

17-11



Convenient TA Cloning System for PCR Products

TArget Clone™

(Code No. TAK-101)

TArget Clone™ -Plus-

(Code No. TAK-201)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3243K

－ 目 次 －

[1] はじめに	1
[2] 本製品に含まれているもの	2
[3] プロトコール	3
(1) PCR	3
(2) 3' 末端のdA付加反応	4
(3) ライゲーション	5
(4) 形質転換	6
(5) 組換え体の確認	7
[4] ベクターの配列情報	8
(1) pTA2 VectorのMap	8
(2) マルチクローニングサイト周辺の塩基配列	8
(3) pTA2塩基配列	9
(4) 制限酵素切断部位	11
[5] トラブルシューティング	14
[6] 参考資料	16
(1) ご用意いただく培地、試薬の組成	16
(2) 関連商品	17

ご注意

本試薬は研究用試薬です。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。

本試薬は日本国内限定で販売されています。

[1] はじめに

Taq DNAポリメラーゼやTth DNAポリメラーゼをベースとした酵素により増幅されたPCR産物の多くは、その3'末端にデオキシリボアデノシン(dA)が一塩基付加された形態となっています。そこで、3'末端にデオキシリボチミジン(dT)を一塩基だけ付加したプラスミドベクター(Tベクター)を用いた場合、PCR産物のdA突出と相補的な関係となり、簡単にPCR産物をクローニングすることができます。これが、TAクローニング法の原理です。TAクローニング法は特別なプライマーを用いる必要が無く、制限酵素消化等の特別な処理も必要としないので、PCR産物のクローニング方法として広く普及しています。

しかし、従来のTAクローニング法では、ライゲーション反応に長い時間を必要とした上、ベクターのセルフライゲーションに起因する偽陽性が多く見られることがありました。そこで東洋紡では、これらの問題を改善するため、新たなTAクローニングキット TArget Clone™を開発しました。本キットには以下のような特長があります。

特長

- 迅速 : 反応促進剤*の効果により、ライゲーション反応が最短5分間で完了します。
- 高効率 : 反応促進剤*の効果により、高いクローニング効率を実現しました。
- 確実 : セルフライゲーションは陰性(青コロニー)となるようにデザインされており、偽陽性の発生が低減されています。また、最長 12kb までの増幅産物のクローニングが可能です。

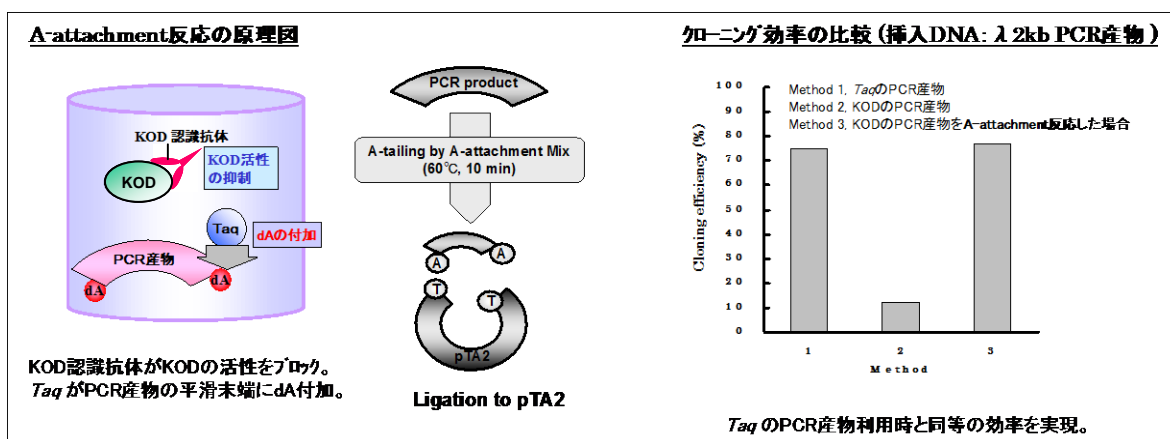
*特許出願中

また、東洋紡 KOD DNA ポリメラーゼシリーズなどの、 α 型 DNA ポリメラーゼによって増幅された PCR 産物の多くは、そのプルーフリーディング活性のため平滑末端となっています。従来、TAクローニング法を利用して効率よくクローニングを行うためには、PCR産物を精製した後、Taq DNAポリメラーゼにより、3'末端にdAを付加する必要がありました。そこで、KODシリーズにより増幅されたPCR産物でも、精製することなく、TAクローニングができる試薬“A-attachment Mix”を開発しました*。先のTAクローニングキットと合わせて、KODシリーズ増幅産物専用のTAクローニング用試薬としてご利用いただけます(TArget Clone™-Plus-に付属)。

