

製品コード 6021

研究用

Takara

DNA Ligation Kit Ver.1

説明書

v201701Da

DNA フラグメントのライゲーションは、遺伝子工学実験で頻繁に行う操作です。DNA 間の結合には T4 DNA Ligase が用いられますが、DNA の末端構造によって反応速度は著しく異なります。そのため、DNA の末端形状にあわせて加える酵素量を加減したり、ポリアミンや 2 価金属塩を加えることによりライゲーション反応を調節して行う必要があります。タカラバイオでは、このような煩雑さをなくし、さらに DNA の末端形状による影響を受けないシステム、DNA Ligation Kit を開発しました。

DNA Ligation Kit では、ポリエチレングリコールを用いたタカラバイオ独自の Buffer 系を採用することにより、従来数時間かかっていたライゲーション反応を、ほとんどの場合、非常に短時間で完了できます。標準の反応条件は 16℃、30 分間ですが、簡単なプラスミドベクターへのライゲーションなどは 25℃、3 分間の反応でも十分なライゲーション効率を得られ、反応を大幅に簡略化できます。

DNA Ligation Kit Ver.1 は、環状 DNA を生成するライゲーションはもちろん、λファージへの外来 DNA の挿入などの直鎖状 DNA を生成するライゲーションにも適したキットです。A 液の使用量を調整することで、DNA 溶液に由来する不純物などの持ち込みの影響を軽減し、確実にライゲーションを行うことができます。

DNA Ligation Kit Ver.1/Ver.2.1 反応液量 (容量比) の比較

	Ver.1 (容量比)	Ver.2.1 (容量比)
環状 DNA を生成するライゲーション ・ Plasmid Vector への外来 DNA の挿入 ・ Plasmid Vector への Linker DNA の挿入 ・ Self-Circularization	DNA 溶液 (1) A 液 (4 ~ 8) B 液 (1)	DNA 溶液 (1) I 液 (1)
直鎖状 DNA を生成するライゲーション ・ cDNA への Adaptor, Linker Ligation ・ λ Phage Vector への外来 DNA の挿入*	DNA 溶液 (1) (300 mM NaCl) B 液 (1)	DNA 溶液 (1) II 液 (1) I 液 (2)

* : DNA Ligation Kit Ver.1 の使用をお勧めします。

DNA Ligation Kit Ver.1 にはライゲーション反応に必要な要素はすべて含まれているので、目的とする DNA を加えるだけで大変簡単にライゲーションが行うことができ、しかもライゲーション後、そのまま形質転換、*in vitro* パッケージングを行うことができます。

なお、本取扱説明書で示した実験結果は、DNA Ligation Kit を用いた時の標準的な数値です。

I. 内容

1. A 液 (Solution A) : Reaction Buffer 1,000 μ l \times 3
2. B 液 (Solution B) : Enzyme Solution 187.5 μ l \times 2

※ 1 回あたり A 液 60 μ l、B 液 7.5 μ l 使用する場合、50 回分に相当します。

II. 保存

– 20℃

III. 使用方法および使用例

【1】プラスミドベクターに外来 DNA を挿入する場合

- (1) プラスミドベクター [0.03 pmol; pUC18 DNA (2,686 bp) の場合、約 50 ng] およびインサート DNA (0.1 ~ 0.3 pmol) を含む DNA 溶液*1 (5 ~ 10 μ l) を用意する。
- (2) (1) の DNA 溶液の 4 ~ 8 倍量*2 の A 液と (1) の DNA 溶液と等量の B 液 (5 ~ 10 μ l) を添加し、よく混合する。
- (3) 16°C*3 で 30 分間*4,5 保温する。
- (4) 直ちに形質転換を行う場合には、100 μ l のコンピテントセルに 10 μ l*6 の反応液を加える。

- * 1: DNA 溶液の組成は、100 mM Tris-HCl, pH7.6、5 mM MgCl₂ が望ましいが、TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.0、1 mM EDTA) でもほぼ同様の効率が得られます。
- * 2: DNA 溶液を (1) のように調製した場合、また DNA 量が 0.5 μ g 以下の場合、A 液は 4 倍量添加してください。A 液は DNA 溶液量の 8 倍量まで添加できます。
- * 3: 反応温度を上げると (26°C >) 環状 DNA が形成されにくくなります。反応は必ず 16°C で行ってください。
- * 4: ライゲーションがおこりにくい場合は時間をのばしてください (overnight)。
- * 5: T-Vector を用いて PCR 産物のライゲーションをおこなう場合は、反応時間は 1 時間以内にしてください。長時間反応させると、バックグラウンドが高くなる場合があります。
- * 6: DNA Ligation Kit の反応液は、反応後そのまま形質転換に用いることができますが、組成上反応後の溶液をそのままコンピテントセルに加えると、効率が悪くなる場合があります。その場合、反応終了後 NaCl を終濃度 500 mM 程度になるように反応液に添加し、形質転換に用いると改善されることがあります。大量の DNA 溶液をコンピテントセルに加える場合、およびエレクトロポレーションにより形質転換を行う場合はエタノール沈殿により DNA を回収してから行ってください。

