

# рAL2-T вектор

Линеаризованная плаزمида для клонирования ПЦР-продуктов

Номер по каталогу:  
ТА002 — на 25 реакций

Инструкция по применению

## Оглавление

1. Назначение .....	4
2. Преимущества .....	4
3. Состав .....	4
4. Условия хранения и транспортировки .....	4
5. Количество реакций .....	4
6. Метод .....	5
7. Основные характеристики .....	5
8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы .....	6
9. Биологический материал .....	6
10. Протокол .....	6
11. Возможные проблемы и способы их решения .....	9

## 1. Назначение

pAL2-T вектор — линейризованная плаزمида, предназначенная для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами. Вектор несет ген устойчивости к ампициллину.

**Только для использования в научно-исследовательских целях.**

## 2. Преимущества

- 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.
- Растворенный в воде pAL2-T вектор выдерживает не менее 10 циклов размораживания/замораживания без снижения эффективности клонирования.

## 3. Состав

Компонент	Количество
pAL2-T vector, lyophilized	1.25 мкг

## 4. Условия хранения и транспортировки

**Хранение:** –20 °С.

**Транспортировка:** при комнатной температуре.

**Срок годности:** 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

## 5. Количество реакций

Набор рассчитан на 25 реакций объемом 10 мкл.

## 6. Метод

рAL2-Т вектор представляет собой линейаризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в рAL2-Т вектор основано на способности Taq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин. Таким образом, продукт ПЦР и рAL2-Т вектор несут выступающие комплементарные 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает значительно более высокую эффективность лигирования по сравнению с лигированием «втую».

## 7. Основные характеристики

- рAL2-Т несет ген устойчивости к ампициллину.
- Рекомендуемый размер вставки — до 1 000 п.о. Клонирование фрагментов большего размера возможно, однако эффективность такого клонирования значительно снижается.

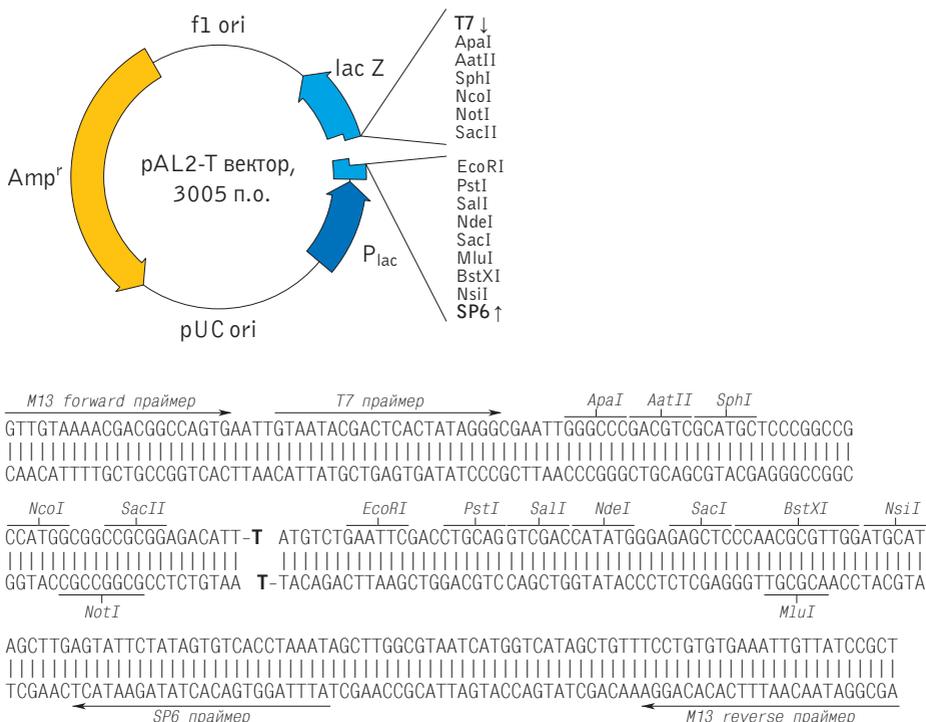


Рисунок 1 — карта вектора и структура полилинкера.