*特許出願中

A-attachment Mix の特長

- 簡便 : KOD シリーズにより増幅された PCR 産物に A-attachment Mix を添加して 60°C、10 分間反応するだけです。PCR 産物の精製を必要としません。
- 高効率 : Taq DNAポリメラーゼで増幅されたPCR産物をTAクローニングした場合と同等のクローニング効率を実現しました。



[2] 本製品に含まれているもの

品名	コード	使用回数	保存温度	内容
<i>TArget Clone</i> TM	TAK-101	10回用	-20°C	10 μl pTA2 Vector (50ng/μl) 50 μl 2x Ligation Buffer 10 μl T4 DNA Ligase
<i>TArget Clone</i> TM -Plus-	TAK-201			10 μl pTA2 Vector (50ng/μl) 50 μl 2x Ligation Buffer 10 μl T4 DNA Ligase 10 μl 10x A-attachment Mix

注) pTA2 Vector と2x Ligation Bufferは、室温で溶解後に、必ずスピンドウンを行い、直ちに氷上に置いてください。特にpTA2 VectorのdT突出末端は不安定ですので、室温で長時間放置することは避けてください。また、凍結融解の繰り返しも出来るだけ避けるようにしてください(凍結融解10回までは、ほとんど性能劣化が認められません)。

注) T4 DNA Ligaseと10x A-attachment Mixについては、ご使用前に必ずスピンドウンを行い、直ちに氷上に置いてください。またご使用後は、必ず冷凍庫内(-30~-15°C)で保存してください。

<その他に必要な試薬>

LB 寒天培地
100mg/ml アンピシリン
100mM IPTG
4% X-gal

[3] プロトコル

ここでは本製品を使用する場合の、標準的なプロトコルを示します。

(1) PCR

Step1. *Taq* DNAポリメラーゼ、*Tth* DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼなどを用いて、対象となるDNAの増幅を行います。増幅の条件は、各反応に応じて設定ください。PCR産物の3'-dA-overhangsを確実に起こすために、PCRの最後のステップで72°C、5~10分間の伸長反応を行ってください。

注) 3'-dA-overhangsは不安定ですので、PCR後すぐに使用するか冷凍(-20°C)保存するようにし、室温で放置することは避けてください。また、凍結融解の繰り返しも出来るだけ避けてください。

Step2. 反応液の一部をとって、アガロースゲル電気泳動により目的のPCR産物の有無を確認します。また、DNA染色後、PCR産物のバンドの濃さを分子量マーカーのバンドの濃さと比較することにより、おおよそのDNA量を推定します。

Step3. 必要に応じてPCR産物を精製します。通常はPCR産物の精製は不要ですが、純度が低いと思われる場合や、後のライゲーション反応の阻害物質が含まれていると考えられる場合には、精製を実施することにより結果の改善が見られます。

注) PCR産物の3'末端にdA付加反応を行う場合には、PCR産物の精製を行わずに、そのまま次の(2)3'末端のdA付加反応(p.4)へ進んでください(*TArget Clone™ -Plus*をご使用の場合のみ)。

注) PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR & Gel Cleanup-” (Code No.:NPK-601, 200回用)のご使用をお勧めします。本キットを用いると、約5分間でPCR産物の精製ができます。

(2) 3'末端のdA付加反応 (TArget Clone™ -Plusをご使用の場合)

* dA付加反応を行わない場合は、次の(3)ライゲーション(P.5)へ進んでください。

* 3'末端のdA付加反応は、可能な限り、ライゲーション反応の直前に行ってください。

Step1. KODシリーズで増幅したPCR産物9 μ lを新しいチューブに分取します。

注) PCR産物は精製せずにそのままお使いください。もし、精製されたPCR産物をお使いの場合には、最終濃度が1x Taqバッファー、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTPsとなるように試薬を添加して、以下の操作を継続してください。

Step2. 10x A-attachment Mixを1 μ l添加してよく攪拌します。

Step3. 60°Cで10分間反応します。

注) 効率が低い場合には、反応時間を30分間まで延長させてください(ほとんどの場合は10分間の反応で十分ですが、最大の付加効率は30分間の反応で得られます)。

Step4. 反応液の一部をライゲーション反応に使用します。

注) 反応液は、使用まで氷上または低温(2~10°C)で保存してください。

(3)ライゲーション

Step1. pTA2 Vector、2x Ligation Buffer、T4 DNA Ligaseのチューブを取り出します。

注)pTA2 Vector と2x Ligation Bufferは室温で溶解させた後、必ずスピンドウンを行い、直ちに氷上に置いてください。特にpTA2 VectorのdT突出末端は不安定なので、室温で長時間放置することは避けてください。また、凍結融解の繰り返しも出来るだけ避けるようにしてください(凍結融解10回までは、ほとんど性能劣化が認められません)。

