



07-05



- DNA Ligation Kit -

Ligation high Ver.2

(Code No. LGK-201)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3706K

目次

[1] はじめに	1
[2] 製品内容	2
[3] プロトコール	3
[4] 実施例	4
(1) 突出末端ライゲーション	4
(2) 平滑末端ライゲーション	4
(3) リンカーライゲーション	5
(4) TAクローニング	5
(5) TAクローニング<PCR産物を直接クローニングする場合>	6
(6) フェージライゲーション	6
[5] トラブルシューティング	7
[6] APPENDIX	8
(1) 関連プロトコール	8
・ベクターの脱リン酸化	8
・プライマーのリン酸化	8
・PCR産物のリン酸化	9
(2) 関連商品	9

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。

また、本試薬の使用にあたっては実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

DNAフラグメントの連結反応(ライゲーション)は、遺伝子組換え実験で欠くことのできない操作の一つです。この反応には通常T4 DNA Ligaseが用いられますが、DNAの末端の構造やフラグメントの大きさなどによって反応効率が大きく異なり、都度条件の設定が必要でした。

弊社では、そのような煩雑さをなくし、迅速・簡便にライゲーションを行うことのできる1液タイプのライゲーション試薬「Ligation high」を開発し、お届けしてまいりました。

「Ligation high Ver.2」は、従来の「Ligation high」をさらに使いやすく改良した、高効率ライゲーション試薬です。

本製品には、以下のような特長があります。

- 高いライゲーション効率*

通常のT4 DNA Ligaseを用いる場合よりも、数十倍の効率を得ることができます。また、組成の改良により、従来品(Ligation high)に比べ、特にTAクローニングの効率が飛躍的に向上しました。

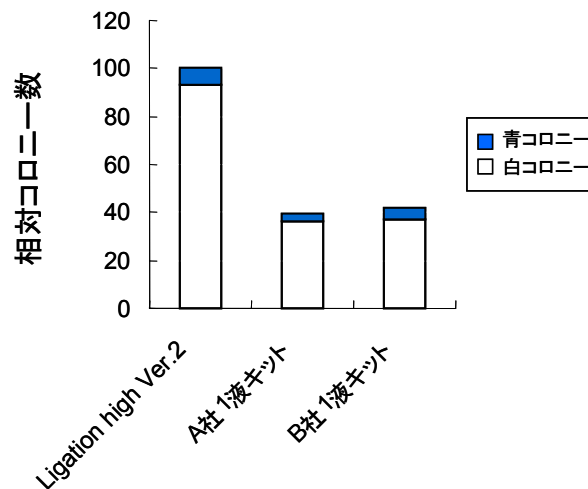


図1 性能比較(TAクローニング効率による比較)

Ligation high Ver.2でのコロニー数を100として比較しました。

- -20°C保存で凍結しません*

フリーザーから取り出してそのままご使用いただけます。

- Ready-to-use

従来のLigation high同様、プレミックスの1液タイプです。DNA溶液と、等量もしくは半量混合して使用します。

*特許出願中

[2] 製品内容

●製品に含まれるもの

Ligation high Ver.2 750 μ l \times 1本

※1反応あたり7.5 μ l使用する場合、100回用としてご使用いただけます。

●保存温度

-20 $^{\circ}$ C

※-30 $^{\circ}$ C以下の温度で長期間保存した場合や、冷凍庫内の冷気の噴出口近くなどに保存した場合、凍結する可能性があります。凍結融解実験により活性が低下しないことを確認しています。凍結した場合は、チューブを指の腹でつまんで、液温が高くないように注意しながら融解してください。

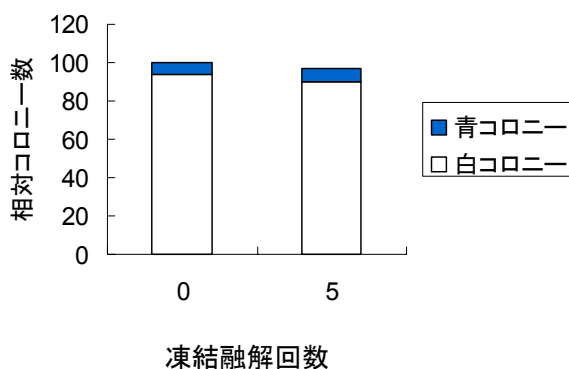


図2 凍結融解による形質転換効率の変化
(TAクローニング効率による比較)

