

ライゲーションキットに長鎖DNA用バージョン登場 もう、長さは障害になりません!

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	製品コード 6024	1キット	¥ 25,000
<i>E. coli</i> HST02 Competent Cells	製品コード 9127	100 μ l \times 10	¥ 18,000
<i>E. coli</i> HST02 Electro-Cells	製品コード 9026	50 μ l \times 10	¥ 15,000

- 10 kb 以上のDNA断片のクローニングに最適です。
- 本キットを用いるとBACライブラリー等、長鎖DNAのライブラリー作製効率が飛躍的にアップします。

DNAは長鎖になるほど物理的な衝撃を受けやすく、ピペッティングやフェノール抽出などの操作により切断されてしまいます。また、十分に注意してDNAを取り扱っても、通常のライゲーションキットでは長鎖DNA断片をライゲーションすることは困難です。特に10 kbを超えるDNA断片では、大腸菌の形質転換効率が極端に下がることもあり、クローニングやライブラリー作製が難しいと考えられています。新発売の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こと」に主眼をおいて開発したキットです。リガーゼと反応バッファーを長鎖ライゲーション用に最適化した本キットは、特に10 kb以上のDNA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。本キットを用いることで熟練した技術や特別のノウハウがなくても、10 kb以上のDNA断片が効率よくクローニングでき、BACライブラリー作製のためのライゲーションも確実に行えます。

なお、本キットでのライゲーションには、同じく新発売の*E. coli* HST02 Competent Cellsまたは*E. coli* HST02 Electro-Cellsをご利用ください。HST02株のコンピテントセルを用いることで、大きなサイズのDNAでも安定した形質転換が行えます。(BACライブラリーの構築には使用できません。)

本稿では、TaKaRa DNA Ligation Kit LONGが長鎖DNAのライゲーションに非常に適していることを示した実験例をご紹介します。

■ 内容*

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

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

■ 実験例

実験例-1: 各インサートサイズでのライゲーション効率 (他社製品との比較)

【方法】

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)、T4 DNA Ligase (製品コード 2011A) および他社製ライゲーションキットを用いて、末端に*Hind* III切断サイトを持つ 4 kb、10 kb、18 kbのDNA断片とpUC118/*Hind* III/BAPの環状化ライゲーション効率を比較した。TaKaRa DNA Ligation Kit LONGならびにT4 DNA Ligaseは16 $^{\circ}$ Cで15 時間反応を行い、他はそれぞれの推奨条件で反応を行った。各ライゲーション液 2 μ lを*E. coli* DH5 α Competent Cells (形質転換効率; 2.1×10^8 cfu/ μ g pUC19) に導入し、SOC培地を加えて回復培養を行った。培養液の1/10量をX-Gal、IPTGおよびアンピシリンを含む寒天培地にプレーティングして培養し、出現した白色コロニーの数から形質転換効率を算出した。

【結果】

TaKaRa DNA Ligation Kit LONGは4 kb、10 kb、18 kb DNA断片のライゲーションすべてにおいて高い形質転換効率を示しました。特に18 kbのDNA断片のクローニングでは、他のどの製品に比べても明らかに高いパフォーマンスを示し、最大で50倍も高い形質転換効率を得られました。

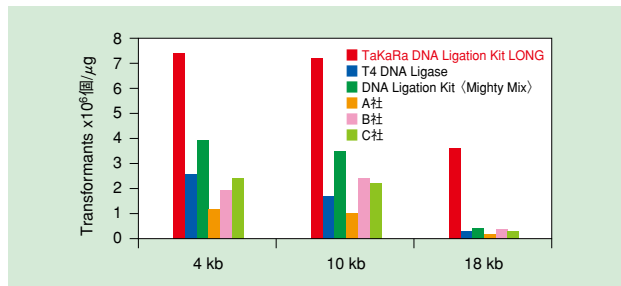


図1 各インサートサイズにおけるライゲーション効率の比較

実験例-2: 反応液中のDNA濃度の違いによる反応性の変化

【方法】

TaKaRa DNA Ligation Kit LONGおよび他社製ライゲーションキットを用いて、末端に*Hind* III切断サイトを持つ 18 kbのDNA断片をpUC118/*Hind* III/BAPとライゲーションした。ベクターDNA濃度、インサートDNA濃度を変えて各社推奨の条件で反応を行った (DNA Ligation Kit LONGの場合は16 $^{\circ}$ C、15 時間)。各ライゲーション液 2 μ lを*E. coli* DH5 α Competent Cells (形質転換効率; 2.1×10^8 cfu/ μ g pUC19) に導入し、SOC培地を加えて回復培養を行った。培養液の1/10量をX-Gal、IPTGおよびアンピシリンを含む寒天培地にプレーティング後、培養して白色コロニーを計数した。

