

TaKaRa DNA Ligation Kit LONGを用いて 哺乳類血液サンプルから効率よく BAC Library を作製

キーワード: BAC Libraryの作製、ライゲーション

はじめに

長鎖DNA、とりわけ10 kbを超えるDNA断片のライゲーションの場合、通常のLigation Kitではライゲーション効率が極端に悪くなります。これまで、長鎖DNA断片のライゲーションが要求される実験では、簡便な市販のキットが利用できなかったため、リガーゼ反応条件の試行錯誤が必要となり、条件検討に膨大な労力を要しました。

タカラバイオが開発したTaKaRa DNA Ligation Kit LONG (製品コード 6024) は、リガーゼとバッファーの最適化を行い、熟練した技術やノウハウを必要とせずに長鎖DNA断片のライゲーションを可能にします。

今回は、本キットをBACライブラリー作製に使用した実例を紹介します。

方法

血液10 mlから白血球を分取し、DNA plugを調製しました。制限酵素BamH Iで部分消化後、100~150 kbのDNA画分をゲルから回収し精製しました。TaKaRa DNA Ligation Kit LONGを使用して、このDNAをBACベクター(pCC1BAC, EPICENTRE)にライゲーションしました。ライゲーション後、Drop Dialysis法で透析精製したライゲーション反応物をエレクトロポレーション法で大腸菌に導入し、寒天培地にまき、ランダムに12個の形質転換体をピックアップしました。培養後、アルカリ法でBACクローンDNAを抽出し、制限酵素Not Iで切断してパルスフィールド電気泳動を行い、インサートDNA断片長を確認しました。

● ライゲーション反応条件

100-150 kbゲノムDNA	20 ng	} 14°CでO/N反応
BACベクター	10 ng	
10× LONG Ligation Buffer	5 µl	
DNA Ligase LONG	1.5 µl	
H ₂ O	up to 50 µl	

● Drop Dialysis法で透析精製後、大腸菌DH10B コンピテントセル(※)にエレクトロポレーション

● パルスフィールドゲル電気泳動条件

Initial switch time 0.4 sec
Final switch time 12.9 sec
6 V/cm, 10 hr, 14°C, 0.5×TBE

※: 同等以上の性能を示す*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028) の使用を推奨いたします。

that's
GOOD
science!

結果 は裏面です→

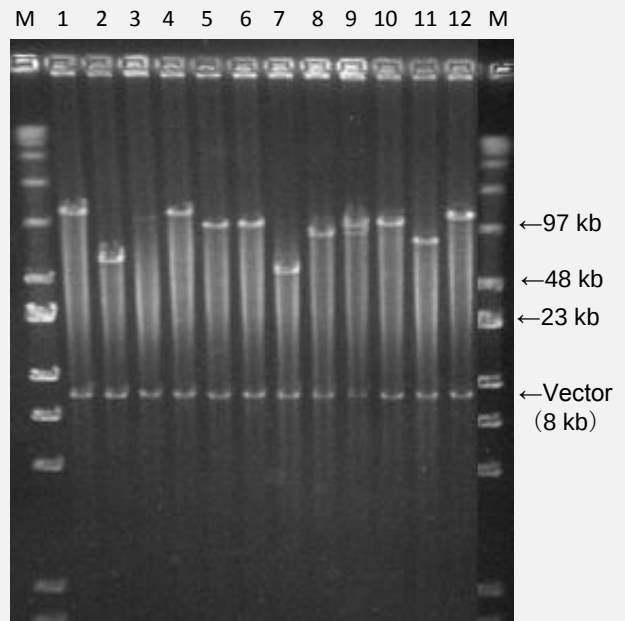
結果

12クローンの全てにおいてインサートが確認されました。

平均インサートサイズ	約90 kb
90 kb以上のクローン	9/12 clones (75 %)
60 kb以下のクローン	1/12 clone (8.3 %)

TIPS

今回の実験により、長鎖DNAのライゲーション反応に最適化されたTaKaRa DNA Ligation Kit LONGを用いることで、これまで難しいとされていたBAC ライブラリーの作製が効率よく簡便に行うことができました。DNAは長鎖になるほど物理的な衝撃を受けやすいため、ピペッティング時にはチップの先を切ったものを使用してゆっくりと操作することが必要です。また、フェノール抽出やエタノール沈殿はDNAをせん断する原因となるので避けるべきです。TaKaRa DNA Ligation Kit LONGのパフォーマンスを十分に発揮させるには、物理的に破壊されてないDNAを調製することが重要です。



<ライゲーション&クローニングキットのご紹介>

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
長鎖のクローニングに最適			
★ TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024	¥27,000
1液タイプのライゲーション試薬、効率がさらにアップ			
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	100回	6023	¥27,000
1液タイプのライゲーション試薬			
DNA Ligation Kit Ver.2.1	100回	6022	¥27,000
2液タイプのライゲーション試薬			
DNA Ligation Kit Ver.1	50回	6021	¥27,000
突出末端DNAを平滑末端処理してライゲーション			
DNA Blunting Kit	20回	6025	¥30,000
突出末端DNAを平滑化してクローニング			
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)	20回	6027	¥30,000
TAクローニングに			
Mighty TA-cloning Kit	20回	6028	¥22,000
平滑末端DNAでも簡単にAを付加してTAクローニング			
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20回	6019	¥33,000

★は今回のテクニカルノートで使用した製品です。

・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。・本チラシに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。・本チラシ記載の価格は2017年9月25日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2017年9月作成N

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
 テクニカルサポートライン
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
 Website <http://www.takara-bio.co.jp>
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店