

# Ligation-Convenience Kit Manual(第四版)

Code No. 319-05961	100 回分
Code No. 315-05963	10 回分

～ 解説 ～

目的の遺伝子をベクターDNAと連結することは、遺伝子クローニングを行う上での最初の重要なステップとなります。ライゲーション反応はDNA末端形状の違いによって効率が異なり、これまでは反応ごとにライゲーション反応の至適化が必要でした。また、通常のT4 DNA Ligaseではライゲーション反応に1～16時間かかり、高い形質転換効率を得ることが困難でした。Ligation-Convenience Kitは、これらの煩雑さを解決し、短時間で高効率なライゲーションを行うことができるキットです。

## 特長

本品は、DNAのライゲーションを迅速・簡便に行うためのキットです。

2×Ligation Mixには、DNAのライゲーションに必要な反応バッファー、ATP、DTT、T4 DNA Ligaseなどが全て含まれており、DNA溶液と等量の2×Ligation Mixを加えるだけでDNAライゲーション反応を行うことができます。

このキットを使用することで、DNAの末端形状に関わらず5～30分でライゲーション反応を行うことができます。また、ライゲーション反応が終了したDNA溶液は、そのまま形質転換や*in vitro*パッケージングに用いることができます。

## キット内容

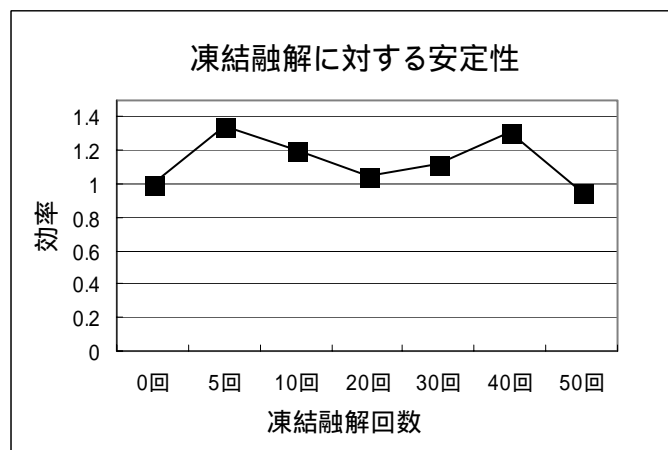
試薬	100 回分*	10 回分*
2×Ligation Mix	250 μl × 4 本	100 μl × 1 本

\* 20 μl の反応系で使用した場合の回数です。

## 保存および融解方法

### - 20 保存

- ・ 使用時は氷上にて完全に融解させ、ピペティングでよく混ぜてから使用して下さい。
- ・ 50 回までの凍結融解による反応効率の低下は認められておりません。



# プロトコールおよび実験例

## 1. プロトコール

### (1) DNA 溶液の調製

適当なモル比のベクターDNA とインサート DNA 断片を合わせて 10  $\mu$ l の DNA 溶液を調製する。<sup>\*2</sup>

### (2) ライゲーション反応液の調製

DNA 溶液と等量の 2  $\times$  Ligation Mix を添加し、混和する。

### (3) ライゲーション反応

16 で 5 ~ 30 分間反応させる。<sup>\*1</sup>

### (4) 形質転換または *in vitro* パッケージング

反応液をそのまま形質転換や *in vitro* パッケージングに用いる。<sup>\*4~9</sup>

ベクターDNA	} up to 10 $\mu$ l
インサート DNA	
ddH <sub>2</sub> O または TE <sup>*2</sup>	
2 $\times$ Ligation Mix	10 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>
↓	
<b>16 で 5 ~ 30 分間反応させる<sup>*1</sup></b>	
↓	
<b>形質転換または <i>in vitro</i> パッケージング <sup>*4~9</sup></b>	

