

製品コード 6027

研究用

Takara

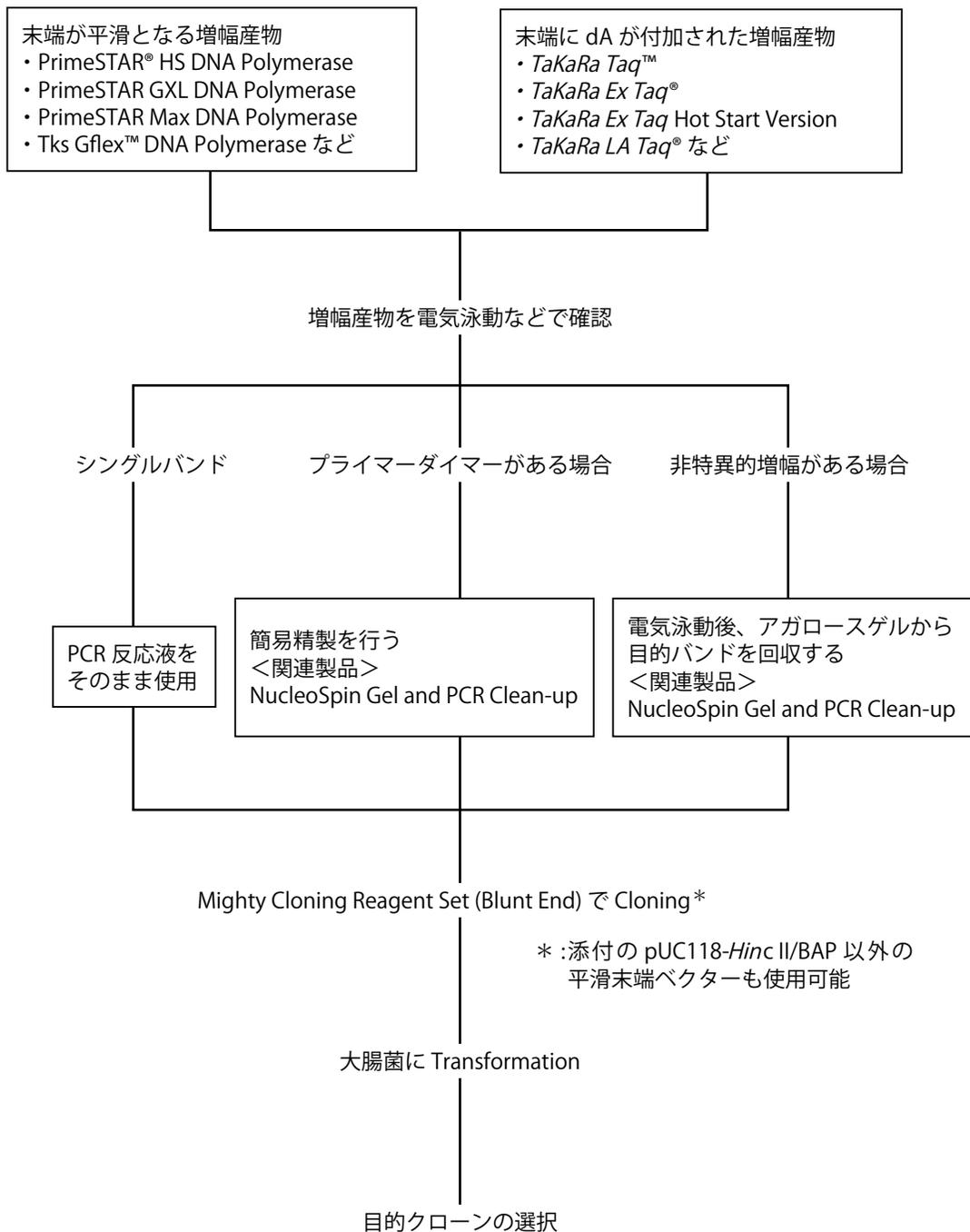
**Mighty Cloning Reagent Set
(Blunt End)**

説明書

v201909Da

【PCR 産物の平滑末端クローニングの流れ】

目的遺伝子を PCR で増幅



本製品は、PCR産物を平滑末端ベクターに短時間で簡便にクローニングするための試薬セットです。PCR産物のリン酸化と末端平滑化を同時に行うことにより、末端が平滑であるPCR産物はもちろん、dAが付加されたPCR産物からでも、一度の反応でライゲーション可能なDNA断片を得ることができます。PCR産物は、酵素の失活、未反応のdNTPやプライマーの除去などの前処理の必要はなく、そのままBlunting Kination反応に用いることができます。また、ライゲーション反応には、非常に効率の良いDNA Ligation Kit <Mighty Mix>を使用しています。このため、ライゲーション反応までの操作を極めて短時間のうちに終了することができます。

I. 内容 (20回分)

1. 10 × Blunting Kination Buffer		40 μl
2. Blunting Kination Enzyme Mix		20 μl
3. Ligation Mighty Mix* ¹		120 μl
4. Control Vector (pUC118- <i>Hinc</i> II/BAP)	50 ng/μl	20 μl
5. Control Insert* ²	200 ng/μl	10 μl
6. ddH ₂ O		340 μl