Step2. 以下の内容でライゲーション液を調製します。

組成	ライゲーション液	チェック
滅菌蒸留水	(3-X) μ l	
2x Ligation Buffer	5 μ l	
pTA2 Vector (50ng/ μ l)	1 μ l	
PCR産物(クローニングの対象)	X μ l	
T4 DNA Ligase	1 μ l	
	10 μ l	

注)PCR産物の濃度、純度、サイズ、DNA配列等により至適な液量は異なりますが、モル比としてpTA2 Vector : PCR産物を1 : 3以上の比になるようにすると、一般的により結果が得られます。pTA2 Vectorの濃度は50ng/ μ l、サイズは約3.0kbなので、次式で求められるX μ l以上のPCR産物を使用してください。

$$X = 50 \cdot Y \div Z \quad (Y\text{kb:PCR産物のサイズ、}Z\text{ ng}/\mu\text{l:PCR産物濃度})$$

例) 20ng/ μ l のPCR産物(0.5kb)を、モル比でpTA2 Vector : PCR産物 = 1 : 3となるように添加するには、 $50 \times 0.5 \div 20 = 1.25 \mu\text{l}$ 必要と計算できます。PCR産物量が少ないとクローニング効率が下がります。ご注意ください。

Step3. ライゲーション液を室温(15~25°C)で30分間、反応させます。

注)短いDNA断片(2kb以下が目安)をライゲーションする場合には、5分間の反応で十分なクローニング効率が得られます。

また、反応時間をさらに伸ばすことによって、クローニング効率が向上することがあります。一晚(12~18時間程度)反応させる場合には、4°Cで反応させてください。

(4) 形質転換

* ここでは東洋紡コンピテントセル (Competent high JM109 (Code No.: DNA-900)、Competent high DH5 α (Code No.: DNA-903) など) を使用する場合の標準的な手順を示します。詳細については、製品添付の取扱い説明書をご参照ください。

Step1. Competent Cell (100 μ l) を氷中にて融解します。

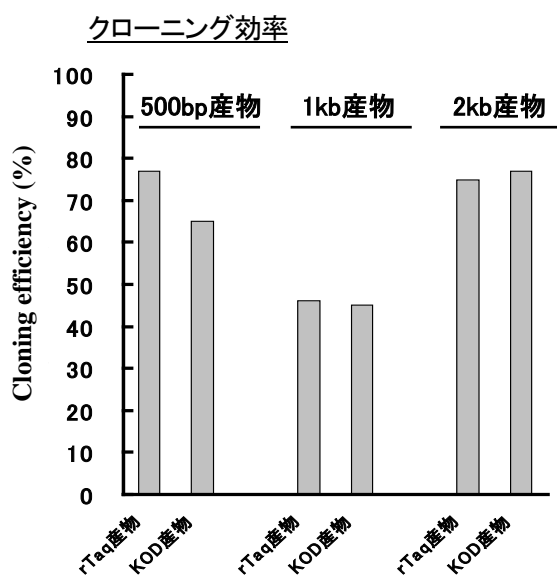
Step2. ライゲーション液を10 μ l 加えて混合し、氷中にて30分間放置します。

Step3. 42°C、30秒間ヒートショックした後、氷中で2分間冷却します。

Step4. SOC培地を900 μ l 加えて混合し、37°Cで1時間振とう培養します。

Step5. LB/アンピシリン/IPTG/X-galプレートに適量をまき、37°Cで1晩培養して青/白コロニー判定にて白コロニーを組換え体の候補として選択します。

注) 複数のプレートに20~100 μ l ずつまくことをお勧めします。
以下に本キットの使用例をお示しします。ご参考ください。



クローン数

PCR産物	挿入DNA		
	500bp	1kb	2kb
rTaq産物 (TAK-101使用)	10,400	4,700	1,800
KOD-Plus産物 (TAK-201使用)	8,950	4,300	2,230

ライゲーション反応条件: 24°C, 5分間
コンピテントセル: *E.coli* DH5 α (1×10^9 cfu/ μ g)

(rTaq産物: TAK-101 使用、KOD産物: TAK-201 使用)

