

製品コード 6024

研究用

TaKaRa

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

説明書

v202001Da

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG は長鎖 DNA 断片を効率良く、ライゲーションするために開発されたキットです。

DNA Ligase および反応バッファーが長鎖 DNA ライゲーションに最適化されており、特に 10 kb 以上の断片を用いてライゲーションを行う場合に威力を発揮します。また、BAC ライブラリーなど長鎖 DNA ライブラリーの作製にも適しています。

長鎖プラスミド DNA の形質転換能力に優れた *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) または *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028) と組み合わせて使用することで、10 kb 以上の長鎖 DNA 断片のクローニングやライブラリー作製も容易に行えます。

I. 内容 (50 回分) *

DNA Ligase <LONG>	50 μ l
10 \times LONG Ligation Buffer	300 μ l
Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP)	10 μ l
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kb)	30 μ l
dH ₂ O	1 ml \times 2

* : 50 μ l 反応系で、粘着末端の場合は 50 回分、平滑末端の場合は 10 回分に相当します。

II. 保存 - 20°C

III. 使用方法

【1】粘着末端の場合

- 以下の反応液を混合する。

試薬	使用量
ベクター DNA *1	X μ l (25 ~ 50 ng)
インサート DNA *1	Y μ l
10 \times LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	Z μ l
Total	49 μ l

- 65°C で 3 分間保温後、氷上で 3 分間、急冷する。
- DNA Ligase <LONG> を 1 μ l 加えて、穏やかに攪拌する。
- 16°C で 3 ~ 15 時間保温する。
- 直ちに形質転換を行う場合は、100 μ l のコンピテントセルに 4 ~ 10 μ l の反応液を加える。
全量あるいは 10 μ l より多く加えたい場合は、バッファー置換後に加える。*2

* 1 : ベクター DNA およびインサート DNA は、TE Buffer などに溶解してください。
ベクター (2 ~ 10 kb) 濃度を 0.5 ~ 1 ng/ μ l に設定して反応を行ってください。
ベクターをインサートと等量程度の重量 (ng) で使用することで良い結果が得られることが多いですが、最適なベクター：インサートのモル比はインサートの長さにより異なります。
ベクター：インサート = 2 : 1 ~ 10 : 1 のモル比で条件を検討してください。
IV. 注意事項 1、3 をご参照ください。

* 2 : IV. 注意事項 5、6 をご参照ください。

【2】平滑末端の場合

1. 以下の反応液を混合する。

試薬	使用量
ベクター DNA*1	X μ l (50 ~ 100 ng)
インサート DNA*1	Y μ l
10 × LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	Z μ l
Total	45 μ l

2. 65°Cで3分間保温後、氷上で3分間急冷する。
3. DNA Ligase <LONG> を5 μ l加えて、穏やかに攪拌する。
4. 16°Cで15時間保温する。
5. 直ちに形質転換を行う場合は、100 μ lのコンピテントセルに4 ~ 10 μ lの反応液を加える。
全量あるいは10 μ l以上加えたい場合は、バッファー置換後に加える。*2

* 1 : ベクター DNA およびインサート DNA は、TE Buffer などに溶解してください。
ベクター (2 ~ 10 kb) 濃度を 1 ~ 2 ng/ μ l に設定して反応を行ってください。
インサートをベクターと等量程度の重量 (ng) で使用することで良い結果が得られることが多いですが、最適なベクター：インサートのモル比はインサートの長さにより異なります。
ベクター：インサート = 1 : 2 ~ 10 : 1 のモル比で条件を検討してください。
IV. 注意事項 1、3 をご参照ください。

* 2 : IV. 注意事項 5、6 をご参照ください。

【3】コントロール反応

1. 以下の反応液を混合する。

試薬	使用量
Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP) (25 ng/ μ l)	1 μ l
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kb) (25 ng/ μ l)	3 μ l
10 × LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	40 μ l
Total	49 μ l

2. 65°Cで3分間保温後、氷上で3分間急冷する。
3. DNA Ligase <LONG> を1 μ l加えて、穏やかに攪拌する。
4. 16°Cで3 ~ 15時間保温する。
5. 上記反応液 4 μ l で、コンピテントセル 100 μ l を形質転換し、X-Gal、IPTG を含む L-amp プレート上でコロニーを形成する。
1 × 10⁸ cfu/ μ g の形質転換効率を持つ *E. coli* Competent Cells (HST08 Premium、DH5 α 、JM109、HST02 など) を使用した場合、1 × 10⁶ cfu/ μ g vector 以上のコロニーが得られる。

