

# Deletion Kit

Code No. 314-01371

マニュアル(第2版)20100812KM

## I 製品説明

Deletion Kit は、ある DNA 断片をその末端から目的に応じた長さに分解し、ベクターに連結するまでの一連の操作を円滑に行えるように構成されたキットです。

Exonuclease III の 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性と Mung Bean Nuclease の一本鎖特異的なヌクレアーゼ活性を利用して行う DNA のディレクション反応は、DNA 断片内の遺伝子の機能的な解析や、塩基配列の決定などに必要なディレクションミュータントの作製に便利です。

## II キット内容

保存温度: -20℃

包装単位: 5 回分

① Exonuclease III (50 units / μl)	20 μl × 1 本
② 1 × Exonuclease III buffer	1 ml × 1 本
50 mM Tris-HCl (pH8.0)	
5 mM MgCl <sub>2</sub>	
1 mM DTT	
③ 5 M NaCl	100 μl × 1 本
④ Mung Bean Nuclease (25 units / μl)	10 μl × 1 本
⑤ 2 × Mung Bean Nuclease buffer	1 ml × 1 本
20 mM CH <sub>3</sub> COONa (pH5.0)	
0.2 mM (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Zn	
200 mM NaCl	
10% Glycerol	
⑥ Klenow Fragment (5 units / μl)	10 μl × 1 本
⑦ 1 × Klenow Fragment buffer	500 μl × 1 本
10 mM Tris-HCl (pH8.0)	
5 mM MgCl <sub>2</sub>	
0.1 mM dNTPs	
⑧ T4 DNA Ligase (500 units / μl)	10 μl × 1 本
⑨ 1 × T4 DNA Ligase buffer	500 μl × 1 本
50 mM Tris-HCl (pH7.9)	
10 mM MgCl <sub>2</sub>	
20 mM DTT	
1 mM ATP	

## III 実験例

本キットを用いて pUC18 の BamH I 部位に挿入された DNA 断片をディレクションさせてディレクションミュータントを作製する例を以下に紹介する。

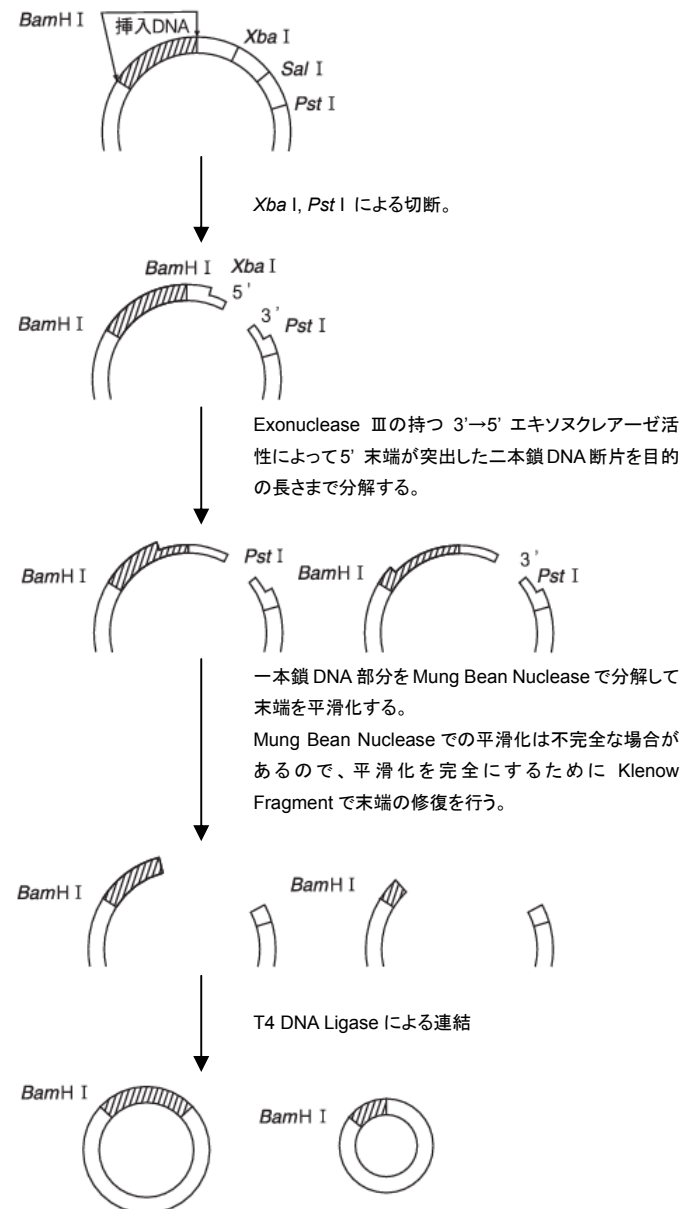
### <ディレクションの方針>

pUC18 の BamH I 部位に挿入された DNA 断片をディレクションさせるために BamH I の上流(あるいは下流)に存在し、かつ Exonuclease III の基質となる 5' 末端が突出する切断末端を形成する制限酵素で組換えプラスミドを切断する。ここでは Xba I を用いる。

次に挿入されている DNA 断片側のみディレクションされるように、Xba I 部位より上流(あるいは下流)に存在し、かつ Exonuclease III で分解され

