

## рAL2-T вектор

Версия 02 от 1 марта 2018 г.

Продукт	Кат. #	Количество
рAL2-T вектор	TA002	1.25 мкг (на 25 реакций)

**Лиофильно высушенный продукт.**

**Хранение:** -20°C

**Транспортировка:** комнатная температура (не более недели) либо -20°C

**Срок хранения:** при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год.

рAL2-T вектор предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами. Вектор представляет собой линейизованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в рAL2-T вектор основано на способности Taq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин. Таким образом, продукт ПЦР и рAL2-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».

Фасовка содержит лиофилизированный вектор, который необходимо растворить в 25 мкл деионизированной воды (до концентрации 50 нг/мкл). Этого количества достаточно для постановки 25 стандартных реакций лигирования объемом 10 мкл.

Векторы рAL2-T и рKAN-T (кат. #TA003) несут гены устойчивости к антибиотикам:

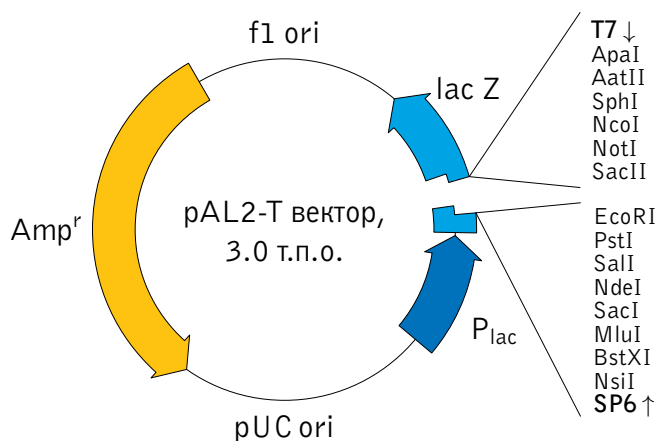
- рAL2-T – к ампициллину;
- рKAN-T – к канамицину.

Различная устойчивость существенно облегчает переклонирование ампликонов и последующую работу с клонированными фрагментами ДНК. Возможность смены устойчивости к антибиотику (ампициллин на канамицин, и наоборот) позволяет исключить возможность роста колоний с исходной плазмидой, что упрощает манипуляции при переклонировании фрагментов из TA-векторов в специализированные вектора. Отказ от обязательной в ряде случаев и трудоемкой стадии очистки продуктов ПЦР/рестрикции через агарозный гель сокращает время клонирования и уменьшает потери ДНК.

## Основные свойства рAL2-Т вектора:

- Клонирование ПЦР-продуктов в вектор не требует дополнительной 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 размораживания/замораживания без снижения эффективности клонирования.

## Карта вектора и структура полилинкера



## Дополнительные необходимые реагенты

1. T4 ДНК лигаза (100-200 ед/мкл) с соответствующим буфером.
  - ▶ Рекомендуем использовать Quick-TA T4 ДНК лигазу (кат. #ТАК02), входящую в состав набора для быстрого лигирования продуктов ПЦР.
2. 5-10 мМ Трис-НСl (рН=7.5-8.5) для растворения очищенного фрагмента ДНК.
3. Набор для выделения ДНК из реакционных смесей.
  - ▶ Например, наборы Cleanup Standard (кат. #BC022), или Cleanup Mini (кат. #BC023).
4. Компетентные клетки (компетентность не менее  $1 \times 10^7$  КОЕ/мкг).
  - ▶ Например, компетентные клетки для химической трансформации XL1-Blue (кат. #CC001), или BL21(DE3) (кат. #CC002), или JM110(dam-) (кат. #CC003); компетентные клетки для электрической трансформации XL1-Blue (кат. ##CC004S, CC004M).

## Протокол лигирования продукта ПЦР

- ▶ Перед первым использованием растворите лиофилизированный pAL2-T вектор в 25 мкл деионизированной воды.
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	Стандартная реакция	Контрольная реакция
Стерильная вода	до 10 мкл	до 10 мкл
10X лигазный буфер / 5X лигазный буфер	1 мкл / 2 мкл	1 мкл / 2 мкл
pAL2-T вектор (50 нг/мкл)	1 мкл	1 мкл
ПЦР продукт	X мкл*	–
T4 ДНК лигаза (100-200 ед/мкл)	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:

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

3. Перемешайте компоненты реакции, сбросьте капли со стенок пробирки путем импульсного откручивания.
  4. Инкубируйте реакцию в течении времени, рекомендованного для используемой системы лигирования.
  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  $1 \times 10^7$  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.

- Для эффективной трансформации объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема 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 $1 \times 10^7$ КОЕ/мкг.
В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей.	Очистите реакционную смесь на колонке или путём пересадки этанолом.
Слишком большой объём добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси.	Объём реакционной смеси не должен превышать 10% от объёма 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 или лигаза плохо подходит для TA-лигирования.	Замените препарат лигазы. Рекомендуется использовать Набор для быстрого лигирования продуктов ПЦР (кат. #ТАКО2).
Присутствие ингибирующих агентов в образцах ДНК.	ПЦР продукт должен быть очищен от таких ингибирующих процесс лигирования агентов, как избыток солей, ЭДТА, фенол, спирт и т.д. Очистите образцы на колонках, через агарозный гель или методом экстракции фенолом.

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.</p> <p>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 вставками, могут быть окрашены в синий или голубой цвета, что является ограничением метода бело-голубой селекции.

# Продукты и услуги компании Евроген

## Молекулярная биология

Наборы для выделения и очистки

нуклеиновых кислот **P**▶▶▶

Маркеры длин ДНК **P**▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ **P**▶▶▶

Приготовление библиотек кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Синтез кДНК и RACE **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Клонирование ДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Нормализация кДНК **P**▶▶▶ **S**▶▶▶

Практикум по генной инженерии **P**▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов **S**▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру **S**▶▶▶

Секвенирование следующего поколения (NGS) **S**▶▶▶

Синтез генов **S**▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)

**P**▶▶▶ – ссылка на страницу  
ПРОДУКТА

**S**▶▶▶ – ссылка на страницу  
УСЛУГИ

## Клеточная биология

Выявление микоплазменной контаминации **P**▶▶▶

Флуоресцентные белки **P**▶▶▶

Генетически-кодируемые сенсоры и фотосенсибилизаторы **P**▶▶▶

Антитела против флуоресцентных белков **P**▶▶▶

Временная трансфекция клеточных линий **S**▶▶▶

Конструирование и сборка лентивирусных частиц **S**▶▶▶

Создание стабильно трансфицированных клеточных линий **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [customer-support@evrogen.ru](mailto:customer-support@evrogen.ru)

## Молекулярно-генетические исследования

Исследования в области молекулярной онкологии

и генетики наследственных заболеваний **S**▶▶▶

*Техническая поддержка:* [oncology@evrogen.ru](mailto:oncology@evrogen.ru)

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](http://www.evrogen.ru)