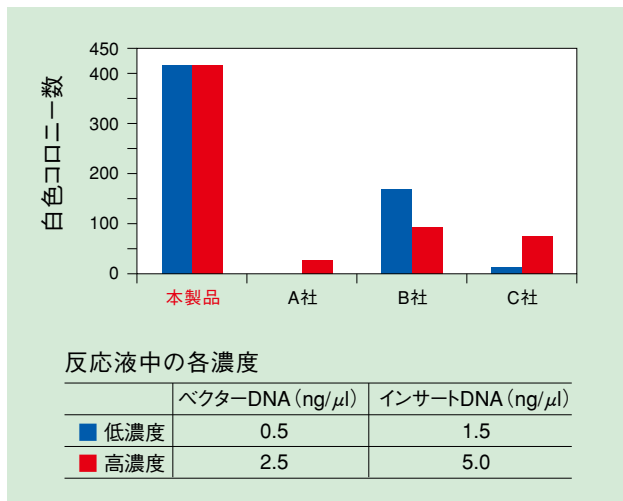


図2 反応液中のDNA濃度の違いによる反応性の変化

【結果】

どちらのDNA濃度でも、TaKaRa DNA Ligation Kit LONGを用いた場合に最も高い形質転換効率を得られました。また、他社製ライゲーションキットと比較して反応中のDNA濃度による形質転換効率への影響が少なく、広いDNA濃度条件で高い形質転換効率が維持されることが確認できました。本キットのプロトコールでは粘着末端の場合は、ベクター濃度 0.5~1 ng/μl、ベクター:インサートのモル比 2:1~10:1、平滑末端の場合はベクター濃度 1~2 ng/μl、ベクター:インサートのモル比 1:2~10:1での検討をお勧めしています。なお、本キットでは、ゲルから切り出したDNA断片など十分な収量が得られないDNAサンプルを扱う場合にも形質転換体得やすいこと、および精製度が低いDNA断片を使用する場合にもライゲーション反応を阻害する物質の影響を比較的受けにくいことも確認しています。

■ 新規コンピテントセル *E. coli* HST02株

大腸菌株JM109をベースに、外来DNAの認識、切断機構に関連する遺伝子 *mcrA*, *mcrB*, *mcrC*, *hsdRMS*, *mcr*, *mrr* を欠損させています。このため、メチル化されたDNAを切断することがなく、バクテリアゲノムのクローニングをはじめ、長鎖DNAのクローニング、cDNAライブラリー作製など幅広く使用することができます。実験例-1で示した 18 kbのインサートを用いるライゲーションで、DH5αと同等以上の形質転換効率が得られることを確認しています。なお、ベクター+インサートの長さが20kbを超えるライゲーションの場合、HST02エレクトロセルの使用が効果的です。

実験例-3: *E. coli* HST02 Competent Cellsの生育速度の違い

HST02株と同様に、外来DNAの認識、切断機構に関連する遺伝子を欠損している大腸菌株DH10Bと、生育速度の違いを比較しました。

注意： HST02株は接合伝達因子(F)を有する大腸菌株であるため、BACライブラリーの構築には使用できません。メチル化されたDNAからBACライブラリーを構築する際には、メチル化DNAの認識・切断に関与する遺伝子およびFを欠損した大腸菌株 (*mcrA*, *mcrBC*, *hsdRMS*, *mrr*; F⁻株) をご使用下さい。

【方法】

pUC18ベクターにλDNAの一部をクローニングしたプラスミド(約20 kb) 1 ngをエレクトロポレーション法によりHST02およびDH10Bに導入した。SOC培地を加えて1時間回復培養を行い、アンピシリンを含む寒天培地に播種した後、37℃で14時間培養した。

各大腸菌の遺伝子型

DH10B:

F⁻, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ80*dlacZ*Δ*M15*, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *ara D139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, λ⁻, *rpsL*, *endA1*, *nupG*, *tonA*

HST02:

F⁺ [*traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ*Δ*M15*]/Δ(*lac-proAB*), *recA*, *endA*, *gyrA96*, *thi*, *e14*⁻(*mcrA*⁻), *supE44*, *relA*, Δ*deoR*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

【結果】

DH10B株に比べ、HST02株は生育速度が速く、通常の一晩培養でコロニーが容易に確認できました。長鎖のプラスミドを大腸菌に導入した場合、生育が遅くなるがありますが、HST02では通常の培養時間で十分な大きさのコロニーが確認できました。

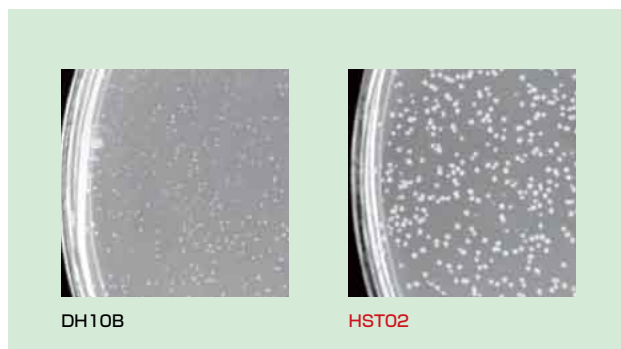


図3 形質転換後一晩培養後のコロニー

■ 関連製品

- DNA Ligation Kit <Mighty Mix>
製品コード 6023 1 Kit ¥ 25,000
- DNA Ligation Kit Ver 2.1
製品コード 6022 1 Kit ¥ 25,000
- Mighty Cloning Kit (Blunt End)
製品コード 6026 20回 ¥ 30,000
- Mighty TA-cloning Kit
製品コード 6028 20回 ¥ 20,000
- Mighty TA-cloning Kit for PrimeSTAR®
製品コード 6029 20回 ¥ 32,000