

효율적인 ligation을 위하여!
TaKaRa Ligation Kit Series의 최신판!

<Mighty Mix>

(DNA Ligation Kit ver 2.1(TaKaRa code 6022) vs Mighty Mix(TaKaRaCode 6023))

DNA 단편의 ligation은 유전자 조작 실험 중 가장 빈번히 사용되는 실험 방법이다. Ligation에 가장 널리 사용되는 효소는 T4 DNA ligase이나, T4 DNA Ligase 사용 시 buffer와 효소를 따로 넣어야 하는 번거로움이 있어 고안한 것이 TaKaRa Ligation Kit series이다.

그 중 현재 가장 많이 사용되고 있는 DNA Ligation Kit Ver.2.1은 판매되고 있는 다른 ligation kit에 비해 월등한 성능을 자랑해왔다.

본 고에서는 DNA Ligation Kit Ver. 2.1 과 신제품 Mighty Mix를 비교, 소개하여 TaKaRa Ligation Kit Series를 이용한 ligation 효율 극대화 방법을 제시하고자 한다.

Ligation Kit series의 최신판 Mighty Mix의 특징

- 조작이 간단
Ligation Mix를 DNA 용액과 혼합함으로써 모든 조작이 끝나며, 반응 후 별도의 처리없이 ligation mixture 그대로 transformation이나 *in vitro* packing에 이용할 수 있다.
- Blunt end, TA cloning에 최적
Sticky end ligation, TA cloning 뿐만 아니라, 일반적으로 효율이 낮은 blunt end ligation에서도 기존 제품 이상의 효율을 나타내었다.
- 5분만에 ligation 가능
간단한 plasmid vector ligation은 25 ℃, 5분 반응으로 가능하다.
- 동결 용해에도 강한 시약
50회 동결 용해에서 효율저하가 없는 것을 확인하였다.

Mighty Mix vs DNA Ligation Kit Ver.2.1

[Kit 구성물]

	Mighty Mix (6023)	Ligation Kit Ver.2.1(6022)
제품구성	1개의 solution으로 구성 (Ligation Mix)	3개의 solution으로 구성 (Solution I, Solution II, Solution III)
Solution 용량	Ligation Mix (250 μl × 3 tubes)	Solution I (250 μl × 3 tubes) Solution II (750 μl × 1 tubes) Solution III (200 μl × 1 tubes) 총 5 tubes

[각 구성물 기능]

	Solution	기능
Mighty Mix (6023)	Ligation Mix	Enzyme solution
Ligation Kit Ver.2.1(6022)	Solution I	Enzyme solution
	Solution II	Concatenation
	Solution III	Transformation enhancer

Ligation Kit Ver.2.1의 3가지 solution의 기능을 하나의 solution(Ligation Mix)으로 해결할 수 있도록 고안되었다.

반응 효율 비교

[반응 1~2]

Mighty Mix와 DNA Ligation Kit ver2.1을 이용하여 일반적인 cloning vector(pUC118, *Hind* III cutting, BAP 처리, TaKaRa Code 3324)에 6.5kb insert를 삽입하였고, T vector (pMD18-T, Perfect T Cloning Kit(TaKaRa Code TK6002)삽입 vector)에 5 kb insert를 삽입하여 그 효율을 비교하였다(Transformation: Heat shock method, Competent cell : JM109 for heat shock).

	pUC118 (<i>Hind</i> III, BAP)	pMD18-T (Perfect T Cloning Kit)
	Molar ratio	Molar ratio
	Vector : Insert	Vector : Insert
6.5 kb[반응1]	1 : 3	
5 kb[반응2]		1 : 3