(5) 組換え体の確認

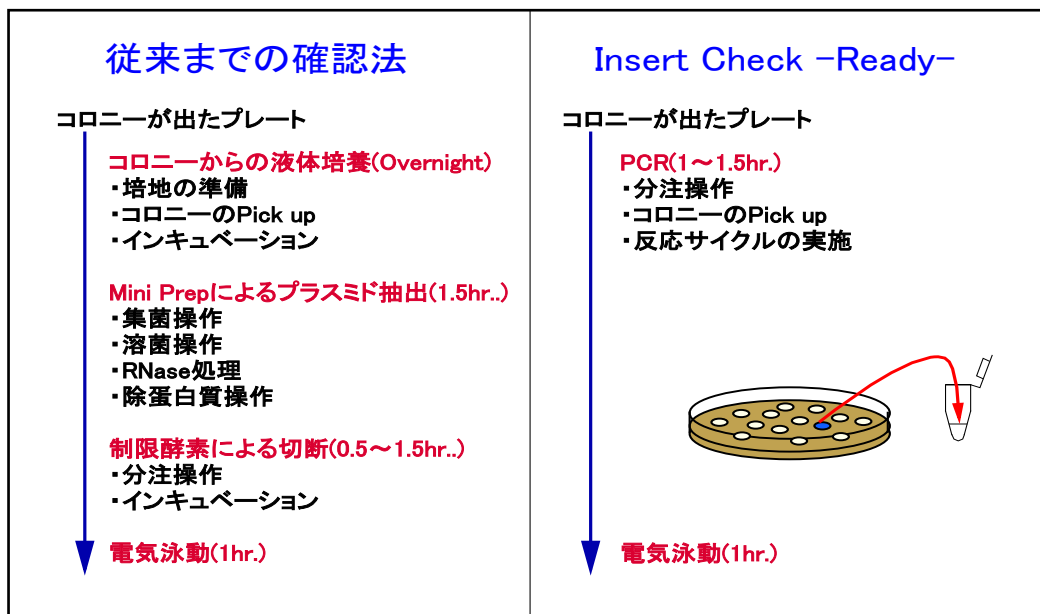
コロニーダイレクトPCR

目的とするDNA断片が組み込まれた組換え体を確認する最も簡便な方法は、大腸菌が持つプラスミドのインサートサイズをコロニーダイレクトPCRにより推定する方法です。特に、東洋紡のコロニーダイレクトPCR用Premix試薬“Insert Check -Ready-” (Code No.:PIK-101)を使用すれば、短時間(2~4時間)で簡単に目的とする組換え体の確認ができます。ここでは、Insert Check -Ready- を使用する場合の標準的な手順を示します。詳細については、製品添付の取扱い説明書をご参照ください。

<Insert Check -Ready- (Code No.:PIK-101)の使用法>

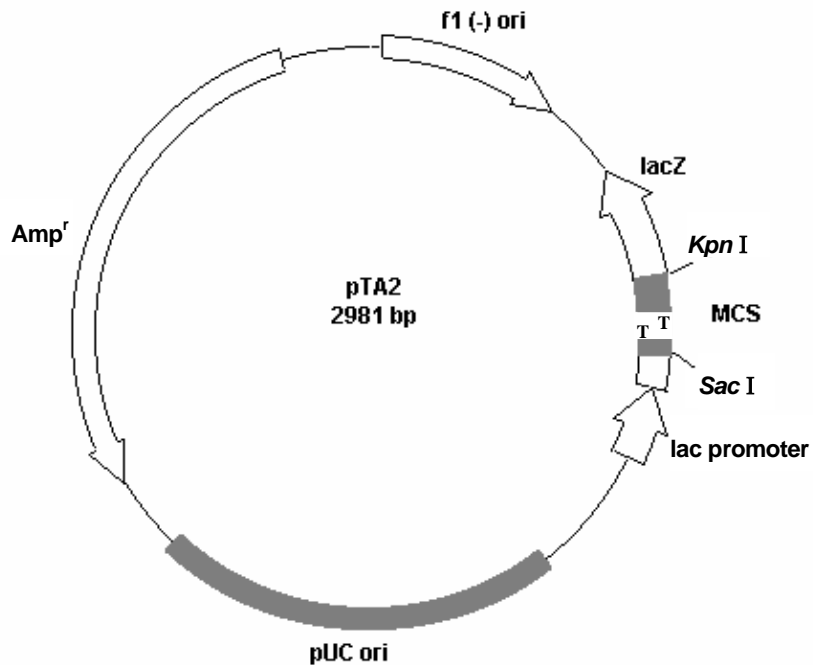
- Step1. 融解したInsert Check -Ready- をPCR用チューブに50 μ lずつ分注します。
- Step2. 爪楊枝またはチップでコロニーを軽く突き、レプリカ用のプレートに爪楊枝またはチップの先端を突き刺します(レプリカしたプレートは37°Cで培養します)。
- Step3. 爪楊枝またはチップの先端をPCR用チューブに入れ、すすぎます。
- Step4. 必要に応じてミネラルオイルを加え、蓋をして、サーマルサイクラーにセットしてPCRを行います。
- Step5. PCR終了後、Loading Dyeを添加し、各反応液の一部をそのままゲルにアプライし、電気泳動を行います。電気泳動の結果からポジティブクローンの判定を行います。

* この後、目的とするDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを分離するには、レプリカプレート上の当該クローンを液体培養し、そこからプラスミドDNAを抽出してください。プラスミドDNAの抽出には東洋紡プラスミドDNA抽出キット“MagExtractor™ -Plasmid-”をお薦めします。