## 8. Необходимое оборудование и дополнительные материалы

- Термостат.
- Вортекс.
- Мини-центрифуга.
- Автоматические дозаторы на 10, 20 и 200 мкл.
- Наконечники для дозаторов с фильтрами.
- Микроцентрифужные пробирки.
- Перчатки для рук неопудренные.
- T4 ДНК лигаза (кат. ## LK101S/L, Евроген).
- Overnight ligation буфер (кат. # LB001, Евроген) или Quick ligation буфер (кат. # LB002, Евроген).
- Вода деионизированная, свободная от нуклеаз (кат. ## PB207S/M/L, Евроген).
- Набор для выделения ДНК из реакционных смесей: Cleanup St PCR (кат. ## BC025S/L, Евроген), Cleanup Standard (кат. ## BC022S/L, Евроген), Cleanup S-Cap (кат. ## BC041S/L, Евроген) или Cleanup Mini (кат. ## BC023S/L, Евроген).

## 9. Биологический материал

Свежеприготовленный ПЦР-продукт, полученный с помощью Taq-полимеразы или ее аналогов, нематрично присоединяющих дезоксиаденозин на 3'-конец ампликона.

## 10. Протокол

### 10.1 Подготовка биоматериала и компонентов

1.1. Произведите очистку свежеприготовленного ПЦР-продукта (присутствие следов полимеразы и ПЦР буфера в лигазной смеси может привести к снижению эффективности лигирования в 2–3 раза).

Используйте колоночные наборы для выделения ДНК из реакционных смесей или метод фенольной экстракции с последующим переосаждением этанолом.

- ▶ Для работы используйте только свежеприготовленный ПЦР-продукт. Если это невозможно, сразу после завершения ПЦР проведите очистку ампликона из реакционной смеси и заморозьте до момента постановки реакции лигирования. Очищенный и замороженный продукт пригоден к использованию в течение 1 дня.

1.2. Перед первым использованием растворите лиофилизированный рAL2-T вектор в 25 мкл деионизированной воды для получения раствора рAL2-T в концентрации 50 нг/мкл.

## 10.2 Лигирование

- ▶ Все манипуляции проводите на льду или в холодовом штативе.

2.1. Рассчитайте необходимый объем компонентов реакционной смеси и замешайте в следующем порядке для каждого образца отдельно:

Компонент	Количество, мкл
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 10 мкл
Лигазный буфер	согласно инструкции к буферу
рAL2-T вектор (50 нг/мкл)	1 мкл
ПЦР-продукт	X нг*
T4 ДНК лигаза	1–2 мкл**

\* Оптимальное соотношение количества ПЦР-продукта и вектора в реакции лигирования зависит от природы клонируемого материала. Если клонируются одиночные ампликоны, рекомендуется использовать 3-х кратный избыток вставки (в молях). В случае клонирования пула ампликонов избыток вставки увеличивают до 8–10 кратного. Для расчета количества ПЦР-продукта для лигирования в рAL2-T вектор можно воспользоваться следующей формулой:

$$X \text{ (нг)}_{\text{вставки}} = \frac{\text{избыток вставки (от 3 до 10)} \times \text{длина вставки (п.о.)} \times \text{количество вектора N (нг)}}{\text{длина вектора (п.о.)}}$$

\*\* Рекомендуется добавлять в реакцию 100–200 е.а. лигазы, но не более 2 мкл.

2.2. Аккуратно перемешайте содержимое пробирок, сбросьте капли кратким центрифугированием.

2.3. Инкубируйте реакцию в течение времени, рекомендованного для используемой системы лигирования.

2.4. После окончания реакции сразу поместите пробирку на –20 °С.

- ▶ Не храните лигат при +4 °С.

## 10.3 Трансформация *E.coli*

3.1. Используйте любой стандартный протокол трансформации *E.coli* лигазной смесью.

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.

3.2. Для химической (кальциевой) трансформации используйте:

- компетентные клетки, например, XL1-Blue (кат. # CC001, Евроген);
- неочищенный лигат (инактивация лигазы не требуется) в количестве 5–10 мкл на 100 мкл клеточной суспензии.

3.3. Для электротрансформации (электропорации) используйте:

- компетентные клетки, например, XL1-Blue (кат. # CC004M, Евроген);
- очищенный от солей лигат в количестве 5 мкл на 100 мкл клеточной суспензии;
- стандартный протокол электропорации.

Для эффективной трансформации объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток.

