

TA-Blunt Ligation Kit Manual (第4版)

Code No. 311-06543

50 回分

～解説～

ニッポンジーンでは、長時間の反応が必要な T4 DNA Ligase 単独による従来のライゲーションに代わり、手軽に効率良く DNA のライゲーション反応を行うことのできる「Ligation-Convenience Kit」を発売しております。しかし、一般的に DNA の末端形状によってライゲーションの効率には差があります。

「TA-Blunt Ligation Kit」は、ニッポンジーン独自のバッファー組成で、T ベクターへの PCR 産物のライゲーション(TA ライゲーション)、および平滑末端ライゲーションに特化したライゲーションキットです。これらのライゲーションにおいては、Ligation-Convenience Kit よりも更に高効率に、DNA をライゲーションすることができます。

I. 特長

- これまで効率が低いとされてきた TA クローニングや平滑末端ライゲーションを 30 分で高効率に行うことができます。
- 5×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 などが含まれています。使用時は、反応系の 1/5 量の 5×Ligation Mix と 1/10 量の 10×Enhancer solution を加えることで高効率な DNA ライゲーション反応を行うことができます。
- 5×Ligation Mix、10×Enhancer solution は-20℃では凍結しませんので、面倒な融解操作がなく、冷凍庫から出してすぐに使用できます。
- ライゲーション反応終了後は、そのまま形質転換に用いることができます。

II. キット内容

試薬	50 回分*
5×Ligation Mix	100μl × 2 本
10×Enhancer solution	50μl × 2 本

*20μl の反応系で使用した場合の回数です。

本キットにベクターDNA は含まれておりません。

III. 保存方法

-20℃保存

- ・ 本製品は-20℃保存では凍結しませんので、凍結融解による安定性低下の心配がなく、面倒な融解操作の必要もありません。
- ・ 使用時は、氷上で操作して下さい。

