

nr kat. 1024-10



10 reakcji

OverLap™ Assembly



A&A BIOTECHNOLOGY, Aleja Zwycięstwa 96/98, 81-451 Gdynia, Poland
tel +48 58 6982194, fax +48 58 6228578, www.aabiot.com, info@aabiot.com

OverLap™ Assembly

Protokół

1. Przygotuj oczyszczone fragmenty DNA* (wektor i insert) o odpowiednim stężeniu, zawieszony w wodzie wolnej od nukleaz. Fragmenty DNA powinny być zmieszane w stosunku równomolowym (wzór obliczenia stężeń na odwrocie instrukcji).

2. Wstaw probówkę do lodu i dodaj składniki reakcji wg poniższego schematu:

| Składnik reakcji | Zalecana ilość fragmentów DNA w pmolach | | |
|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | 2 fragmenty DNA* | 3-6 fragmentów DNA* | Reakcja kontrolna |
| Końcowa ilość fragmentów | 0,02-0,5 pmoles | 0,2-1,0 pmoles | 2 µl kontroli DNA** |
| 5x OverLap™ Assembly Buffer | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| Nucleotides | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| OverLap™ Assembly Enzyme Mix | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| Woda wolna od nukleaz | uzupełnić do 20 µl | uzupełnić do 20 µl | 12 µl |

3. Przenieś probówkę do termocyklera i inkubuj w 50 °C przez 15 min w przypadku składania 2 fragmentów lub przez 60 min gdy jest składanych 3-6 fragmentów. Po inkubacji, wstaw probówkę do lodu lub do -20 °C jeśli chcesz wykonać transformację w późniejszym terminie (maksymalnie 48 godzin).

4. Całość mieszaniny reakcyjnej przenieś do komórek kompetentnych *E.coli* według standardowego protokołu transformacji. Zalecamy użycie 950 µl pożywki SOC dla wzrostu komórek *E.coli* natychmiast po szoku termicznym lub elektroporacji. Transformowane komórki będące w pożywce SOC powinny być inkubowane w temp. 37 °C przez 60 min i energicznie wytrząsane.

Uwagi:

* Jeden z fragmentów stanowi wektor

** Kontrola DNA jest złożona z wektora pUC19/Sma I i fragmentu DNA faga Lambda (o długości 1000 pz).

Właściwy przebieg procedury klonowania prowadzi do uzyskania co najmniej 100 kolonii dla reakcji kontrolnej.

nr kat. 1024-10

10 reakcji



nr kat. 1024-10

10 reakcji

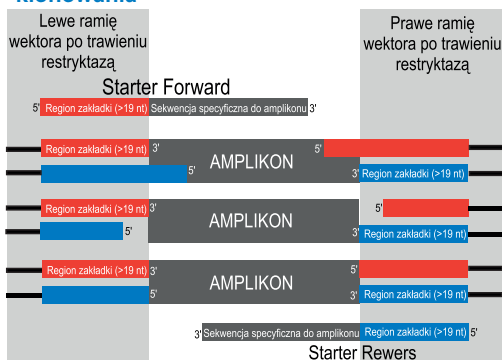


OverLap™ Assembly

Zastosowanie

1. Klonowanie produktu PCR.
2. Jednoczesne klonowanie kilku produktów PCR do jednego wektora.
3. Mutageniza ukierunkowana.
4. Usuwanie intronów; delecje; złożone klonowania.
5. Nokaut genowy - gene knockout.

Strategia projektowania starterów i klonowania



OverLap™ Assembly

Wzór obliczenia stężenia DNA

Aby obliczyć liczbę pmoli każdego fragmentu w oparciu o długość fragmentu i jego masę, zalecamy następujący wzór:

$$\text{ilość pmoli} = (\text{masa w ng}) \times 1000 / (\text{dł. pz} \times 650 \text{ daltonów})$$

| Długość fragmentu DNA (pz) | Ilość fragmentu DNA (0,1 pmole) |
|----------------------------|---------------------------------|
| 200 | 6,5 ng |
| 300 | 19,5 ng |
| 500 | 32,5 ng |
| 1000 | 65 ng |
| 2000 | 130 ng |
| 3000 | 195 ng |
| 4000 | 260 ng |
| 5000 | 325 ng |

A&A Biotechnology zaleca następujące zestawy do użycia w strategii OverLap™ Assembly:

- PCR Mix Rapid do amplifikacji produktów PCR
- Clean-Up Concentrator lub Gel-Out Concentrator do oczyszczania fragmentów DNA
- E.coli Transformer do przygotowania komórek kompetentnych *E.coli*

OverLap™ Assembly

Zawartość

1 x 32 µl OverLap™ Assembly Enzyme Mix
1 x 65 µl 5x OverLap™ Assembly Buffer
1 x 35 µl Nucleotides
1 x 1,5 ml Woda wolna od nukleaz
1 x 16 µl Kontrola DNA
4 x 4 ml Pożywka SOC

Przechowywać w -20 °C

Powtórne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na aktywność produktu.

Produkty powiązane

| | |
|-------------------------|---------------------|
| PCR Mix Rapid | 2009-100 |
| Walk DNA Polimeraza | 1002-200, 1002-1000 |
| Marathon DNA Polimeraza | 1003-200, 1003-1000 |
| EPPIC | 1021-1000 |
| Clean-Up Concentrator | 021-50C, 021-250C |
| Gel-Out Concentrator | 023-50C, 023-250C |
| KineX | 1008-20, 1008-100 |
| E.coli Transformer | 4020-240 |

Produkt opracowany, sprzedawany i przeznaczony wyłącznie do badań naukowych

Gibson, D.G. et al (2009). Nature Methods. 343-345, Gibson, D.G. et al. (2010). Nature Methods. 901-903

nr kat. 1024-10

10 reakcji



nr kat. 1024-10

10 reakcji



nr kat. 1024-10

10 reakcji

