

# TA-Enhancer Cloning Kit

Code No. 316-08271

簡易マニュアル Ver.5-2411

Taq DNA ポリメラーゼ等のターミナルトランスフェラーゼ (TdT) 活性を有する PCR 酵素を用いて合成される PCR 産物の多くは、3' 末端にデオキシアデノシン (dA) が一塩基付加された形になっているため、T ベクターの 3' 末端に突出しているチミジン (dT) と相補的に対合し、簡便に PCR 産物のクローニングを行うことができます。この方法は TA クローニングとして知られています。

「TA-Enhancer Cloning Kit」は、T ベクターとライゲーション用試薬を組み合わせた TA クローニング用キットです。ライゲーション用試薬は、ニッポンジーン独自のバッファー組成と 10× Enhancer Solution に含まれる PprA タンパク質によって、これまで効率が低いとされてきた TA クローニングを高効率に行うことができます。

- \* これまで効率が低いとされてきた TA クローニングを高効率に行うことができます。
- \* LacZ を用いた青白判定が可能です。
- \* pANT Vector に PCR 産物が挿入されると HindⅢと BglⅡの制限酵素サイトが新たに形成。

## 製品内容

保存：-20℃保存

キット内容品	容量 (25 回用*1)	備考
pANT Vector (25 ng/μl)	45 μl × 1 本	-20℃保存
5× Ligation Mix	100 μl × 1 本	-20℃保存*2、別途購入可能*3
10× Enhancer Solution	50 μl × 1 本	-20℃保存*2、別途購入可能*3
Control Insert DNA (10 ng/μl)	10 μl × 1 本	-20℃保存

\*1：20 μl の反応系で使用した場合の回数です。

\*2：5× Ligation Mix と 10× Enhancer Solution は、-20℃保存では凍結しませんので、凍結融解による安定性低下の心配がなく面倒な融解操作の必要もありません。使用時は、氷上で操作して下さい。

\*3：5× Ligation Mix と 10× Enhancer Solution は、TA-Blunt Ligation Kit (Code No. 311-06543)として別途購入可能です。

## プロトコール

### < 操作手順 >

#### 1. インサート DNA の調製

- ① Hot-Start Gene Taq NT 等の TdT 活性のある PCR 酵素を用いて目的の配列を増幅します。校正活性のある PCR 酵素を用いると、3' 突出末端が平滑化されるため、PCR 酵素の種類をご確認下さい。
- ② 反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供して、増幅産物の確認を行います。
- ③ ISOSPIN PCR Product 等を用いて PCR 産物の精製を行います。非特異的なバンドが確認された場合は、目的サイズのバンドをゲルから切り出して ISOSPIN Agarose Gel 等を用いて精製を行って下さい。
- ④ PCR 産物の一部を ddH<sub>2</sub>O または TE (pH8.0) で適した濃度に希釈します。<sup>注1)</sup>

#### 2. ライゲーション

- ① 新しいチューブに以下の内容でライゲーション液を調製して下さい。<sup>注2)</sup>

反応液	PCR 産物	Positive Control
pANT Vector (25 ng/μl)	1.8 μl	1.8 μl
PCR 産物	X μl	-
Control Insert DNA (10 ng/μl)	-	2 μl
5 × Ligation Mix	4 μl	4 μl
10 × Enhancer Solution	2 μl	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 μl	Up to 20 μl

- ◆ 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、特定の条件で最も良い結果が得られたインサート量です。ライゲーション液調製の際のご参考にして下さい。<sup>注3)</sup>

インサートサイズ	200 bp	500 bp	1 kbp	3 kbp
インサート量 (ng)	20.0~32.0	24.0~50.0	8.0~100.0	24.0~50.0

