

рAL2-T вектор

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.

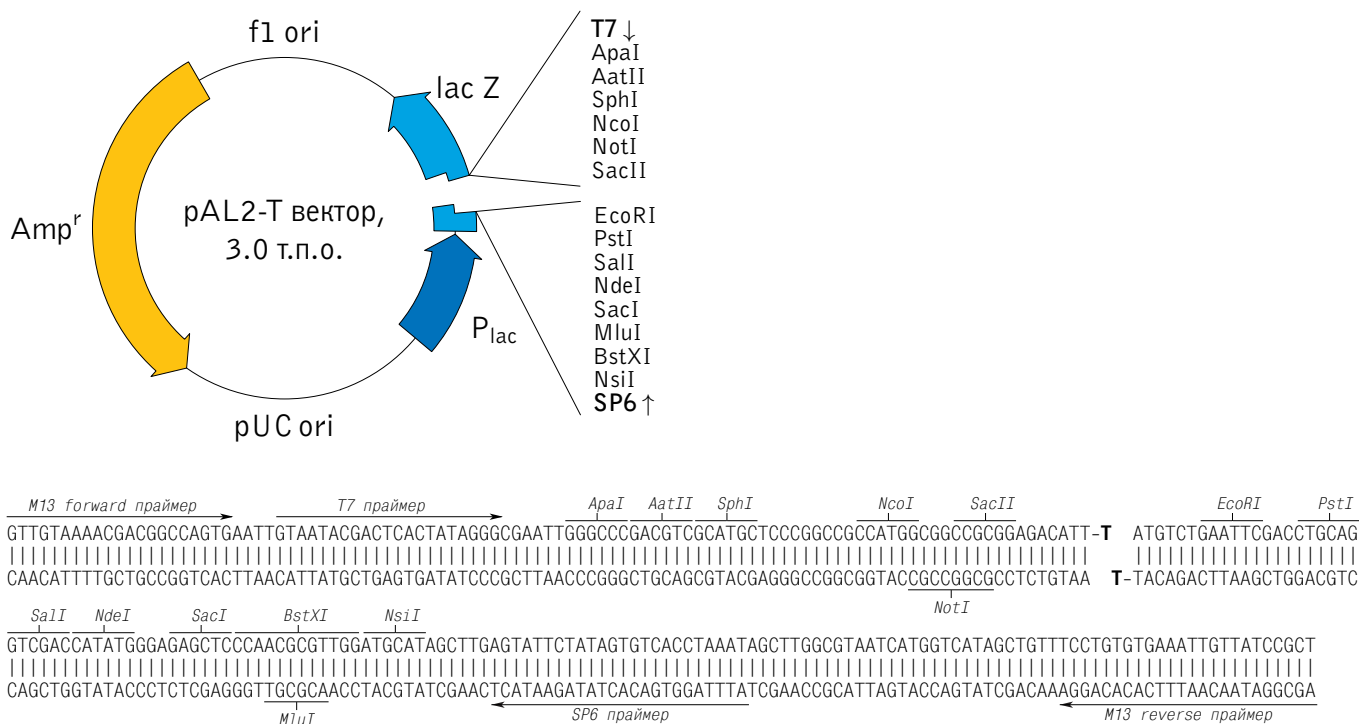
рAL2-T вектор предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами. Вектор представляет собой линейризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в рAL2-T вектор основано 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.

Основные свойства рAL2-T вектора:

- В 10 раз более высокая эффективность клонирования по сравнению с рAL-TA 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-T 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, входящую в состав набора для быстрого лигирования продуктов ПЦР, кат. #ТАК02.
2. 5-10 мМ Трис-НСI (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 1×10^7 КОЕ/мкг).
 - ▶ Например, компетентные клетки для химической трансформации XL1-Blue, кат. #CC001.

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 клонируются 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 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 1×10^7 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 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.	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 ТА-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. 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.

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