

рKAN-T вектор

Линеаризованная плазмида для клонирования ПЦР-продуктов

Номер по каталогу:
TA003 — 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

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

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 pKAN-T вектор выдерживает не менее 10 циклов размораживания/замораживания без снижения эффективности клонирования.

3. Состав

Компонент	Количество
pKAN-T vector, liophilized	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

рKAN-T вектор представляет собой линейаризованную 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 «втую».

7. Основные характеристики

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

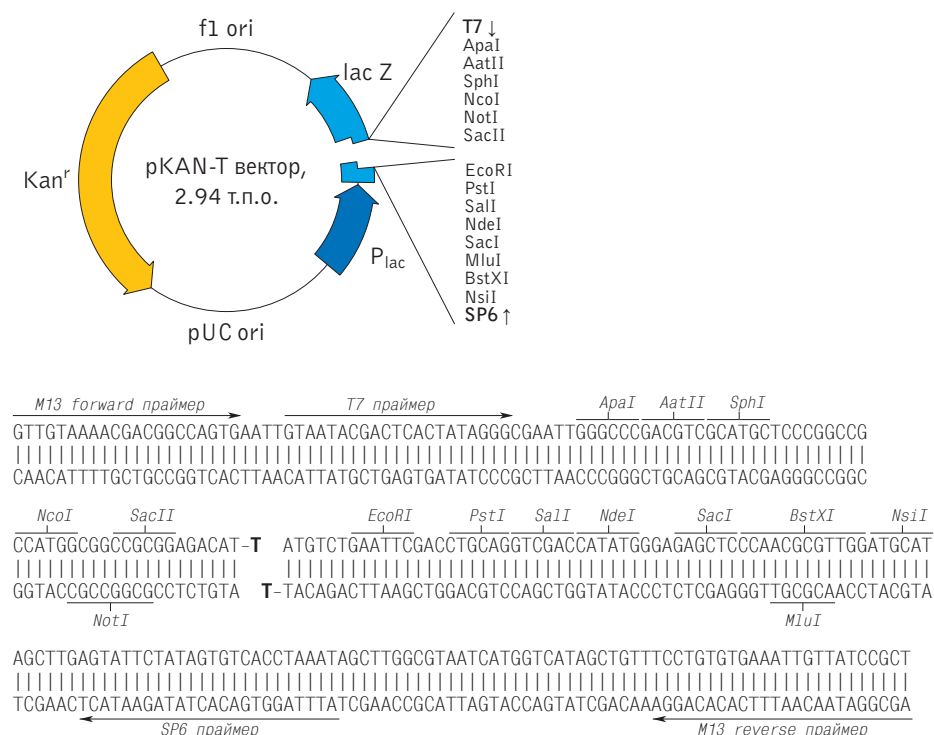


Рисунок 1 — карта вектора и структура полилинкера.

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 pKAN-T вектор в 25 мкл деионизированной воды для получения раствора pKAN-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
pKAN-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 pKAN-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 1×10^7 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.	1. Низкая эффективность компетентных клеток. 2. В случае использования электропорации реакционная смесь не была очищена от солей. 3. Слишком большой объем добавленной к компетентным клеткам реакционной смеси. 4. Низкая эффективность лигирования.	1. Проверьте эффективность трансформации добавлением 0.1 нг суперскрученной плазмидной ДНК (обычно pUC) к компетентным клеткам. Используйте свежие компетентные клетки с эффективностью не ниже 1×10^7 КОЕ/мкг. 2. Очистите реакционную смесь на колонке или путем переосаждения этанолом. 3. Объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток. 4. См. следующий пункт.
2. Количество синих колоний доминирует над количеством белых вне зависимости от общего количества выросших колоний. Низкая эффективность лигирования.	1. Активность Т4-ДНК лигазы слишком низка или лигаза плохо подходит для ТА-лигирования. 2. Размер клонируемой вставки превышает 1.0–1.5 т.п.о. 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. 4. Клонировемый фрагмент не содержит на 3'-концах выступающих 3'-дезоксиаденозинов.	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 Т4-ДНК лигазу. 2. Увеличьте количество вставки. В случае клонирования длинных вставок или кДНК используйте 8–10 кратный избыток вставки. 3. Приготовьте свежий препарат ДНК для клонирования (продукт амплификации должен храниться не более суток перед постановкой реакции лигирования). 4. Использование полимераз с корректирующей 3'-5' экзонуклеазной активностью существенно снижает количество выступающих 3'-нуклеотидов. Для ПЦР с последующим клонированием в rKAN-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.

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. 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. 2. 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.
	2. Плазмиды в выросших колониях содержат целевую вставку.	

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
LB001	Overnight ligation буфер	1 мл (4 x 250 мкл)
LB002	Quick ligation буфер	1 мл (4 x 250 мкл)
LK101S	T4 ДНК лигаза	50 реакций
LK101L		250 реакций
PB207S	Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	7.5 мл (5 x 1.5 мл)
PB207M		50 мл
PB207L		1 л

Наборы и сервисы Евроген

    – ссылка на страницу
НАБОРА

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   

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