

Ligation-Convenience Kit Manual (第五版)

Code No. 319-05961	100 回分
Code No. 315-05963	10 回分

～解説～

目的の遺伝子をベクターDNAと連結することは、遺伝子クローニングを行う上での最初の重要なステップとなります。ライゲーション反応はDNA末端形状の違いによって効率が異なり、これまでは反応ごとにライゲーション反応の至適化が必要でした。また、通常の T4 DNA Ligase ではライゲーション反応に1～16時間かかり、高い形質転換効率を得ることが困難でした。Ligation-Convenience Kit は、これらの煩雑さを解決し、短時間で高効率なライゲーションを行うことができるキットです。

I. 特長

- 本品は、DNA のライゲーションを迅速・簡便に行うためのキットです。
- 2×Ligation Mix には、DNA のライゲーションに必要な反応バッファー、ATP、DTT、T4 DNA Ligase などが全て含まれており、DNA 溶液と等量の 2×Ligation Mix を加えるだけで DNA ライゲーション反応を行うことができます。
- このキットを使用することで、DNA の末端形状に関わらず 5～30 分でライゲーション反応を行うことができます。また、ライゲーション反応が終了した DNA 溶液は、そのまま形質転換や *in vitro* パッケージングに用いることができます。

II. キット内容

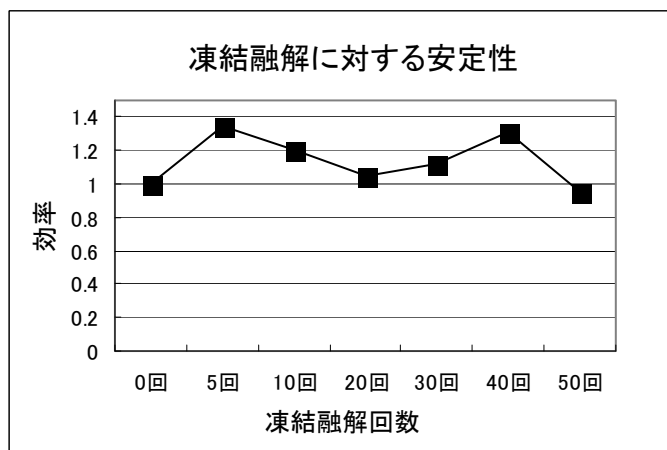
試薬	100 回分*	10 回分*
2×Ligation Mix	250 μ l × 4 本	100 μ l × 1 本

* 20 μ l の反応系で使用した場合の回数です。

III. 保存および融解方法

－20℃保存

- ・ 使用時は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。



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

適当なモル比のベクターDNA とインサート DNA 断片を合わせて 10 μ l の DNA 溶液を調製する。^{*2}

(2) ライゲーション反応液の調製

DNA 溶液と等量の 2 \times Ligation Mix を添加し、混和する。

(3) ライゲーション反応

16°C で 5~30 分間反応させる。^{*1}

(4) 形質転換または *in vitro* パッケージング

反応液をそのまま形質転換や *in vitro* パッケージングに用いる。^{*4~9}

ベクターDNA	} up to 10 μ l
インサート DNA	
ddH ₂ O または TE ^{*2}	
2 \times Ligation Mix	10 μ l
Total	20 μ l
↓	
16°C で 5~30 分間反応させる ^{*1}	
↓	
形質転換または <i>in vitro</i> パッケージング ^{*4~9}	

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) 粘着末端

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	10	5~10	2~10	0.5~2

ベクター : EcoRI で切断した pUC19 (0.03 pmol)
 インサート : EcoRI 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

(2) 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

(3) TAクローニング

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	10	5	5	1

ベクター : pGEM[®]-T Easy; Promega 社 (0.03 pmol)
 インサート : Gene Taq NT (Code No. 318-03231) で増幅した PCR 産物
 (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

