Quick-TA kit

Набор для быстрого клонирования ПЦР-продуктов

Номер по каталогу:
ТАК02 — на 50 реакций

Инструкция по применению

Версия 6 от 13 февраля 2025 г.

Оглавление

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

1. Назначение

Набор Quick-TA предназначен для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или экзонуклеазами.

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, liophilized	2.5 мкг (2 x 1.25 мкг)
Quick-TA T4 DNA ligase (200 u/µl)	50 мкл
5X Quick ligation buffer	200 мкл
10X Overnight ligation buffer	200 мкл
M13 Forward primer (10 µM)	400 мкл
M13 Reverse primer (10 µM)	400 мкл

4. Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °C.

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

5. Количество реакций

Набор рассчитан на 50 реакций объемом 10 мкл.

6. Метод

pAL2-T вектор представляет собой линеаризованную 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 A:T. Наличие таких «липких» концов обеспечивает значительно более высокую эффективность лигирования по сравнению с лигированием «втупую».

В состав набора входит рекомбинантная Quick-TA T4 ДНК лигаза. Фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами двухцепочечной ДНК и использует АТФ в качестве кофактора (в присутствии Mg^{2+}).

Фермент ингибируется NaCl и KCl в концентрации 200 мМ, а также ЭДТА в концентрации 20 мМ. Температурная инактивация фермента наступает после десятиминутной инкубации при 65 °C или пятиминутной инкубации при 70 °C.

- *Ингибирование реакции лигирования путем добавления химических веществ приводит к необходимости очистки лигата для дальнейших ферментативных обработок или трансформации.*

За единицу активности Quick-TA T4 ДНК лигазы принимается 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.

Входящие в состав набора буферы позволяют проводить быстрое лигирование в течение 5–15 минут при комнатной температуре (5X Quick ligation buffer) и стандартное лигирование в течение 14–16 часов при 14 °C (10X Overnight ligation buffer). Быстрое лигирование хорошо подходит для клонирования одиночных ПЦР-продуктов. Для клонирования пула ампликонов рекомендуется использовать стандартный протокол.

7. Основные характеристики

- Компоненты набора позволяют проводить быстрое и стандартное (ночное) лигирование, а также скрининг колоний.
- pAL2-T несет ген устойчивости к ампициллину.
- Рекомендуемый размер вставки — до 1 000 п.о. Клонирование фрагментов большего размера возможно, однако эффективность такого клонирования резко снижается.

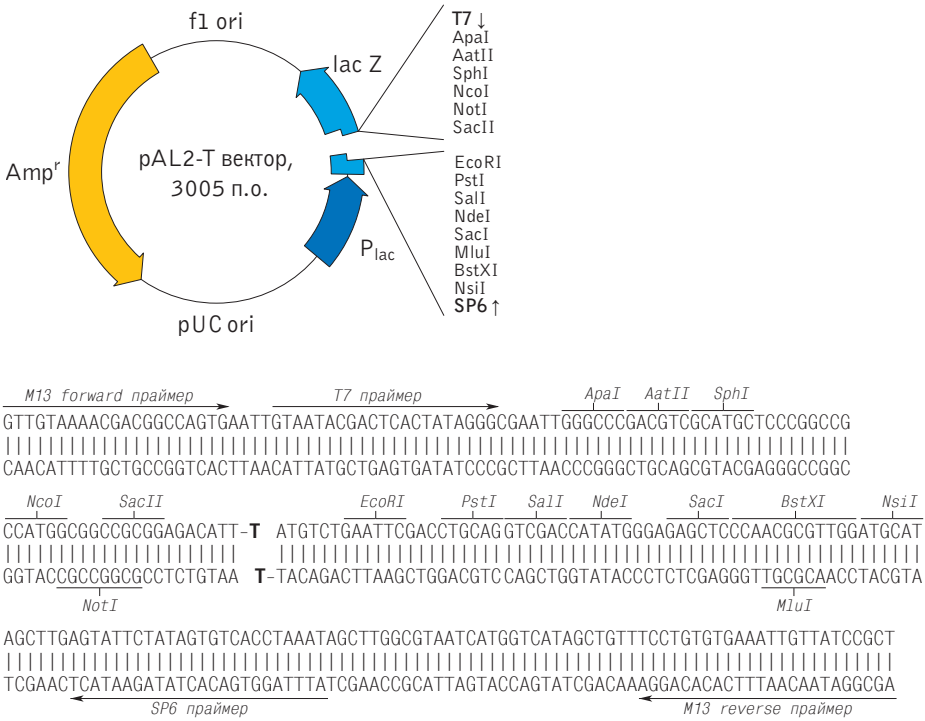

Рисунок 1 — карта вектора и структура полилинкера.