20 μl 反応系 (pANT Vector 45 ng) の場合

- ② ライゲーション反応液を 16°C で 30 分間反応させます。

#### 3. 形質転換 (ECOS™ Competent *E.coli* JM109 を用いた方法)

ライゲーション反応液は、そのまま形質転換に使用できます。形質転換に用いる反応液量はコンピテントセルの 10%以下にして下さい。また、ニッポンジーンの ECOS™ Competent *E.coli* を用いると 6 分間高速プロトコールが利用できます (6 分間高速プロトコールはアンピシリンの場合にのみ有効です)。なお ECOS™ Competent *E.coli* を使用する場合、添加する DNA 溶液の量はコンピテントセルの容量に対して 5%以下にして下さい。

#### <ECOS™ 6 分間プロトコール>

- ① 氷上でコンピテントセルを融解します。
- ② ECOS™ Competent *E.coli* JM109 にライゲーション反応液を加えます。<sup>注4), 注5)</sup>
- ③ 1 秒間ボルテックスを行います。
- ④ 氷上で 5 分間インキュベートを行います。
- ⑤ 42°C で 45 秒間インキュベートを行います。
- ⑥ 1 秒間ボルテックスを行います。
- ⑦ LB プレートに、反応させた ECOS™ Competent *E.coli* を均一に塗布し 37°C で 16 時間培養を行います。

#### <青白判定用プレートの作製>

LB プレート (約 20 ml) に対して、以下の内容で調製して下さい。

- ・アンピシリン 50 mg/ml を 20  $\mu$ l (最終濃度 50  $\mu$ g/ml)
- ・X-gal 20 mg/ml を 40  $\mu$ l (最終濃度 40  $\mu$ g/ml)
- ・1 M IPTG を 4  $\mu$ l (最終濃度 0.2 mM)

注 1) 高塩濃度のバッファーおよび EDTA が高濃度に含まれたバッファーに 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 (pH8.0) にて調製して下さい。

注 2) 添加する 10×Enhancer Solution の量は正確に測りとって下さい。指定量より多く添加したり、少なく添加したりするとライゲーション効率が著しく低下する場合があります。

注 3) ライゲーション反応に用いる DNA の精製度によってライゲーション効率が異なる場合があります。

注 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。ECOS™ Competent *E.coli* を使用する場合、形質転換に用いる反応液の量はコンピテントセルの容量に対して 5%以下にしてください。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。

注 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、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) 処理、クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) 処理を行い、エタノール沈殿法によって 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 (pH8.0) に溶解してから形質転換を行って下さい。

#### 4. コロニーPCRによるインサートチェック

目的とする DNA 断片が組み込まれた組み換え体を確認する方法として、大腸菌が持つプラスミドのインサートサイズをコロニーPCR という方法で推定することができます。pANT Vector では M13 Primer が使用できます。

2×M13 Primer Mix と Gene RED PCR Mix Plus を組み合わせて使用することで、迅速かつ簡単にコロニーPCR を行うことができます。

- ① チューブに以下の組成で試薬を調整し、50 µl ずつ PCR チューブに分注します。

Gene RED PCR Mix Plus (2×)	25 µl
2×M13 Primer Mix	25 µl
Total	50 µl

- ② 爪楊枝やチップでコロニーを軽く突き、反応液中でけん濁します。このとき、コロニーの多量持ち込みに注意して下さい。
- ③ PCR を以下の条件で行います。

94°C	3 min	25 サイクル
94°C	20 sec	
55°C	20 sec	
72°C	10 sec/kbp (1 kbp 以下は 10 sec)	

- ④ PCR 終了後、各反応液をそのままアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行って下さい。
- ◆ Control Insert DNA のサイズは 600 bp です。ニッポンジーンの 2×M13 Primer Mix を用いた場合は 760 bp に増幅産物が確認されます。

※本品について詳しくは、ニッポンジーンホームページや詳細マニュアル [WEB 版] をご参照下さい。

- ・ pANT Vector のマップとマルチクローニングサイト
- ・ Q & A
- ・トラブルシューティング

---

本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。  
マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

#### <お問い合わせ先>

株式会社ニッポンジーン 学術営業課

TEL 076-451-6548 (受付：平日 9 時-12 時、13 時-17 時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>