2. リンカーライゲーション

インサート長	8 bp
ベクター	1
インサート	50以上

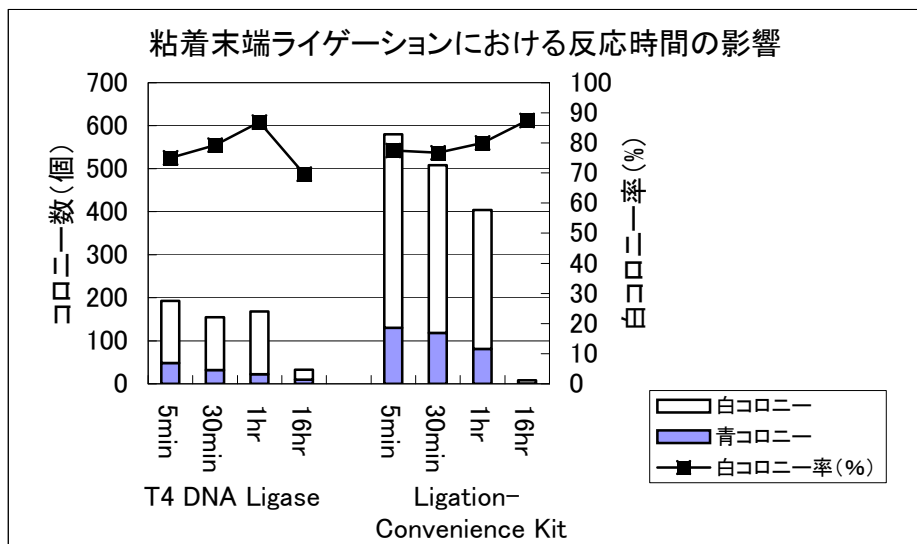
ベクター : HincII で切断した pUC19 (0.03 pmol)
 インサート : Linker EcoRV (Code No. 318-02251)
 (0.3 pmol , 1.5 pmol , 3 pmol , 15 pmol)
 ライゲーション反応: 16°C, 5 分間

3. 実験例

< 実験例① 粘着末端ライゲーション >

T4 DNA Ligase との比較

- (1) pUC19 DNA を EcoRI で切断し、脱リン酸化、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 バッファーに溶解した。^{*2}
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 500bp を EcoRI で切断した。
- (3) pUC19 DNA 50ng とインサート DNA 断片 20ng (インサート/ベクターモル比≒2) を含む DNA 溶液 10 μ l を調製した。^{*2}
- (4) DNA 溶液 10 μ l に 2×Ligation Mix を 10 μ l 添加し、混和した。
- (5) 16°C で 5 分～16 時間反応させた。
- (6) 反応後、JM109 コンピテントセル 50 μ l を反応液 5 μ l で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 1.3×10^8 cfu/ μ g (pBR322 DNA) である。^{*4, 5}



ライゲーション反応時間と形質転換効率の関係(白コロニー数)

反応時間	5 min	30 min	1 hr	16 hr
Ligation-Convenience Kit	450	390	323	7
T4 DNA Ligase	145	123	146	23

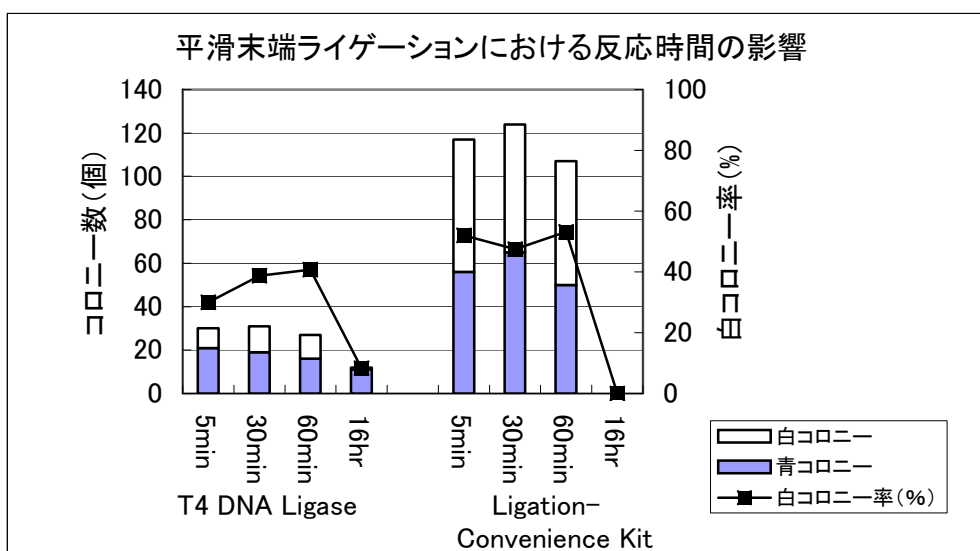
「結果」

上記の結果より、Ligation-Convenience Kit を使用した場合、5 分間の反応時間で十分にライゲーション反応が完了していることがわかる。また、ライゲーション反応の時間を 16 時間まで長くすると、逆に形質転換効率が低下する傾向があった。^{*3}

