
TA-Enhancer Cloning Kit

マニュアル（第5版）

Code No. 316-08271 (25 回分)

I 製品説明

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。

■ 特長

- ・ 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る。
- ・ LacZ を用いた青白判定が可能。
- ・ pANT Vector に PCR 産物が挿入されると *Hind* III と *Bgl* II の制限酵素サイトが新たに形成。

II 製品内容

製品	(25 回分)	保存
pANT Vector (25 ng/μl)	45 μl × 1 本	-20°C
5 × Ligation Mix	100 μl × 1 本	-20°C
10 × Enhancer Solution	50 μl × 1 本	-20°C
Control Insert DNA (10 ng/μl)	10 μl × 1 本	-20°C

- ・ 包装単位は 20 μl の反応系で使用した場合の回数です。
- ・ 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。

Ⅲ 保存

-20°C保存

- ・ 5 × Ligation Mix および 10 × Enhancer Solution は-20°C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。

Ⅳ 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 ddH₂O または TE (pH8.0) で適した濃度に希釈します。^{注1)}

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。^{注2)}

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 ₂ 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。^{注3)}

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%以下にしてください。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%以下にしてください。

<*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。^{注4), 注5)}
- 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ください。

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

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。

V 注意点

- 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 ddH₂O 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、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。
- 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 ddH₂O または TE (pH8.0) に溶解してから形質転換を行って下さい。

VII Q & A

Q: ライゲーション産物を保存する場合はどうしたら良いですか？

A: -20°C で凍結保存して下さい。融解後は、そのまま形質転換実験に用いることができます。

Q: サンプル数が多いのですが、あらかじめ 10 × Enhancer Solution と 5 × Ligation Mix を混ぜたプレミックスを作製してから使用することはできますか？

A: プレミックスを作製して使用できます。ただし、プレミックスは使用直前に調製し、調製後すぐに使用して下さい。

Q: ライゲーション反応を 4°C オーバーナイトで行うことはできますか？

A: 4°C オーバーナイト(16 時間)でもライゲーション可能です。

Q: ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿してもよいですか？

A: ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿するとコロニー数が著しく減少します。フェノール/クロロホルム精製してからエタノール沈殿して下さい。

VIII トラブルシューティング

トラブル	予想される原因	対策
コロニーが全く生じない	末端の不一致	TdT 活性のある PCR 酵素を用いてインサートの 3' 末端に dA を必ず付加していることをご確認ください。 (マニュアルIV-1 参照)
	コンピテントセルの形質転換効率が低い	形質転換効率が 1×10^7 cfu/ μ g 以上のコンピテントセルをご使用下さい。
	ライゲーション産物をそのままエタノール沈殿した	ライゲーション産物をフェノール/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)処理後、エタノール沈殿法により DNA を回収し、ddH ₂ 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。
白コロニーがほとんど得られない、白コロニーが全く得られない	末端の不一致	TdT 活性のある PCR 酵素を用いてインサートの 3' 末端に dA を必ず付加していることをご確認ください。 (マニュアルIV-1 参照)
	ベクター3'末端の dT が欠失している	・pANT Vector の室温での放置や凍結融解の繰り返しは避けて下さい。 ・dT を分解するヌクレアーゼのご使用は避けて下さい。
	ライゲーション時間が短い	・ライゲーション時間を延ばして下さい。 ・4°C でオーバーナイト反応を行って下さい。
	インサート量が不適	マニュアルに載っているインサート量を参考に、ライゲーションを行って下さい。(マニュアルIV-1 参照)
	使用する Enhancer Solution の量が不適當	Enhancer Solution 添加量は反応系の 1/10 量にして下さい。
	使用するベクター量が不適當	pANT Vector 量は 20 μ l 反応系で 1.8 μ l を使用して下さい。
	EDTA 等のキレート剤濃度が高い	キレート剤を含まない水または TE (pH8.0) で DNA を溶解し、ライゲーション反応を行って下さい。
	DNA 溶液が高塩濃度	塩を含まない水または TE (pH8.0) で DNA を溶解し、ライゲーション反応を行なって下さい。
	PCR 産物に夾雑物が含まれている	PCR 産物の精製を ISOSPIN PCR Product 等で行って下さい。
	フレームシフトによって <i>lacZ</i> 遺伝子が発現している	青コロニーや薄い青コロニーをチェックしてみてください。インサートが入っている場合があります。
ピリミジンダイマーが形成されている	アガロースゲルから切出しを行う時は、UV 照射時間を短くして下さい。	
ほとんど白コロニー、全部が白コロニー	アンピシリン、X-gal、IPTG の濃度を確認し、作り直して下さい。(マニュアルIV-3 参照)	
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量はコンピテントセルに対して 1/10 量にして下さい。 ECOS™ Competent <i>E. coli</i> を使用する場合は、添加する反応液量をコンピテントセルに対して 5%以下にして下さい。
	コンピテントセルの形質転換効率が低い	形質転換効率が 1×10^7 cfu/ μ g 以上のものを使用して下さい。

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 TEL 076-451-6548 www.nippongene.com お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。

TA-Enhancer Cloning Kit マニュアル（第 5 版）