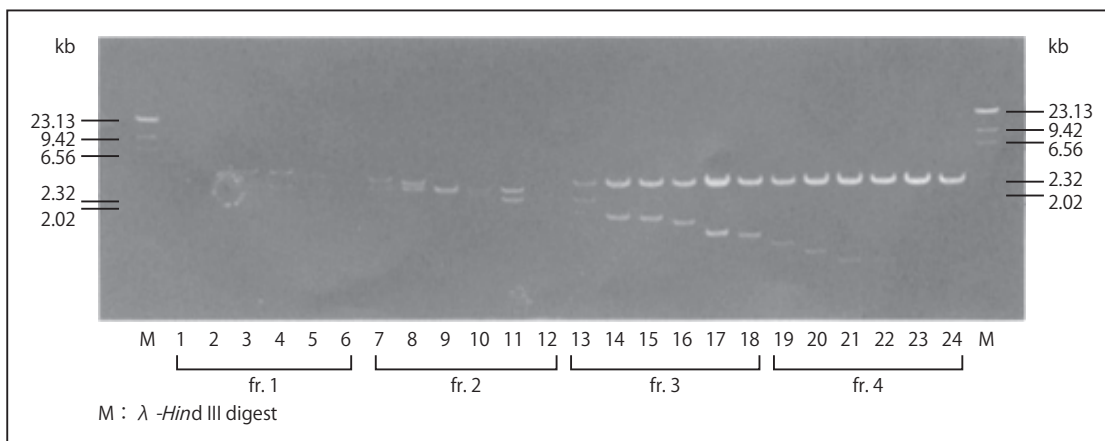


図 3. pUC118 DNA にクローニングした DNA 断片のデレーションミュータントの作製

## V. 参考文献

- 1) Steven Henikoff. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted break-points for DNA sequencing. (1984) *Gene*. **28**, 351-359.
- 2) Celeste Yanisch-Perron. Jeffrey Vieira and Joachim Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. (1985) *Gene*. **33**, 103-119.

## IV. 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。
- PrimeGel 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**