

- DNA Ligation Kit -

Ligation high

(Code No. LGK-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3274K

目次

[1] はじめに	1
[2] プロトコール	1
1 使用方法	1
2 効率よくライゲーションをおこなうために	1
[3] Ligasion highの特長	2
1 ライゲーション効率が優れています。	2
2 少ない液量で反応できます。	2
3 安定性に優れています。	2
[4] 実施例	3
1 インサート挿入ライゲーション	3
2 リンカーライゲーション	4
3 塩濃度の影響	5
[5] トラブルシューティング	6
[6] 関連商品一覧	7

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フラグメントのライゲーションは、遺伝子操作実験で頻繁に行われる操作です。従来のライゲーション反応は、基質に応じて条件を設定し、各反応組成を別々に添加するなど煩雑でした。また、インサート挿入ライゲーション等の場合、高い形質転換効率を得ることが困難でした。

そこで弊社ではこれらの問題を解決するために、ライゲーション反応を簡単な操作で、かつ高い効率で完了させるキットを開発しました。本キットの反応液にはライゲーション反応に必要な試薬はすべて含まれており、多種類のライゲーションに適用できます。なお、本説明書ではLigation highを用いた時の標準的な結果を示しました。

[2] プロトコール

1. 使用方法

- 本品は-20℃で保存してください。
- Ligation highの融解を氷中で行います。5～10分で自然融解します。^{*1}
- ライゲーションに使用するDNA溶液を調製、準備します。
- DNA液量と半分量～同量のLigation highを混合します。
- 16℃にて30分間反応させます。
- 反応液は、反応終了後そのまま形質転換に使用できます。

2. 効率よくライゲーション反応をおこなうために

- ライゲーション効率が悪いときは、エタノール沈殿等でDNAを精製してください。
- 反応液量を抑えたいときは、使用するDNA液量を少量にして、半分量のLigation highと混合して下さい(2ページご参照)。
- コンピテントセルに多量の反応液を添加すると、形質転換効率が低下しますのでご注意ください。多量の反応液を添加する必要がある場合は、DNAをエタノール沈殿等にて濃縮してから実施してください。
- 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、塩を含まないTE buffer^{*2}でDNAを溶解した後、ライゲーション反応を実施してください(5ページご参照)。

^{*1} 本キット中に沈殿が見られる場合がありますが、この沈殿は安定化剤として使用しているBSAが沈殿を形成したものです。ライゲーション効率には問題ありませんので、加温して溶かしたりせず、そのまま使用してください。

^{*2} 10mM Tris-HCl, pH8.0/1mM EDTA

[3] Ligation highの特長^{*1}

1. ライゲーション効率が優れています。

T4 DNA Ligaseを用いた場合よりも50倍以上の効率が得られます。

2. 少ない液量で反応できます。

Ligation highはDNA溶液と半分量～同量混合して使用します。

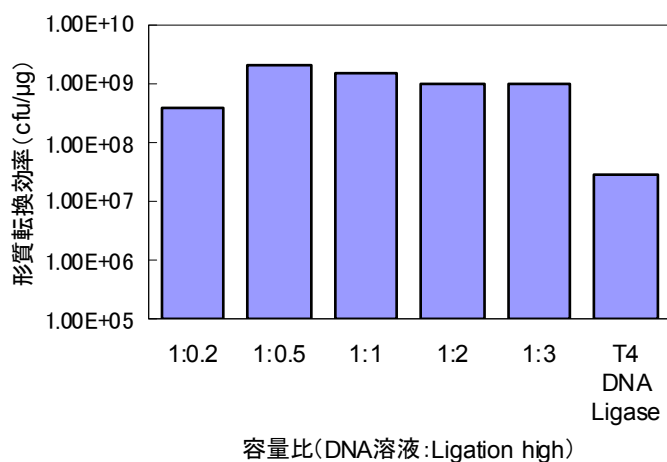


図1 容量比(DNA溶液:Ligation high)による形質転換効率の違い

3. 安定性に優れています。

50回の凍結融解を行ってもライゲーション効率の低下は認められません。

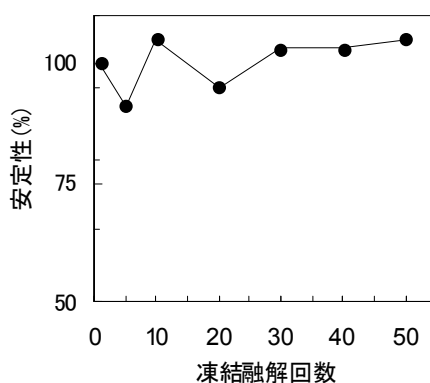


図2 凍結融解による形質転換効率の変化

^{*1} 本ページの実験結果はすべてセルフライゲーションによる結果です。セルフライゲーションは5ページと同様(TE bufferに溶解)の方法を用いました。

[4] 実施例

1. インサート挿入ライゲーション

(1) 方法

- 脱リン酸化したpBluescript[®]II/*Ban* III(50ng,25fmol)に、pUC18/*Taq* Iの1,444bp断片(5~125ng,5~125fmol)を加えたDNA溶液を5 μ l調製した。
- DNA溶液と同量(5 μ l)または半分量(2.5 μ l)のLigation highを混合し、16 $^{\circ}$ Cで30分反応させた。
- E.coli* JM109のコンピテントセル^{*1}を反応液2 μ lで形質転換し、X-Gal、IPTGおよびアンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育した白コロニー数より形質転換効率を測定した。
- コントロールとして、T4 DNA Ligaseを用いて16hr反応したものをを用いた。

