

高効率ライゲーション試薬:Ligation high Ver.2 を用いたライゲーション反応の条件検討

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、長くご利用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飛躍的に向上しています(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ようになりました。本試薬は、様々な末端を有するDNA断片の連結反応に幅広く用いることができます。

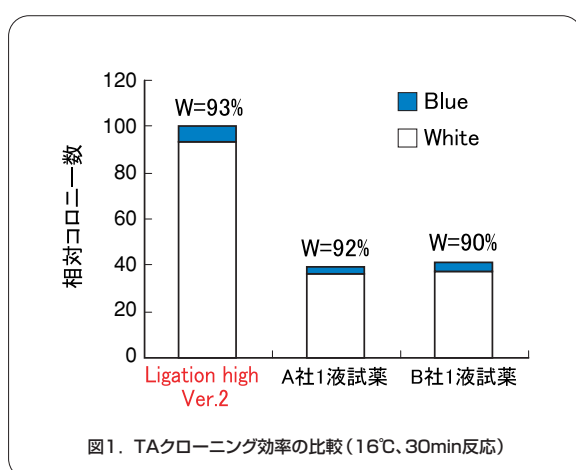


図2. -20℃保存での試薬の状態
従来品(緑)、本製品(青)
本製品は-20℃保存で凍結しません。

本稿では、Ligation high Ver.2の基本性能に関する実施例に加え、通常ではあまり検討されることのない、平滑末端、およびTAクローニングにおけるインサートの挿入方向についての検討例をご紹介します。

方法

(1) インサートDNA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Taq DNA polymeraseを用いて増幅して調製しました。平滑末端クローニング用のDNA断片は、同じプライマーを使用し、高正確性PCR酵素KOD -Plus-*にて増幅して調製しました(リン酸化プライマー使用)。突出末端クローニング用のDNA断片は、両端にHindIIIサイトを有するようにλDNAの約0.5kbの領域を増幅した後、両末端をHindIIIで切断し、調製しました。すべてのDNA断片は、最後にMagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-(Code No.:NPK-601)を用いて精製した後に、DNA量を定量し、使用しました。

*KOD -Plus-で増幅されたDNA断片の末端は平滑化されています。

(2) ベクターの調製

平滑末端クローニング用のベクターは、pUC 19をHincIIで切断した後に、*E. coli* Alkaline Phosphatase (BAP-111)にて脱リン酸化し、使用しました。突出末端クローニング用のベクターはpUC 19をHindIIIで切断した後、同様に脱リン酸化して使用しました。脱リン酸化処理後、ベクターは(1)と同様の方法で精製して用いました。TAベクターは市販のものを使用しました。

(3) ライゲーション反応

上記の方法で調製したベクター(50ng)とDNA断片をモル比で1:3となるように混合し(7.5μl)とし、その溶液に等量(7.5μl)のLigation high Ver.2を加え、様々な温度、時間でライゲーション反応を行いました。その後、反応液10μlをCompetent high DH5α (Code No.:DNA-903) 100μlに添加し、常法に従って形質転換を行いました。続けてその一部を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)と、青コロニー(インサートなし)をカウントしました。インサートの方向の確認は、ベクター上とインサート上に設計したプライマーを用いるコロニーダイレクトPCR法を用いて行いました(各20コロニーを解析)。

プライマーのリン酸化、ベクターの脱リン酸化、およびインサートの方向性の確認はUPLOAD Vol. 86のプロトコールコーナー「平滑末端クローニング」をご覧ください(弊社ウェブサイト(www.toyobo.co.jp/bio)にてご覧いただけます)。

結果及び考察

(1) 反応時間とクローニング効率

16℃反応における、各種DNA断片のクローニング効率を末端形状別に比較しました。その結果、突出末端ライゲーションでは約5分でほぼライゲーション反応が完了していることが分かりました。また、平滑末端、およびTAクローニングにおいても30分間で約70～80%の反応が完了することが分かりました(図3)。

平滑末端、およびTAクローニングにおいては、1時間を越えて2時間まで徐々に効率が向上することも分かっており、クローニング効率が低い場合は、反応時間を2時間まで延ばすことにより、さらに効率を向上させることが可能であると思われました。

