TA Cloning Vector (کیت کلونینگ)

شماره کاتالوگ (BP-153)

مقادیر و غلظت	Component	محتویات و اجزای کیت
30 ng/µl 50 µl	Vector PTZ	وکتور PTZ خطی باز با انتهای 3’ overhang Thymine به طول ۲۸۸۶ bp
5 IU/ µl 30 µl	T4 DNA ligaze	آنزیم متصل کننده
200 µl	5X ligation Buffer	بافر برای واکنش لیگیشن
60 µl	Control Fragment	محصول PCR
60 µl	Control 1	پلاسمید حلقوی سوپرکویل حلقوی دست نخورده
20 ng/ µl 30 µl	Control 2	پلاسمید حلقوی سوپرکویل حلقوی با طول 4000 bp
50ml	BP-Medium	محیط LB سوپلمنت با آمپی سیلین
15 ml	BP-solution	محلول باز کننده دیواره باکتری

مشخصات فنی:

این کیت جهت کلونینگ محصولات PCR با انتهاي 3' – dA overhang مي باشد. اين كيت داراي وكتور PTZ57 R/T كه در هنگام ترانسفورم شدن در سلول هاي مستعد[1] نظير سويه هاي DH5a و XL1 Blue به تعداد زيادی از پلاسميد های نوترکيب وارد سلول باكتري مي شود و جزء وكتورهاي High-Copy Number Plasmid محسوب مي گردد و و به تعداد 300-700 كپي از اين پلاسميد مي تواند در يك سلول باكتري قرار بگيرد. ميزان غلظت بالاي از توالي هدف كلون شده را فراهم آورد. در اين سيستم بعد از قراردادن محصول PCR به مدت ۳۰-۲۰ دقيقه در حضور آنزيم Taq Polymerase به دو انتهای 5’ از يک رشته و به انتهايی 3’ از رشته مكمل آن باز آدنين اضافه می شود. از طرفی به دليل اينكه در دو سر پلاسميد خطی باز تيمين قرار دارد بنابراين در طی فرايندە كلونينگ محصول PCR با مكمل خود در پلاسميد خطی پيوند يافته كه در نهايت توسط آنزيم ليگاز دو انتهای پلاسميد با دو انتهای محصول PCR وصل می گردد. در اين حالت يک پلاسميد نوتركيب حلقوی سوپركويل تشكيل می شود. جهت استفاده كارآمد در فرايند كلونينگ و انتقال پلاسميد نوتركيب به باكتري اشرشياكولي مستعد اين كيت با كيت BPAid™ Bacterial

[1] -Competent Cell

transformation kit ادغام گرديد. بر اساس اين پروتكل الحاق محصول PCR به داخل پلاسميد ۲و اماده سازي سلول هاي كامپتنت به صورت موازي پيش مي رود.

موارد استفاده:

۱- انجام کلونینگ و بدست آوردن تعداد کپی های یکسان از توالی موردنظر

۲- گرداوری کتابخانه DNA

۳- انجام تست های تشخیص

۴- حفظ توالی میکروارگانیسم های کمیاب جهت نگهداری در بانک ژنومی

تعداد واکنش های قابل انجام:

۵- این کیت برای انجام ۳۰ بار انجام کلونینگ کافی است.

پروتکل انجام آزمایش:

الف مواد و تجهیزات لازم:

۶- باكس حاوي يخ

۷- ميكروسانتريفيوژيفيوژ يخچال دار با حداكثر دور 14000 RPM

۸- سمپلر هاي اپندروف 10 و 100

۹- سر سمپلر هاي فيلتر دار مخصوص سمپلر 100 و 10

۱۰- لوله هاي فالكون 15 mL استريل

۱۱- آنتي بيوتيك آمپي سيلين با غلظت استوك 100 µg/mL

۱۲- پليت هاي استريل كشت

۱۳- تريپتون و Nacl از شركت مرك

۱۴- Yeast extract از شركت فولكا

۱۵- لوله هاي شيشه اي

۱۶- سوش هاي باكتري DH5α

۱۷- سوش باكتري XL1Blue

[2] Ligation

۱۸- IPTG و X-Gal

۱۹- ماده DMSO از شرکت مرك

۲۰- اتوكلاو مدل تامي ژاپن

۲۱- پيپت پاستور

۲۲- فيلتر 0.2 ميلي پور

۲۳- سواپ هاي استريل

ب) تهيه محيط LB Agar & LB Broth :

