

Ligation-Convenience Kit

Code No. 319-05961, 315-05963

簡易マニュアル Ver.5-2411

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。

- * 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。
- * 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。

ベクターDNA, インサートDNA, ddH ₂ O または TE	up to 10 µl
2×Ligation Mix	10 µl
Total	20 µl

↓
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

製品内容

保存：-20°C保存

キット内容品	容量 (100回用*)	備考
2×Ligation Mix	250 µl × 4本	Code No. 319-05961

キット内容品	容量 (10回用*)	備考
2×Ligation Mix	100 µl × 1本	Code No. 315-05963

* 20 µlの反応系で使用した場合の回数です。

(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。

- ・ 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。

(2) ライゲーション反応液の調製

DNA 溶液と等量の 2×Ligation Mix を添加し、混和する。

- ・ 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。
- ・ 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。

(3) ライゲーション反応

16°C で 5~30 分間反応させる。

- ・ 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。

(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。

- ・ 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 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。
- ・ 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 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。
- ・ Gigapack (Agilent 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。
- ・ 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°C 10 分間) を行って下さい。

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。

* 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。

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.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 (0.3 pmol, 1.5 pmol, 3 pmol, 15 pmol)
 ライゲーション反応：16°C, 5 分間

※本品について詳しくは、ニッポンジーンホームページや詳細マニュアル [WEB 版] をご参照下さい。

実験例① 粘着末端ライゲーション (T4 DNA Ligase との比較)

実験例② 平滑末端ライゲーション (T4 DNA Ligase との比較)

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)

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

トラブルシューティング

本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

<お問い合わせ先>

株式会社ニッポンジーン 学術営業課

TEL 076-451-6548 (受付 : 平日 9 時-12 時、13 時-17 時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>