

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.

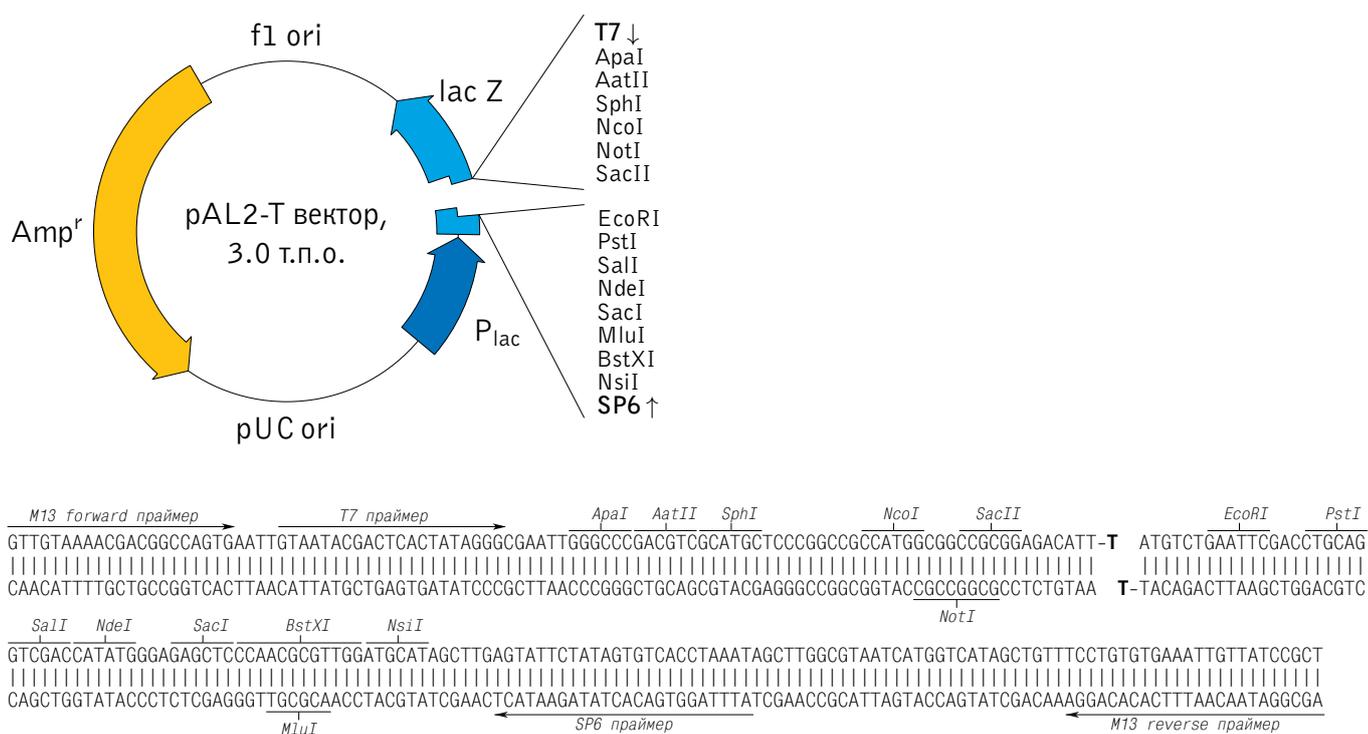
pAL2-T вектор

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:

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

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

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 матричную 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.

Наборы и сервисы Евроген

 – ссылка на страницу НАБОРА

 – ссылка на страницу СЕРВИСА

Выделение и очистка нуклеиновых кислот 

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ 

Синтез и амплификация кДНК  

Клонирование ДНК  

Выявление контаминации микоплазмой 

Оценка ДНК 

Нормализация кДНК  

Практикум по генной инженерии 

Генотипирование 

Синтез олигонуклеотидов и зондов 

Секвенирование по Сэнгеру 

NGS секвенирование 

Синтез генов 

Сайт-направленный мутагенез 

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