製品コード 6019

研究用

TaKaRa

# Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®

説明書

v201510Da

*Taq* DNA ポリメラーゼをベースとする PCR 酵素を用いて得られた増幅産物のほとんどは、その 3′ 末端にデオキシリボアデノシン（dA）が一塩基付加されています。これらの PCR 増幅産物をクローニングする方法として、3′ 末端にデオキシリボチミジン（dT）を一塩基付加した T ベクターを使用し、PCR 増幅産物の dA 一塩基突出部分と相補的となることを利用してクローニングを行う、TA クローニング法があります。Mighty TA-cloning Kit（製品コード 6028）は、この TA クローニング法により、PCR 産物を短時間で簡便にクローニングするためのキットです。ライゲーション反応に DNA Ligation Kit <Mighty Mix>（製品コード 6023）を使用していますので、簡便な操作で短時間に高効率なライゲーション反応を行うことが可能です。
一方、PrimeSTAR シリーズなどの α 型 DNA ポリメラーゼにより増幅された PCR 産物のほとんどは、酵素自身の持つ強力な 3′ → 5′ exonuclease 活性により平滑末端となっており、そのままでは TA クローニングに用いることはできません。PrimeSTAR シリーズによる増幅産物を TA クローニングに用いたい場合には、3′ 末端に dA を付加する必要があります。
本製品 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR には、PrimeSTAR シリーズによる PCR 増幅産物の 3′ 末端に、簡便に dA を付加するための試薬（A-overhang mixture）が含まれています。この試薬と上記 TA クローニングキットを組み合わせることで、PrimeSTAR シリーズによる増幅産物専用の TA クローニング用試薬として使用することができます。

## I. 内容（20 回分）

Mighty TA-cloning Kit
- pMD20-T vector（50 ng/μl） 20 μl
- Ligation Mighty Mix ＊1 50 μl × 2
- Positive Control Insert ＊2 10 μl

A-overhang mixture
- A-overhang enzyme 10 μl
- 10 × Buffer 20 μl
- dATP 10 μl

＊1：Ligation Mighty Mix は DNA Ligation Kit <Mighty Mix> と同じものです。

＊2：3′- 末端に dA オーバーハングを有する約 200 bp の DNA フラグメント（*E. coli* ゲノム DNA を鋳型として、*TaKaRa Ex Taq*® で増幅したもの）（10 ng/μl）

## II. キット以外に必要な試薬

- PCR 増幅産物回収・精製用試薬（VI. 操作（1）参照）
- コンピテントセルまたはエレクトロセル（*E. coli*）
- SOC 細菌培養培地
- アンピシリン／ X-Gal および IPTG を添加した LB プレート