凍結融解回数0回でのコロニー数を100として比較しました。

[3] プロトコール

DNA溶液に対し、本品を等量もしくは半量添加して使用します(詳細は表1)。

ベクターDNA+インサートDNA*1	7.5 μ l
Ligation high Ver.2	3.75~7.5 μ l*2
16°C、30分間*3*4	
↓	
100 μ lのコンピテントセルに、~10 μ lの反応溶液を加え形質転換を行う*5	

*1 比率は[4]実施例をご参照ください。

ライゲーション効率は塩濃度によって影響を受けます。高いライゲーション効率を得たい場合は、塩濃度の低いTE Buffer (10mM Tris-HCl[pH8.0], 1mM EDTA)などに溶解したDNA断片を用いてください。

*2 TAクローニングを行うときは、ライゲーション試薬を等量添加した方がライゲーション反応の特異性が向上します。

*3 ライゲーション効率が低い場合は、2時間を目安に時間を延長してください。2時間以上反応させても問題ありませんが、目だった効率の向上は期待できません。また、突出末端ライゲーションなどの場合は、5分程度の反応で十分な効率を得ることができます。

*4 反応温度は、4°C~25°Cで検討することができますが、本試薬は16°Cで最も効率が高くなるように設計されています。

*5 形質転換時の添加量は、コンピテントセルの10%を越えないようにしてください。大量に加える場合は、エタノール沈殿等で濃縮して添加してください。また、エレクトロコンピテントセルを用いる場合も、エタノール沈殿が必要です。

表1 Ligation high Ver.2の添加液量比率および反応条件

	DNA溶液 : Ligation試薬の容量比	推奨反応条件
突出末端ライゲーション	1 : 1 or 1 : 0.5	16°C、5~30分
平滑末端ライゲーション	1 : 1 or 1 : 0.5	16°C、30分
リンカーライゲーション	1 : 1 or 1 : 0.5	16°C、30分
Tベクターへのライゲーション (精製PCR産物を用いる場合)	1 : 1	16°C、30分
Tベクターへのライゲーション*1*2 (PCR産物を直接使用する場合)	1 : 1	16°C、30分
ファージライゲーション	1 : 1 or 1 : 0.5	16°C、30分

*1 プライマーダイマーや非特異増幅がみられる場合は、できる限り精製してご使用ください。

*2 十分な増幅がみられる場合は、0.5~1 μ lを用いることにより良好な結果が得られます。以下のように混合して反応させます。

滅菌水	X
PCR産物	0.5~1
Ligation high Ver.2	7.5
	15 (μ l)

<→詳しくは、実施例(5)[p6]をご参照ください>

[4] 実施例

(1) 突出末端のライゲーション

脱リン酸化したpUC19/*Hind*III (50ng, 25fmol)とλ DNA由来の*Hind*III断片(564bp)を様々なモル比で混合したDNA溶液<7.5 μl>に、Ligation high Ver.2<7.5 μl>を添加し、16°Cで30分間反応しました。その後、反応液10 μlを用いて*E. coli* DH5 αコンピテントセル<100 μl>を形質転換し、LB/Amp(X-Gal, IPTG)プレートで培養後、コロニー数をカウントしました。その結果、Vector:Insert比は1:3以上で良好な結果を示すことが分かりました。

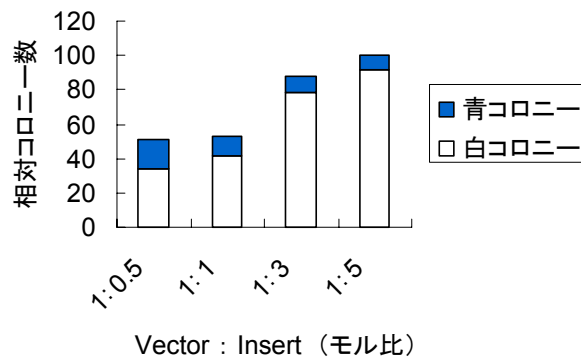


図3 突出末端のベクターライゲーション
1:5でのコロニー数を100として比較しました。

(2) 平滑末端のライゲーション

脱リン酸化したpUC19/*Hinc*II (50ng, 25fmol)と精製PCR産物(KOD -Plus-で増幅した0.5kb λ DNA断片^{*1}、リン酸化済み)を様々なモル比で混合したDNA溶液<7.5 μl>に、Ligation high Ver.2<7.5 μl or 3.75 μl>を添加し、16°Cで30分間反応しました。その後、反応液10 μlを用いて*E. coli* DH5 αコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp(X-Gal, IPTG)プレートで培養後、コロニー数をカウントしました。その結果、Vector:Insert比は1:3以上で良好な結果を示すことが分かりました。

