

# Blunting-Convenience Kit Manual(第4版)

Code No. 312-06291

25 反応用

～解説～

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。

## I. 特長

- DNA 末端の平滑化からライゲーションまでを迅速、簡便に行うことができます。
- 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。

## II. キット内容

試薬	25 反応用*
T4 DNA Polymerase	25 μl × 1 本
10×Blunting Buffer	50 μl × 1 本
2×Ligation Mix	250 μl × 1 本

\* 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。

## III. 保存および融解方法

-20℃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ください。
- ・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。
- ・2×Ligation Mix は、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。

## IV. プロトコルおよび実験例

### <1. プロトコル>

#### (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 0.1~10pmol) を 17  $\mu$ l に調製する。<sup>\*1</sup>

次に、10× Blunting Buffer を 2  $\mu$ l 加え混合する。

#### (2) 酵素の添加

T4 DNA Polymerase を 1  $\mu$ l 加え、ピペティングで混合する。<sup>\*2</sup>

#### (3) 平滑化反応

37°C で 5 分間反応させる。<sup>\*3</sup>

#### (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。

#### (5) ライゲーション反応液の調製

平滑化反応液、平滑末端 DNA ベクター溶液を合わせて 10  $\mu$ l の DNA 溶液を調製する。

10  $\mu$ l の 2× Ligation Mix を添加し、混和する。

#### (6) ライゲーション反応

16°C で 5~30 分間反応させる。<sup>\*4</sup>

#### (7) 形質転換

反応液をそのまま形質転換に用いる。<sup>\*5</sup>

#### <Blunting 反応>

サンプル DNA 溶液 (0.1~10 pmol) 17  $\mu$ l  
10× Blunting Buffer 2  $\mu$ l



T4 DNA Polymerase を 1  $\mu$ l 加える



37°C で 5 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)

\*平滑化反応液は  
必要量使用する  
(1~5  $\mu$ l) <sup>\*6</sup>

#### <Ligation 反応>

平滑化反応液	} up to 10 $\mu$ l
平滑末端 DNA ベクター溶液	
ddH <sub>2</sub> O	
2× Ligation Mix	10 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l



16°C で 5~30 分間反応させる



形質転換または *in vitro* パッケージング

\*1 DNA 末端濃度 0.1~10pmol は pUC19 (2686bp) 0.1~10  $\mu$ g に相当します。

\*2 T4 DNA Polymerase は絶対にボルテックスしないでください。ボルテックスにより失活する恐れがあります。

\*3 反応時間は 5 分間を厳守してください。

\*4 16 時間、オーバーナイト等の長時間の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。

\*5 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 ddH<sub>2</sub>O または TE (pH 8.0) に溶解してから形質転換に使用してください。

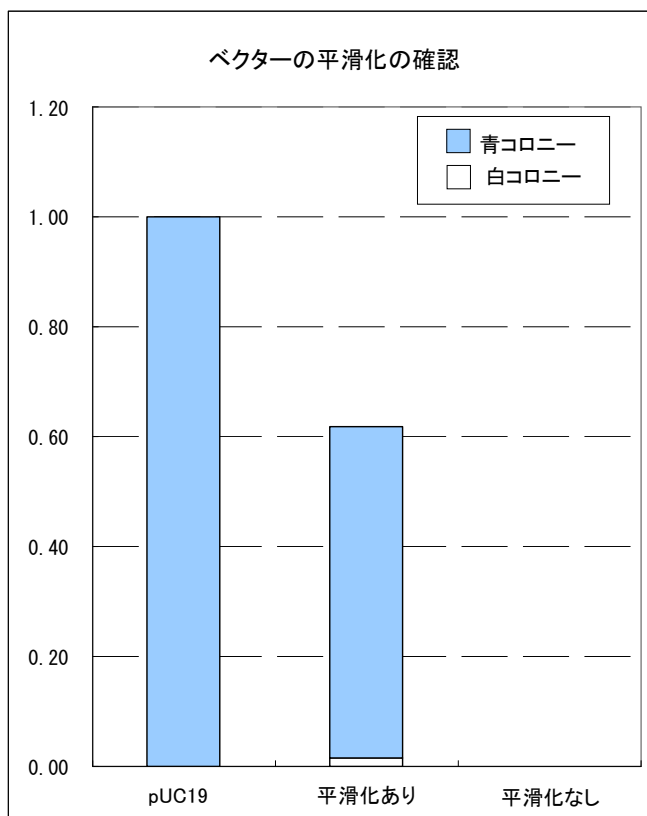
\*6 ライゲーション反応に持ち込む平滑化反応液は 5  $\mu$ l 以下にして下さい。5  $\mu$ l 以上持ち込む場合はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後、エタノール沈殿を行い ddH<sub>2</sub>O または TE (pH 8.0) に溶解してから使用して下さい。

