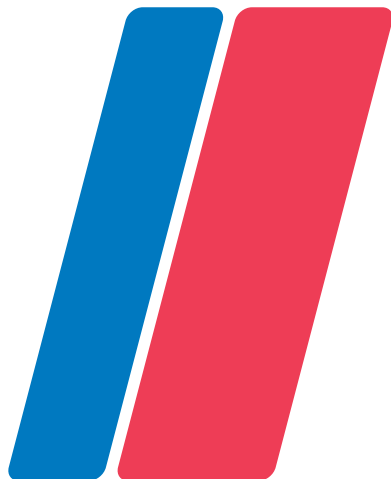


nr kat. 1024-50



50 reakcji



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

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. 1024-50

50 reakcji



nr kat. 1024-50

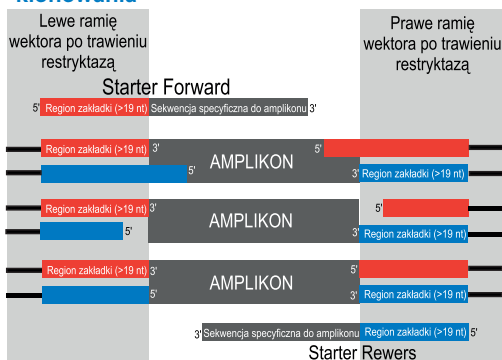
50 reakcji



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



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*

Zawartość

1 x 140 µl OverLap™ Assembly Enzyme Mix
1 x 270 µl 5x OverLap™ Assembly Buffer
1 x 140 µl Nucleotides
5 x 1,5 ml Woda wolna od nukleaz
1 x 25 µl Kontrola DNA
18 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. 1024-50

50 reakcji



nr kat. 1024-50

50 reakcji



nr kat. 1024-50

50 reakcji

