

IV. プロトコールおよび実験例

1. プロトコール

(1) DNA 溶液の調製

適切なモル比のベクターDNA(約 0.025pmol)とインサート DNA 断片を合わせて 14μl の DNA 溶液を調製する。^{*1}

(2) ライゲーション反応液の調製

2μl の 10×Enhancer solution と 4μl の 5×Ligation Mix を添加し混和する。^{*2}

(3) ライゲーション反応

16°C で 30 分間反応させる。^{*3}

(4) 形質転換

反応液をそのまま形質転換に用いる。^{*4~6}

ベクターDNA	} up to 14μl
インサート DNA	
ddH ₂ O または TE ^{*1}	
10 × Enhancer solution	2μl
5 × Ligation Mix	4μl
<hr/>	
Total	20μl
↓	
16°C で 30 分間反応させる ^{*3}	
↓	
形質転換 ^{*4~6}	

* ベクター量と 10 × Enhancer solution の割合は非常に重要です。

20μl の反応系では約 0.025pmol のベクターを使用して下さい(3kbp のベクターサイズの場合、約 50ng 量です)。

* 10μl の反応系でライゲーション反応を行う場合は、DNA、10 × Enhancer solution、5 × Ligation Mix の使用量を 20μl の反応系の半量にして下さい。

2. 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、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。^{*3}

1. プラスミドベクターライゲーション

(1) 平滑末端ライゲーション

インサートサイズ	200bp	500bp	1kbp	3kbp
ベクター	1	1	1	1
インサート	6~10	3~6	3	0.5~1

ベクター : *EcoR* V で切断した pBluescript II SK(+)
Stratagene 社 (0.025pmol)

インサート : *EcoR* V で切断したインサート DNA
(0.0125pmol, 0.025pmol, 0.0375pmol, 0.15pmol, 0.25pmol)
ライゲーション反応: 16°C, 30 分間

(2) TAクローニング

インサートサイズ	200bp	500bp	1kbp	3kbp
ベクター	1	1	1	1
インサート	6~10	3~6	1~6	0.5~1

ベクター : pGEM[®]-T Promega 社 (0.025pmol)

インサート: Gene *Taq* NT(Code No. 318-03231)で増幅した
PCR 産物
(0.0125pmol, 0.025pmol, 0.0375pmol, 0.15pmol, 0.25pmol)
ライゲーション反応: 16°C, 30 分間

2. リンカーライゲーション

インサートサイズ	8bp
ベクター	1
インサート	700~1000

ベクター : *Hinc* II で切断した pUC19 (0.03pmol)

インサート : Linker *EcoR* V (Code No. 318-02251)
(0.09pmol, 0.3pmol, 1.5pmol, 3pmol, 6pmol, 15pmol, 21pmol, 30pmol)
ライゲーション反応: 16°C, 30 分間