IV. 注意事項

1. ベクターおよび長鎖 DNA 調製について

ベクターおよびインサート DNA は、粘着末端である方がライゲーション効率が高くなります。

平滑末端の場合、粘着末端に比べて 1/10 ~ 1/100 の効率です。

ベクター、インサート DNA の調製、特に 10 kb を超える長鎖 DNA の調製を行う場合には物理的な損傷を避ける必要があります。特に電気泳動ゲルからの切り出しにより断片を精製する際に UV に長時間当てると DNA が損傷し、ライゲーションがうまくいかなくなる原因となります。

2. PCR 産物のクローニングについて

長鎖 PCR 産物のクローニングを行う場合には末端を平滑化*¹して Ligation 反応を行ってください。一般に用いられている TA クローニング法は、長鎖 PCR 産物の場合はお勧めできません。

PCR の増幅産物は電気泳動像で特異的バンドとして観察されていても、電気泳動では確認できない多くの非特異的増幅産物を含んでいる場合がありますので、電気泳動ゲルからの切り出し等により精製したものをを用いることをお勧めします。

Fidelity の高いポリメラーゼ (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase など) を用いた PCR 増幅産物では、3' エキソヌクレアーゼ活性によりほとんどの末端が平滑化されています。この場合、増幅産物の末端はリン酸化されていないので、T4 Polynucleotide Kinase*¹によりリン酸化を行うか、リン酸化されたプライマーを用いて PCR 反応を行ってください。

* 1 : PCR 産物の末端平滑化・リン酸化には以下の製品をご利用いただけます。

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) *²

T4 Polynucleotide Kinase (製品コード 2021S/A/B)

T4 DNA Polymerase (製品コード 2040A/B)

* 2 : 製品コード 6027 には、別のライゲーション試薬が含まれています。

3. インサート DNA とベクターのモル比について

一般的にベクター／インサート DNA のモル比が小さい (インサート DNA が少ない) とライゲーション効率が低くなり、モル比が高い (インサート DNA が多い) とキメラクローンの割合が高くなると考えられています。ベクター／インサート DNA のモル比はライゲーション効率に大きく影響するため、重要なファクターであると言えます。ライゲーションを行う DNA 断片の配列や、末端形状により最適なベクター／インサート DNA のモル比が変わってきますので、以下を参考に最適な条件を検討することをお勧めします。

粘着末端の場合

ベクター (2 ~ 10 kb) は反応液中の濃度が 0.5 ~ 1 ng/μl の時が最も効率が良く、濃度を上げると出現するコロニーの数は多くなりますが、ベクター量当りの効率は悪くなる傾向があります。

ベクター：インサートのモル比はインサートの長さにより条件が異なりますので、2 : 1 ~ 10 : 1 で最適な条件を検討してください。

平滑末端の場合

ベクター (2 ~ 10 kb) は反応液中の濃度が 1 ~ 2 ng/μl の時が最も効率が良く、濃度を上げると出現するコロニーの数は多くなりますが、ベクター量当りの効率は悪くなる傾向があります。

ベクター：インサートのモル比はインサートの長さにより条件が異なりますので、1 : 2 ~ 10 : 1 で最適な条件を検討してください。

4. ライゲーション時間について

粘着末端の場合、16℃、3～15時間の間で反応を行ってください。平滑末端の場合では、16℃、15時間の反応時間が必要です。

約18 kbのインサートDNAを用いた場合のライゲーション時間と効率の関係を図1および図2に示しました。

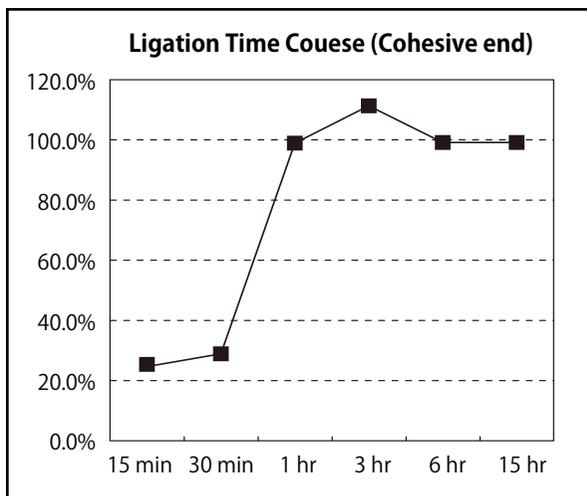


図1. pUC118/*Hind* III/BAP、18 kb Insert DNA/*Hind* III を用いてプロトコールに従い、16℃でライゲーション反応を行った。15分～15時間でライゲーション液の一部を抜き取り、形質転換を行った。15時間の反応で出現したコロニー数を100%として、各反応時間でのコロニー数の比率を計算した。

