

рKAN-T вектор

Версия 03 от 15 февраля 2022 г.

Продукт	Кат. #	Количество
рKAN-T вектор	TA003	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.

Назначение:

рKAN-T вектор предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами.

Описание продукта:

Вектор представляет собой линейризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в рKAN-T вектор основано на способности Taq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конец синтезированной цепи ДНК дезоксиаденозин. Таким образом, продукт ПЦР и рKAN-T вектор несут выступающие комплементарные 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает значительно более высокую эффективность лигирования по сравнению с лигированием «втупую». 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 рKAN-T и рAL2-T (кат. #TA002) несут гены устойчивости к антибиотикам:

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

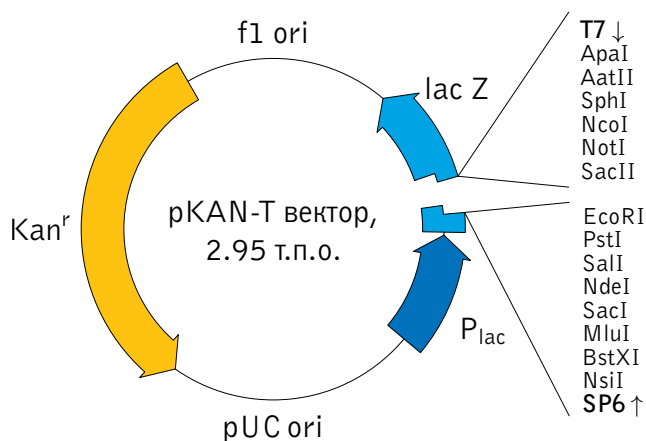
Различная устойчивость существенно облегчает переклонирование ампликонов и последующую работу с клонированными фрагментами ДНК. Возможность смены устойчивости к антибиотику (ампициллин на канамицин, и наоборот) позволяет исключить возможность роста колоний с исходной плазмидой, что упрощает манипуляции 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.

Использование канамицина в качестве селективного антибиотика исключает проблему вторичного роста колоний и существенно увеличивает выход плазмидной ДНК при стандартных выделениях.

Основные свойства рKAN-T вектора:

- Клонирование ПЦР-продуктов в вектор не требует дополнительной ферментативной обработки;
- рKAN-T несет ген устойчивости к канамицину;
- 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 рKAN-T вектор выдерживает не менее 10-15 циклов размораживания/замораживания без снижения эффективности клонирования.
- Рекомендуемый размер вставки — до 1 000 п.о. Клонирование фрагментов большего размера возможно, однако эффективность такого клонирования резко снижается.

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 1×10^7 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 pKAN-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
pKAN-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 pKAN-T вектор можно воспользоваться следующей формулой:

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

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 $+4^{\circ}\text{C}$.

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 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 1×10^7 КОЕ/мкг.
В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей.	Очистите реакционную смесь на колонке или путем пересадки этанолом.
Слишком большой объем добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси.	Объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема 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.
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'-дезоксиаденозинов.</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'-дезоксиаденозинов.</p>	<p>Использование полимераз с корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью существенно снижает количество выступающих 3'-нуклеотидов. Для ПЦР с последующим клонированием в рKAN-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.



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