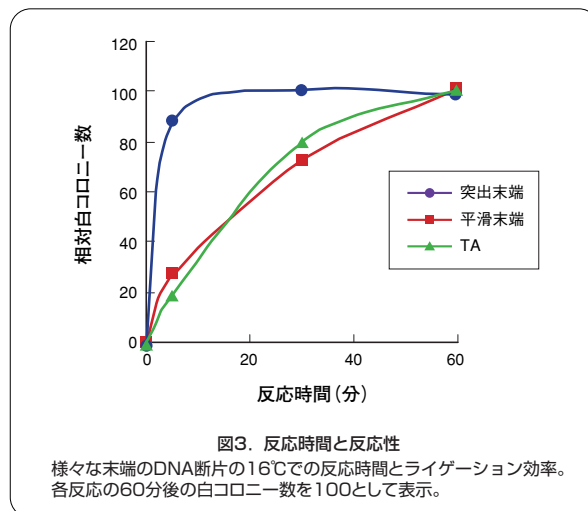


図3. 反応時間と反応性
様々な末端のDNA断片の16℃での反応時間とライゲーション効率。各反応の60分後の白コロニー数を100として表示。

(2) 反応温度とインサートの方向

以下に、反応温度とクローニング効率(図4)、反応温度とインサートの方向性(図5)に関する実験結果を示します。

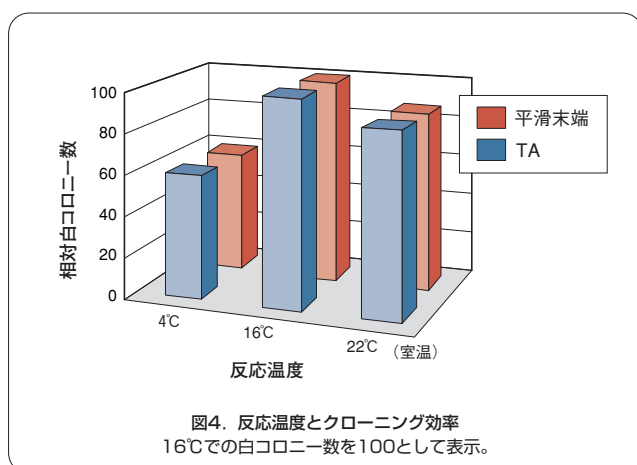


図4. 反応温度とクローニング効率
16℃での白コロニー数を100として表示。

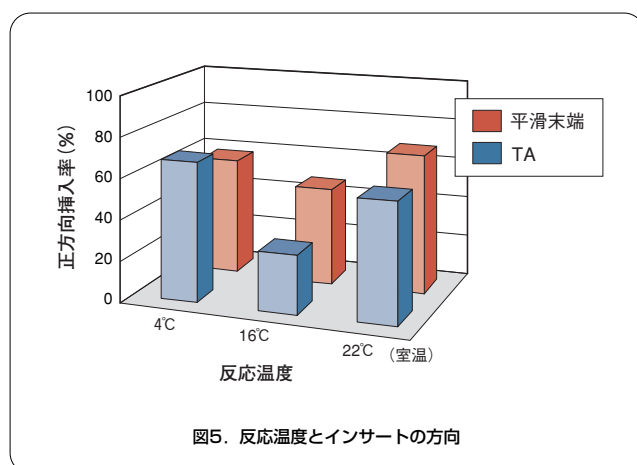


図5. 反応温度とインサートの方向

まず、反応効率に関しては、本試薬のプロトコールで推奨している16℃が最も良い結果となりました。ただし、4℃や22℃(室温)でも実験を進めるのに支障のない数のコロニーを得ることができました。インサートの方向に関しては、温度によって異なる傾向が認められました。また、平滑末端とTAクローニングにおいて弱いながら方向性に関して相関が見られました。挿入方向の偏りは広く知られている現象であり、これは末端付近のDNAの立体構造や末端の塩基配列によっても変わってくるようです。今回の検討では、反応温度によってクローニングされるインサートの方向が変化することが分かりました。このことは、あまりにインサートの方向が一方に偏ってしまった場合、挿入の配向性を変化させる対策のヒントとなるのではないかと考えられました。

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	包装*	保存温度	Code No.	価格
Ligation high Ver.2	750μl×1本	-20℃	LGK-201	¥22,000

*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。

関連商品 高効率コンピテントセル

品名	包装*	保存	Code No.	価格
Competent high JM109	0.1ml×10本	液体窒素	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	0.1ml×10本	液体窒素	DNA-903	¥17,000

*SOC培地1ml×10本、Positive Control Plasmid 50μl×1本を含みます。