

рAL-TA вектор

Продукт	Кат. #	Количество
рAL-TA вектор	TA001	на 20 реакций

Хранение и транспортировка: -20°C

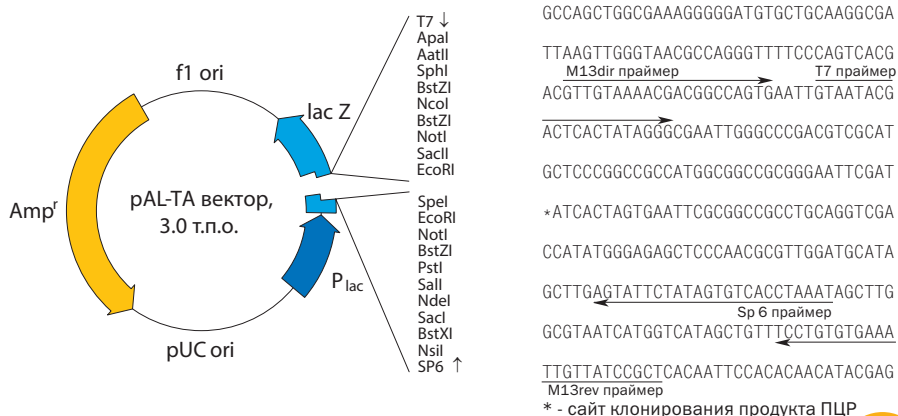
Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки - 1 год.

рAL-TA вектор является аналогом известного вектора рGEM-T Easy и предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР. Фасовка содержит лиофилизированный вектор, который необходимо растворить в 20 мкл деионизированной воды (до концентрации 50 нг/мкл). Этого количества достаточно для постановки 20 стандартных реакций лигирования объемом 10 мкл.

Основные свойства рAL-TA вектора:

- Клонирование продуктов ПЦР в вектор не требует предварительной ферментативной обработки ДНК;
- Возможно клонирование как индивидуальных амплифицированных фрагментов ДНК, так и сложных смесей (например, библиотек кДНК);
- Возможна бело-голубая селекция клонов, достигнуто оптимальное соотношение белых и синих колоний. Клонированный материал содержит не менее 70% белых колоний. Около 90% белых колоний содержат рекомбинантную плазмидную ДНК (по результатам ПЦР-скрининга);
- Возможен отбор рекомбинантных клонов путем ПЦР-скрининга бактериальных колоний с использованием стандартной пары праймеров;
- рAL-TA вектор намного более стабилен, чем зарубежные аналоги, и выдерживает многократное размораживание/замораживание без ощутимого снижения эффективности клонирования.

Карта вектора и структура полилинкера



Протокол

Необходимые реагенты

1. T4 ДНК лигаза и подходящий для нее лигазный буфер;

Примечание: для реакции лигирования можно использовать любую T4 ДНК лигазу приемлемого качества.

2. 5.0-10.0 мМ Трис-НСl (рН = 7.5-8.5)

Требования к продукту ПЦР

Для эффективного лигирования продукт ПЦР необходимо очистить от полимеразы и ПЦР буфера с помощью специальных коммерческих наборов или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом.

Примечание: присутствие полимеразы и ПЦР буфера в лигазной смеси приведет к снижению эффективности реакции лигирования и, как следствие, уменьшению числа трансформантов (бактериальных колоний, выросших после трансформирования лигазной смесью компетентных клеток *E. coli*).

Для очистки продукта ПЦР методом фенольной экстракции, добавьте к одному объему ПЦР-реакции 0.5-1.0 объема насыщенного и уравновешенного трис-буфером фенола (рН 7.5), интенсивно перемешайте на вортексе, затем добавьте 1.0 объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), вновь интенсивно перемешайте на вортексе и центрифугируйте 3-5 мин на микроцентрифуге при максимальных оборотах. Аккуратно отберите водную фракцию (избегайте захвата фенола и интерфазы!!!) и переосадите этиловым спиртом следуя любому стандартному протоколу. Растворите осадок в 5.0-10.0 мМ Трис-НСl (рН7.5-8.5) таким образом, чтобы конечная концентрация ПЦР-продукта составила не менее 20 нг/мкл.

Лигирование продукта ПЦР

1. В стерильной пробирке для ПЦР приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже.

Объем реакции 10 мкл:

Компонент	Стандартная реакция	Контрольная реакция
Стерильная вода	до 10 мкл	до 10 мкл
10x лигазный буфер	1 мкл	1 мкл
pAL-TA вектор (50 нг/мкл)	1 мкл	1 мкл
ПЦР продукт (100-250 нг)	X мкл	-
T4 ДНК лигаза (3-5 Weiss U/мкл)	1 мкл	1 мкл

2. Перемешайте компоненты реакции мягким пипетированием, сбросьте капли со стенок пробирки путем импульсного откручивания.