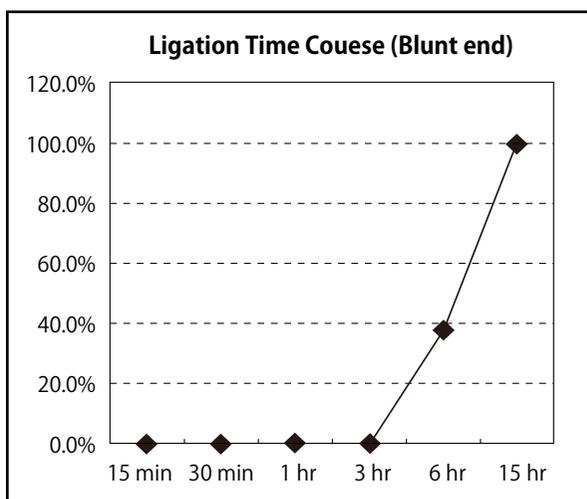


図2. pUC118/*Hinc* II/BAP、18 kb Insert DNA/*Sma* I を用いてプロトコールに従い、16℃でライゲーション反応を行った。15分～15時間でライゲーション液の一部を抜き取り、形質転換を行った。15時間の反応で出現したコロニー数を100%として、各反応時間でのコロニー数の比率を計算した。

粘着末端では16℃、3時間でライゲーションがほぼ完了し、15時間の反応でも変化はほとんど認められませんでした。平滑末端の場合は16℃、15時間の反応が必要であることが確認されました。

5. 形質転換について

ライゲーション反応液はそのまま形質転換に用いることが可能です。形質転換方法については、コンピテントセルの取扱説明書に従ってください。通常のケミカルコンピテントセルを用いた形質転換法により、約 20 kb (ベクター長+インサート長) までのライゲーション産物が形質転換可能であることを確認しています。20 kb 以上の長鎖 DNA の形質転換には、エレクトロポレーション法で行うことをお勧めします。エレクトロポレーションの場合、ライゲーション反応液をそのままエレクトロポレーションに使用することはできません。エレクトロポレーション法を行うには、ライゲーション反応液をエタノール沈殿法、または、透析法 (6. Drop Dialysis法によるバッファー置換を参照)等を用いて滅菌精製水または TE バッファーに置換してください。より高い効率を求める場合には、透析によるバッファー置換をお勧めします。フェノール/クロロホルムによる抽出は、形質転換効率を下げる原因になりますので避けてください。

バクテリアゲノム等、部分的に DNA がメチル化されている生物のゲノム DNA をクローニングする場合、宿主大腸菌が持つメチル化 DNA を認識、切断機構に関連する遺伝子 (*mcrA*, *mcrB*, *mcrC*, *hsdRMS*, *mcr*, *mrr*) により導入した DNA が切断されます。特に長鎖 DNA では、メチル化された DNA を含む確率が高く、クローニングしようとする形質転換効率が極端に低くなり、目的の DNA がクローン化されない結果となります。これを避けるためには、これらの遺伝子を欠損させた大腸菌株* (HST08 Premium 等) に形質転換を行ってください。

* : メチル化 DNA のクローニング、ライブラリー作製には以下の製品をご利用いただけます。

E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)

[HST08 Premium の遺伝子型]

F⁻, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ (*lacZYA-argF*) U169, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Δ *mcrA*, λ ⁻

6. Drop Dialysis法によるバッファー置換¹⁾

- (1) シャーレ (丸 12 cm) を氷上に置き、1/10 に希釈した TE バッファー (1/10 TE バッファー) 約 25 ml を入れる。
- (2) Millipore 0.025 μ m TypeVS メンブレンを、(1) の 1/10 TE バッファーを入れたシャーレに浮かべる。
- (3) 先端を切ったチップを用いてゆっくりと、浮かべたメンブレン上にライゲーション液を載せ、3 時間以上置換する。30 分～1 時間ごとに 1/10 TE バッファーを静かに攪拌する。
- (4) 先端を切ったチップを用いてサンプルを回収する。
- (5) 回収したライゲーション溶液 1～10 μ l を 50 μ l のエレクトロコンピテントセルに加え、形質転換を行う。

V. 参考文献

- 1) Osoegawa K *et al. Genomics.* (1998) **52**: 1.

VI. 関連製品

E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
E. coli HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)
T4 Polynucleotide Kinase (製品コード 2021S/A/B)
T4 DNA Polymerase (製品コード 2040A/B)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)

VII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・PrimeSTAR はタカラバイオ株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社