## 2. ベクターとインサートのモル比の検討

ライゲーションの際の ベクター:インサート のモル比は、ライゲーション効率に大きく影響します。以下は、ニッポンジーンで様々な長さのインサート DNA をライゲーション、形質転換した結果、それぞれ下記の特定の条件で最も良い結果が得られたモル比を示した表です。<sup>\*3</sup>

### 1. プラスミドベクターライゲーション

#### (1) 粘着末端

インサート長	200bp	600bp	1000bp	3000bp
ベクター	1	1	1	1
インサート	10	5 ~ 10	2 ~ 10	0.5 ~ 2

ベクター : *EcoR* I で切断した pUC19 ( 0.03 pmol )  
 インサート : *EcoR* I で切断したインサート DNA  
 ( 0.015 pmol, 0.03 pmol, 0.06 pmol, 0.15 pmol, 0.3 pmol )  
 ライゲーション反応: 16 , 5 分間

#### (2) 平滑末端

インサート長	200bp	600bp	1000bp	3000bp
ベクター	1	1	1	1
インサート	5	5	2 ~ 10	0.5 ~ 2

ベクター : *Sma* I で切断した pUC19 ( 0.03 pmol )  
 インサート : *Sma* I で切断したインサート DNA  
 ( 0.015 pmol, 0.03 pmol, 0.06 pmol, 0.15 pmol, 0.3 pmol )  
 ライゲーション反応: 16 , 5 分間

#### (3) TAクローニング

インサート長	200bp	600bp	1000bp	3000bp
ベクター	1	1	1	1
インサート	10	5	5	1

ベクター : pGEM -T Easy; Promega 社 ( 0.03 pmol )  
 インサート : Gene Taq NT(Code No. 318-03231)で増幅した PCR 産物 ( 0.015 pmol, 0.03 pmol, 0.06 pmol, 0.15 pmol, 0.3 pmol )  
 ライゲーション反応: 16 , 5 分間

### 2. リンカーライゲーション

インサート長	8bp
ベクター	1
インサート	50 以上

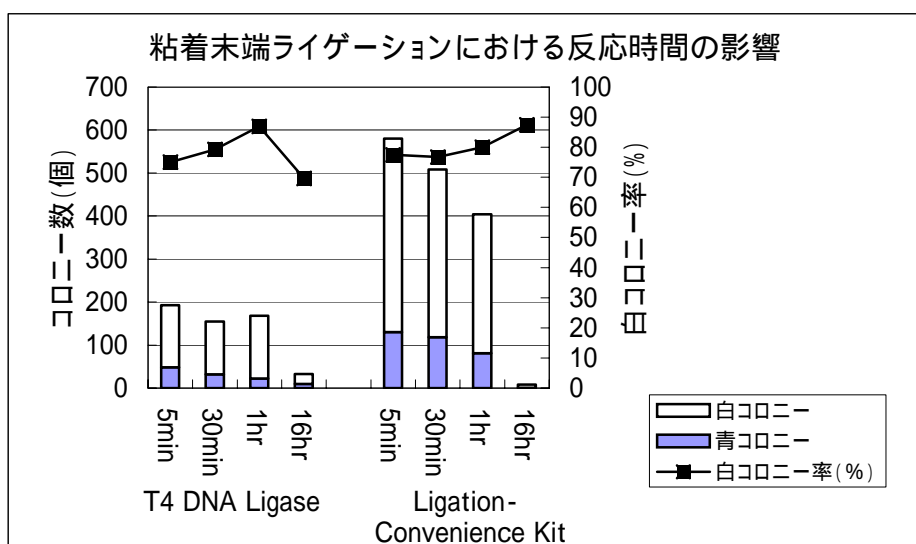
ベクター : *Hinc* II で切断した pUC19 ( 0.03 pmol )  
 インサート : Linker *EcoRV* (Code No. 318-02251)  
 ( 0.3 pmol , 1.5 pmol , 3 pmol , 15 pmol )  
 ライゲーション反応: 16 , 5 分間

