

TAクローニング効率向上の検討

東洋紡績（株） ライフサイエンス事業部 黒板 敏弘

はじめに

Ligation high Ver.2は、ご好評いただいておりますLigation high (Code No.LGK-101)を、更に使いやすく改良した高効率な1液タイプのライゲーション試薬です。特に、TAクローニング効率が向上しています(図1)。また、-20℃保存で凍結しないため、フリーザーから取り出してそのままご使用いただける利点があります(図2)。本試薬は、様々な末端を有するDNA断片のライゲーション反応に幅広く用いることができます。

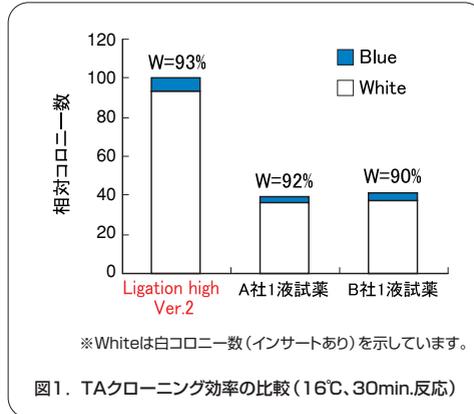
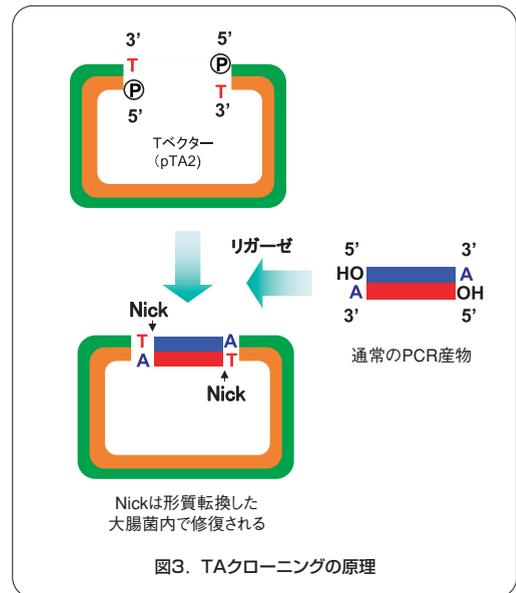


図2. -20℃保存での試薬の状態 (従来品(緑)、本製品(青))
本製品は-20℃保存で凍結しません。

本稿では、TAクローニングの効率を向上させる方法をLigation high Ver.2を用いて検討しましたので、ご紹介いたします。

TAクローニングには、Taq DNA polymeraseなどで増幅したPCR産物を用います。一般的に、通常使用しているPCRプライマーの5'末端はリン酸化されていないため、PCR産物をTベクターとライゲーションした後も、2本鎖DNAの片側のみが連結されるだけで、片側にはニックが残ります(図3)。このニックは、形質転換後に大腸菌内で修復を受けますが、両鎖が連結されたものに比べ効率が低下する可能性があります。そこで本稿では、T4 Polynucleotide Kinaseを用いてリン酸化したプライマーを用いて増幅したPCR産物を用い、TAクローニングの効率向上の可否を検討した結果をご報告いたします。



方 法

(1) プライマーのリン酸化

T4 Polynucleotide Kinase(Code No.PNK-111)とrATP(Code No.ATP-111)を用いて、以下のようにリン酸化を行いました。

Primer (50pmole/μl [50μM])	14 (μl)
10×Protruding End Kinase Buffer	2
10mM rATP**	2
T4 Polynucleotide Kinase (5~20U/μl)*	2
Total	20 μl
↓	
37℃, 1h反応	
↓	
95℃, 5min (T4 Polynucleotide Kinaseを失活)	
↓ ← 50μl 滅菌ミリQ水を添加	
10pmole/μl [10μM] primer溶液***として使用します****	

* Kinaseは添加できる最大量を添加します(最終液量の10%)。
 ** 別途準備する必要があります。T4 Polynucleotide Kinase (Code No.PNK-111)には含まれません。
 *** このままPCR反応に使用します。
 **** 凍結して何度でも使用可能です。