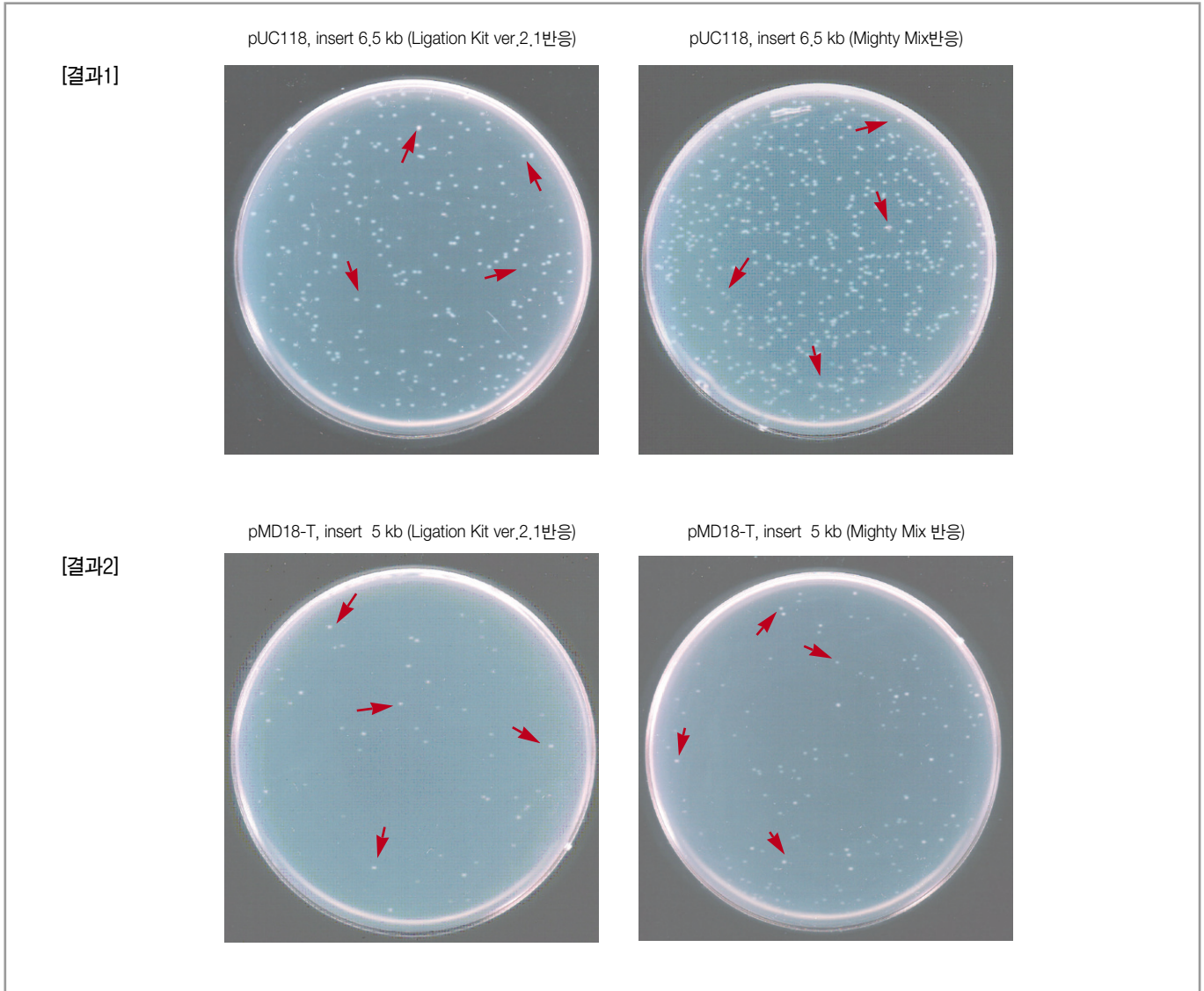
[반응3]

반응 1~2와 동일한 방법으로 반응한 후 EtOH ppt를 수행하여 transformation을 진행하였다.

(Transformation: electroporation, competent cell : DH10B for electroporation)

[결과3]

Mighty Mix를 이용한 반응 효율과 DNA Ligation Kit Ver.2.1을 이용한 반응 효율이 동등 수준을 나타내었다 (data not shown).



Mighty Mix를 이용한 반응의 효율이 DNA Ligation Kit Ver.2.1을 이용한 반응에 비해 동등 이상의 효율을 나타내었다.

이는 Mighty Mix내에 포함되어 있을 것으로 생각되는 형질전환을 향상시키는 구성성분의 역할이 electroporation을 이용한 형질전환에는 큰 영향을 주지 못했기 때문이라고 추정된다.

결론

일반적으로 말하는 ligation 반응의 효율은 실질적인 ligation 효율과 형질전환의 효율을 모두 포함한 말이다. Ligation 반응의 효율을 판단하는 기준이 형질전환 후에 나타나는 positive clone의 수이기 때문이다.

DNA Ligation Kit Ver.2.1은 ligation 반응을 일으키는 Solution I 을 첨가한 후에 형질전환의 효율을 올리기 위해 Solution III를 첨가하는 과정을 거친다. 이에 반해 Mighty Mix는 Ligation Mix내에 위와 같은 작용을 하는 구성성분이 포함되어 있으므로, 따로 첨가하는 과정을 거칠 필요가 없는 것이다. 따라서 위와 같이 Mighty Mix와 DNA Ligation Kit Ver.2.1의 ligation 효율은 동등수준이라고 예상할 수 있으나, transformation 효율은

Mighty Mix가 DNA Ligation Kit Ver.2.1에 비해 높게 나타났다.