### 3. 実験例

#### < 実験例 粘着末端ライゲーション >

##### T4 DNA Ligase との比較

- (1) pUC19 DNA を *EcoR* で切断し、脱リン酸化、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後に TE バッファーに溶解した。<sup>\*2</sup>
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 500bp を *EcoR* で切断した。
- (3) pUC19 DNA 50ng とインサート DNA 断片 20ng (インサート/ベクターモル比 2) を含む DNA 溶液 10  $\mu$ l を調製した。<sup>\*2</sup>
- (4) DNA 溶液 10  $\mu$ l に 2 $\times$  Ligation Mix を 10  $\mu$ l 添加し、混和した。
- (5) 16 で 5 分~16 時間反応させた。
- (6) 反応後、JM109 コンピテントセル 50  $\mu$ l を反応液 5  $\mu$ l で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 $1.3 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g (pBR322 DNA) である。<sup>\*4,5</sup>



ライゲーション反応時間と形質転換効率の関係 (白コロニー数)

反応時間	5 min	30 min	1 hr	16 hr
Ligation-Convenience Kit	<b>450</b>	390	323	7
T4 DNA Ligase	145	123	146	23

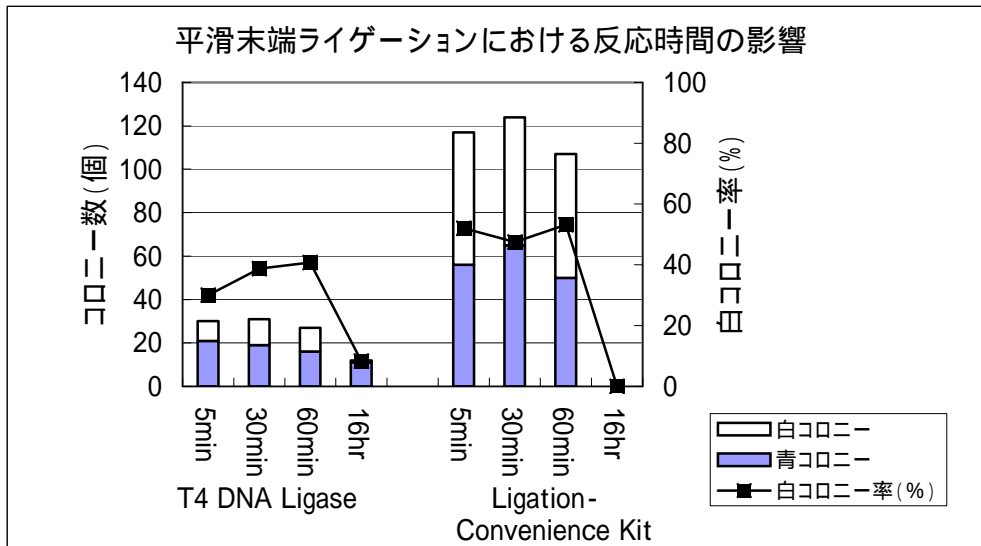
#### 「結果」

上記の結果より、Ligation-Convenience Kit を使用した場合、5 分間の反応時間で十分にライゲーション反応が完了していることがわかる。また、ライゲーション反応の時間を 16 時間まで長くすると、逆に形質転換効率が低下する傾向があった。<sup>\*3</sup>

< 実験例 平滑末端ライゲーション >

**T4 DNA Ligase との比較**

- (1) pBluescript SK(+)を *EcoR* で切断し、脱リン酸化、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後に TE バッファーに溶解した。<sup>\*2</sup>
- (2) ラムダ DNA 由来の DNA 断片 500bp を *EcoR* で切断した。
- (3) pBluescript SK(+)<sup>50ng</sup> とインサート DNA 断片 20ng (インサート/ベクターモル比 2.4) を含む DNA 溶液 10  $\mu$ l を調製した。<sup>\*2</sup>
- (4) DNA 溶液 10  $\mu$ l に 2 $\times$  Ligation Mix を 10  $\mu$ l 添加し、混和した。
- (5) 16  $^{\circ}$ C で 5 分～16 時間反応させた。
- (6) 反応後、JM109 コンピテントセル 50  $\mu$ l を反応液 5  $\mu$ l で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 $1.3 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g (pBR322 DNA) である。<sup>\*4,5</sup>