(使用例)

pUC118 DNA の *Eco*RI 断片 (50 ng ; 0.025 pmol) に 1.5 kb DNA の *Eco*RI 断片 (2.5 ~ 250 ng ; 0.0025 ~ 0.25 pmol) を加えた DNA 溶液 (5 μ l) を調製した。プロトコールに従って、16°C で 30 分間反応させ、反応液の一部で JM109 コンピテントセルを形質転換し、X-Gal、IPTG を含む L-Amp プレート上でコロニーを形成させた。白色コロニー数を計測し、形質転換効率を調べた結果を、〔表 1〕に示す。また通常のライゲーション反応で T4 DNA Ligase を 350 U 使用して 16°C で 16 時間反応させた場合の効率も併記した。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルは 6.3×10^7 コロニー数 / μ g pUC118 DNA の効率である。

〔表 1〕

インサート / ベクター (モル比)	DNA Ligation Kit		T4 DNA Ligase	
	脱リン酸化 ベクター	リン酸化 ベクター	脱リン酸化 ベクター	リン酸化 ベクター
0.1	1.7×10^6	7.8×10^5	1.6×10^5	4.6×10^5
0.3	5.0×10^6	2.5×10^6	2.0×10^5	1.0×10^6
1.0	1.7×10^7	8.2×10^6	1.8×10^6	1.9×10^6
3.0	2.3×10^7	1.7×10^7	3.1×10^6	5.0×10^6
10.0	2.1×10^7	2.3×10^7	1.9×10^6	1.2×10^7

(白色コロニー数 / μ g インサート DNA)

[2] 直鎖状 DNA の分子内ライゲーション (self circularization) の場合

使用方法は、「【1】プラスミドベクターに外来 DNA を挿入する場合」と同じです。DNA 濃度は希薄なほど、高い形質転換効率が得られます。

(使用例)

350 ng (10 μ l) の *Sca*I 分解 pBR322 DNA を調製し、プロトコールに従って、16°C で 30 分間反応させた後、1 μ l を形質転換に用いた時の結果を [表 2] に示した。この時、通常のライゲーション反応液中で、T4 DNA Ligase を 350 U 用いて 16°C で 16 時間反応させた場合をコントロールとした。

[表 2]

DNA 量	DNA Ligation Kit	T4 DNA Ligase
17 ng	7.2×10^6	5.0×10^5

DNA 量：コンピテントセル (100 μ l) に入れた DNA 量
形質転換効率：総コロニー数 / μ g DNA 量

[3] Linker Ligation, Adaptor Ligation の場合

- ・プラスミドベクターにリンカーを挿入する場合

使用方法は、「【1】プラスミドベクターに外来 DNA を挿入する場合」と同じです。

脱リン酸化ベクターにリン酸化リンカーを挿入する場合は、リン酸化リンカーをベクターの 10 ~ 100 倍量 (モル比) 加えて反応してください。脱リン酸化していないベクターを用いる場合には、100 倍以上のリンカーを加えて反応してください。

- ・DNA 断片の両末端にリンカー (またはアダプター) を結合する場合 (cDNA リンカーライゲーションなど)

- (1) 結合したい DNA フラグメント (0.01 ~ 0.1 pmol) の 100 倍量以上のリンカー (またはアダプター) (モル比) を加えた溶液 5 ~ 10 μ l*1 を用意する。
- (2) (1) の DNA 溶液と等量の B 液を加えよく混合し、16°C で 30 分間反応させる。*2
- (3) 70°C で 10 分間熱処理し、酵素を失活させる。その後、制限酵素での切断を行う場合は、一度エタノール沈殿により DNA を回収して、バッファー交換した後行う。

* 1 : DNA 溶液は、100 mM Tris-HCl, pH7.6、5 mM MgCl₂、100 mM NaCl に調製してください。

* 2 : リンカーが不安定な構造 [AT 配列が多い、短い (~ 8 base) リンカー] の場合には、反応温度を下げ (< 10°C) 1 ~ 2 時間反応してください。

(使用例: プラスミドベクターにリンカーを挿入する場合)

pUC118 *Hinc* II/BAP 脱リン酸処理済みベクター 100 ng (50 fmol) に 2.6 ~ 130 ng (0.5 ~ 25 pmol) の pBgl/II リンカー pd (CAGATCTG) を加え 5 μ l とした DNA 溶液を調製した。プロトコールに従って、16°C で 30 分間反応した。この反応液の一部で JM109 コンピテントセルを形質転換し、X-Gal、IPTG を含む L-Amp プレート上でコロニーを形成させた。白色コロニー数を計測し、その形質転換効率を調べた結果を [表 3] に示す。また、通常のライゲーション反応で T4 DNA Ligase を 350 U 用いて 16°C で 16 時間反応させた結果も併記した。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルは 1.5×10^8 コロニー数 / μ g pUC118 DNA の効率である。