(2) 結果および考察

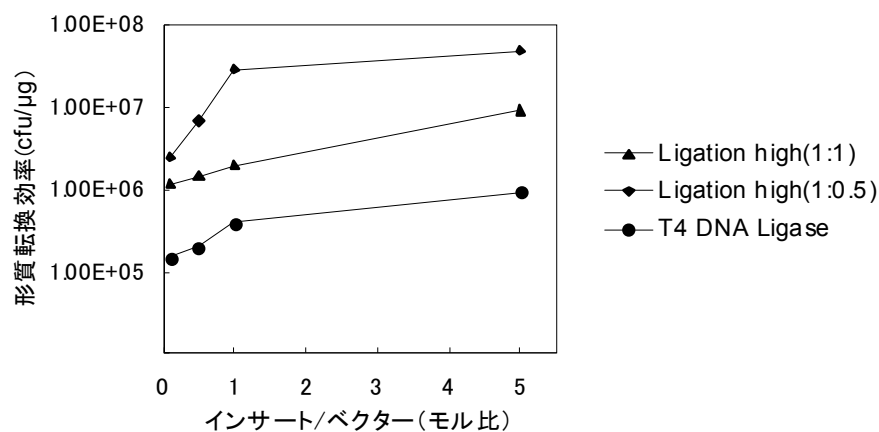


図3 ライゲーション効率に及ぼすインサート/ベクターのモル比の影響

表2 全コロニーに対する白コロニーの割合

インサート/ベクター (モル比)	Ligation high (容量比1:1)	Ligation high (容量比1:0.5)	T4 DNA Ligase
0.2	52	63	12
0.5	50	65	21
1.0	56	61	27
5.0	66	72	39

- インサート/ベクターのモル比は1.0以上で良好な結果を得ました。

^{*1} 形質転換効率は 1.07×10^9 cfu/ μ g pBluescript[®]II

2. リンカーライゲーション

(1) 方法

- 脱リン酸化したpBluescript[®] II / *Hinc* II (100ng, 50fmol)、リン酸化した*Eco*R I リンカー (2.6~130ng, 0.5~25pmol) を加えたDNA溶液を5 μ l 調製した。
- DNA溶液と同量(5 μ l) または半分量(2.5 μ l) のLigation highを混合し、16°Cで30分反応させた。
- *E. coli* JM109のコンピテントセル^{*1}を反応液2 μ lで形質転換し、X-Gal、IPTG およびアンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育した白コロニー数より形質転換効率を測定した。
- コントロールとして、T4 DNA Ligaseを用いて16hr反応したものをを用いた。

(2) 結果および考察

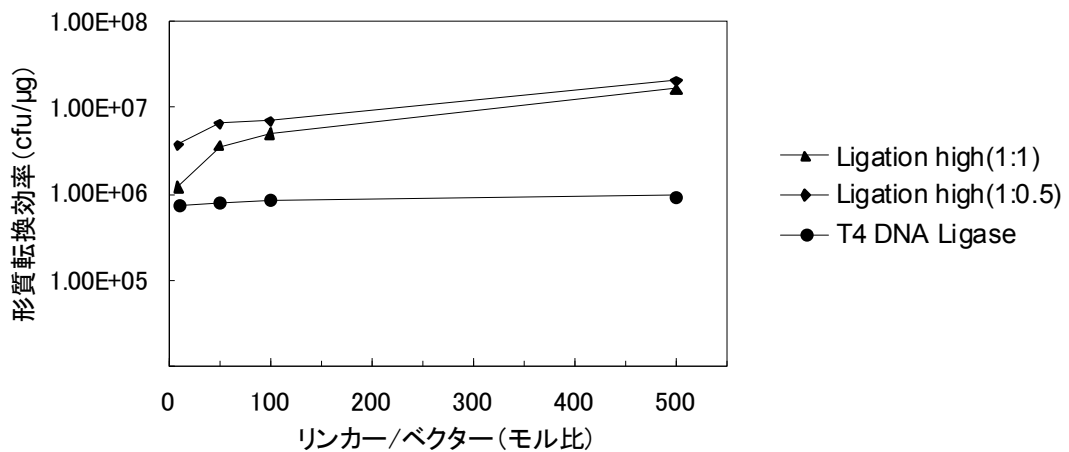


図4 ライゲーション効率に及ぼすリンカー／ベクターのモル比の影響

表3 全コロニーに対する白コロニーの割合

(%)

リンカー／ベクター (モル比)	Ligation high (容量比1:1)	Ligation high (容量比1:0.5)	T4 DNA Ligase
10	51	57	23
50	54	65	24
100	57	64	38
500	54	76	38

