

Quick-TA kit

Набор для быстрого клонирования ПЦР продуктов

Кат. #ТАК02

На 50 реакций

Состав и условия хранения

| Компонент | Количество |
|--------------------------------------|--------------|
| pAL2-T вектор, лиофилизированный | 2 x 1.25 мкг |
| Quick-TA T4 DNA Ligase (200 ед/мкл) | 50 мкл |
| 5X Quick ligation buffer | 250 мкл |
| 10X Overnight ligation buffer | 250 мкл |
| M13 Forward primer (10 μ M) | 400 мкл |
| M13 Reverse primer (10 μ M) | 400 мкл |

Хранение и транспортировка: -20°C

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки - 1 год.

Набор Quick-TA предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами. В состав набора входят две фасовки pAL2-T вектора, Quick-TA T4 ДНК лигаза, буферы для быстрого и стандартного лигирования и праймеры для скрининга клонов и секвенирования вставки.

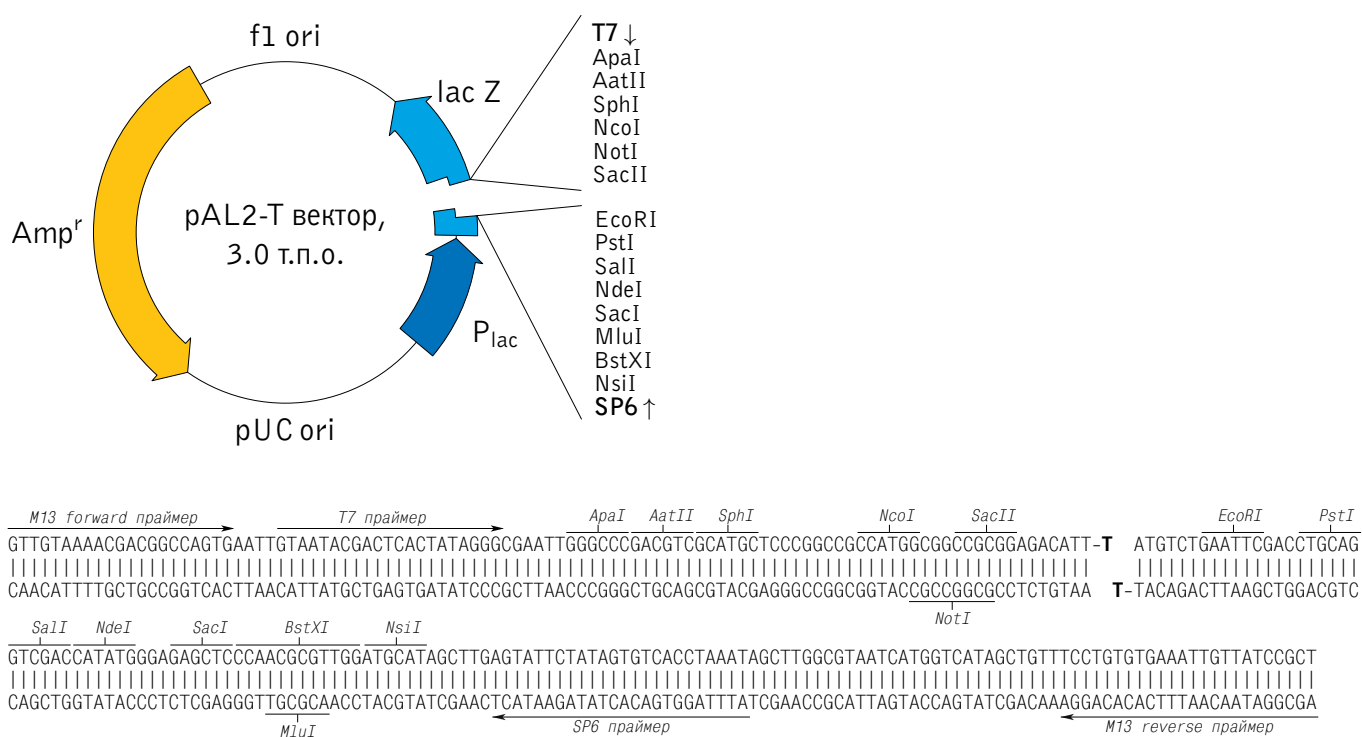
pAL2-T вектор

pAL2-T вектор представляет собой линейризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в pAL2-T вектор основано на способности Taq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин. Таким образом, продукт ПЦР и pAL2-T вектор несут выступающие комплементарные 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает значительно более высокую эффективность лигирования по сравнению с лигированием «вступую».