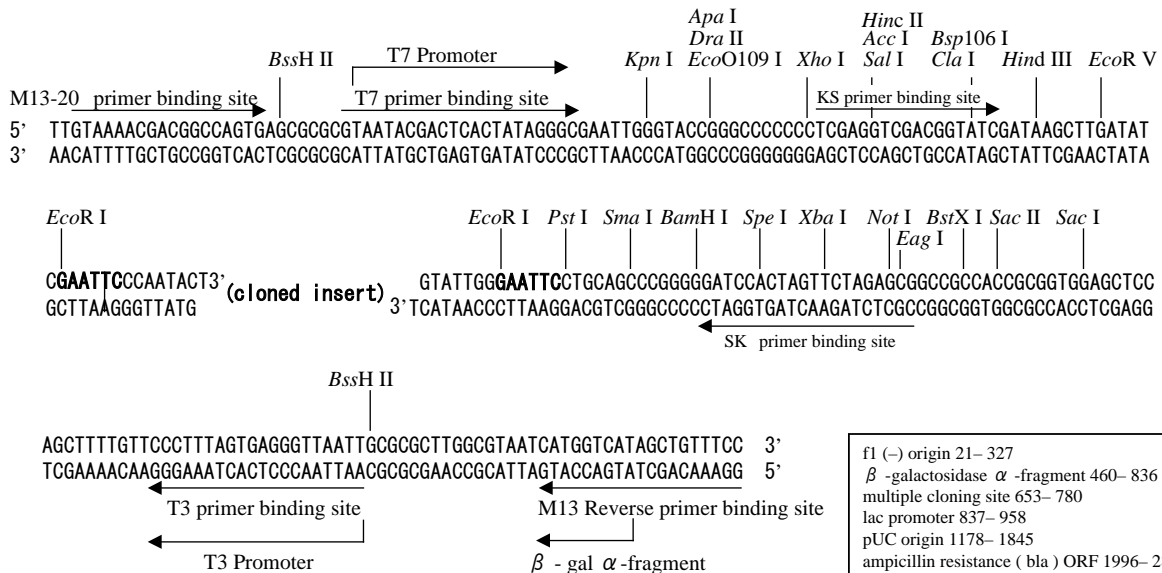


[4] ベクターの配列情報

(1) pTA2 VectorのMap



(2) マルチクローニングサイト周辺の塩基配列



(3)pTA2塩基配列 (2981 bp)

```
1   CTGACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGGTGT GGTGGTTACG
51  CGCAGCGTGA CCGCTACACT TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCTTTCGC
101 TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG CCACGTTCGC CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC
151 TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCGGAT TTAGTGCTTT ACGGCACCTC
201 GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGATGGT TCACGTAGTG GGCCATCGCC
251 CTGATAGACG GTTTTTCGCC CTTTGACGTT GGAGTCCACG TTCTTTAATA
301 GTGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCCTAT CTCGGTCTAT
351 TCTTTTGATT TATAAGGGAT TTTGCCGATT TCGGCCTATT GGTAAAAAAA
401 TGAGCTGATT TAACAAAAAT TTAACGCGAA TTTTAACAAA ATATTAACGC
451 TTACAATTTT CATTGCGCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT
501 CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT
551 GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG TTTTCCCAGT CACGACGTTG
601 TAAAACGACG GCCAGTGAGC GCGCGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT
651 TGGGTACCGG GCCCCCCCTC GAGGTCGACG GTATCGATAA GCTTGATATC
701 GAATTCCTAA TAC*GTATTGG GAATTCCTGC AGCCCGGGGG ATCCACTAGT
751 TCTAGAGCGG CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT
801 GAGGGTTAAT TGCGCGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG
851 TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT
901 AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG
951 CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG
1001 CATTAAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGGCG
1051 CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC
1101 GCGGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA
1151 TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC
1201 CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
1251 CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC
1301 CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT
1351 GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC
1401 TCCCTTCCGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCACGCTG TAGGTATCTC
1451 AGTTCGGTGT AGGTCGTTTC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC
1501 CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
1551 ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG
1601 ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG
1651 GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC
1701 TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGGAAA
1751 CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC
1801 GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
1851 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA
1901 TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTTAA AATGAAGTTT
1951 TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT
```

```

2001 GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC
2051 ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT
2101 ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG
2151 CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA
2201 AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG
2251 GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG
2301 CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA
2351 TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT
2401 GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA
2451 AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT
2501 CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC
2551 AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC
2601 CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG
2651 CTCATCATTG GAAAACGTTT TCGGGGGCGA AACTCTCAA GGATCTTACC
2701 GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT
2751 CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG
2801 CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT
2851 CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTTATTGTC
2901 TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG
2951 GTTCCGCGCA CATTTCCCG AAAAGTGCCA C