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

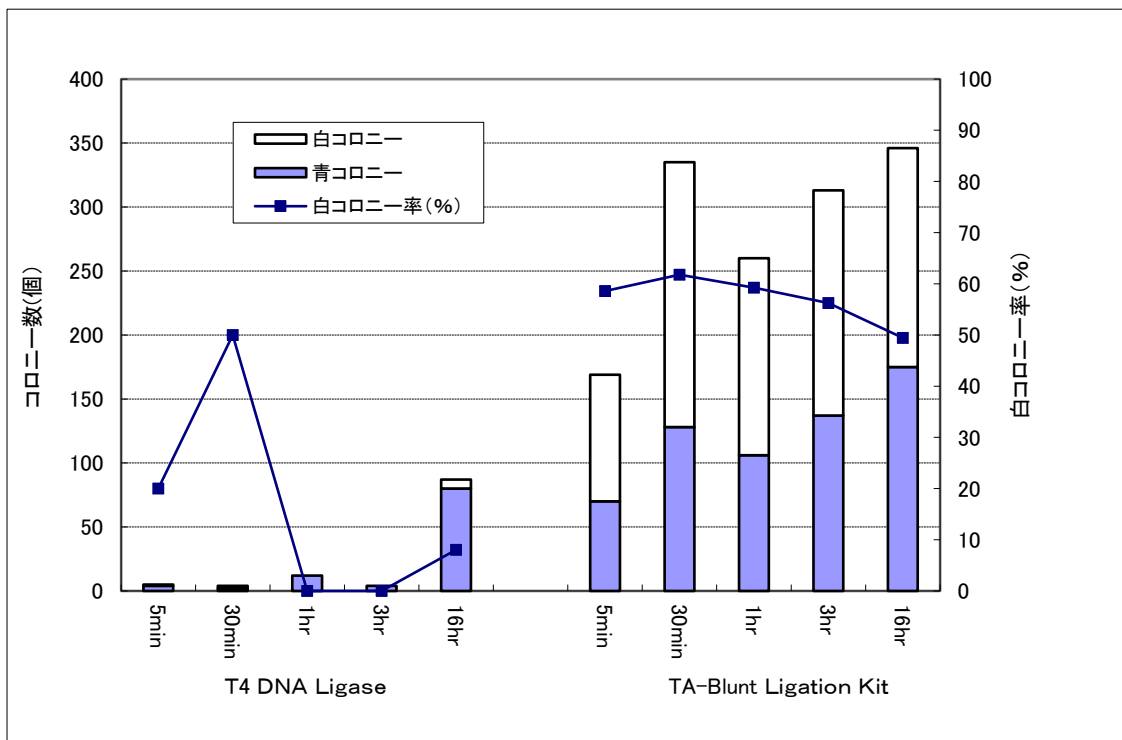
3. 実験例

< 実験例 1:TA クローニング >

T4 DNA Ligase との比較

- (1) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 500bp を *Taq* DNA Polymerase で PCR 増幅した。
- (2) pGEM®-T vector 50ng (0.025pmol) とインサート DNA 断片 25ng (インサート/ベクターモル比≒3) を含む DNA 溶液 14μl を調製した。^{*1}
- (3) DNA 溶液 14μl に 10× Enhancer solution を 2μl、5× Ligation Mix を 4μl 添加し、混和した。
- (4) 16°C で 5 分～16 時間反応させた。
- (5) 反応後、JM109 コンピテントセル 30μl を反応液 1μl 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、 1.41×10^8 cfu/μg (pBR322 DNA) である。^{*4,5}

TA クローニングにおける反応時間の影響



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	3hr	16hr
TA-Blunt Ligation Kit	99	207	154	176	171
T4 DNA Ligase	1	2	0	0	7

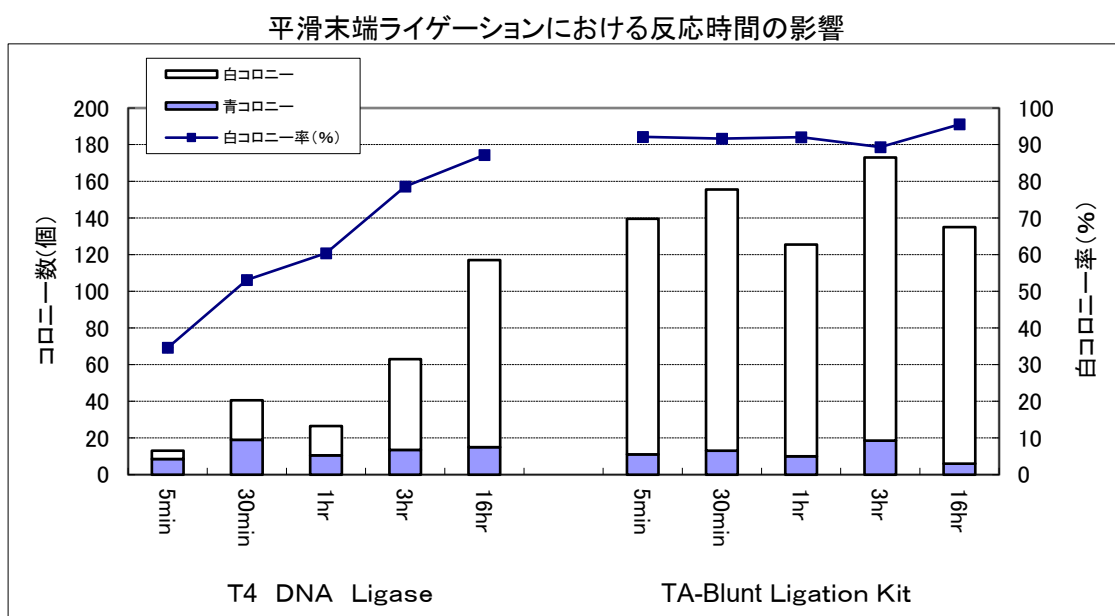
「結果」

TA-Blunt Ligation Kit を使用した場合、30 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。