Основные свойства рAL2-Т вектора:

- В 10 раз более высокая эффективность клонирования по сравнению с рAL-ТА вектором;
- Клонирование продуктов ПЦР в вектор не требует предварительной ферментативной обработки;
- Вектор обеспечивает возможность бело-голубой селекции клонов (по результатам ПЦР-скрининга не менее 90% белых колоний содержат рекомбинантную плазмидную ДНК);
- Вектор можно использовать для клонирования как индивидуальных ампликонов, так и сложных смесей (например, амплифицированных библиотек кДНК);
- Возможен отбор рекомбинантных клонов путем ПЦР-скрининга бактериальных колоний с использованием стандартной пары праймеров;
- Растворённый в воде рAL2-Т вектор выдерживает не менее 10-15 циклов размножения/замораживания без снижения эффективности клонирования.

Карта вектора и структура полилинкера



Quick-TA T4 ДНК лигаза

Рекомбинантная Quick-TA T4 ДНК лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами двуцепочечной ДНК. Фермент использует АТФ в присутствии Mg^{2+} в качестве кофактора. За единицу активности Quick-TA T4 ДНК лигазы принимали количество фермента, необходимое для 50% сшивки HindIII-фрагментов ДНК фага лямбда за 30 мин при 16°C в 20 мкл реакционной смеси при концентрации ДНК 300 мкг/мл.

Quick-TA T4 ДНК лигаза хорошо подходит как для «тупого», так и для «липкого» лигирования. Фермент ингибируется NaCl и KCl в концентрации 200 мМ, а также ЭДТА в концентрации 20 мМ. Температурная инактивация фермента наступает после 10-минутной инкубации при 65°C или 5-минутной инкубации при 70°C.

- ▶ *Ингибирование реакции лигирования путем добавления химических веществ приводит к необходимости очистки лигата для дальнейших ферментативных обработок или трансформации. При работе следует избегать нагревания фермента до комнатной температуры. Используйте контейнер-холодильник или тару со льдом.*

Реакционные буферы

В состав кита входят два буфера – 5X Quick ligation буфер для быстрого (5-15 минут) лигирования при комнатной температуре и 10X Overnight ligation буфер для стандартного лигирования (14-16 часов при 14°C). Быстрое лигирование хорошо подходит для клонирования одиночных ПЦР-продуктов. Для клонирования амплифицированной кДНК рекомендуется использовать стандартный протокол.

В состав обоих реакционных буферов входят АТФ и ДТТ, которые плохо сохраняются в водных растворах. Чтобы минимизировать число циклов заморозки-разморозки, рекомендуется хранить буферы в аликвотах по 50-100 мкл.

Протокол

Подготовка продукта ПЦР

- ▶ *Перед первым использованием растворите лиофилизированный pAL2-T вектор в 25 мкл деионизированной воды до концентрации 50 нг/мкл.*
 1. Произведите очистку свежеприготовленного ПЦР-продукта с помощью колоночных наборов для выделения ДНК из реакционных смесей или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом.
- ▶ *Очистка ПЦР-продукта не является обязательным требованием, однако присутствие следов полимеразы и ПЦР буфера в лигазной смеси может привести к снижению эффективности лигирования в 2-3 раза.*
- ▶ *Для работы используйте только свежеприготовленный ПЦР-продукт. Если это невозможно, сразу после завершения ПЦР очистите амплифицированную ДНК из реакционной смеси и заморозьте до момента постановки реакции лигирования (но не дольше, чем на 2-3 дня).*
 2. В стерильной пробирке для ПЦР приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже.
- ▶ *Тщательно перемешайте лигазный буфер перед использованием.*

| Компонент | Быстрое лигирование (5-15 минут при комнатной температуре) | Стандартное лигирование (14-16 часов при 14°C) |
|------------------------------|--|--|
| Стерильная вода | до 10 мкл | до 10 мкл |
| 5X Quick ligation буфер | 2 мкл | – |
| 10X Overnight ligation буфер | – | 1 мкл |
| pAL2-T вектор (50 нг/мкл) | 1 мкл | 1 мкл |
| ПЦР продукт | X мкл* | X мкл* |
| Quick-TA T4 ДНК лигаза | 1 мкл | 1 мкл |
| Финальный объём | 10 мкл | 10 мкл |