## <2. 実験例>

### ベクター平滑化の確認

- 1) pUC19 を *EcoR* I (5' 突出末端) と *Pst* I (3' 突出末端) で切断し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後、TE バッファーに溶解した。
- 2) *EcoR* I と *Pst* I で切断した pUC19 1  $\mu$ g をプロトコルに従って末端を平滑化した。
- 3) 平滑化した DNA の一部を 2  $\times$  Ligation Mix を用いて 16 $^{\circ}$ C 30 分間ライゲーション反応を行った。
- 4) ライゲーション反応後、未切断の pUC19 を除きバックグラウンドをなくすため、ライゲーション反応液を 5 倍希釈し 65 $^{\circ}$ C 5 分間熱処理することで T4 DNA Ligase を失活させた後、*BamH* I で切断した。
- 5) *BamH* I で切断したライゲーション反応液で ECOS<sup>TM</sup> Competent *E.coli* DH5  $\alpha$  を形質転換し、生じたコロニー数を計測した。

下に pUC19 で形質転換したときのコロニー数を 1 としたときの、平滑化後セルフライゲーションによって生じたコロニー数の割合を示す。



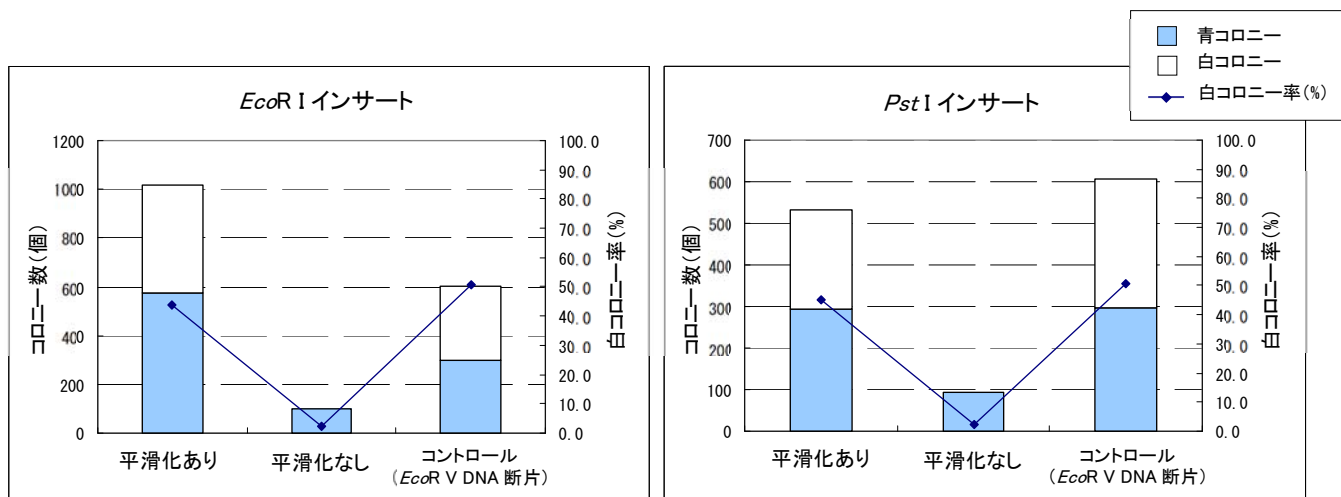
### 結果

pUC19 を *EcoR* I と *Pst* I で切断したベクターを平滑化し、セルフライゲーションすると、*LacZ* のフレームが合い青コロニーを生じる。*BamH* I で切断することで、pUC19 由来の青コロニーは排除されているので、生じた青コロニーは末端平滑化後にセルフライゲーションでできたプラスミドである。

左記のグラフより、5 分間の反応で約 6 割のベクターが平滑末端ライゲーションされていることがわかる。

## インサート DNA の平滑化

- 1) pBluescript II SK(+)を *EcoRV* で切断し脱リン酸化後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後に TE に溶解した。
- 2) λ DNA を鋳型にして増幅した 500bp の断片を *EcoRI* 及び *PstI* で切断し、2 種類の断片を調製した。
- 3) プロトコルに従って、2 種類の断片を平滑化した。
- 4) pBluescript II SK(+)を *EcoRV* で切断し脱リン酸化したベクターと平滑化した断片を 2 × Ligation Mix を用いてインサート/ベクターモル比 = 5 で 16°C 30 分間ライゲーション反応を行った。また、コントロールとして λ DNA を鋳型にして増幅した断片を *EcoRV* で切断した断片のライゲーション反応も行った。
- 5) ライゲーション反応液の一部で ECOS™ Competent *E.coli* DH5 α を形質転換し、生じたコロニー数を計測した。