[表 3]

リンカー/ベクター (モル比)	DNA Ligation Kit	T4 DNA Ligase
10	2.0×10^6	1.2×10^6
50	8.0×10^6	3.2×10^6
100	3.0×10^7	2.3×10^6
500	2.5×10^7	2.4×10^6

(白色コロニー数 / μ g pUC118DNA)

[4] λ phage ベクターに外来 DNA を挿入する場合

- (1) λ phage ベクター [250 ng (0.01 pmol)] およびインサート DNA (0.03 ~ 0.1 pmol) を含む DNA 溶液を用意する。^{*1}
- (2) (1) の DNA 溶液と同量の B 液 (5 ~ 10 μl) を添加して、よく攪拌する。
- (3) 26°C で 5 ~ 10 分間^{*2} 反応する。
- (4) *in vitro* packaging を行う。^{*3}

* 1: DNA 溶液は 100 mM Tris-HCl, pH7.6、5 mM MgCl₂、300 mM NaCl に調製してください。塩濃度が重要なポイントになりますので、TE Buffer の場合でも、必ず終濃度 300 mM になるように NaCl を加えてください。

* 2: 反応温度は、16°C よりも 26°C の方が高い効率が得られます。反応時間を長くしても、かえって効率がおちる場合がありますので、反応は短時間 (5 ~ 10 分間) で行ってください。

* 3: DNA Ligation Kit の反応液は、反応後そのまま packaging に用いることができます。市販の Packaging Kit を使用する場合も、packaging に用いる DNA Ligation Kit の溶液量が packaging lysate に対して 10% 以下 (容量比) の場合は、DNA Ligation Kit 溶液の組成が packaging を阻害することはありません。反応溶液をすべて packaging に用いる場合は、DNA を一度エタノール沈殿した後、packaging lysate に対して 10% 以下 (容量比) の TE Buffer に溶解してお使いください。

(使用例)

λgt11 の *Eco*RI arm (脱リン酸化したもの) 250 ng に、*Eco*RI 分解 pBR322 DNA 25 ng (4,361 bp) を加えた DNA 溶液をプロトコールに従って、10 分 ~ 16 時間反応させた。このライゲーション溶液 20 μl 中 4 μl を用いて packaging を行い、ファージ粒子を形成させた。こうして得られたファージを *E. coli* Y1090(r) に感染させ、プラークを形成させた。その結果を [表 4] に示した。この時、通常のライゲーションの反応液中で、T4 DNA Ligase を 350 U 用いて、26°C で反応させた場合をコントロールとした。

[表 4]

反応時間	DNA Ligation Kit	T4 DNA Ligase
10 分	8.5 × 10 ⁶	1.8 × 10 ⁶
16 時間	—	3.1 × 10 ⁶

(透明プラーク数 / μg λgt11)

IV. Q & A

- Q1 ライゲーションがおこりにくく、形質転換効率が悪い場合に効率を高める方法は？
- A1
- ・ライゲーションの反応時間を overnight まで延長してください。
 - ・ライゲーション反応後の溶液に終濃度 500 mM になるようにして NaCl を加えて、形質転換を行ってください。塩を加えることにより、形質転換の効率を上げることができます。
- 以上の操作で改善されない場合は DNA の再精製をお勧めします。
- Q2 エレクトロポレーションにより形質転換する時、ライゲーション反応液をそのまま使用できるか？
- A2 効率が低下する場合がありますので、そのままエレクトロポレーションには使用できません。エタノール沈殿等でバッファー交換をしてからエレクトロポレーションにご使用ください。
- Q3 コスミドにライゲーションするときの方法は？
- A3 通常のプラスミドのようにコンピテントセルで形質転換を行う場合は、「【1】プラスミドベクターに外来 DNA を挿入する場合」に従って操作してください。ただし Packaging を行う場合は、「【4】λphage ベクターに外来 DNA を挿入する場合」に従って操作してください。
- Q4 制限酵素反応後の溶液をそのまま Ligation Kit の系に持ち込むことができるか？
- A4 エタノール沈殿してから指定のバッファーに溶解し直す方が望ましいでしょう。逆にライゲーション後の反応液を制限酵素処理する場合にもエタノール沈殿してから反応を行ってください。
- Q5 DNA Ligation Kit (Ver.1、Ver.2.1) で反応後、反応液をエタノール沈殿する際、通常通り塩 (NaCl 等) を加えてもよいか？
- A5 DNA Ligation Kit で反応後は、通常通り塩 (NaCl; 終濃度 150 mM、酢酸アンモニウム; 終濃度 2 M、酢酸ナトリウム; 終濃度 300 mM) を加えてから、エタノール沈殿を行ってください。

