

TA-Blunt Ligation Kit

Code No. 311-06543

簡易マニュアル Ver.4-2411

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。

- * 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 と 10×Enhancer solution は-20°Cで凍結しませんので、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が終了した DNA 溶液は、そのまま形質転換に用いることができます。

| | |
|---------------------------|-------------|
| ベクターDNA (約 0.025 pmol), | |
| インサート DNA, | |
| ddH ₂ O または TE | up to 14 μl |
| 10×Enhancer solution | 2 μl |
| 5×Ligation Mix | 4 μl |
| <hr/> | |
| Total | 20 μl |
| ↓ | |
| 16°Cで 30 分間反応させる | |
| ↓ | |
| 形質転換 | |

製品内容

| キット内容品 | 容量 (50 回用*) | 備考 |
|----------------------|--------------|---------|
| 5×Ligation Mix | 100 μl × 2 本 | -20°C保存 |
| 10×Enhancer solution | 50 μl × 2 本 | -20°C保存 |

* 20 μl の反応系で使用した場合の回数です。

本キットを使用する時は、氷上で操作して下さい。

本キットにベクターDNA は含まれておりません。

(1) DNA 溶液の調製

適当なモル比のベクターDNA (約 0.025 pmol) とインサート DNA 断片を合わせて 14 μ l の DNA 溶液を調製する。

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

- ・ 20 μ l の反応系では約 0.025 pmol のベクターを使用して下さい (3 kbp のベクターサイズの場合、約 50 ng 量です)。
- ・ 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 (pH 8.0) にて調製して下さい。

(2) ライゲーション反応液の調製

2 μ l の 10×Enhancer solution と 4 μ l の 5×Ligation Mix を添加し混和する。

- ・ 5×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。
- ・ 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、少なく添加したり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。
- ・ 10 μ l の反応系でライゲーション反応を行う場合は、DNA 溶液、10×Enhancer solution、5×Ligation Mix の使用量を 20 μ l の反応系の半量にして下さい。

(3) ライゲーション反応

16°C で 30 分間反応させる。

- ・ 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

反応液をそのまま形質転換に用いる。

- ・ 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や、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、エタノール沈澱法によって DNA を回収し、その DNA を ddH₂O または TE buffer (pH 8.0) に溶解してから形質転換を行って下さい。**※ライゲーション産物をそのままエタノール沈澱するとコロニー数が著しく減少します。上記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澱して下さい。**

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) 平滑末端ライゲーション

| インサート長 | 200 bp | 500 bp | 1000 bp | 3000 bp |
|--------|--------|--------|---------|---------|
| 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：EcoRV で切断した pBluescript II SK(+) (0.025 pmol)
インサート：EcoRV で切断したインサート DNA
(0.0125 pmol, 0.025 pmol, 0.0375 pmol, 0.15 pmol, 0.25 pmol)
ライゲーション反応：16°C, 30 分間

(2) TA クローニング

| インサート長 | 200 bp | 500 bp | 1000 bp | 3000 bp |
|--------|--------|--------|---------|---------|
| 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 (0.025 pmol)
インサート：Gene Taq NT(Code.318-03231)で増幅した PCR 産物
(0.0125 pmol, 0.025 pmol, 0.0375 pmol, 0.15 pmol, 0.25 pmol)
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

| | |
|--------|----------|
| インサート長 | 8 bp |
| ベクター | 1 |
| インサート | 700~1000 |

ベクター：HincII で切断した pUC19 (0.03 pmol)
インサート：Linker EcoRV (0.09 pmol, 0.3 pmol, 1.5 pmol, 3 pmol, 6 pmol, 15 pmol, 21 pmol, 30 pmol)
ライゲーション反応：16°C, 30 分間

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製し、調製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。プロトコール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。

※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 TA クローニング（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 室温 25℃におけるライゲーション反応（15℃と 25℃との比較）

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/>