## 結果

5' 突出末端、3' 突出末端にかかわらず、平滑化したインサートは *EcoRV* 断片と同じ割合でライゲーションできたことから、*EcoRI* 断片及び *PstI* 断片は 37°C 5 分間の反応で十分に平滑化されていることがわかった。

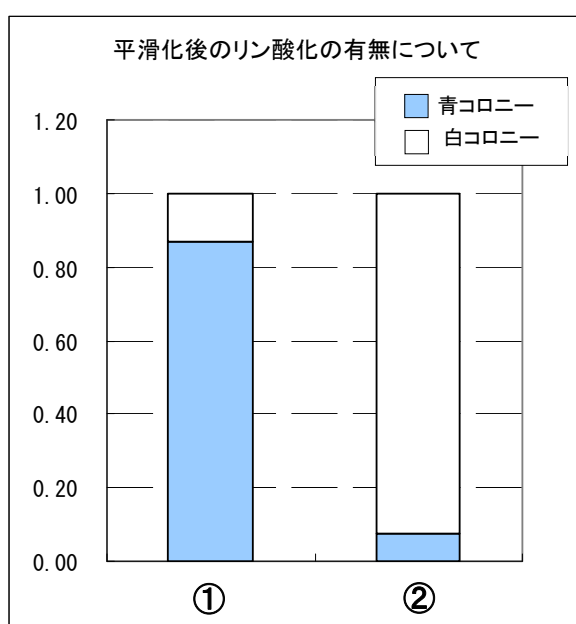
### <3. 参考データ>

#### 1. PCR 産物の平滑化について

PCR で増幅した 500bp の断片を、プロトコールに従って平滑化した。

- ① 一方は、平滑化後にそのまま *EcoRV* で切断した *pBluescript II SK(+)* にライゲーションした。
- ② もう一方は、平滑化後に *T4 Polynucleotide Kinase* でリン酸化し、熱処理をして *T4 Polynucleotide Kinase* を失活させた後、*EcoRV* で切断、脱リン酸化した *pBluescript II SK(+)* とライゲーションした。\*

下のグラフは生じたコロニー数を 1 とした時の、青コロニーと白コロニーの割合を示した。



#### 結果

PCR 産物を平滑化後、そのままリン酸が付加しているベクターとライゲーションした場合は、白コロニーの割合が約 13% だった。一方、PCR 産物をリン酸化し、脱リン酸化したベクターとライゲーションした場合は、90% 以上の割合で白コロニーが得られた。

PCR 産物を平滑化してライゲーションに用いる場合、通常、PCR 産物の 5' 末端にはリン酸基が付加していないため、脱リン酸化していないベクターを用いる必要があります。しかし、脱リン酸化していないベクターをライゲーションに用いると、ベクターのセルフライゲーションの割合が多くなるため、PCR 産物を平滑化してライゲーションする場合は、平滑化後に *T4 Polynucleotide Kinase* を用いてリン酸化し、かつ、ベクターは脱リン酸化することをお勧めします。

\* ニッポンジーンの *T4 Polynucleotide Kinase* (Code No. 312-01551) を利用する場合、10× Kinase Buffer A でリン酸化を行った場合は、熱処理後そのまま 2× Ligation Mix でライゲーション反応を行っても構いません。10× Kinase Buffer B でリン酸化を行った場合は、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後、エタノール沈澱してから 2× Ligation Mix でライゲーション反応を行ってください。

## 2. ライゲーションにおけるインサートモル比の検討

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、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、最も良い結果が得られたモル比を示した表です。

### ・ 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 : *Sma* I で切断した pUC19 ( 0.03 pmol )

インサート : *Sma* I 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

## ライゲーション反応における注意点

- 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。
- 高塩濃度のバッファーに DNA を溶解させると、ライゲーション効率が著しく低下します。DNA 溶液は ddH<sub>2</sub>O または TE buffer (pH8.0) にて調製して下さい。
- 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 ddH<sub>2</sub>O 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。
- パッケージングに用いる反応液の量はパッケージング Extract の 1/10 量以下にして下さい。多量の反応液を使用すると、パッケージング効率が低下する場合があります。
- パッケージング Extract の 1/10 量以上の反応液を使用する場合は、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 をパッケージング Extract の 1/10 量以下になるように ddH<sub>2</sub>O に溶解してから形質転換を行って下さい。
- Gigapack (Stratagene 社) を使用してもパッケージングを阻害することはありません。

お問い合わせ先

---

**株式会社ニッポンジーン**

TEL 076-451-6548

[www.nippongene.com](http://www.nippongene.com)

「Blunting-Convenience Kit」 マニュアル(第 4 版)0505-2305