ライゲーション反応時間と得られた白コロニー数(個)

反応時間	5min	30min	1hr	16hr
Ligation-Convenience Kit	61	59	57	0
T4 DNA Ligase	9	12	11	1

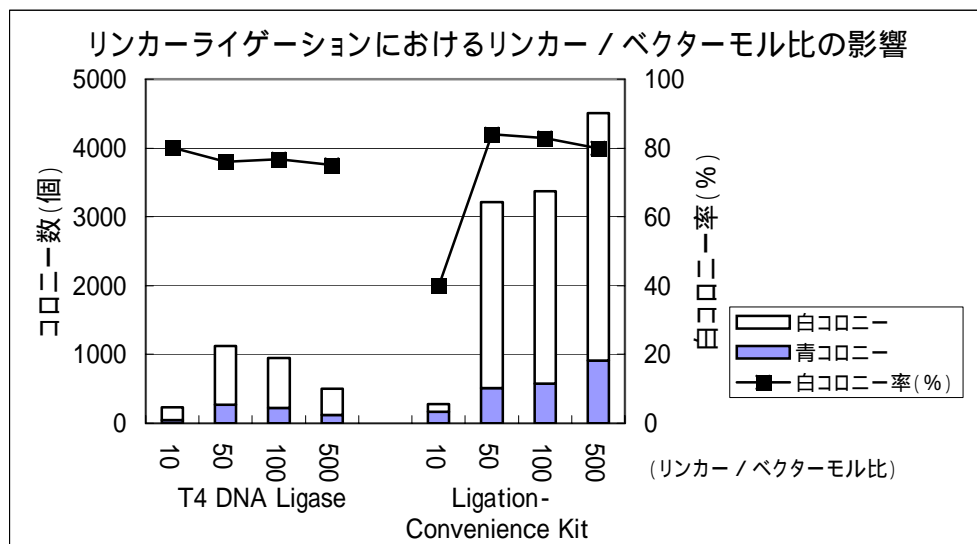
「結果」

Ligation-Convenience Kitを使用した場合、5分間の反応時間で十分にライゲーションが完了していることがわかる。また、ライゲーション反応時間を16時間まで長くすると、逆に形質転換効率が低下する傾向があった。<sup>\*3</sup>

## < 実験例 リンカーライゲーション >

### T4 DNA Ligase との比較(リンカー / ベクターモル比の検討)

- (1) pUC19 DNA を *Hinc* で切断し、脱リン酸化、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出後に TE バッファーに溶解した。<sup>\*2</sup>
- (2) pUC19 DNA ベクター50ng(約0.03pmol)に対して、リンカーDNA モル比(リンカー / ベクター)が 10, 50, 100, 500 になるように混合した DNA 溶液を各 10 µl 調製した。<sup>\*2</sup>
- (3) それぞれの DNA 溶液 10 µl に 2×Ligation Mix を 10 µl 添加し、混和した。
- (4) 16 で 5 分間反応させた。<sup>\*1</sup>
- (5) 反応後、JM109 コンピテントセル 50 µl を反応液 5 µl で形質転換し、生じたコロニー数を計測した。また、コントロールとして T4 DNA Ligase 単体を用いて同様にライゲーション反応を行った。なお、本実験に使用した JM109 コンピテントセルの形質転換効率は、 $1.3 \times 10^8$  cfu/µg (pBR322 DNA) である。<sup>\*4,5</sup>