* Оптимальное соотношение количества вставки и вектора в реакции лигирования зависит от природы клонируемого материала. Если клонируется одиночные фрагменты ДНК, рекомендуется использовать 3-х кратный избыток вставки (в молях). В случае клонирования библиотек кДНК избыток вставки увеличивают до 8-10 кратного. Для расчета количества ПЦР-продукта для лигирования в pAL2-T вектор можно воспользоваться следующей формулой:

$$X \text{ (нг)}_{\text{вставки}} = \frac{3 \div 10_{\text{избыток вставки}} \times \text{длина вставки (п.о.)} \times \text{количество вектора (нг)}}{3000 \text{ (п.о.)}_{\text{длина pAL2-T вектора}}}$$

3. Перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки путем импульсного откручивания.

4. Инкубируйте реакцию в течении времени, рекомендованного для используемого буфера.

5. После окончания реакции сразу поместите пробирку на -20°C .

► Не храните лигат на +4°C .

Трансформация *E.coli*

Для трансформации *E.coli* лигазной смесью подходит любой стандартный протокол. Число колоний, выросших на чашке, зависит от эффективности трансформации выбранного штамма компетентных клеток. Для успешного клонирования эффективность трансформации компетентных клеток не должна быть меньше 1×10^7 КОЕ/мкг. Для химической (кальциевой) трансформации используйте неочищенный лигат. Инактивация лигазы не требуется. Добавьте 5-10 мкл лигата к 100 мкл клеточной суспензии.

Для электротрансформации (электропорации) необходимо очистить лигат от следов соли переосаждением этанолом (фенольная экстракция не требуется) либо на колонке. Добавьте половину объема раствора ДНК, полученного после очистки, к 100 мкл электрокомпетентных клеток. Далее следуйте стандартным протоколам и рекомендациям производителей приборов для электропорации.

► Не рекомендуется превышать количество лигазы, заявленное в протоколе лигирования.

► Для эффективной трансформации объём реакционной смеси не должен превышать 10% от объёма компетентных клеток.

Возможные проблемы и способы их решения

1. Низкая эффективность трансформации или полное отсутствие колоний на чашке.

| Возможная причина проблемы | Варианты решения |
|---|---|
| Низкая эффективность компетентных клеток. | Проверьте эффективность трансформации добавлением 0,1 нг суперскрученной плазмидной ДНК (обычно рUC) к компетентным клеткам. Используйте свежие компетентные клетки с эффективностью не ниже 1×10^7 КОЕ/мкг. |
| В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей. | Очистите реакционную смесь на колонке или путём переосаждения этанолом. |
| Слишком большой объём добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси. | Используйте не более 5-10 мкл реакционной смеси для трансформации 50 мкл компетентных клеток. |
| Низкая эффективность лигирования. | См. следующий пункт. |

2. Количество синих колоний доминирует над количеством белых вне зависимости от общего количества выросших колоний. Низкая эффективность лигирования.

| Возможная причина проблемы | Варианты решения |
|--|--|
| Активность T4-ДНК лигазы слишком низка. | Убедитесь в правильном хранении набора. Препарат фермента нельзя прогревать до комнатной температуры, во время работы необходимо использовать контейнер-холодильник или тару со льдом. При необходимости замените препарат лигазы. |
| Присутствие ингибирующих агентов в образцах ДНК. | ПЦР продукт должен быть очищен от таких ингибирующих процесс лигирования агентов, как избыток солей, ЭДТА, низкомолекулярные продукты амплификации, фенол, спирт и т.д. Очистите образцы на колонках, через агарозный гель или методом экстракции фенолом. |