## 11. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Низкая эффективность трансформации или полное отсутствие колоний на чашке.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Низкая эффективность компетентных клеток.</li><li>2. В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей.</li><li>3. Слишком большой объем добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси.</li><li>4. Низкая эффективность лигирования.</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проверьте эффективность трансформации добавлением 0.1 нг суперскрученной плазмидной ДНК (обычно pUC) к компетентным клеткам. Используйте свежие компетентные клетки с эффективностью не ниже <math>1 \times 10^7</math> КОЕ/мкг.</li><li>2. Очистите реакционную смесь на колонке или путем переосаждения этанолом.</li><li>3. Объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток.</li><li>4. См. следующий пункт.</li></ol>
2. Количество синих колоний доминирует над количеством белых вне зависимости от общего количества выросших колоний. Низкая эффективность лигирования.	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Активность T4-ДНК лигазы слишком низка или лигаза плохо подходит для TA-лигирования.</li><li>2. Размер клонируемой вставки превышает 1.0–1.5 т.п.о.</li><li>3. Клонировемый материал (кДНК или фрагмент) был приготовлен ранее, чем за 24 часа до постановки реакции лигирования, что привело к потере молекулами ДНК выступающих 3'-дезоксиаденозинов.</li><li>4. Клонировемый фрагмент не содержит на 3'-концах выступающих 3'-дезоксиаденозинов.</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Убедитесь в правильном хранении набора. Фермент нельзя прогревать до комнатной температуры, во время работы необходимо использовать холодовой штатив или тару со льдом. При необходимости замените T4-ДНК лигазу.</li><li>2. Увеличьте количество вставки. В случае клонирования длинных вставок или кДНК используйте 8–10 кратный избыток вставки.</li><li>3. Приготовьте свежий препарат ДНК для клонирования (продукт амплификации должен храниться не более суток перед постановкой реакции лигирования).</li><li>4. Использование полимераз с корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью существенно снижает количество выступающих 3'-нуклеотидов. Для ПЦР с последующим клонированием в pAL2-T вектор рекомендуется использовать полимеразы, рекомендованные производителем для TA-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.</li></ol>

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
3. Подавляющее большинство выросших колоний имеют синюю или голубую окраску, при этом плазмиды в выросших колониях содержат вставки.	1. Плазмиды в выросших колониях содержат короткие нецелевые вставки.	1. Клонировемый 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.
	2. Плазмиды в выросших колониях содержат целевую вставку.	2. Клонировемый 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.

## Возможно приобрести дополнительно

Кат. #	Продукт	Количество
<b>BC022S</b>	Cleanup Standard	50 реакций
<b>BC022L</b>		250 реакций
<b>BC023S</b>	Cleanup Mini	50 реакций
<b>BC023L</b>		250 реакций
<b>BC025S</b>	Cleanup St PCR	50 реакций
<b>BC025L</b>		250 реакций
<b>BC041S</b>	Cleanup S-Cap	50 реакций
<b>BC041L</b>		250 реакций
<b>CC001</b>	XL1-Blue для химической трансформации	10 x 100 мкл
<b>CC004M</b>	XL1-Blue для электрической трансформации	6 x 40 мкл
<b>LB001</b>	Overnight ligation буфер	1 мл (4 x 250 мкл)
<b>LB002</b>	Quick ligation буфер	1 мл (4 x 250 мкл)
<b>LK101S</b>	T4 ДНК лигаза	50 реакций
<b>LK101L</b>		250 реакций
<b>PB207S</b>	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)

## Наборы и сервисы Евроген

Выделение и очистка нуклеиновых кислот [Н](#)▶▶▶

Реактивы для ПЦР и ПЦР-РВ [Н](#)▶▶▶

Синтез и амплификация кДНК [Н](#)▶▶▶

Клонирование ДНК [Н](#)▶▶▶ [С](#)▶▶▶

Выявление контаминации микоплазмой [Н](#)▶▶▶

Оценка ДНК [Н](#)▶▶▶

Нормализация кДНК [Н](#)▶▶▶

Практикум по геной инженерии [Н](#)▶▶▶

Генотипирование [Н](#)▶▶▶

Синтез олигонуклеотидов и зондов [С](#)▶▶▶

Секвенирование по Сэнгеру [С](#)▶▶▶

Синтез генов [С](#)▶▶▶

Сайт-направленный мутагенез [С](#)▶▶▶

[Н](#)▶▶▶ – ссылка на страницу  
НАБОРА

[С](#)▶▶▶ – ссылка на страницу  
СЕРВИСА

Консультация по продуктам: [support@evrogen.ru](mailto:support@evrogen.ru)

Подробную информацию о наших наборах и сервисах  
можно получить на сайте [www.evrogen.ru](http://www.evrogen.ru)

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