Technical tip

일반적인 ligation 반응에는 DNA Ligation Kit Ver.2.1과 Mighty Mix 두 종류의 ligation kit를 이용한 효율의 차이는 나타나지 않는다. 하지만 아래와 같은 경우에는 DNA Ligation Kit Ver.2.1보다는 Mighty Mix를 사용하는 것을 권장한다.

- Size가 큰 fragment를 ligation 하고자 할 때
- Blunt end ligation을 하고자 할 때
- cDNA에 Linker[Adaptor]를 ligation 하고자 할 때
- λ-phage vectors로 DNA fragment를 삽입하고자 할 때*

* 위의 실험은 Mighty Mix도 사용가능하나, Ligation Kit Ver.1을 사용하기 권장함

Technical Tip 1 <Mighty Mix>

[참고 1 타사제품 비교]

회사명	Blunt end 500 bp			TA cloning 2 kb		
	Colonies/ug vector		White/ total (%)	Colonies/ug vector		White/ total (%)
	White	Blue		White	Blue	
TaKaRa Mighty Mix	9.5E+06	3.0E+05	96.9	1.3E+06	3.7E+05	77.2
T사	1.4E+06	3.8E+05	79.0	1.5E+05	2.4E+05	37.7
N사	4.6E+06	3.7E+05	92.6	7.3E+05	3.4E+05	67.8
P사	1.5E+06	4.3E+05	77.9	1.7E+05	2.9E+05	37.3
B사	1.4E+04	4.7E+05	3.0	2.0E+04	3.0E+05	6.3
R사	4.7E+06	2.5E+05	95.1	2.6E+05	1.2E+06	18.4

[참고 2 실험에 따른 TaKaRa Ligation Kit series 사용방법]

	Mighty Mix(6023)	Ligation Kit ver.1(6021)	Ligation Kit ver.2,1(6022)
	Volume ratio	Volume ratio	Volume ratio
1. Insertion of DNA fragment into plasmid vectors	DNA solution : 1 Ligation Mix : 1	DNA solution : 1 Solution A : 4~8 Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 1
2. Cloning of PCR products into T vector	DNA solution : 1 Ligation Mix : 1	DNA solution : 1 Solution A : 4~8 Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 1
3. Intramolecular ligation of linear DNA (self circularization)	DNA solution : 1 Ligation Mix : 1	DNA solution : 1 Solution A : 4~8 Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 1
4. Insertion of linker DNA into plasmid vectors	DNA solution : 1 Ligation Mix : 1	DNA solution : 1 Solution A : 4~8 Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 1
5. Linker[Adaptor] ligation to cDNA	DNA solution : 1 Ligation Mix : 2	DNA solution : 1 (300 mM NaCl) Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 2 Solution II : 1
6. Insertion of DNA fragments into λ-phage vectors*	DNA solution : 1 Ligation Mix : 2	DNA solution : 1 (300 mM NaCl) Solution B : 1	DNA solution : 1 Solution I : 2 Solution II : 1

* 위의 실험은 Mighty Mix도 사용가능하나, Ligation Kit Ver.1을 사용하기를 권장함 (참고 3)

[참고 3 Insertion of DNA fragments into λ-phage vectors]

	Packing reagent	Plaques/ μg Uni-ZAP vector
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	GigaPack III MaxPlax	2.6 × 10 ⁸ 5.5 × 10 ⁸
DNA Ligation Kit Ver.1	GigaPack III MaxPlax	6.0 × 10 ⁸ 9.2 × 10 ⁸

HIT PRODUCTS

PCR product의 cloning을 간편하게!

Perfect-T Cloning Kit

Perfect-T Cloning Kit는 pMD18-T vector(pUC18 유래)와 TaKaRa DNA Ligation Solution(2×)과의 결합으로 탄생한 T vector cloning을 간편하게 할 수 있도록 만들어진 kit이다.



1:1 Mix
16°C 30분 OK

Ligation



Mighty Mix가 해결해 드립니다.

Mighty Mix는...

[All in One]

Enzyme과 Buffer의 Premix I Solution Type으로 Ligation Mix를 DNA 용액과 혼합만 하면 된다. Circular 및 linear ligation 어느 쪽에도 사용 가능하다.

[Blunt end, TA-cloning에서 높은 효율 보장]

Cohesive end, Blunt end cloning 및 TA-cloning에서도 높은 효율을 보장한다.

[5분 정도의 Ligation 반응으로도 OK!]

표준 Protocol은 16°C 30분이지만, 25°C 5분 정도로도 ligation이 가능하여, 급한 실험에 매우 유용하다.

[동결 용해에도 강하다]

50회의 동결 용해에서도 활성의 저하가 없다는 것을 확인하였다