< 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 *EcoR* V 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、エタノール沈殿後に TE バッファーに溶解した。^{*1}
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 1000bp を *EcoR* V で切断した。
- (3) pBluescript II SK(+)50ng とインサート DNA 断片 50ng (インサート/ベクターモル比≒3)を含む DNA 溶液 14μl を調製した。^{*1}
- (4) DNA 溶液 14μl に 10×Enhancer solution を 2μl、5×Ligation Mix を 4μl 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 30μl を反応液 1μl 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、 1.41×10^8 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	3hr	16hr
TA-Blunt Ligation Kit	129	143	116	155	129
T4 DNA Ligase	5	22	16	50	102

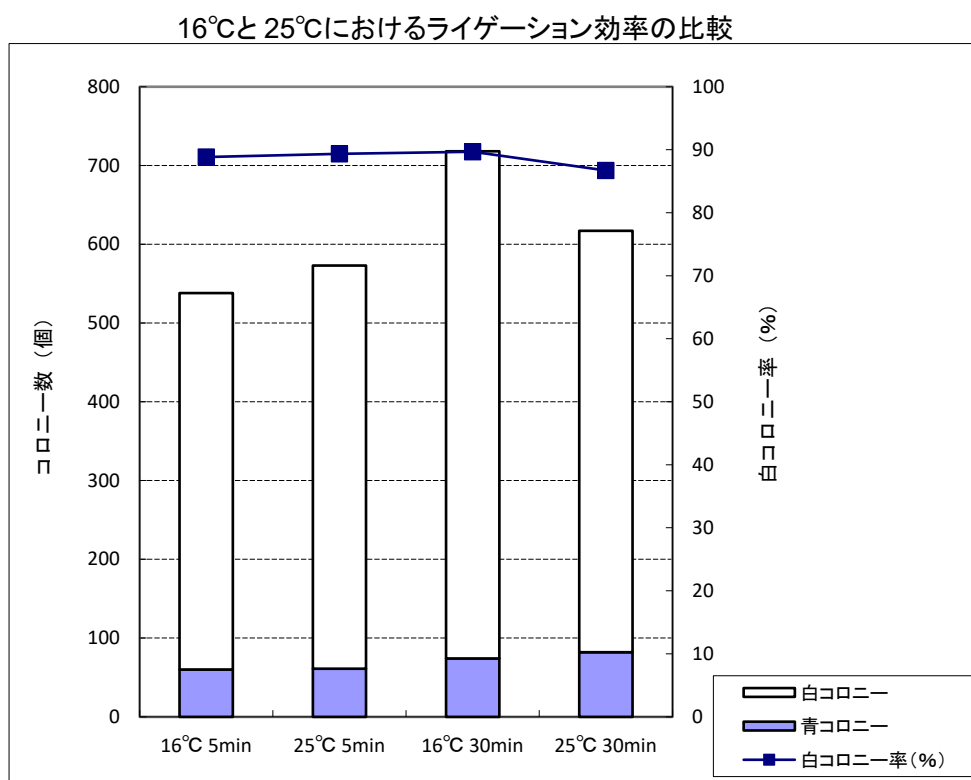
「結果」

TA-Blunt Ligation Kit を使用した場合、30 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。

< 実験例 3: 室温 25°Cにおけるライゲーション反応 >

16°Cと25°Cとの比較

- (1) pBluescript II SK(+)を *EcoR* V 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、エタノール沈殿後に TE バッファーに溶解した。^{*1}
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 1000bp を *EcoR* V で切断した。
- (3) pBluescript II SK(+)50ng とインサート DNA 断片 50ng (インサート/ベクターモル比≒3) を含む DNA 溶液 14μl を調製した。^{*1}
- (4) DNA 溶液 14μl に 10×Enhancer solution を 2μl、5×Ligation Mix を 4μl 添加し、混和した。
- (5) 25°Cまたは 16°Cで 5~30 分間反応させた。
- (6) 反応後、JM109 コンピテントセル 30μl を反応液 1μl 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、 1.41×10^8 cfu/μg (pBR322 DNA) である。^{*4, 5}