3. Инкубируйте реакцию при +14°C в течение 14-16 часов.

Примечание: допустимо сократить время реакции лигирования до 3-4 часов (при этом количество ДНК лигазы в реакции должно быть увеличено), однако, как правило, это ведет к снижению эффективности лигирования и уменьшению числа трансформантов. Если число трансформантов не является критичным (например, в случае клонирования индивидуальных фрагментов ДНК), можно воспользоваться ускоренным вариантом постановки лигирования.

4. Заморозьте реакцию по ее окончании на -20°C или переосадите этанолом (фенольная экстракция не требуется) для последующей электротрансформации (электропорации) *E. coli*.

Трансформация *E. coli*

Для трансформации *E. coli* лигазной смесью подходит любой стандартный протокол. В случае использования процедуры электропорации, добавьте 5 мкл раствора, полученного после переосаждения реакции лигирования к 40-50 мкл электрокомпетентных клеток, далее следуйте стандартным протоколам и рекомендациям производителей приборов для электропорации. При соблюдении оптимальных режимов и успешного прохождения реакции лигирования должно вырасти порядка 1-2 тыс. колоний на чашку при посеве 1/6-1/7 части объема трансформации.

Возможные проблемы и способы их решения

1. Количество выросших после трансформации колоний слишком мало, но соотношение белых колоний к синим нормальное (от 70:30 до 50:50).
 - Эффективность трансформации компетентных клеток слишком низка. Используйте свежие компетентные клетки с эффективностью не ниже 1×10^7 cfu/ug.
 - Активность T4-ДНК лигазы слишком низка. Замените препарат лигазы на другой.

2. Малое количество выросших после трансформации колоний при измененном соотношении белых и синих колоний в пользу последних (30:70 и ниже).

- Размер клонируемой вставки превышает 1.0-1.5 т.п.о. Увеличьте количество вставки. В общем случае, используйте 3-10-кратные молярные избытки вставки над вектором. В случае клонирования кДНК используйте 8-10 кратный избыток вставки.

- Клонировемый материал (кДНК или фрагмент) был приготовлен ранее, чем за 24 часа до постановки реакции лигирования, что привело к потере молекулами ДНК выступающих 3'- нуклеотидов А. Приготовьте свежий препарат ДНК для клонирования (продукт амплификации должен храниться не более суток перед лигированием).

- Клонировемый материал (кДНК или ДНК фрагмент) не содержит на 3'-конце (концах) выступающих 3'- нуклеотидов А.

Примечание: использование proof-reading полимераз (Vent, Pfu) существенно снижает количество выступающих 3' нуклеотидов. Для ПЦР с последующим клонированием в pAL-TA вектор рекомендуется использовать полимеразы компании Евrogen.

Примечание: Taq-полимераза менее эффективно добавляет нематричную 3'-А 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.

3. Соотношении белых и синих колоний изменено в пользу синих при достаточно высокой эффективности трансфекции.

- Клонировемый материал не был очищен перед клонированием от ПЦР буфера и низкомолекулярных продуктов амплификации (например, димеров праймеров). Всегда используйте очищенный препарат ДНК. При наличии низкомолекулярных продуктов амплификации и особенно димеров праймеров необходимо очистить целевой продукт через агарозный гель - более короткие фрагменты ДНК всегда клонируются предпочтительнее длинных.

Примечание: в ряде случаев, колонии, содержащие рекомбинантные плазмиды с клонированными короткими (нецелевыми) фрагментами, могут быть окрашены в синий или голубой цвета, что является известным ограничением метода отбора клонов посредством бело-голубой селекции.

Наборы и сервисы Евроген

Н >>> – ссылка на страницу НАБОРА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот **Н** >>>

С >>> – ссылка на страницу СЕРВИСА

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **Н** >>>

Синтез и амплификация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Клонирование ДНК **Н** >>> **С** >>>

Выявление контаминации микоплазмой **Н** >>>

Оценка ДНК **Н** >>>

Нормализация кДНК **Н** >>> **С** >>>

Практикум по генной инженерии **Н** >>>

Генотипирование **Н** >>>

Синтез олигонуклеотидов и зондов **С** >>>

Секвенирование по Сэнгеру **С** >>>

NGS секвенирование **С** >>>

Синтез генов **С** >>>

Сайт-направленный мутагенез **С** >>>

Консультация по продуктам: support@evrogen.ru

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

ЗАО Евроген
Москва 117997
ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15
Тел.: +7 (495) 784-7084
order@evrogen.ru
www.evrogen.ru