< 実験例② 平滑末端ライゲーション >

T4 DNA Ligase との比較

- (1) pBluescript II SK(+)を EcoRV で切断し、脱リン酸化、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 バッファーに溶解した。^{*2}
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 500bp を EcoRV で切断した。
- (3) pBluescript II SK(+)50ng とインサート DNA 断片 20ng (インサート/ベクターモル比≒2.4)を含む DNA 溶液 10 μl を調製した。^{*2}
- (4) DNA 溶液 10 μl に 2×Ligation Mix を 10 μl 添加し、混和した。
- (5) 16°Cで 5 分～16 時間反応させた。
- (6) 反応後、JM109 コンピテントセル 50 μl を反応液 5 μl で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 1.3×10^8 cfu/μg (pBR322 DNA)である。^{*4, 5}



ライゲーション反応時間と得られた白コロニー数(個)

反応時間	5min	30min	1hr	16hr
Ligation-Convenience Kit	61	59	57	0
T4 DNA Ligase	9	12	11	1

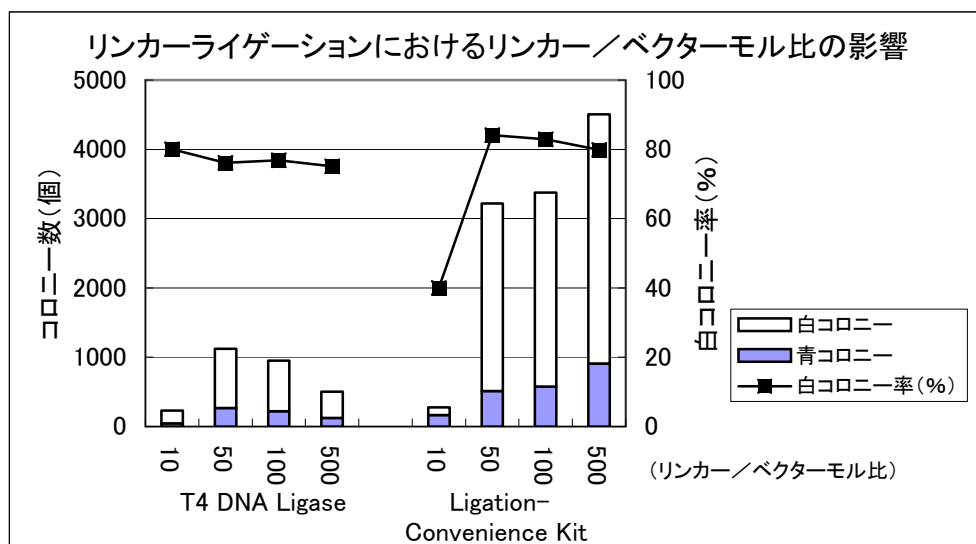
「結果」

Ligation-Convenience Kitを使用した場合、5 分間の反応時間で十分にライゲーションが完了していることがわかる。また、ライゲーション反応時間を 16 時間まで長くすると、逆に形質転換効率が低下する傾向があった。^{*3}

< 実験例③ リンカーライゲーション >

T4 DNA Ligase との比較(リンカー / ベクターモル比の検討)

- (1) pUC19 DNA を HincII で切断し、脱リン酸化、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 バッファーに溶解した。^{*2}
- (2) pUC19 DNA ベクター50ng(約0.03pmol)に対して、リンカーDNA モル比(リンカー/ベクター)が 10, 50, 100, 500 になるように混合した DNA 溶液を各 10 μ l 調製した。^{*2}
- (3) それぞれの DNA 溶液 10 μ l に 2×Ligation Mix を 10 μ l 添加し、混和した。
- (4) 16°Cで 5 分間反応させた。^{*1}
- (5) 反応後、JM109 コンピテントセル 50 μ l を反応液 5 μ l で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 1.3×10^8 cfu/ μ g (pBR322 DNA) である。^{*4, 5}