## III. 保存 －20℃

## IV. ベクターマップ

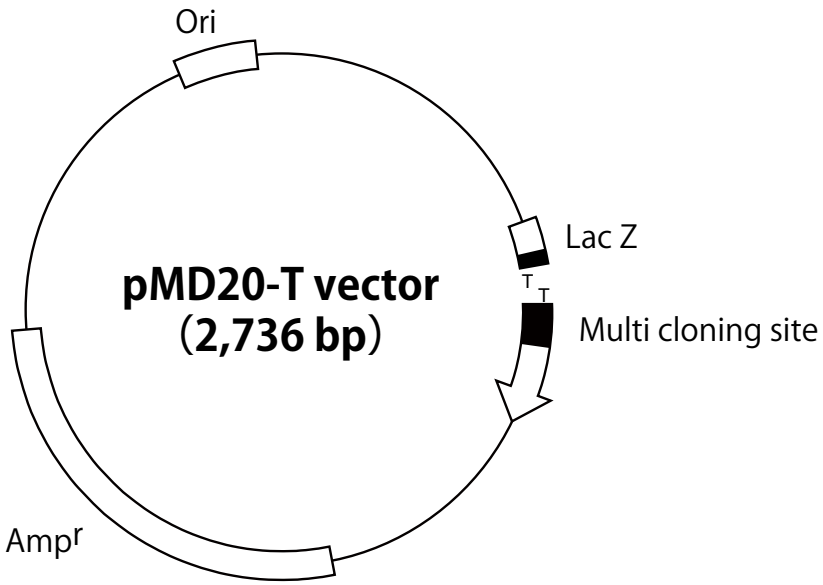


図 1. pMD20-T のベクターマップ

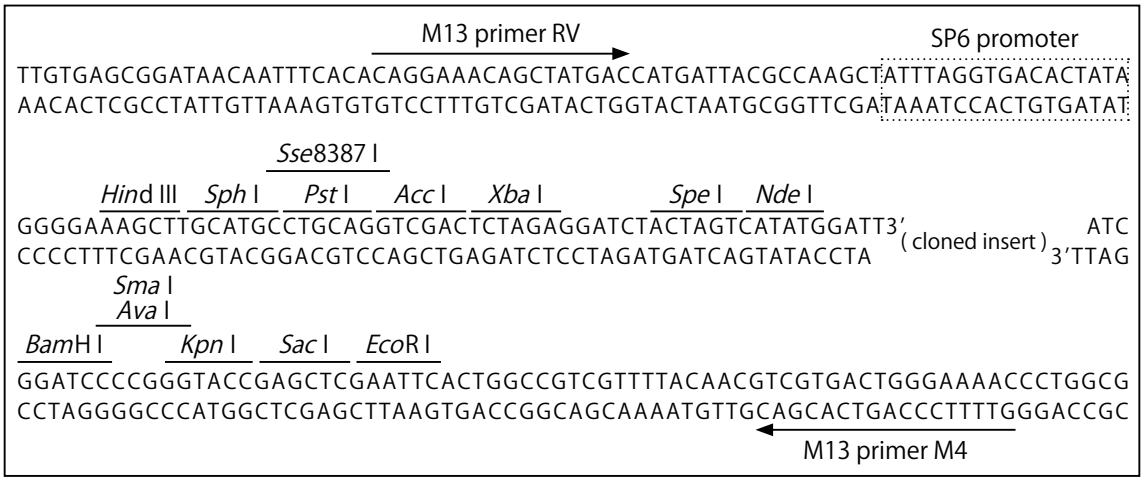


図 2. pMD20-T クローニングサイト

## V. 使用上の注意

1. Ligation Mighty Mix は氷中で溶解し、穏やかに撹拌してから使用してください。

2. クローニングするフラグメントによっては、挿入されるフラグメントの長さや向きにより停止コドンの出現やフレームシフトが起こらず、カラーセレクションプレート上で淡青色のコロニーとなることがあります。このような場合、コロニー PCR を行ってインサートを確認することをお勧めします。

3. アガロースゲルから目的の増幅フラグメントを回収する場合、UV の照射に注意してください。長い時間照射されると DNA がダメージを受け、クローニングの効率が低下します。

4. PCR の鋳型にクローニングベクターと同一の選択マーカー（pMD20-T vector の場合は Amp$^r$）を有するプラスミドを用いる場合は、鋳型プラスミドそのものを保持する形質転換コロニーの出現を防ぐため、PCR 反応液を電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収・精製して本操作に使用することをお勧めします。

## VI. 操作

### （1）目的遺伝子の増幅、精製

PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、あるいは Tks Gflex™ DNA Polymerase を用いて PCR を行い、目的遺伝子断片を増幅します。反応液の一部を使用し、増幅産物を電気泳動で確認してください。

- 増幅産物がシングルバンドの場合、フェノール / クロロホルム抽出後、エタノール沈殿により増幅産物を精製して（2）dA 付加反応に進む。または、QuickClean Enzyme Removal Resin（製品コード 631770）＊により増幅産物を精製後、（2）dA 付加反応に進む。

  ＊：QuickClean Enzyme Removal Resin を利用する場合は、以下プロトコールに従い精製を行ってください。

  1. QuickClean Enzyme Removal Resin を十分に懸濁する。
  2. PCR 反応液を 1.5 ml チューブに移し、1/10 量の QuickClean Enzyme Removal Resin を添加後、ボルテックスにより 10 ～ 20 秒間十分に攪拌する。
  3. 2 のチューブを 10,000 rpm 以上で 1 分間遠心した後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。この時、QuickClean Enzyme Removal Resin が上清に混入しないよう十分に注意する。
  4. 回収した上清について、1 ～ 3 の操作を再度行い、得られた上清を「回収した DNA 溶液」として、（2）dA 付加反応を行う。

- プライマーダイマーや非特異的増幅バンドが認められた場合は、電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを回収する。この際、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）などを使用すると良い。これらの操作の後、（2）dA 付加反応に進む。

### (2) dA 付加反応

1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製し、よく混和する。

| | |
|---|---|
| 回収した DNA 溶液 | 8 μl |
| 10 × Buffer | 1 μl |
| dATP | 0.5 μl |
| A-overhang enzyme | 0.5 μl |
| Total | 10 μl |