^{*1} KOD -Plus-で増幅したDNA末端は平滑化されています。

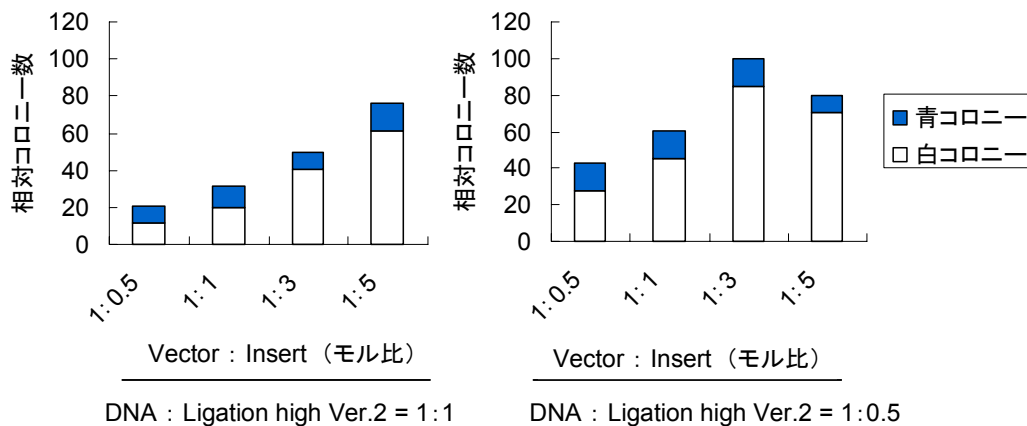


図4 平滑末端のベクターライゲーション

DNA : Ligation high Ver.2 = 1:0.5、Vector : Insert = 1:3でのコロニー数を100として比較しました。また、相対コロニー数はベクター量で補正した値になっています。

(3) リンカーライゲーション

脱リン酸化したpUC19/*Hinc*II (50ng, 25fmol)と*Hind*IIIリンカー(10mer:リン酸化済み)を様々なモル比で混合したDNA溶液<7.5 μl>に、Ligation high Ver.2<7.5 μl or 3.75 μl>を添加し、16°Cで30分間反応しました。その後、反応液10 μlを用いて*E. coli* DH5 αコンピテントセルを形質転換し、LB/Amp(X-Gal, IPTG)プレートで培養後、コロニー数をカウントしました。その結果、Vector: Linker比は1: 10以上で良好な結果を示すこと、およびLigation high Ver.2の添加量が1/2量(DNA:Ligation high Ver.2 = 1:0.5)の方が若干良好な結果が得られることが分かりました。

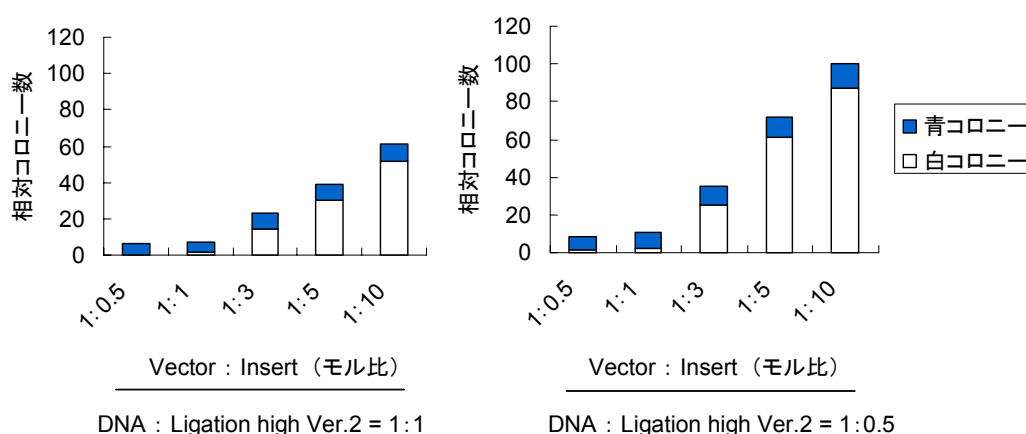


図5 リンカーライゲーション

DNA : Ligation high Ver.2 = 1:0.5、Vector : Insert = 1: 10でのコロニー数を100として比較しました。また、相対コロニー数はベクター量で補正した値になっています。

(4) TAクローニング

Tベクター(50ng, 25fmol)と精製PCR産物(Taq DNA polymeraseで増幅した0.5kb断片)を様々なモル比で混合したDNA溶液<7.5 μl>に、Ligation high Ver.2 <7.5 μl >を添加し、16°Cで30分間反応しました。その後、反応液10 μlを用いて*E. coli* DH5 αコンピテントセル<100 μl>を形質転換し、LB/Amp(X-Gal, IPTG)プレートで培養後、コロニー数をカウントしました。その結果、Vector: Insert比は1: 3以上で良好な結果を示すことが分かりました。