「結果」 25°Cにおいても 16°Cと同等のライゲーション効率でライゲーションが可能である。

V. 注意点

- *1 ライゲーション反応に使用するベクター量は、約 0.025pmol にして下さい。
また、高塩濃度のバッファーおよび EDTA が高濃度に含まれたバッファーに 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 添加する 10×Enhancer solution の量は正確に測りとって下さい。指定量より多く添加したり、少なく添加するとライゲーション効率が著しく低下する場合があります。
- *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ことがあります。
- *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、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)処理、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)処理を行い、エタノール沈殿法によって 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 エレクトロポレーション法を用いて形質転換する場合は、ライゲーション産物をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)処理、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)処理後、エタノール沈殿法により DNA を回収し、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。

Q&A

Q: ライゲーション産物を保存する場合はどうしたら良いですか？

A: -20℃で凍結保存して下さい。融解後は、そのまま形質転換実験に用いることができます。

Q: サンプル数が多いのですが、あらかじめ 10×Enhancer solution と 5×Ligation Mix を混ぜたプレミックスを作製してから使用することはできますか？

A: プレミックスを作製して使用できます。ただし、ミックスは使用直前に調整し、調整後すぐに使用して下さい。

Q: ライゲーション反応を 4℃オーバーナイトで行うことはできますか？

A: 4℃オーバーナイト(16 時間)でもライゲーション可能です。

Q: ライゲーション産物を熱処理してもよいですか？

A: 70℃、10 分間で熱処理を行うことができます。

Q: ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿してもよいですか？

A: ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿するとコロニー数が著しく減少します。マニュアル(*5)記載の方法に従ってフェノール/クロロホルム精製してからエタノール沈殿して下さい。また、Ethachinmate を使用してエタノール沈殿を行うと、効率よく DNA を回収することができます。

Q: Ethachinmate を使用してエタノール沈殿を行った DNA を用いて、ライゲーション反応を行うことはできますか？

A: できます。

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(コロニーが生じない)	末端の不一致	末端を確認する
	エレクトロポレーションで形質転換を行う際に、ライゲーション産物の精製を行っていない	ライゲーション産物をフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)処理、クロロホルム・イソアミルアルコール(24:1)処理後、エタノール沈殿法によりDNAを回収し、ddH ₂ O または TE buffer (pH8.0)に溶解してから形質転換を行う
	ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿した	
ライゲーション効率が低い	ベクター量が少なすぎる、または、多すぎる	ベクター量は20μl 反応系で約0.025pmolにする
	使用する Enhancer solution の量が過剰、あるいは少なすぎる	Enhancer solution 添加量は反応系の1/10量にする
	Enhancer solution を添加していない	反応系の1/10量の Enhancer solution を添加する
	EDTA 等のキレート剤濃度が高い	キレート剤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
	DNA 溶液が高塩濃度である	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なう
	ライゲーション時間が短い	ライゲーション時間を延ばしてみる
	インサート:ベクター比率が不適	マニュアルに載っているインサート:ベクター比を参考に、至適モル比でライゲーションする
粘着末端ベクターである	粘着末端のライゲーションには使用できません。 Ligation-Convenience Kit のご利用をお勧めします	
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量はコンピテントセルに対して1/10量にする。 ECOS™ Competent <i>E. coli</i> を使用する場合は、添加する反応液量をコンピテントセルに対して5%以下にする
	コンピテントセルの形質転換効率が低い	形質転換効率が1×10 ⁷ cfu/μg 以上のものを使用する
青コロニー率が高い	平滑末端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

株式会社 ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課
TEL 076-451-6548
URL : <http://www.nippongene.com>