

Instrukcja

Liga5™

5-minutowy zestaw do ligacji DNA o końcach tępych i lepkich.

numer katalogowy	wielkość
1108-25	25 reakcji
1108-50	50 reakcji
1108-150	150 reakcji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Zalety

- szybka, 5-minutowa procedura.
- nawet 10-krotnie większa wydajność ligacji w porównaniu do metod tradycyjnych.

Opis

Zestaw do ligacji Liga5™ zawiera ligazę DNA faga T4, która katalizuje tworzenie wiązania fosfodiesterowego pomiędzy resztą fosforanową końca 5' i hydroksylową końca 3' w sąsiadujących fragmentach dwuniciowego DNA lub RNA, zakończonych na tępo lub lepko. Enzym odbudowuje pęknięcia jednej z nici dwuniciowego DNA, RNA bądź DNA-RNA. Ligaza faga T4 oczyszczana jest ze szczepu bakterii *E. coli* niosącego plazmid z wklonowanym genem g30 bakteriofaga T4.

W przypadku reakcji prowadzonych na DNA, zestaw Liga5™ pozwala na dziesięciokrotne podniesienie wydajności ligacji dla końców tępych oraz trzykrotne dla końców lepkich, w porównaniu do ligacji DNA metodami tradycyjnymi.

Mieszanina nie wykazuje aktywności w przypadku jednoniciowych kwasów nukleinowych.

Skład

	1108-25	1108-50	1108-150	przechowywanie
enzym Liga5™	28 µl	55 µl	165 µl	-20 °C
bufor Liga5™	140 µl	275 µl	825 µl	-20 °C
woda ultraczysta	1,5 ml	1,5 ml	2 x 1,5 ml	-20 °C – +20 °C

Uwagi

- Wektor i insert DNA muszą być zawieszone w wodzie lub w buforze Tris (10 mM Tris HCl pH 8.0).
- Zaleca się stosowanie typowych dla ligacji ilości wektora i insertu z zachowaniem stosunku molowego wektora do insertu 1:3 np. 0,020 pmola wektora do 0,060 pmola insertu.
- Nie należy inaktywować termicznie ligazy po etapie ligacji. Inaktywacja znacznie obniża wydajność transformacji.
- Nie zaleca się wydłużania czasu ligacji ponad 10 min.

Protokół

1. Przygotować w probówce umieszczonej w lodzie następującą reakcję:

Uwaga. Ilości wektora i insertu (ng) są podane przykładowo dla wektora o wielkości 4 000 p. z. i insertu o wielkości 1000 pz.

	objętość reakcji
składnik	20 µl
enzym Liga5™	1 µl
bufor Liga5™	5 µl
wektor DNA	0,02 pmol*
insert DNA	0,06 pmol*
woda ultraczysta	uzupełnić do 20 µl

* wzór obliczenia stężenia DNA patrz. str. 5

2. Wymieszać przez pipetowanie.
3. Inkubować 5 min w temp. pokojowej (21°C - 23°C).
4. Schłodzić w lodzie do czasu transformacji lub przechowywać w temp. -20 °C.

Wzór obliczania stężenia DNA

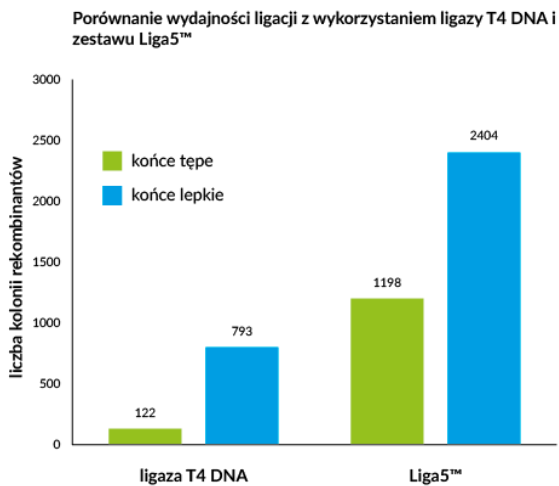
Aby obliczyć liczbę pmoli każdego fragmentu w oparciu o długość fragmentu i jego masę, zalecamy następujący wzór:

ilość pmoli = (masa w ng) x 1000 / (dł. w pz x 650 daltonów)

długość fragmentu DNA (pz)	ilość fragmentów DNA (0,1 pmoli)
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

Transformacja komórek *E. coli*

Mieszanina reakcyjna może być bezpośrednio użyta do transformacji komórek bakterii *E. coli* metodami chemicznymi lub z użyciem techniki elektroporacji.





A&A BIOTECHNOLOGY

innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