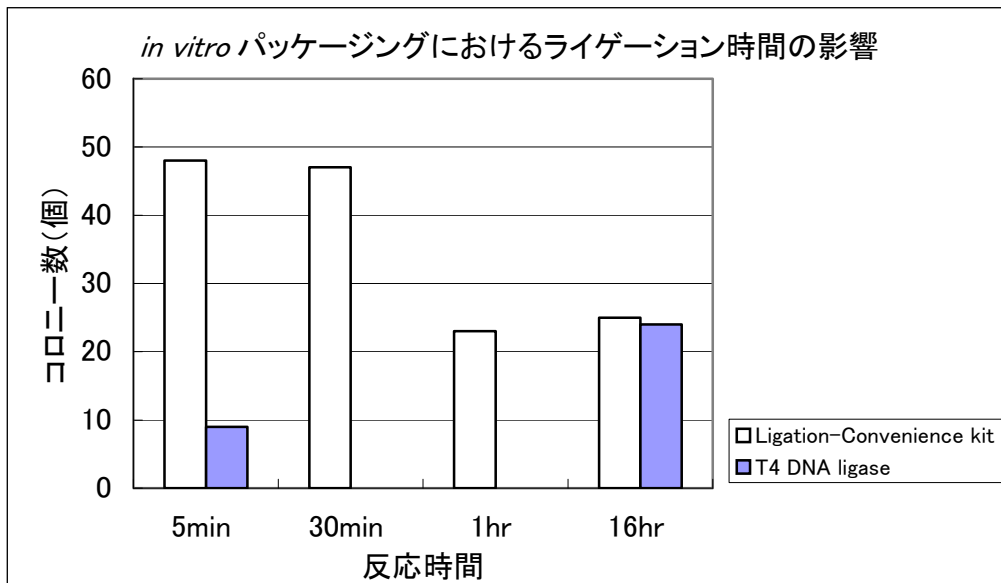


「結果」

上記の結果より、リンカー/ベクターのモル比が 50~100 倍以上にすることで、リンカーライゲーション効率が高くなる。^{*3}

< 実験例④ コスミドベクターへのライゲーションおよび *in vitro* パッケージング >

- (1) EcoRI で線状化した Charomid 9-36 (Code No.311-01401) 1 μ g と ColE1 由来の 4 kbp DNA 断片 0.5 μ g (インサート/ベクターモル比=4.5) を 10 μ l 調製した。^{*2}
- (2) DNA 溶液 10 μ l に 2×Ligation Mix 10 μ l を添加し、混和した。
- (3) 16°Cで 5 分~16 時間反応させた。
- (4) 反応終了液 3 μ l (パッケージング Extract の 1/10 量) で LAMBDA INN (Code No.317-01741) を用いた *in vitro* パッケージングを行った。^{*6~8}
- (5) また、コントロールとして T4 DNA Ligase を用いてライゲーション反応を行い、同様の *in vitro* パッケージングを行った。



「結果」

Ligation-Convenience Kitを使用した場合、ライゲーション反応時間は5～30分間で十分であることが分かる。また、反応時間を長くすることで逆にパッケージング効率が悪くなった。T4 DNA Ligaseを単独で使用した場合は、16時間反応させてもパッケージング効率はあまり改善しなかった。^{*3}

V. 注意点

- *1 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。
- *2 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ddH₂OまたはTE buffer(pH8.0)にて調製して下さい。
- *3 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。
- *4 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場合があります。
- *5 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 buffer(pH8.0)に溶解してから形質転換を行って下さい。
- *6 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。
- *7 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ddH₂OまたはTE buffer(pH8.0)に溶解してから形質転換を行って下さい。
- *8 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。
- *9 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℃10分間)を行って下さい。

VI.トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
全くライゲーションしない	末端の不一致	末端を確認する
ライゲーション効率が低い	融解後の2×Ligation Mixの濃度が不均一	氷上で融解後、ピペッティングで良く混ぜる
	短いDNA断片の混入	制限酵素反応で生じる短いDNA断片を、ゲル電気泳動などで除去する
	高塩濃度	塩を含まない水またはTE bufferでDNAを溶解し、ライゲーション反応を行う
	ライゲーション時間が長い	ライゲーション時間を1時間以内にする
トランスフォーメーション効率が低い	多量の反応液を使用した	形質転換に用いる反応液をコンピテントセルに対して1/10量以内にする
	ベクターの脱リン酸化が不十分	セルフライゲーションの有無をあらかじめ確認しておく
	ライゲーション反応終了液を希釈しないで熱処理した	ライゲーション反応終了溶液をddH ₂ O (DNase Free)で2倍希釈してから熱処理(70°C10分間)を行って下さい
	コンピテントセルの形質転換効率が低い	形質転換効率 5×10^7 cfu/ μ g (pBR322 DNA)以上のものを使用して下さい

株式会社 ニッポンジーン

TEL 076-451-6548

FAX 076-451-6547

URL: <http://www.nippongene.com/siyaku/>

Ligation-Convenience Kit Manual 第 5 版 (0512MO-1804)