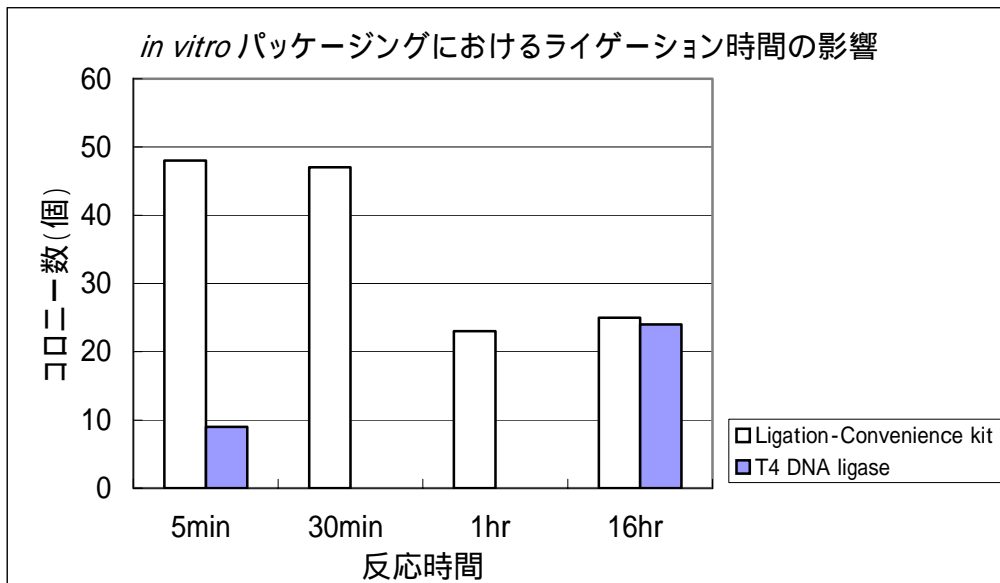


「結果」

上記の結果より、リンカー / ベクターのモル比が 50 ~ 100 倍以上にすることで、リンカーライゲーション効率が高くなる。<sup>\*3</sup>

## < 実験例 コスミドベクターへのライゲーションおよび *in vitro* パッケージング >

- (1) *EcoR* で線状化した Charomid 9-36(Code No.311-01401)1 µg と ColE1 由来の 4kbp DNA 断片 0.5 µg(インサート / ベクターモル比 4.5)を 10 µl 調製した。<sup>\*2</sup>
- (2) DNA 溶液 10 µl に 2×Ligation Mix 10 µl を添加し、混和した。
- (3) 16 で 5 分 ~ 16 時間反応させた。
- (4) 反応終了液 3 µl(パッケージング Extract の 1/10 量)で LAMBDA INN(Code No.317-01741)を用いた *in vitro* パッケージングを行った。<sup>\*6-8</sup>
- (5) また、コントロールとして T4 DNA Ligase を用いてライゲーション反応を行い、同様の *in vitro* パッケージングを行った。



### 「結果」

Ligation-Convenience Kitを使用した場合、ライゲーション反応時間は5～30分間で十分であることが分かる。また、反応時間を長くすることで逆にパッケージング効率が悪くなった。T4 DNA Ligaseを単独で使用した場合は、16時間反応させてもパッケージング効率はあまり改善しなかった。<sup>\*3</sup>

### 注意点

- \*1 16時間、オーバーナイト等の長時間ライゲーションを行うと、形質転換効率が著しく低下する場合があります。
- \*2 高塩濃度のバッファーにDNAを溶解させると、ライゲーション効率が著しく低下します。DNA溶液はddH<sub>2</sub>OまたはTE buffer(pH8.0)にて調製して下さい。
- \*3 ライゲーション反応に用いるDNAの精製度、使用する制限酵素の違いによってライゲーション効率が異なる場合があります。
- \*4 形質転換に用いる反応液の量はコンピテントセルの1/10量以下にして下さい。多量の反応液を使用すると、形質転換効率が低下することがあります。
- \*5 反応液の量がコンピテントセルの1/10量以上になってしまう場合は、ライゲーション反応後、エタノール沈澱法によってDNAを回収し、そのDNAをコンピテントセルの1/10量以下になるようにddH<sub>2</sub>OまたはTE buffer(pH8.0)に溶解してから形質転換を行って下さい。
- \*6 パッケージングに用いる反応液の量はパッケージング Extractの1/10量以下にして下さい。多量の反応液を使用すると、パッケージング効率が低下する場合があります。
- \*7 パッケージング Extractの1/10量以上の反応液を使用する場合は、ライゲーション反応後、エタノール沈澱法によってDNAを回収し、そのDNAをパッケージング Extractの1/10量以下になるようにddH<sub>2</sub>OまたはTE buffer(pH8.0)に溶解してから形質転換を行って下さい。
- \*8 Gigapack (Stratagene社)を使用してもパッケージングを阻害することはありません。
- \*9 ライゲーション反応終了液を熱処理すると形質転換効率が著しく低下します。熱処理を行う場合は、ライゲーション反応終了溶液をddH<sub>2</sub>O(DNase Free)で2倍希釈してから熱処理(70℃ 10分間)を行って下さい。

