



高効率TAクローニングキット

TA-Enhancer Cloning Kit

製品概要

本品は、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。

特長

高効率な
ライゲーションが可能

弊社独自のバッファー組成と10× Enhancer Solutionによって、TAクローニングを高効率に行うことができます。

ライゲーション反応後は
そのまま形質転換可能

ケミカルコンピテントセルでの形質転換の場合はそのまま大腸菌の形質転換に使用することができます。

ここが違う! ~Enhancer Solution~



図1. PprAが二本鎖DNA末端に結合

資料提供: 東洋大学 放射線微生物学研究室 鳴海先生

Enhancer Solutionに含まれるPprAタンパク質は、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* 由来のDNA修復促進活性を有するDNA結合タンパク質です。PprAは直鎖状二本鎖DNA末端を認識し、インサートとベクターをすばやく、効率よく連結させます。

ライゲーション反応は
30分間で完了

30分間で十分なライゲーション効率が得られます。

構成

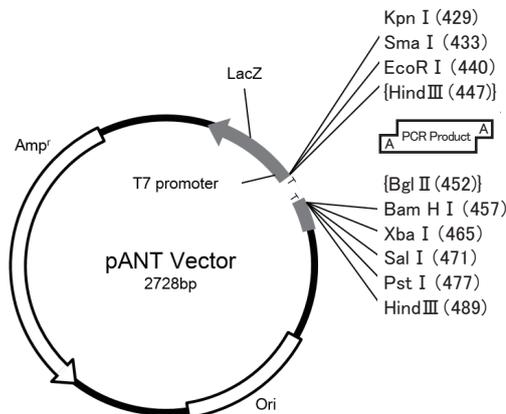
TA-Enhancer Cloning Kit (25回分)

構成	容量※
pANT Vector (25 ng/μl)	45 μl
5× Ligation Mix	100 μl
10× Enhancer Solution	50 μl
Control Insert DNA (10 ng/μl)	10 μl

※ 20 μl 反応系の場合

保存温度 : -20℃

ベクターマップ



製造元 株式会社ニッポンジーン

〒930-0834 富山市問屋町二丁目7番18号
TEL: 076-451-6548 FAX: 076-451-6547
URL: <http://www.nippongene.com>

販売元 富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)
フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806

プロトコール

1. インサートDNAの調製

- Hot Start Gene Taq NT (Code No. 311-07523) 等のTdT活性のあるPCR酵素を用いて目的の配列を増幅する。
- PCR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、ISOSPIN PCR Product (Code No.315-08001) 等を用いてPCR産物の精製を行う。
- PCR産物の一部をddH₂OまたはTE (pH8.0) で適した濃度に希釈する。

2. ライゲーション

本品 TA-Enhancer Cloning Kit

- 以下の組成でライゲーション液を調製する。

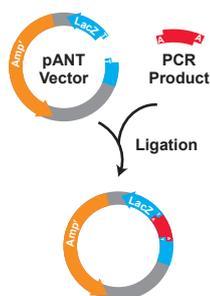
pANT Vector (25 ng/μl)	1.8 μl
PCR産物	x μl
5× Ligation Mix	4 μl
10× Enhancer Solution	2 μl
ddH ₂ O	up to 20 μl

- 16°Cで30分間反応させる。

◆インサート量について (20 μl 反応系; pANT Vector 45 ngの場合)

インサートサイズ	200 bp	500 bp	1 kbp	3 kbp
インサート量 (ng)	20 - 32	24 - 50	8 - 100	24 - 50

上記は、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、特定の条件下で最も良い結果が得られたインサート量です。

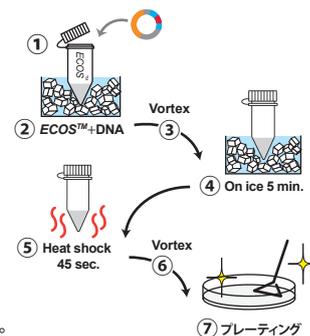


3. 形質転換

おすすめ ECOS™ Competent E. coli

< 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する。
- ①にライゲーション反応液を加える。*2
- 1秒間ボルテックス
- 氷上で5分間インキュベート
- 42°Cで45秒間インキュベート
- 1秒間ボルテックス
- LBプレートに塗布し、37°Cで16時間培養。