مقدار ۱۰ گرم تريپتون، ۵ گر، پودر Yeast Extract و 5 گرم Nacl توزين كنيد و در يک ارلن مايِر به حجم ۱۰۰۰ ميلي ليتر بريزيد سپس مقدار 800mL آب ديونايز به آن اضافه كرده و حجم آن را ۸۰۰ ميلي ليتر برسانيد و PH آن را با كمک سود به ۵ برسانيد و در نهايت حجم آن با آب ديونيزه به 1000mL برسانيد. و در پايان 500mL از آن در درون ارلن جديدي تهيه محيط LB براث ريخته شد. به ارلن حاوي LB آگار 7.5 گرم ماده آگار اضافه گرديد و در روي شعله بصورت ملايم حرارت داده شد تا اينكه شفاف شد و در پايان هر دو ارلن مربوط به محيط LB براث اتوكلاو كنيد. بعد از اتمام اتوكلاو به هر كدام از محيط ها در دماي حدوداً 50°C مقدار 500 µL از محلول آنتي بيوتيك به غلظت 100 mg/mL اضافه شد(تا غلظت نهاي انتي بيوتيك در آن به 50 µg/mL برسد) و به آرامي مخلوط كنيد و سپس در پليت هاي محيط كشت استريل بريزيد.

پ) تهيه Ligation Mixture:

مطابق جدول زير نسبت به تهيه مخلوط ليگيشن اقدام كنيد:

Component	محتويات
Vector PTZ	3µL
5X ligation Buffer	6 µL
PCR Product	3 µL
آب مقطر تزريقی	16 µL
T4 DNA ligaze	2 µL
حجم كلی	30 µL

سپس مخلوط فوق به مدت 5 ثانيه در دور 5000RPM سانتريفيوژ كنيد و بصورت Overnight در يخچال ۴ درجه سانتيگراد انكوباسيون كنيد به اين ميكروتيوب Ligation Mixture می گويم.

نکته:۲۰ دقیقه قبل از کشت سلول هاي ترانسفورم شده (مرحله ۸) 40 µL از هريك از محلول هاي اماد ه شده X-Gal و IPTG به محيط كشت LB آگار اضافه كرد و با يك سواپ استريل به صورت يكسان در سرتاسر سطح پليت پخش گرديد و به مدت 20 دقيقه در در انكوباتور ۳۷ قرار داده تا محيط براي كشت باكتري اماده گردد و IPTH و X-Gal جذب محيط كشت گردد.

روش كار:

ابتدا 300 µL از باكتري سويه هاي DH5α و EL1Blue در ۲ لوله جداگانه از محيط LB Broth تلقيح كرده و بصورت Overnight در انكوباتور شيكر دار با دور 50RPM بصورت گردشي قرار داده شد. فردا صبح ساير مراحل بشرح ذيل انجام گرفت:

۱- آماده سازي BP-solution : ابتدا 500 µL از محلول BP-solution به يك ميكروتيوب 1.5 استريل اضافه شد و بر روي يخ انكوبه گرديد.

۲- محيط BP-Medium را در درون انكوباتور قرار داده شد تا يخ آن ذوب گرديده و دماي آن به 37°C برسد.

۳- سپس 150 µL از باكتري هاي سويه هاي DH5α و يا به يک ميكروتيوب جداگانه اضافه كنيد و مقدار 1.5 mL از محيط BP-Medium به آن اضافه كنيد و به مدت 20 دقيقه در يك انكوباتور شيكر دار با دور 60RPM شيک كنيد.

۴- سپس ميكروتيوب بالا را به مدت 1 دقيقه در دماي 4°C و دور 5000RPM سانتريفيوژ كنيد و سپس مايع رويي(سوپرناتانت) آن دور دور بريزيد.

۵- بر روی يخ مقدار 300 µL از محلول BP-solution به پلت اضافه كنيد و با كمک پيپت كردن پلت را حل و سپس در دماي 4°C و بمدت 1 دقيقه در دور 5000RPM سانتريفيوژ گرديد سوپرناتانت را دور بريزيد.

۶- پلت حاصله در120 µL از محلول BP-solution بصورت سوسپانسيون در آمده و به مدت 5 دقيقه بر روي يخ انكوبه گرديد.

۷- سپس 2.5 µL از محلول Ligation Mixture تهيه شده در بند پ به يك ميكروتيوب 1.5 جديد ريخته شد و به مدت 2 دقيقه بر روي يخ سرد شد(همچنين 1 µL از Control 1 و Control 2 موجود در كيت در داخل ۲ ميكروتيوب جداگانه ريخته شد و به مدت 2 دقيق بر روي يخ سرد شد.

۸- سپس 50 µL از سلول هاي آماده فوق(DH5α و XL1Blue) به تيوب هاي آماده سازی شده در مرحله ۷ اضافه و مخلوط گرديد و براي مدت 5 دقيقه بر روي يخ انكوباسيون گرديد.

۹- فوراً 30 µL از مخلوط قسمت ۸ س بر روي محيط LB Agar حاوي Supplement شده با 40 µL از X-Gal و xL1Blue برده شد و با كمك پيپت پاستور استريل خنك شده در تمام سطح پليت حاوي آمپي سلين پخش گرديد. در نهايت پليت محيط كشت براي مدت ۲۴ ساعت در دماي 37°C انكوباسيون كنيد.