## .トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対 策
全くライゲーションしない	末端の不一致	末端を確認する
ライゲーション効率が低い	融解後の 2 × Ligation Mix の濃度が不均一	氷上で融解後、ピペティングで良く混ぜる
	短い DNA 断片の混入	制限酵素反応で生じる短い DNA 断片を、ゲル電気泳動などで除去する
	高塩濃度	塩を含まない水または TE buffer で DNA を溶解し、ライゲーション反応を行う
	ライゲーション時間が長い	ライゲーション時間を 1 時間以内にする
トランスフォーメーション効率が低い	多量の反応液を使用した	形質転換に用いる反応液をコンピテントセルに対して 1/10 量以内にする
	ベクターの脱リン酸化が不十分	セルフライゲーションの有無をあらかじめ確認しておく
	ライゲーション反応終了液を希釈しないで熱処理した	ライゲーション反応終了溶液を ddH <sub>2</sub> O (DNase Free) で 2 倍希釈してから熱処理 (70 10 分間) を行って下さい。
	コンピテントセルの形質転換効率が低い	形質転換効率 $5 \times 10^7$ cfu/ $\mu$ g (pBR322 DNA) 以上のものを使用して下さい

## . 関連製品

Code No.	製品名	包装単位	希望納入価格(円)
315-06541	TA-Blunt Ligation Kit	5 回用	3,200
311-06543	TA-Blunt Ligation Kit	50 回用	22,000
312-06291	Blunting-Convenience Kit	25 回用	20,000
318-06293	Blunting-Convenience Kit	5 回用	5,600
316-06233	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> DH5α	100 μl × 20 本	36,000
313-06243	ECOS™ Competent <i>E. coli</i> JM109	100 μl × 20 本	36,000
314-06251	Bac'n'Roll Beads	100 回分	4,400
318-01313	Competent <i>E. coli</i> HB101	100 μl × 10 本	18,000
316-01353	Competent <i>E. coli</i> JM109	100 μl × 10 本	18,000
316-01711	Competent <i>E. coli</i> MV1184	100 μl × 10 本	18,000
319-01701	Competent <i>E. coli</i> DH5	100 μl × 10 本	18,000
316-01331	Transformation Kit HB101	10 回分	22,000
319-01321	Transformation Kit JM109	10 回分	22,000
310-01731	Transformation Kit MV1184	10 回分	22,000
313-01721	Transformation Kit DH5	10 回分	22,000
311-00404	T4 DNA Ligase	50,000units	9,000
317-00406	T4 DNA Ligase	50,000units × 5	36,000
310-01471	Ligation Pack	100 回分	10,000
319-01343	Hi-Competence Broth	1ml × 20 本	18,000
317-01741	LAMBDA INN	3 回分	14,000

株式会社 ニッポンジーン  
学術営業部 学術営業課

TEL 076-451-6548

FAX 076-451-6547

Email: [info@nippongene.com](mailto:info@nippongene.com)

URL : <http://www.nippongene.com>

Ligation-Convenience Kit Manual 第四版(051226MO)