V. 応用例

環状化ライゲーション反応において、通常の 16°C で 30 分間の反応に加えて 25°C (室温) で 3 分間の反応を試みました。

(使用例 1)

DNA Ligation Kit Ver.1 を用いて、pUC118 *Hinc* II/BAP 脱リン酸処理済みベクター 100 ng と p*Bgl* II リンカー pd (CAGATCTG) 260 ng を 25°C (室温) で 3 分間、および 16°C で 30 分間ライゲーション反応を行った後、JM109 コンピテントセル (2.3×10^8 コロニー数/μg pUC118 DNA) を形質転換した結果を [表 5] に示した。

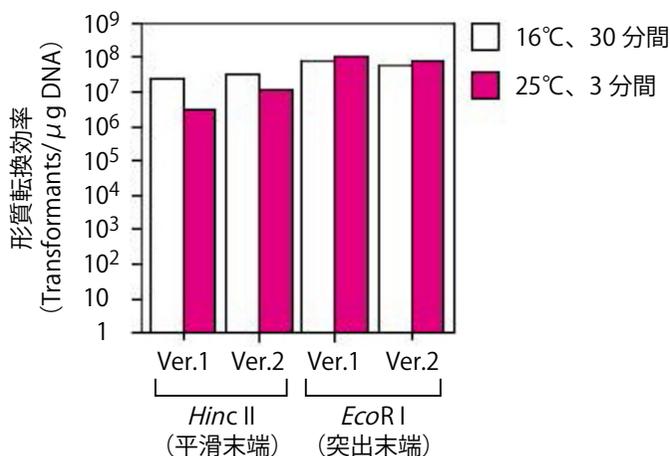
[表 5]

	25°C、3 分間反応	16°C、30 分間反応
Ver.1	1.8×10^7	2.0×10^7

(使用例 2)

EcoRI (突出末端) または *HincII* (平滑末端) 切断 pUC118 DNA をそれぞれ 200 ng (10 μ l) 調製し、DNA Ligation Kit を用いて 25°C (室温) で 3 分間および 16°C で 30 分間で反応した後、1.6 μ l (16 ng) を用いて JM109 コンピテントセル (1.3×10^8 コロニー数/ μ g pUC118 DNA) を形質転換した結果を [図 1] に示した。

[図 1]



これらの結果が示すように、リンカーのライゲーション、突出末端のセルフライゲーションにおいて 3 分間の反応でも従来条件 (16°C、30 分間) とほぼ同等の結果が得られています。このように DNA Ligation Kit Ver.1 は、簡単なライゲーションにおいては 25°C、3 分間の反応でも十分なライゲーション効率を得られ、反応を大幅に簡略化することができます。

VI. 使用上の注意

- (1) DNA Ligation Kit の各コンポーネントは、 -20°C では凍結品になっていますが、凍結融解・攪拌による失活はありません。
室温で (ポルテックス等により、攪拌しながら) 融解していただいて結構ですが、できれば氷冷水中で融解してください。ご使用前には、もう一度、よく混合してください。
- (2) DNA を本製品で反応後、電気泳動のサンプルとして用いる場合、アガロースゲルではそのまま泳動できますが、ポリアクリルアミドゲルでは、一度エタノール沈殿してから泳動を行ってください。
- (3) 反応後、直接フェノール抽出を行った場合、反応液が白濁することがあります。
- (4) ライゲーション反応後にエタノール沈殿を行う場合は、反応液の 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) または反応液の 1/20 量の 5 M NaCl と 2 ~ 2.5 倍量のエタノールを加え、 -20°C 、20 分または -80°C 、10 分で保冷した後、 4°C で遠心し DNA を回収してください。また、DNA が微量の場合、キャリアーを使用するのも有効です。

VII. 参考文献

Hayashi, K., Nakazawa, M., Ishizaki, Y., Hiraoka, N., and Obayashi, A.
Nucleic Acids Res. (1986) **14**: 7617-7631.

VIII. 関連製品

DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022)
DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024)
T4 DNA Ligase (製品コード 2011A/B)
pUC118 *Hinc* II/BAP (製品コード 3322)
pUC118 *Eco*R I/BAP (製品コード 3320)
pUC118 *Bam*H I/BAP (製品コード 3321)
pUC118 *Pst* I/BAP (製品コード 3323)
pUC118 *Hind* III/BAP (製品コード 3324)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
E. coli HB101 Competent Cells (製品コード 9051)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)

IX. 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。
- ・PrimeGelはタカラバイオ株式会社の商標です。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