```

* 3'末端にdTが付加されている部分

(4) 制限酵素切断部位

制限酵素	切断部位数	切断箇所
<i>Acc65I</i>	1	653
<i>Accl</i>	1	674
<i>AflIII</i>	1	1173
<i>AhdI</i>	1	2061
<i>Alw44I</i>	2	1487, 2733
<i>AlwI</i>	10	739, 740, 1740, 1814, 1826 1911, 1924, 2388, 2691, 2709
<i>AlwNI</i>	1	1584
<i>Apal</i>	1	659
<i>ApoI</i>	3	417, 428, 701
<i>AvaI</i>	2	668, 733
<i>AvaII</i>	2	2204, 2426
<i>BamHI</i>	1	739
<i>BanI</i>	4	193, 653, 917, 2014
<i>BanII</i>	3	159, 659, 775
<i>BciVI</i>	2	1382, 2909
<i>BfaI</i>	6	81, 746, 752, 1668, 1921 2256
<i>BglI</i>	2	466, 2180
<i>Bpml</i>	2	778, 2151
<i>BsaAI</i>	1	232
<i>BsaHI</i>	1	2602
<i>BsaI</i>	1	2133
<i>BsaJI</i>	6	575, 733, 734, 767, 912 1333
<i>BsaWI</i>	3	1379, 1526, 2357
<i>BseMII</i>	4	1448, 1857, 2023, 2563
<i>BsiEI</i>	6	497, 758, 1086, 1510, 2433 2582
<i>BsiHKA1</i>	4	775, 1487, 2648, 2733
<i>BsII</i>	8	9, 335, 664, 1015, 1189 1207, 1373, 1652
<i>BsmAI</i>	2	2133, 2898
<i>Bsp120I</i>	1	659
<i>Bsp1286I</i>	6	159, 659, 775, 1487, 2648 2733
<i>BspHI</i>	2	1893, 2901
<i>BspLU11I</i>	1	1173
<i>BsrBI</i>	5	88, 755, 863, 1104, 2905
<i>BsrDI</i>	2	2120, 2302
<i>BssHII</i>	2	619, 812
<i>BssSI</i>	2	1346, 2730
<i>BstF5I</i>	4	542, 2046, 2227, 2514
<i>BstXI</i>	1	764
<i>Cfr10I</i>	2	129, 2146
<i>Clal</i>	1	683
<i>Csp6I</i>	2	654, 2545

<i>Ddel</i>	4	1448,	1857,	2023,	2563	
<i>Dral</i>	3	1930,	1949,	2641		
<i>DraIII</i>	1	232				
<i>DrdI</i>	2	275,	1275			
<i>Dsal</i>	1	767				
<i>EaeI</i>	4	609,	758,	1012,	2454	
<i>EarI</i>	3	511,	1051,	2855		
<i>Ecl136II</i>	1	775				
<i>Eco52I</i>	1	758				
<i>Eco57I</i>	2	1700,	2748			
<i>EcoO109I</i>	1	659				
<i>EcoRI</i>	2	701,	721,			
<i>EcoRII</i>	5	575,	912,	1200,	1321,	1334
<i>EcoRV</i>	1	695				
<i>FauI</i>	5	33,	87,	505,	965,	1022
<i>FokI</i>	4	542,	2046,	2227,	2514	
<i>FspI</i>	2	477,	2286			
<i>HaeIII</i>	4	75,	83,	1047,	1417	
<i>HgaI</i>	4	3,	1275,	1853,	2603	
<i>HincII</i>	1	674				
<i>HindIII</i>	1	689				
<i>HinfI</i>	8	282,	304,	632,	1008,	1073
		1148,	1544,	2061		
<i>HphI</i>	6	222,	1917,	2144,	2540,	2766
		2781				
<i>KpnI</i>	1	653				
<i>Maell</i>	8	123,	233,	276,	288,	595
		1876,	2292,	2665		
<i>MbolI</i>	8	103,	512,	1052,	1823,	1914
		2669,	2747,	2856		
<i>MspI</i>	4	765,	2314,	2473,	2832	
<i>MspA1I</i>	6	527,	767,	995,	1513,	1758
		2699				
<i>MvaI</i>	5	575,	912,	1200,	1321,	1334
<i>NaeI</i>	1	129				
<i>NciI</i>	6	657,	733,	734,	1552,	2248
		2599				
<i>NgoMIV</i>	1	129				
<i>NlaIII</i>	8	828,	1174,	1894,	2385,	2395
		2473,	2509,	2902		
<i>NotI</i>	1	757				
<i>NspI</i>	1	1173				
<i>PleI</i>	6	282,	304,	632,	1073,	1544
		2061				
<i>Psp1406I</i>	2	2291,	2664			
<i>PstI</i>	1	727				
<i>PvuI</i>	2	497,	2433			
<i>PvuII</i>	2	527,	995			
<i>RsaI</i>	2	654,	2545			
<i>SacI</i>	1	775				
<i>SacII</i>	1	767				
<i>SalI</i>	1	674				