* 1 : Ligation Mighty Mix は DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) と同じものです。

* 2 : λ DNA を鋳型として *TaKaRa Ex Taq* で増幅した 500 bp の PCR フラグメント。

II. 保存

− 20°C

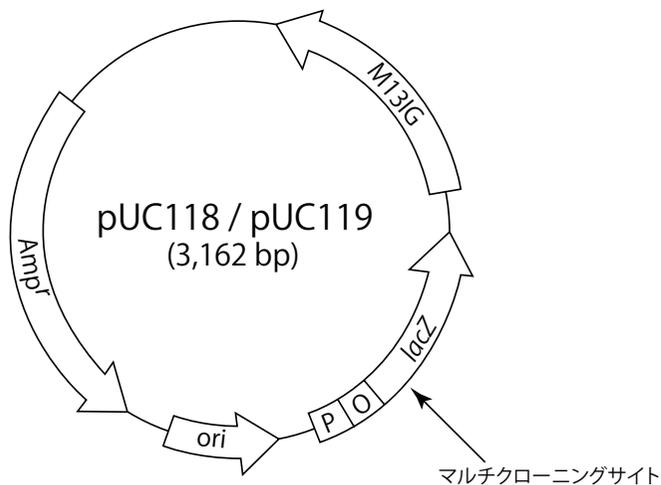
III. 本製品以外に必要な試薬 (主なもの)

- コンピテントセルまたはエレクトロセル
- SOC 培地
- アンピシリン / X-Gal / IPTG 添加 LB プレート

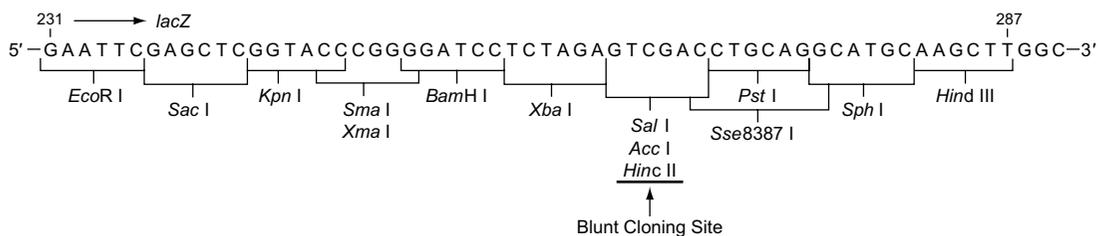
IV. pUC118 *Hinc* II/BAP

pUC118 *Hinc* II/BAP は、*Hinc* II を用いて pUC118 DNA を切断後、大腸菌アルカリホスファターゼ (BAP) により脱リン酸化を行った平滑末端クローニングベクターです。本ベクターにクローニングした DNA のシーケンスは、M13 プライマー M4、RV で確認できます。

●pUC118の概略図



●pUC118クローニングサイト



V. 操作

V-A. PCR 反応液をそのまま使用する場合

< Blunting Kination 反応 >

1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
PCR 反応液*1~3	< 2 μ l
10 × Blunting Kination Buffer	2 μ l
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μ l
ddH ₂ O	X μ l
Total	20 μ l

2. 37°Cで10分間インキュベートする。
3. Blunting Kination 反応液に 80 μ l の滅菌精製水を添加し、全量を 100 μ l とする。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を 100 μ l 添加し、よく混合。
4. 室温で 12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、DNA を含む上層を新しいチューブに移す。
5. 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を添加し、混合。
6. 室温で 12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、上層を新しいチューブに移す。
7. 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μ l の冷エタノールを添加して混合後、15 ~ 20 分間、- 80°Cで静置する。
8. 4°Cで 12,000 rpm、10分間遠心操作を行い、上清を除去。
9. 沈殿に冷 70%エタノールを添加し、4°Cで 12,000 rpm、5分間遠心後、上清を除去。
10. 沈殿を乾燥。
11. 10 ~ 20 μ l の TE に溶解する。

<ライゲーション反応>

12. 新しいマイクロチューブに精製 DNA 溶液 5 μ l を加える。
13. pUC118 *Hinc* II/BAP (50 ng/ μ l) を 1 μ l 加え、混合する。
14. Ligation Mighty Mix を 6 μ l 加え、穏やかに混合する。
15. 16°Cで1時間インキュベートする。
16. 100 μ l のコンピテントセルに対して 15. 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/クロロホルム抽出~エタノール沈殿でバッファー交換をしてから行う。
17. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する。

* 1 : PCR 産物に目的のバンド以外のエキストラバンドが混在している場合や、低分子の DNA (primer dimer など) ばかりがクローニングされる場合には、まず目的フラグメントの精製を行ってください。

* 2 : PCR 反応液の使用量は 2 μ l 程度が適当です。多量に用いた場合は反応効率が低下しますので、増幅産物の添加量を増やしたい場合は、必要に応じてエタノール沈殿などによるバッファー交換を行ってください。

