

Blunting-Convenience Kit

Code No. 312-06291

簡易マニュアル Ver.4-2411

目的の遺伝子をベクターDNAに連結する際に適当な制限酵素がない場合、DNA末端が平滑であれば配列に依存することなくライゲーションすることができます。T4 DNA Polymerase は、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼで、3' →5' Exonuclease 活性と 5' →3' Polymerase 活性を持ち、5' 突出末端及び 3' 突出末端のどちらの場合もこの酵素で平滑化することができます。また、ライゲーション反応を短時間で行うことができる 2×Ligation Mix (Ligation-Convenience Kit)と組み合わせることによって、平滑化からライゲーションまでを短時間で行うことができます。

- * 本品は、DNA 末端の平滑化からライゲーションまでを迅速・簡便に行うためのキットです。
- * 10×Blunting Buffer には反応に必要な dNTP などが含まれているので、T4 DNA Polymerase を加えるだけで、簡単に DNA 末端の平滑化が行えます。
- * 5' 突出末端 DNA、3' 突出末端 DNA および 3' 末端に A が付加した PCR 産物などを平滑化できます。
- * 2×Ligation Mix を用いて、ライゲーション反応を短時間で行うことができます。

<Blunting 反応>	<Ligation 反応>
サンプル DNA 溶液(0.1~10 pmol) 17 µl	平滑化反応液 (1~5 µl),
10×Blunting Buffer 2 µl	平滑末端 DNA ベクター溶液,
T4 DNA Polymerase 1 µl	ddH ₂ O up to 10 µl
<hr/> Total 20 µl	<hr/> 2×Ligation Mix 10 µl
↓	Total 20 µl
37°Cで5分間反応させる	↓
↓	16°Cで5~30分間反応させる
氷上に置き反応を停止させる(平滑化反応液として、次の反応で一部を使用する)	↓
	形質転換

製品内容

キット内容品	容量 (25 反応用*)	備考
T4 DNA Polymerase	25 µl × 1 本	-20°C保存
10×Blunting Buffer	50 µl × 1 本	-20°C保存
2×Ligation Mix	250 µl × 1 本	-20°C保存

* 平滑化、ライゲーション共に 20 µl の反応系で使用した場合の反応数です。

保存および融解方法

-20°C保存

- ・失活を避けるため、T4 DNA Polymerase は絶対にボルテックスしないで下さい。
- ・2×Ligation Mix は、使用時に氷上にて完全に融解させ、ピペティングでよく混ぜてから使用して下さい。50 回までの凍結融解による反応効率の低下は認められておりません。

プロトコール

<Blunting 反応>

(1) 平滑化反応液の調製

5' 突出末端、3' 突出末端及び PCR 産物など、末端を平滑化したい DNA (DNA 末端濃度で 0.1~10 pmol)を 17 µl に調製する。

次に、10×Blunting Buffer を 2 µl 加え混合する。

- ・ DNA 末端濃度 0.1~10 pmol は pUC19 (2686 bp) 0.1~10 µg に相当します。

(2) 酵素の添加

T4 DNA Polymerase を 1 µl 加え、ピペティングで混合する。

- ・ T4 DNA Polymerase は絶対にボルテックスしないで下さい。ボルテックスにより失活する恐れがあります。

(3) 平滑化反応

37°Cで 5 分間反応させる。

- ・ 反応時間は 5 分間を厳守して下さい。

(4) 反応の停止

平滑化反応液を氷中に置き反応を停止する。

すぐに使用しない場合はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出、エタノール沈澱を行い-20°Cで保存する。

<Ligation 反応>

(5) ライゲーション反応液の調製 (DNA 溶液の調製)

平滑化反応液 (1~5 μ l)、平滑末端 DNA ベクター溶液を合わせて 10 μ l の DNA 溶液を調製する。

- ・ ライゲーション反応に持ち込む平滑化反応液は 5 μ l 以下にして下さい。5 μ l 以上持ち込む場合はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後、エタノール沈殿を行い ddH₂O または TE (pH8.0) に溶解してから使用して下さい。

(6) ライゲーション反応液の調製 (酵素の添加)

DNA 溶液と等量の 10 μ l の 2×Ligation Mix を添加し、混和する。

- ・ 2×Ligation Mix は、使用時に氷上にて完全に融解させ、ピペティングでよく混ぜてから使用して下さい。

(7) ライゲーション反応

16°C で 5~30 分間反応させる。

- ・ 16 時間、オーバーナイト等の長時間ライゲーションを行うと、形質転換効率が著しく低下する場合があります。

(8) 形質転換

反応液をそのまま形質転換に用いる。

- ・ 形質転換に用いる反応液の量はコンピテントセルの 1/10 量以下にして下さい。多量の反応液を使用すると、形質転換効率が低下することがあります。
- ・ 反応液の量がコンピテントセルの 1/10 量以上になってしまう場合は、ライゲーション反応後、エタノール沈澱法によって DNA を回収し、その DNA をコンピテントセルの 1/10 量以下になるように ddH₂O または TE (pH8.0) に溶解してから形質転換を行って下さい。
- ・ ライゲーション反応終了液を熱処理すると形質転換効率が著しく低下します。熱処理を行う場合は、ライゲーション反応終了溶液を ddH₂O (DNase free) で 2 倍希釈してから熱処理 (70°C 10 分間) を行って下さい。

ベクターとインサートのモル比の検討

ライゲーションの際の ベクター：インサート のモル比は、ライゲーション効率に大きく影響します。以下は、平滑末端ライゲーションにおいてニッポンジーンで様々な長さのインサート DNA をライゲーション、形質転換した結果、それぞれ下記の特定の条件で最も良い結果*が得られたモル比を示した表です。

*ライゲーション反応に用いる DNA の精製度、使用する制限酵素の違いによってライゲーション効率が異なる場合があります。

平滑末端

インサート長	200 bp	600 bp	1000 bp	3000 bp
ベクター	1	1	1	1
インサート	5	5	2~10	0.5~2

ベクター：SmaI で切断した pUC19 (0.03 pmol)

インサート：SmaI で切断したインサート DNA

(0.015 pmol, 0.03 pmol, 0.06 pmol, 0.15 pmol, 0.3 pmol)

ライゲーション反応：16°C, 5 分間

※本品について詳しくは、ニッポンジーンホームページや詳細マニュアル [WEB 版] をご参照下さい。

実験例：ベクター平滑化の確認

実験例：インサート DNA の平滑化

参考データ:PCR 産物の平滑化について

※キット構成 2×Ligation Mix について詳しくは、ニッポンジーンホームページの下記資料をご参照下さい。

Ligation-Convenience Kit 詳細マニュアル [WEB 版]

本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

<お問い合わせ先>

株式会社ニッポンジーン 学術営業課

TEL 076-451-6548 (受付：平日 9 時-12 時、13 時-17 時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>