プライマーのリン酸化、及びベクターの脱リン酸化などのコツは弊社ウェブサイト (www.toyobo.co.jp/bio) 「実験お助けコーナー」の「実験ガイド:平滑末端クローニング」にてご覧いただけます。

(2) 増幅産物の調製

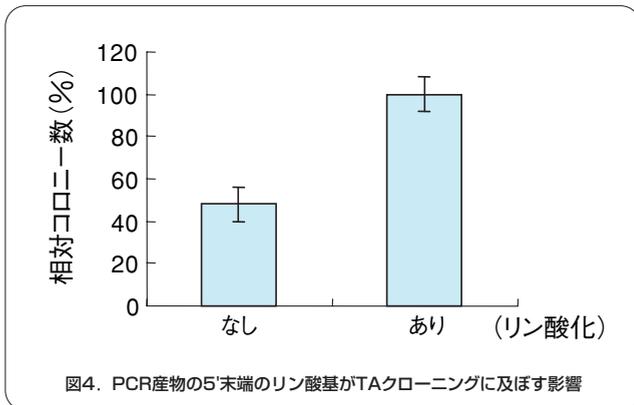
TAクローニング用のDNA断片は、λDNAの約0.5kbの領域をrTaq DNA polymerase (Code No.TAP-201) を用いて増幅し調製しました。増幅には、全ページの方法でリン酸化したプライマー、及び未処理のプライマー (リン酸化なし) を用いました。増幅後、PCR産物はMagExtractor™ -PCR & Gel Clean up- (Code No.NPK-601) を用いて精製し、定量したものを使用しました。

(3) ライゲーション反応

Tベクター (50ng) とDNA断片をモル比で1:3となるように混合して5μlとした後、その溶液に5μlのLigation high Ver.2を添加し、16℃にて30分間ライゲーション反応を行いました。そして、反応液10μlをCompetent high DH5α (Code No.DNA-903) 100μlに加え、形質転換を行いました。その後、その一部をLB/Ampプレートにプレーティングし、翌日、白コロニー (インサートあり) の数をカウントしました。実験はn=3で行いました。

結果及び考察

結果を以下に示します。



結果より、生じた白コロニー数 (インサートあり) はリン酸化プライマーを用いて増幅したPCR産物を用いた場合、通常のPCR産物を用いた場合に比べて約2倍となりました。青コロニーの比率は、両方ともに10%以下でほぼ同等でした。

このことは、リン酸化されたPCR産物をTAクローニングに用いることで、2本鎖DNAの両鎖が連結されるようになり、効率が向上したことに起因していると考えられました。

プライマーは簡単にリン酸化できますので、TAクローニングの効率が低い場合の対策の一つとして有効であると考えられます。また、PCR産物を精製して用いる方が効率が向上する傾向にありますので、PCR産物のサイズが大きい場合などは、リン酸化と併用することで更に良い結果が期待できます。

おわりに

Ligation high Ver.2は、従来の一液系のライゲーション試薬と同等以上の効率を有し、さらに使い勝手も考慮した設計になっています。是非一度お試しください。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Ligation high Ver.2	750μl×1本*	-20℃	LGK-201	¥22,000
T4 Polynucleotide Kinase	1,500U×1本	-20℃	PNK-111	¥15,000
rATP	50μmoles/0.5ml	-20℃	ATP-111	¥15,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	200回用	室温	NPK-601	¥25,000
Competent high DH5α	100μl×10本**	液体窒素	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	100μl×20本	-80℃	DNA-913	¥29,000



*1反応に7.5μl使用する場合、100回用としてご使用いただけます。
**他にSOC培地1ml×10本、及びPositive Control Plasmidを含みます。

Ligation high Ver.2、及びT4 Polynucleotide Kinaseは30%OFFキャンペーン (2007年12月3日~2008年2月29日 [ご注文分]) を実施しております。詳しくはp9をご参照ください。