

## PCR 産物の blunting および kination

1. PCR 産物を フェノール・クロロホルム、クロロホルム処理してエタノール沈殿、リンスする。場合によって **glycogen** を共沈剤として添加する。
2. 以下の試薬を混合する。

PCR 産物	x $\mu$ l
10 x TAKARA L buffer (※1)	1.0 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	0.5 $\mu$ l
水	y $\mu$ l
Klenow	1.0 $\mu$ l
合計	10.0 $\mu$ l

(※1) 組成がちょうど良いので代用している。

3. 37°C 30 分放置する (時間厳守)。
4. 65°C 5 分放置する。

+ PNK (※2) buffer	3.0 $\mu$ l
+ 0.1 mM ATP (final 10 M)	3.0 $\mu$ l
+ 水	13.0 $\mu$ l
+ T4 PNK (TAKARA#2021A)	1.0 $\mu$ l
合計	30.0 $\mu$ l

(※2) PNK: T4 DNA polynucleotide kinase

5. 37°C 30 分放置する (時間厳守)。
6. 電気泳動し、目的のバンドを切り出して回収する。

<以上>