продолжение на следующей странице

| Возможная причина проблемы | Варианты решения |
|---|--|
| <p>ДНК была повреждена УФ светом в процессе очистки из агарозного геля.</p> | <p>При вырезании ДНК минимизируйте время экспозиции геля в ультрафиолете. В процессе облучения держите гель на пластиковой или стеклянной подложке. Безопасная альтернатива УФ-трансillюминатора – синий светодиодный трансillюминатор на 470 нм и флуоресцентный интеркалирующий краситель SYBR Green вместо этидия бромида.</p> |
| <p>Размер клонируемой вставки превышает 1.0-1.5 т.п.н.</p> | <p>Увеличьте количество вставки. В случае клонирования длинных вставок или кДНК используйте 8-10 кратный избыток вставки.</p> |
| <p>Клонируемый материал (кДНК или фрагмент) был приготовлен ранее, чем за 24 часа до постановки реакции лигирования, что привело к потере молекулами ДНК выступающих 3'-дезоксиденозинов.</p> | <p>Приготовьте свежий препарат ДНК для клонирования (продукт амплификации должен храниться не более суток перед постановкой реакции лигирования).</p> |
| <p>Клонируемый фрагмент не содержит на 3'-концах выступающих 3'-дезоксиденозинов.</p> | <p>Использование полимераз с корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью существенно снижает количество выступающих 3'-нуклеотидов. Для ПЦР с последующим клонированием в рAL2-T вектор рекомендуется использовать полимеразы, рекомендованные производителем для ТА-лигирования. Также рекомендуется немедленно очищать ПЦР продукт после реакции. Taq-полимераза менее эффективно добавляет нематричную букву вслед за последним нуклеотидом А, тогда как наиболее эффективно добавление происходит в случае последнего нуклеотида С. Таким образом, по возможности следует использовать нуклеотид G и избегать присутствия нуклеотида Т на 5'-концах праймеров для ПЦР.</p> |

3. Подавляющее большинство выросших колоний имеют синюю или голубую окраску, при этом плазмиды в выросших колониях содержат вставки.

| Возможная причина проблемы | Варианты решения |
|---|---|
| Плазмиды в выросших колониях содержат короткие нецелевые вставки. | Клонлируемый материал не был очищен от побочных продуктов амплификации (например, димеров праймеров). Уделите особое внимание очистке целевого фрагмента от низкомолекулярных продуктов амплификации, и особенно димеров праймеров (короткие фрагменты ДНК всегда клонируются предпочтительнее длинных). Использование колонки или экстракции фенолом/хлороформом не полностью убирает неспецифические побочные продукты ПЦР. Для освобождения от них воспользуйтесь очисткой через агарозный гель. |
| Плазмиды в выросших колониях содержат целевую вставку. | Клонлируемый фрагмент имеет небольшой размер (менее 200 п.о.). В ряде случаев колонии, содержащие целевые рекомбинантные плазмиды с короткими фрагментами могут быть окрашены в синий или голубой цвета, что является ограничением метода белоголубой селекции. |

Сопутствующие товары:

1. ДНК полимеразы и киты для ПЦР;
2. Готовые смеси для ПЦР;
3. Компетентные клетки для химической трансформации;
4. Наборы для выделения плазмид.

Сопутствующие услуги:

1. Синтез олигонуклеотидов;
2. Секвенирование ДНК.

Продукты и услуги компании Евроген

P – продукты

S – услуги

Молекулярная биология

Выделение и очистка нуклеиновых кислот, маркеры длин ДНК **P**

ПЦР, синтез кДНК и RACE **P**

Клонирование ДНК **P**

Нормализация кДНК **P S**

Учебные наборы **P**

Синтез олигонуклеотидов и секвенирование **S**

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**

Синтез генов и направленный мутагенез **S**

Приготовление библиотек кДНК **S**

Сложные сервисы **S**

Клеточная биология

Флуоресцентные белки **P**

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**

Антитела против флуоресцентных белков **P**

Временная трансфекция и создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**

Конструирование лентивирусных частиц **S**

Лентивирусные конструкции для РНК-интерференции **S**

Молекулярная медицина

Наборы для детекции мутаций в протоонкогенах **P**

Услуги в области молекулярной онкологии **S**

Услуги в области молекулярной генетики наследственных заболеваний **S**

Подробную информацию о наших продуктах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

Техническая поддержка: customer-support@evrogen.ru

ЗАО Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, корпус 70

(Технопарк ИБХ)

Тел.: +7 (495) 988-4083

Факс: +7 (495) 988-4085

www.evrogen.ru

order@evrogen.ru