*1 ニッポンジーンのECOS™ Competent E. coliを用いると6分間の高速プロトコールが利用できます。

*2 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、ECOS™ Competent E. coliを使用する場合は5%以下にして下さい。

4. インサートチェック(コロニーPCR)

おすすめ Gene RED PCR Mix Plus

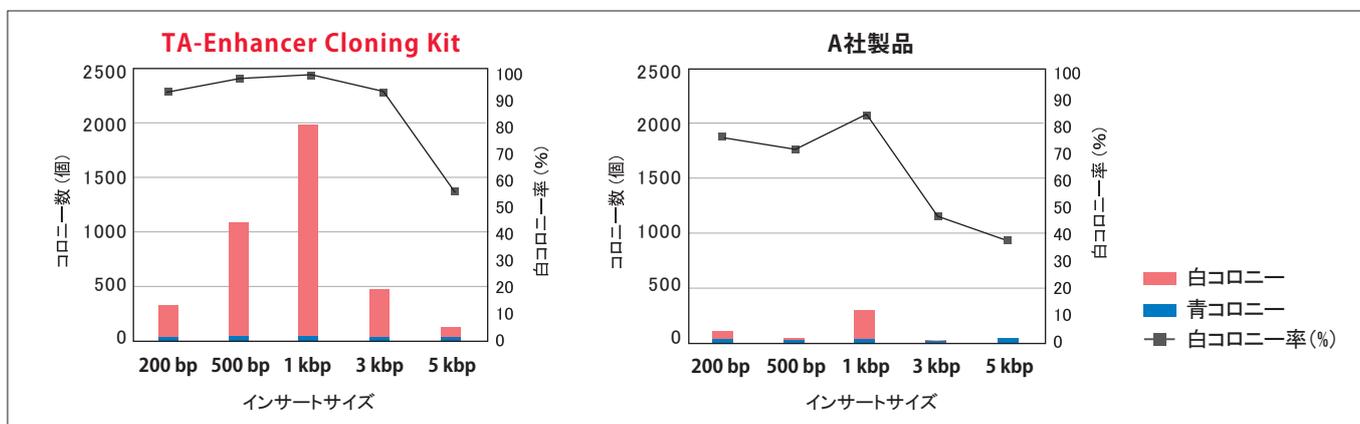
- 以下の組成で反応液を調製する。
- 爪楊枝でコロニーを軽く突き、反応液に懸濁する。
- 以下の条件でPCRを行う。
- PCR終了後、各反応液をそのままアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行う。

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

94°C 3 min.	} 25 cycles
94°C 20 sec.	
55°C 20 sec.	
72°C 10 sec./kbp	

実験例 各鎖長のライゲーション効率

各社製品のプロトコールに従ってクローニングを行った。Taq DNA polymeraseで増幅したインサート長 200 bp, 500 bp, 1 kbp, 3 kbp, 5 kbpのPCR産物を用いて、16°C、30分間(A社: 室温、60分間)のライゲーション反応を行った。反応後、ECOS™ Competent E. coli JM109へ形質転換(6分間プロトコール)し、本品とA社製品のライゲーション効率を比較した。



本品はA社製品と比較して、コロニー数および白コロニー率において優位性が認められた。

キット内容

Code No.	製品名	容量	希望納入価格(税別)
316-08271	TA-Enhancer Cloning Kit	25 回分	¥ 25,600

関連製品

Code No.	製品名	容量	希望納入価格(税別)
310-06236	ECOS™ Competent E.coli DH5 α	50 μl × 40 本	¥ 42,000
316-06233	ECOS™ Competent E.coli DH5 α	100 μl × 20 本	¥ 38,000
317-06246	ECOS™ Competent E.coli JM109	50 μl × 40 本	¥ 42,000
313-06243	ECOS™ Competent E.coli JM109	100 μl × 20 本	¥ 38,000
311-07763	Gene RED PCR Mix Plus	96 回分	¥ 9,600