2. 65℃で 10 分間反応する。
3. 反応液を (3) ライゲーション反応に使用する。

[ 注意 ] dA 付加反応は、できるだけライゲーション反応の直前に行ってください。

### (3) ライゲーション反応

1. 新しいマイクロチューブに dA 付加を行った PCR 産物を 1 μl*1 入れる。
2. pMD20-T vector を 1 μl、滅菌蒸留水 3 μl*1 を加え混合する。
   ＊ 1：適宜調整可能。PCR 産物と滅菌蒸留水で、あわせて 4 μl になるように調整してください。
3. Ligation Mighty Mix を 5 μl 加え、穏やかに混合する。
4. 16℃で 30 分間インキュベートする。
5. 100 μl のコンピテントセル*2 に対して 4. の溶液全量を用いて形質転換を行う。
   エレクトロポレーション法により形質転換する場合は、フェノール抽出〜エタノール沈殿でバッファー交換してから行う。
   ＊ 2：*E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells などをご使用ください。(*E. coli* HST08 Premium Competent Cells の場合は、IPTG は不要です。)
6. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する*3。
   ＊ 3：適宜 SOC 培地で希釈して、複数のプレートに塗布してください。
7. 37℃で一晩培養し、青／白判定で白コロニーを候補とする。

### (4) インサートの有無の確認

目的とする DNA 断片が組み込まれた組換え体を確認するための簡便な方法として、大腸菌の保持するプラスミドのインサートサイズをコロニー PCR により確認する方法があります。
pMD20-T vector は M13 primer M4、M13 primer RV が使用できるので、これらのプライマーと EmeraldAmp PCR Master Mix、SapphireAmp Fast PCR Master Mix などを組み合わせて使用することで、迅速にインサートの有無を確認することが可能です。

【 実施例 】
PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いて増幅した 2 kb の PCR 産物 (シングルバンド) を、本キットのプロトコールに従って dA 付加後、pMD20-T vector へのライゲーションに使用し、*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052) を用いて形質転換した場合、$1 \times 10^3$ 程度の陽性クローンが出現します。

## VII. コントロール反応

1. 新しいマイクロチューブに Positive Control Insert を 1 μl 入れる。
2. pMD20-T vector を 1 μl、滅菌蒸留水 3 μl を加え混合する。
3. Ligation Mighty Mix を 5 μl 加え、穏やかに混合する。
4. 16℃で 30 分間インキュベートする。
5. 100 μl のコンピテントセル＊1 に対して 4. の溶液全量を用いて形質転換を行う。
   エレクトロポレーション法により形質転換する場合は、フェノール抽出～エタノール沈殿でバッファー交換してから行う。

   ＊ 1：*E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells などをご使用ください。（*E. coli* HST08 Premium Competent Cells の場合は、IPTG は不要です。）
6. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する。
7. 37℃で一晩培養し、青／白判定で白コロニーを候補とする。＊ 2

   ＊ 2：1 × $10^8$ コロニー / μg pUC119 DNA の形質転換効率を持つ *E. coli* JM109 コンピテントセルを使用した場合、ベクター 50 ng あたり、約 1 ～ 5 × $10^4$ 個の白色コロニーが得られます。

## IX. 関連製品

Mighty TA-cloning Kit（製品コード 6028）
Reagent Set for Mighty Cloning Kit（Blunt End）(製品コード 6027）
T-Vector pMD20（製品コード 3270）
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）
*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells（製品コード 9028）
*E. coli* JM109 Competent Cells（製品コード 9052）
*E. coli* JM109 Electro-Cells（製品コード 9022）
QuickClean Enzyme Removal Resin（製品コード 631770）
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（製品コード 740609.10/.50/.250）
M13 Primer M4（製品コード 3832A/B）
M13 Primer RV（製品コード 3830A/B）

＜ PCR 酵素＞
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase（製品コード R010A/B）
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（製品コード R050A/B）
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase（製品コード R045A/B）
Tks Gflex™ DNA Polymerase（製品コード R060A/B）

＜インサートチェック用＞
EmeraldAmp® PCR Master Mix（製品コード RR300A/B）
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix（製品コード RR320A）
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix（製品コード RR350A/B）

## X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。

- PrimeSTAR、*TaKaRa Ex Taq*、EmeraldAmp、SapphireAmp はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Tks Gflex 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
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999　Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201510Da