<i>SapI</i>	1	1050				
<i>Sau96I</i>	8	240, 2187, 2544	507, 2204,	659, 2426	660,	2108
<i>Scal</i>	1	2544				
<i>SchI</i>	6	282, 2061	304,	632,	1073,	1544
<i>SfaNI</i>	4	1261,	2313,	2523,	2753	
<i>Sfcl</i>	6	11, 2307	638,	727,	1438,	1629
<i>SmaI</i>	1	733				
<i>SmlI</i>	5	668,	1279,	1541,	1818,	2686
<i>SpeI</i>	1	745				
<i>SspI</i>	2	440,	2868			
<i>TaaI</i>	8	258, 1676,	483, 1989,	678, 2504	1135,	1206
<i>TaiI</i>	8	123, 1876,	233, 2292,	276, 2665	288,	595
<i>TaqI</i>	7	199, 1273,	669, 2717	675,	684,	699
<i>TatI</i>	1	2544				
<i>TfiI</i>	2	1008,	1148			
<i>Tsp45I</i>	4	57,	589,	2323,	2534	
<i>TspRI</i>	10	613, 1859,	960, 2008,	1069, 2113,	1575, 2460,	1588 2487
<i>VspI</i>	3	943,	1002,	2237		
<i>XbaI</i>	1	751				
<i>XhoI</i>	1	668				
<i>XhoII</i>	7	739, 2691,	1814, 2708	1825,	1911,	1923
<i>XmaI</i>	1	733				
<i>XmnI</i>	1	2661				

* 1-10カ所の切断部位を持つ制限酵素についてまとめています。

切断部位の無い制限酵素

<i>AatII</i>	<i>AccIII</i>	<i>AflII</i>	<i>AgeI</i>	<i>AscI</i>
<i>BbeI</i>	<i>BbsI</i>	<i>BbvCI</i>	<i>BclI</i>	<i>BglII</i>
<i>BlnI</i>	<i>Bpu10I</i>	<i>Bpu1102I</i>	<i>BsaBI</i>	<i>BseRI</i>
<i>BsgI</i>	<i>BsiWI</i>	<i>BsmBI</i>	<i>BsmFI</i>	<i>BsmI</i>
<i>BspMI</i>	<i>BsrGI</i>	<i>Bst1107I</i>	<i>BstAPI</i>	<i>BstBI</i>
<i>BstEII</i>	<i>Bsu36I</i>	<i>Eco47III</i>	<i>Eco72I</i>	<i>EcoNI</i>
<i>EheI</i>	<i>FseI</i>	<i>HpaI</i>	<i>KasI</i>	<i>MluI</i>
<i>MscI</i>	<i>MunI</i>	<i>NarI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NdeI</i>
<i>NheI</i>	<i>NruI</i>	<i>NsiI</i>	<i>PacI</i>	<i>PmeI</i>
<i>Ppu10I</i>	<i>PpuMI</i>	<i>PshAI</i>	<i>RsrII</i>	<i>SanDI</i>
<i>SbfI</i>	<i>SexAI</i>	<i>SfiI</i>	<i>SgfI</i>	<i>SgrAI</i>
<i>SnaBI</i>	<i>SphI</i>	<i>SrfI</i>	<i>StuI</i>	<i>StyI</i>
<i>Swal</i>	<i>Tth111I</i>	<i>Van91I</i>	<i>XcmI</i>	

[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	コンピテントセルの能力が不足している	・ 10^8 cfu/ μ g-pBR322 以上の形質転換効率を持ったコンピテントセルをご使用ください。
	プレートの抗生物質濃度が高すぎる	・プレートに終濃度50–100 μ g/mlのアンピシリンを入れてください。
コロニーがプレート一面に出る	プレートの抗生物質量が不足している	・プレートに50–100 μ g/mlのアンピシリンを入れてください(アンピシリンを含むプレートは4°Cで約1ヶ月保存できます)。
白コロニーがほとんど得られない あるいは 白コロニーがかなり少ない	PCR産物中に3'-dA-overhangsが少ない	<ul style="list-style-type: none"> ・Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ以外のDNAポリメラーゼをご使用の際は、3'-dA付加活性があることをご確認ください。 ・Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼをご使用の際も、PCR産物の3'-dA-overhangsを確実に起こすためにPCRの最後のステップで72°C、5-10分の伸長反応を追加してください。 ・3'-dA-overhangsは不安定なので、PCR産物はPCR後すぐに使用するか-20°Cで保存し、室温での放置は避けてください。 ・10x A-attachment MixによるdA付加反応は、KODシリーズで増幅されたPCR産物のみに対応しています。その他のPCR酵素で増幅されたPCR産物に対してdA付加反応を行う場合には、あらかじめ、PCR産物を精製してからdA付加反応を実施してください(p.4参照)。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-”をお勧めします。
	ベクターのdT突出末端が分解している	・pTA2 Vectorの室温での放置や凍結融解は、できるだけ避けてください。
	ライゲーション反応の時間が短い	・ライゲーション反応時間を30分以上2時間まで延ばしてください。または、4°Cで一晩(12~18時間程度)反応を行ってください。
	反応温度が高すぎる	・反応温度は25°C以下で行ってください。25°Cを超えると白コロニーの取得効率が低下します。