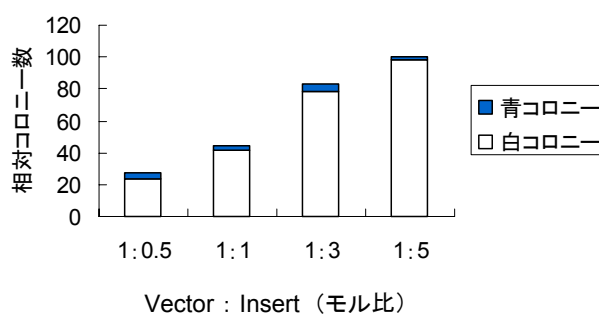


図6 TAクローニング(精製産物使用)

1:5でのコロニー数を100として比較しました。

(5)TAクローニング <PCR産物を直接クローニングする場合>

Tベクター (50ng, 25fmol) と良好な増幅の確認できた未精製PCR産物 (Taq DNA polymeraseで増幅した0.5kb断片) を様々な比率で混合したDNA溶液<7.5 μl>に、Ligation high Ver.2 <7.5 μl>を添加し、16°Cで30分間反応しました。その後、反応液10 μlを用いて *E. coli* DH5 α コンピテントセル<100 μl>を形質転換し、LB/Amp(X-Gal, IPTG)プレートで培養後、コロニー数をカウントしました。その結果、なるべくPCR反応液の持ち込み量を少なくした方が良好な結果が得られることが分かりました。

また、(4)に示すように、精製したDNA断片を用いた方が高い効率が得られることが分かっており、効率が低い場合は、精製PCR産物を用いる方が良好な結果が期待できます。

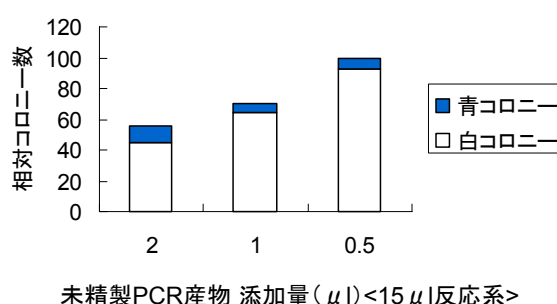


図7 TAクローニング(未精製産物使用)
0.5 μl 添加でのコロニー数を100として比較しました。

(6)ファージライゲーション

EcoRI 処理した λ ZAP®II(500ng)と2.8kbのpRheo/*EcoRI* test insert(225ng)を混合した溶液<5 μl>に、ライゲーション試薬を<5 μl>もしくは<2.5 μl>添加し、16°Cで30min反応を行いました。その後、反応液1.5 μlをGIGAPACK®III (Stratagene社製)を用いてインビトロパッケージングし、*E. coli* XL-1 Blue MRF'を感染させ、導入効率を測定しました。コントロールとして、Ligation highを用いて推奨条件にて同様の実験を行いました。生じたプラークをカウントした結果、Ligation high Ver.2を用いても、Ligation highとほぼ同等の結果が得られることが分かりました(表2)。

表2 ファージライゲーションにおける反応条件の影響

	Ligation high	Ligation high Ver.2	Ligation high Ver.2
DNA溶液: Ligation試薬 の容量比	1 : 0.5	1 : 0.5	1 : 1
効率 (pfu/ μ g ZAP®II)	5.6×10^6	6.3×10^6	5.5×10^6

[5] トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	コメント
コロニーが得られない、少ない。	形質転換に用いている反応液量が多い	コンピテントセルに対して、1/10 量を越える反応液を加えて形質転換すると効率が低下します。1/10 量以下で形質転換を行ってください。
	ベクター量が少ない	ベクター量を増やしてライゲーションを行ってください。
	ベクターに対してインサートDNAが少ない	実施例を目安にインサート DNA 量を見積もってください。
	塩の持込が多い	PCR 産物を直接用いる場合など、反応液を多く持ち込むと効率が低下します。精製して用いることで、効率を向上させることができます。
	ライゲーション反応が成立していない	脱リン酸化したベクターには、リン酸化されていない PCR 産物などの DNA 断片を連結することはできません。リン酸化した DNA 断片を用いてください。
	TA クローニング	リン酸化された DNA 断片を用いることで、TA クローニングの効率を向上させることができます。リン酸化プライマー (APPEDIX 参照) を用いて PCR を行ってみてください。
インサート挿入率が低い	プライマーダイマーの影響	TAクローニングを行う場合、プライマーダイマーが多いと目的インサートの挿入率が低下します。精製してから行ってください。
	反応が不十分	2時間まで反応時間を延ばしてください。16時間反応も可能ですが、2時間以上の効率の向上は期待できません。
	ベクターに対してインサートDNAが少ない	実施例を目安にインサートDNA量を見積もってください。
・一面にコロニーが出現する ・インサート挿入率が低い	ベクターのセルフライゲーション	ベクターの切断面が相補的な場合 (平滑末端ライゲーションや単一制限酵素サイトへのクローニング)、ベクターをあらかじめ脱リン酸化処理しておくことにより、セルフライゲーションのノイズを効果的に減少させることができます。
試薬が保存中 (輸送中) に凍ってしまった	保存・輸送条件など	-30℃以下で保存した場合、試薬が凍結することがありますが、そのまま融解してご使用いただけます。凍結で品質が低下しないことをあらかじめ確認しています。