* 3 : PCR の鑄型にクローニングベクターと同一の選択マーカーを有するプラスミドを用いる場合は、鑄型プラスミドそのものを保持するコロニーの出現を防ぐために、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。

V-B. 精製した DNA 断片を用いる場合

< Blunting Kination 反応 >

1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
DNA Fragment	0.1 ~ 2 pmol
10 × Blunting Kination Buffer	2 μ l
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μ l
ddH ₂ O	X μ l
Total	20 μ l

2. 37°Cで10分間インキュベートする。
3. Blunting Kination 反応液に 80 μ l の滅菌精製水を添加し、全量を 100 μ l とする。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を 100 μ l 添加し、よく混合。
4. 室温で 12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、DNA を含む上層を新しいチューブに移す。
5. 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を添加し、混合。
6. 室温で 12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、上層を新しいチューブに移す。
7. 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 250 μ l の冷エタノールを添加して混合後、15 ~ 20分間、-80°Cで静置する。
8. 4°Cで 12,000 rpm、10分間遠心操作を行い、上清を除去。
9. 沈殿に冷 70%エタノールを添加し、4°Cで 12,000 rpm、5分間遠心後、上清を除去。
10. 沈殿を乾燥。
11. 10 ~ 20 μ l の TE に溶解する。

< ライゲーション反応 >

12. 新しいマイクロチューブに精製 DNA 溶液 5 μ l を加える。
13. pUC118 *Hinc* II/BAP (50 ng/ μ l) を 1 μ l 加え、混合する。
14. Ligation Mighty Mix を 6 μ l 加え、穏やかに混合する。
15. 16°Cで1時間インキュベートする。
16. 100 μ l のコンピテントセルに対して 15. 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/クロロホルム抽出~エタノール沈殿でバッファー交換をしてから行う。
17. アンピシリン、X-Gal、IPTG を含む LB プレートに塗布する。

V-C. コントロール反応

< Blunting Kination 反応 >

1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
Control Insert	2 μ l
10 \times Blunting Kination Buffer	2 μ l
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μ l
ddH ₂ O	15 μ l
Total	20 μ l

2. 37°Cで10分間インキュベートする。
3. Blunting Kination 反応液に80 μ lの滅菌精製水を添加し、全量を100 μ lとする。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)を100 μ l添加し、よく混合。
4. 室温で12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、DNAを含む上層を新しいチューブに移す。
5. 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を添加し、混合。
6. 室温で12,000 rpm、5分間遠心操作を行い、上層を新しいチューブに移す。
7. 10 μ lの3 M 酢酸ナトリウムと250 μ lの冷エタノールを添加して混合後、15 ~ 20分間、-80°Cで静置する。
8. 4°Cで12,000 rpm、10分間遠心操作を行い、上清を除去。
9. 沈殿に冷70%エタノールを添加し、4°Cで12,000 rpm、5分間遠心後、上清を除去。
10. 沈殿を乾燥。
11. 10 ~ 20 μ lのTEに溶解する。

<ライゲーション反応>

12. 新しいマイクロチューブに精製DNA溶液5 μ lを加える。
13. pUC118 *Hinc* II/BAP (50 ng/ μ l)を1 μ l加え、混合する。
14. Ligation Mighty Mixを6 μ l加え、穏やかに混合する。
15. 16°Cで1時間インキュベートする。
16. 100 μ lのコンピテントセルに対して15.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/クロロホルム抽出~エタノール沈殿でバッファー交換をしてから行う。
17. アンピシリン、X-Gal、IPTGを含むLBプレートに塗布する。

1 \times 10⁸ コロニー/ μ g pUC118 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2 ~ 8 \times 10⁴ 個の白色コロニーが得られます。Control Insertの両末端の配列は、5'-GAC...GTC-3'になっています。このため、正しく処理された場合には *Hinc* II サイトが再生され、インサートを切り出すことができます。

VI. 使用上の注意点

1. Ligation Mighty Mix は氷中で溶解し、ピペッティング等により、均一になるまでよく混合してから使用してください。凍結融解による失活はありません。
2. 形質転換効率が低い場合は、ライゲーション反応時間を overnight まで延長することをお試しください。
この操作で改善されない場合は、DNA の再精製をお勧めします。
3. 短い DNA 断片をクローニングした場合、インサートが挿入されても停止コドンの出現、フレームシフトなどが起こらず、カラーセレクションプレート上で淡青色のコロニーを生じることがあります。
4. 短い DNA 断片をクローニングした場合、インサート DNA 同士がライゲーションされ、数個つながった状態のクローンが出現することがあります。

VII. 関連製品

pUC118 *Hinc* II/BAP (製品コード 3322)
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)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

< 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)
TaKaRa Ex Taq® (製品コード RR001A/B/C)
TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)
TaKaRa LA Taq® (製品コード RR002A/B)
TaKaRa Taq™ (製品コード R001A/B/C)

< 大腸菌コロニー PCR に最適 >

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)

VIII. 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。
- ・PrimeSTAR、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、EmeraldAmp、SapphireAmp はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Tks Gflex、*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