8. Меры предосторожности

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны для человека.

Не допускать проглатывания, попадания на слизистые и кожу.

При работе необходимо соблюдать зонирование помещений, использовать одноразовые неопудренные перчатки, халаты.

9. 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.
- Вода деионизированная (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).

10. Биологический материал

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

11. Протокол

11.1 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 pAL2-T вектор в 25 мкл деионизированной воды для получения раствора pAL2-T в концентрации 50 нг/мкл.

1.3. Рекомендуется разделить буферы для лигирования на аликвоты, чтобы минимизировать циклы разморозки/заморозки. Перед использованием тщательно перемешивайте буферы для лигирования.

11.2 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	Быстрое лигирование (5–15 мин. при комнатной температуре)	Стандартное лигирование (14–16 ч. при 14 °C)
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 10 мкл	до 10 мкл
5X Quick ligation buffer	2 мкл	—
10X Overnight ligation buffer	—	1 мкл
pAL2-T vector, liophilized	1 мкл	1 мкл
ПЦР-продукт	X нг*	X нг*
Quick-TA T4 DNA ligase	1 мкл	1 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 pAL2-T вектор можно воспользоваться следующей формулой:

$$X\,(\text{нг})_{\text{вставки}} = \frac{3 \div 10_{\text{избыток вставки}} \times \text{длина вставки (п.о.)} \times \text{количество вектора (нг)}}{3005\,(\text{п.о.})_{\text{длина pAL2-T вектора}}}$$

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 °C .

► *Не храните лигат при +4 °C .*

11.3 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 $1x10^7$ КОЕ/мкг.

3.2. Для химической (кальциевой) трансформации используйте:

– компетентные клетки, например, XL1-Blue (кат. # СС001, 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. # СС004М, 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.

12. Возможные проблемы и способы их решения

Возможные проблемы	Возможная причина	Варианты решения
1. Низкая эффективность трансформации или полное отсутствие колоний на чашке.	1. Низкая эффективность компетентных клеток.	1. Проверьте эффективность трансформации добавлением 0.1 нг суперскрученной плазмидной ДНК (обычно pUC) к компетентным клеткам. Используйте свежие компетентные клетки с эффективностью не ниже 1 x 10^7 КОЕ/мкг.
	2. В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей.	2. Очистите реакционную смесь на колонке или путем переосаждения этанолом.
	3. Слишком большой объем добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси.	3. Объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток.
	4. Низкая эффективность лигирования.	4. См. следующий пункт.
2. Количество синих колоний доминирует над количеством белых вне зависимости от общего количества выросших колоний. Низкая эффективность лигирования.	1. Активность T4-ДНК лигазы слишком низка или лигаза плохо подходит для TA-лигирования.	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.
	2. Размер клонируемой вставки превышает 1.0–1.5 т.п.о.	2. Увеличьте количество вставки. В случае клонирования длинных вставок или кДНК используйте 8–10 кратный избыток вставки.
	3. 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.	3. Приготовьте свежий препарат ДНК для клонирования (продукт амплификации должен храниться не более суток перед постановкой реакции лигирования).
	4. Клонируемый фрагмент не содержит на 3'-концах выступающих 3'-дезоксиаденозинов.	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 A, тогда как наиболее эффективно добавление происходит в случае последнего нуклеотида C. Таким образом, по возможности следует использовать нуклеотид G и избегать присутствия нуклеотида T на 5'-концах праймеров для ПЦР.

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. Клонируемый 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. Клонируемый 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
BC022S	Cleanup Standard	50 реакций
BC022L		250 реакций
BC023S	Cleanup Mini	50 реакций
BC023L		250 реакций
BC025S	Cleanup St PCR	50 реакций
BC025L		250 реакций
BC041S	Cleanup S-Cap	50 реакций
BC041L		250 реакций
CC001	XL1-Blue для химической трансформации	10 x 100 мкл
CC004M	XL1-Blue для электрической трансформации	6 x 40 мкл
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	1.5 мл
PB207M		50 мл
PB207L		1 л

Наборы и сервисы Евроген

Н ▸▸▸ – ссылка на страницу НАБОРА

С ▸▸▸ – ссылка на страницу СЕРВИСА

- 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 генной инженерии Н ▸▸▸
- Генотипирование Н ▸▸▸
- Синтез олигонуклеотидов и зондов С ▸▸▸
- Секвенирование по Сэнгеру С ▸▸▸
- Синтез генов С ▸▸▸
- Сайт-направленный мутагенез С ▸▸▸

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