[6] APPENDIX

(1) 関連プロトコール

●ベクターの脱リン酸化 (*E. coli* Alkaline Phosphatase使用[関連商品参照])

精製ベクター溶液(0.5~2.5 μ g:制限酵素処理後精製)	80 (μ l)
10 \times Buffer	10
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase (0.1~1U/ μ l)*	10
Total	100

*目安として 5~20pmoles の 5'末端に対して 2U ですが、添加できる最大量(最終液量の 10%)を添加することでほとんどの場合、問題なく脱リン酸化できます。

↓

平滑末端、3'突出末端 \Rightarrow 60°C、60min

5'突出末端 \Rightarrow 37°C、60min

↓

MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No.: NPK-601)などによる精製

●プライマーのリン酸化 (T4 polynucleotide Kinase, rATP使用[関連商品参照])

(1)50pmole/ μ l(μ M)以上の Primer 溶液を準備します。

(2)以下のように混合、反応させます。

Primer (50pmole/ μ l [50 μ M])	14 (μ l)
10 \times Protruding End Kinase Buffer	2
10mM rATP <Code No. ATP-111 を希釈して使用>	2
T4 Polynucleotide Kinase(5~20U/ μ l) ^{*1}	2
Total	20

↓

37°C、1h 反応

↓

95°C、5min (T4 Polynucleotide Kinase を失活)

↓ ← 50 μ l 滅菌ミリ Q 水を添加します

10pmole/ μ l [10 μ M] primer 溶液として使用します^{*2*3}

↓

PCR を行います

^{*1} T4 Polynucleotide Kinase は添加できる最大量を添加します(最終液量の 10%)。

^{*2} このまま PCR 反応に使用します。

^{*3} 凍結して何度でも使用可能です。

●PCR産物(平滑末端)のリン酸化(T4 polynucleotide Kinase, rATP使用[関連商品参照])

- (1) 高正確性 PCR 酵素で増幅した PCR 産物を精製します。
 (2) 以下のように混合、反応させます。

精製 PCR 産物(～1 μg)	35 (μl)
10 × Blunt End Kinase Buffer	5
10mM rATP ^{*1} <Code No. ATP-111 を希釈して使用>	5
T4 Polynucleotide Kinase(5～20U/μl) ^{*1}	5
Total	50

↓

37°C、1h 反応

↓

精製

^{*1} T4 Polynucleotide Kinase は添加できる最大量を添加します(最終液量の 10%)。

(2) 関連商品

品名	内容	Code No.
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	100U × 1 本	BAP-111
T4 Polynucleotide Kinase	1,500U × 1 本	PNK-111
rATP	50 μ moles/0.5ml	ATP-111
MagExtractor™ -Plasmid- <磁性ビーズを利用した Plasmid DNA 精製キット>	500 回用	NPK-301
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- <磁性ビーズを利用した DNA fragment 精製キット>	200 回用	NPK-601
Magical Trapper <磁性ビーズ分離用スタンド>	1個	MGS-101
Competent high DH5 α <高効率 <i>E. coli</i> DH5 α コンピテントセル、SOC 培地付>	100 μl × 10 本	DNA-903
Competent high JM109 <高効率 <i>E. coli</i> JM109 コンピテントセル、SOC 培地付>	100 μl × 10 本	DNA-900
KOD -Plus- <高正確性 PCR 試薬>	200U × 1 本	KOD-201
KOD -Plus- Ver.2 <高正確性 PCR 試薬:バージョンアップ品>	200U × 1 本	KOD-211
KOD FX <高効率・正確性 PCR 試薬>	200U × 1 本	KFX-101



【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

－納期・注文に関するお問い合わせ－

ライフサイエンス事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部（東京）
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>