ないように 3' 末端が突出する切断末端を形成する制限酵素でさらにこの組換えプラスミドを切断する。ここでは Pst I を用いる。

2 番目の制限酵素で切断する場合、反応組成に注意する。1 番目の制限酵素で切断した後、エタノール沈殿し、2 番目の制限酵素反応液に再溶解することが最もよいが、制限酵素の組み合わせによっては塩を加えるだけ、あるいは中間の条件を用いて同時に両方の制限酵素で切ることができる。



<実験例>

① 5~10 µg(1~2 pmol)の pUC18/*Bam*H I (挿入 DNA)を *Xba* I と *Pst* I で切断する。

pUC18/ <i>Bam</i> H I (挿入 DNA)	5~10 µg
<i>Xba</i> I	15~30 units
10×M Buffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	up to 20 µl

37°Cで1時間反応させる。  
65°Cで15分間熱失活させる。

pUC18/ <i>Bam</i> H I (挿入 DNA)/ <i>Xba</i> I	20 µl
<i>Pst</i> I	15~30 units
10×H Buffer	3 µl
ddH <sub>2</sub> O	up to 30 µl

37°Cで1時間反応させる。  
65°Cで15分間熱失活させる。

② 等量の TE 飽和フェノール、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)でそれぞれ1回ずつ抽出する。

③ 1/2 量の 6 M 酢酸アンモニウムと、2.5 倍量のエタノールを加え、-80°Cにて5分間放置<sup>1)</sup>した後遠心分離して沈殿を回収し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、真空乾燥する。

④ 回収した沈殿を100 µlの1×Exonuclease III Buffer に溶解させる。(別の1.5 ml チューブに100 µlの2×Mung Bean Nuclease Buffer を入れて氷冷しておく。)

⑤ 3.6 µlの Exonuclease III を加え、ただちに30°Cに移す。<sup>2)</sup>

⑥ 1分間ごとに10 µl ずつサンプリングして<sup>3)</sup> ④で用意した100 µlの2×Mung Bean Nuclease Buffer に順次加えていく。

⑦ 混合液中の Exonuclease III を65°Cで5分間熱処理して失活させてから37°Cに保温する。

⑧ 2 µl(50 units)の Mung Bean Nuclease を加え、37°Cで30~60分間反応させる。

⑨ ②、③の操作を行う。

⑩ 回収した DNA を50 µlの1×Klenow Fragment Buffer に溶解させる。

⑪ 1 µl(5 units)の Klenow Fragment を加え、37°Cで15分間反応させる。

⑫ ②、③の操作を行う。

⑬ 回収した沈殿を10 µlの1×T4 DNA Ligase Buffer に溶解させる。

⑭ 1 µl(500 units)の T4 DNA Ligase を加え、16°Cで一晩反応させる。

⑮ ③の操作を行う。

⑯ ⑮で得られた DNA を *Xba* I で切断した後<sup>4)</sup>、Competent *E. coli* JM109 に導入(薬剤耐性マーカーなど)し、形質転換細胞を得る。

\*1) アルコール沈殿用共沈剤の Ethachinmate(Code No. 312-01791)を添加してエタノール沈殿した場合、低温でのインキュベーションは不要である。

\*2) Exonuclease III の反応速度は塩濃度や反応温度によって影響を受ける。下の表を参考に反応条件を決めるとよい。なお、NaCl 濃度は、添付の 5 M NaCl 溶液にて調節する。

反応温度(°C)	NaCl 濃度(mM)	反応速度(base/min./end)
30	0	200 ~ 400
23	0	100 ~ 200
23	50	50 ~ 100
23	100	20 ~ 50

\*3) Mung Bean Nuclease の反応容量は、1~10分間の各 Exonuclease III 反応液を加えることにより200 µlになる。

\*4) ①で *Xba* I による未切断のためディレーション反応が起こらなかった組換えプラスミドを除く目的で行う。

IV トラブルシューティング

Q. ディレーション反応後の DNA のゲル電気泳動パターンがスミアになる。

- A1. Exonuclease III はニック部分からも分解するので、プラスミドの場合はなるべく cc 型を用い、制限酵素反応もできる限り短時間で行って下さい。
- A2. Mung Bean Nuclease 反応時間を短くして下さい。

V 参考文献

- 1) Kowalski, D., Kroeker, W.D. and Laskowski, M.Sr. : *J. Biochem.*, **15**, 4457 (1976)
- 2) McCutchan, T.F., Hansen, J.L., Dame, J.B. and Mullins, J.A. : *Science*, **225**, 625 (1984)

VI 関連製品

Code No.	製品名	包装単位	希望納入価格
312-01791	Ethachinmate	0.2 ml	15,000 円
318-01793		0.02 ml	3,200 円
313-90091	TE Saturated Phenol	50 ml	9,000 円
319-90093		250 ml	13,000 円
316-90025	TE (pH8.0)	500 ml	9,000 円
314-90021		100 ml	4,000 円
310-90023		100 ml×6	15,600 円
314-00994	pUC18 DNA	15 µg	9,000 円
310-00996		15 µg×5	36,000 円
—	制限酵素	小包装 1 本	9,000 円
007-04035	Combination 5	5 本 Set	29,000 円
005-04036	Combination 10	10 本 Set	52,000 円
310-01231	Exonuclease III	5,000 units	12,000 円
317-01361	Mung Bean Nuclease	2,000 units	14,000 円
312-00814	Klenow Fragment	200 units	13,000 円
318-00816		1,000 units	52,000 円
311-00404	T4 DNA Ligase	50,000 units	9,000 円
317-00406		250,000 units	36,000 円