- リンカー／ベクターのモル比は100以上で良好な結果を得ました。

^{*1} 形質転換効率は 1.07×10^9 cfu/ μ g pBluescript[®] II

3. 塩濃度の影響

(1) 方法

- pBluescript[®] II / Sca I (5ng)を、塩(NaCl)を添加したTE buffer 5 μ lに溶解した。
- DNA溶液と同量(5 μ l)または半分量(2.5 μ l)のLigation highを混合し、16 $^{\circ}$ Cで30分反応させた。
- *E.coli* JM109のコンピテントセル^{*1}を反応液2 μ lで形質転換し、アンピシリンを含むLBプレート上で培養し、生育したコロニー数より形質転換効率を測定した。

(2) 結果及び考察

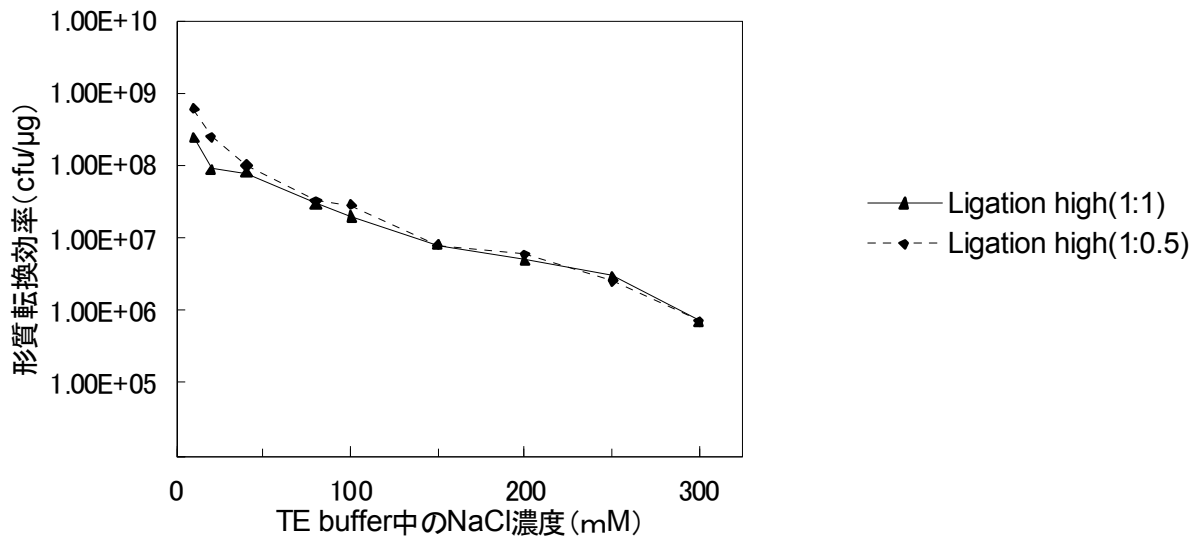


図5 セルフライゲーションによる形質転換効率

- DNAを溶解するbufferに塩が含まれていると、形質転換効率は低下する傾向にあります。高い形質転換効率を得たいときは、塩を含まないTE bufferにDNAを溶解してください。

^{*1} 形質転換効率は 1.17×10^9 cfu/ μ g pBluescript[®] II

[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。
インサート挿入率が低い	プライマーダイマーの影響	PCR産物の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。その場合は、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。
	TA クローニングの効率が悪い	Target Clone™ シリーズ (Code No. TAK-101, TAK-201) のご使用をお勧めします。
・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。

[6] 関連商品

品名	内容	Code No.
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 μ l \times 10 本	DNA-903
Competent Quick DH5 α <サブクローニング用 <i>E.coli</i> DH5 α コンピテントセル>	100 μ l \times 20 本	DNA-913
Competent high JM109 <高効率 <i>E.coli</i> JM109 コンピテントセル、SOC 培地付>	100 μ l \times 10 本	DNA-900
Competent high DH5 <高効率 <i>E.coli</i> DH5 コンピテントセル、SOC 培地付>	100 μ l \times 10 本	DNA-901
Ligation high Ver.2 <高効率ライゲーションキット>	750 μ l \times 1 本	LGK-201
DNA Size Markers λ /HindIII digest <DNA サイズマーカー>	120 μ g \times 1 本	DNA-010
DNA Ladder Markers 100bp DNA Ladder <DNA ラダーマーカー>	100 回用(15 μ g) \times 1 本	DNA-035
InsertCheck -Ready- (プライマー入り) <形質転換体のインサートの確認>	100 回用	PIK-101
Quick Taq [®] HS DyeMix <ホットスタート対応・色素入り Taq Master Mix>	100 回用	DTM-101
Quick Taq [®] HS DyeMix <ホットスタート対応・色素入り Taq Master Mix>	1000 回用	DTM-101 X10
Target Clone [™] <高効率 TA クローニングキット>	10 回用	TAK-101
Target Clone [™] -Plus- <高効率 TA クローニングキット>	10 回用	TAK-201

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

◆東洋紡ライフサイエンス事業部ウェブサイト◆

<http://www.toyobo.co.jp/bio>



【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 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@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部（東京）
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

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 : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>