白コロニーがほとんど得られない あるいは 白コロニーがかなり少ない	挿入DNAの濃度が低い	<ul style="list-style-type: none"> ・挿入DNAの濃縮を行なってください。 ・ベクター使用量を1/2～1/5に調節してライゲーション反応を行ってください。
	PCR産物量が不足している	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR産物の濃度、純度、サイズ、DNA配列等により至適な液量は変わりますが、モル比として、pTA2 : PCR産物 = 1 : 3 以上になるようにしてください。
	PCR産物に含まれるきょう雑物の持込みにより、TAライゲーション反応が阻害されている	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR産物の精製を行ってください。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-”をお勧めします。
	PCR産物へのUVの過照射によりピリミジンダイマーが形成している	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR産物をゲルから切出す時にはUVの過照射にご注意ください。PCR産物の確認は長波長のUV光源を用いることをお勧めします。
	PCR産物が挿入されてもlacZが発現している	<ul style="list-style-type: none"> ・薄い青コロニーをチェックすることにより組換え体が得られることがあります。
ほとんど或は全部が白コロニー	IPTG、X-gal が低濃度で青/白コロニーの判定ができていない	<ul style="list-style-type: none"> ・LB/アンピシリン/IPTG/X-galプレートの性能をご確認ください。また、アンピシリン、IPTG、X-galの使用濃度を再確認してください。
白コロニーを拾っても、目的の長さの断片が挿入されていない	目的とする断片の増幅量が少ない	<ul style="list-style-type: none"> ・ライゲーションに使用するPCR産物の液量を増やしてください。本製品は最大3 μlのPCR産物を使用することができます。 ・目的とする断片が特異的に増幅されるよう、PCR条件を検討してください。
	PCR産物にプライマーダイマーが多く含まれている	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR産物の精製を行ってください。PCR産物の精製には東洋紡DNA fragment精製キット“MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-”をお勧めします。本キットは、プライマーダイマーなどの短鎖DNA(およそ50bp以下)の除去に有効です。 ・コロニーダイレクトPCRを利用して、目的の長さの断片が含まれるコロニーを選別してください。

[6] 参考資料

(1) ご用意いただく培地、試薬の組成

① LB培地

10g bacto-tryptone、5g bacto-yeast extract、10g NaClを1Lの蒸留水で溶解し、NaOHでpH7.2に調製する。

② LB/アンピシリンプレート

LB培地調製後、15gの寒天末を加えてオートクレーブする。約50°C程度になってから、アンピシリンを終濃度100 μ g/mlとなるよう加え、シャーレに適量流し込み、寒天末を固める。

③ 100mM IPTG

0.24g IPTGを蒸留水に溶解し、終量10mlとする。フィルター滅菌後、-20°Cにて保存する。

④ 4% X-gal

0.4g X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)をN,N-dimethyl-formamideに溶解し、終量10mlとする。-20°Cにて遮光保存する。

⑤ LB/アンピシリン/IPTG/X-galプレート

LB/アンピシリンプレートに100mM IPTG、4% X-galを各20 μ l塗布して、乾燥させる。

(2) 関連商品

品 名	内 容	Code No.
10 x A-attachment mix	25 μ l (25 回用)	TAK-301
T4 DNA Ligase	400U \times 1 本	LGA-111
<i>rTaq</i> DNA Polymerase <Mg 別添タイプ>	250U \times 1 本	TAP-201
<i>rTaq</i> DNA Polymerase <Mg 含有タイプ>	250U \times 1 本	TAP-211
<i>rTth</i> DNA Polymerase	250U \times 1 本	TTH-301
KOD FX	200U \times 1 本	KFX-101
KOD -Plus-	200U \times 1 本	KOD-201
KOD -Plus- Ver.2	200U \times 1 本	KOD-211
KOD Dash	250U \times 1 本	LDP-101
Blend Taq [®]	250U \times 1 本	BTQ-101
Blend Taq [®] -Plus-	250U \times 1 本	BTQ-201
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
<i>Magical Trapper</i> <磁性ビーズ分離用スタンド>	1 台	MGS-101
Competent high DH5 α <大腸菌 DH5 α コンピテントセル、SOC 培地付>	100 μ l \times 10 本	DNA-903
Insert Check -Ready- < <i>E.coli</i> コロニーダイレクト PCR 用 Premix 試薬 >	1ml \times 5 本	PIK-101



【製造・販売元】

— 納期・注文に関するお問い合わせ —

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

— 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 : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://lifescience.toyobo.co.jp/>