نتيجه:

۱- كلوني هاي سفيد كه در واقع كلوني هاي نوتركيب هستند

۲- كلوني هاي آبي كه فاقد پلاسميد نوتركيب هستند

کیت BP TA-Cloning Vector :

مواد مورد نیاز

۱- وکتور PTZ خریداری می شود
۲- آنزیم محدود کننده
۳- باکتری اکولای سویه مهندسی شده XL1 Blue
۴- انزیم ترمینال ترانسفراز
۵- 5X ligation Buffer
۶- کلرید کلسیم
۷- پلی اتیلن گلیکول
۸- IPTG& X-Gal
۹- پلیت محیط کشت
۱۰- اتوکلاو
۱۱- تریپتون
۱۲- Mgcl2
۱۳- Kcl
۱۴- Mgso4
۱۵- Spin culumn

محتویات کیت:

مشخصات	Component
وکتور PTZ خطی باز با انتهای 3’ overhang Thymine به طول ۲۸۸۶ bp	Vector PTZ
آنزیم متصل کننده	T4 DNA ligaze
بافر برای واکنش لیگیشن	5X ligation Buffer
محصول PCR	Control Fragment
پلاسمید حلقوی سوپرکویل حلقوی دست نخورده	Control 1
پلاسمید حلقوی سوپرکویل حلقوی با طول 4000 bp	Control 2
محیط LB سوپلمنت با آمپی سیلین	BP-Medium
محلول باز کننده دیواره باکتری	BP-solution

پروسه:

تهیه وکتور PTZ با دنباله های 3’ – overhang Thymine

۱- ابتدا وکتور PTZ حلقوی سوپرکویل بداخل باکتری اکولای سویه XL1 Blue در مجاورت کلرید کلسیم سرد انتقال داده می شود. و بروی محیط LB جامد حاوی ۵۰ میکروگرم آمپی سیلین، XGAL وIPTG کشت داده می شوند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می گیرند.

۲- آنگاه کلون های جدا سازی شده و این باردر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم آمپی سیلین کشت داده می شوند. سپس استخراج پلاسمید با کمک کیت فرمنتاز انجام می شود.

۳- سپس وکتور PTZ با کمک آنزیم محدود کننده Blunt end ایجاد می گردد. مقداری از وکتور در این مرحله در حضور مقدار مناسبی از آنزیم ترمینال ترانسفراز و در حضور ddTTP به انتهای دنباله خارجی وکتور باز تیمین اضافه کرده و دنباله های 3’ – overhang Thymine ایجاد می کند.

طرز تهیه 5X Ligation Buffer:

مقدار مناسبی از تریس HCL ، کلرید منیزیم، ATP ، DTT و پلی اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ و به عنوان 5X Ligation Buffer در ویال مربوطه ریخته می شود.

تهیه محیط BP- Medium :

مقدار مناسبی از تریپتون، عصاره مخمر، کلرید سدیم، کلرید منیزیم، سولفت منیزیم با یکدیگر مخلوط کرده و اتوکلاو می کنیم سپس در شرایط استریل مقداری امپی سیلین به آن اضافه کمی شود.

تهیه BP – Solution:

مقدار مناسبی از کلرید کلسیم، پلی اتیلن گلیکول و گلسیرول اضافه می شود.

طرز تهیه control 1 :

مقدار مناسبی از وکتور خطی PTZ در یک واکنش آنزیمی در حضور انزیم لیگاز به فرم حلقوی درامده و بعد از انتقال به سلول باکتری در میزان بالا تکثیر شده و بعد از استخراج پلاسمید و تخلیص شدن به عنوان کنترل ۱ مورد استفاده قرار می گیرد.

طرز تهیه Cintrol 2

محصول PCR حاصل از یک واکنش به طول 1114 bp بدرون پلاسمید کلون شده و به عنوان کنترل ۲ جهت مقایسه فرایند کلونینگ مورد استفاده قرار می گیرد.

ستون جاذب Spin column

توصیف:

این کیت جهت کلونینگ محصولات PCR با انتهاي 3' – dA overhang **مي باشد. این کیت داراي وکتور** PTZ57 R/T **که در هنگام ترانسفورم شدن در سلول هاي مستعد[3] نظیر سویه هاي** DH5a **و** XL1 Blue **به تعداد زیادی از پلاسمید های نوترکیب وارد سلول باکتري مي شود و جزء وکتورهاي** High-Copy Plasmid Number **محسوب مي گردد و و به تعداد** 300-700 **کپي از این از این پلاسمید مي تواند در يك سلول باکتري قرار بگیرد. میزان غلظت بالاي از توالي هدف کلون شده را فراهم آورد.**

در این سیستم بعد از قراردادن محصول PCR به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در حضور آنزیم Taq Polymerase **به دو انتهای** 5' **از یک رشته و به انتهایی** 3' **از رشته مکمل آن باز آدنین اضافه می شود. از طرفی به دلیل اینکه در دو سر پلاسمید خطی باز تیمین قرار دارد بنابراین در طی فرایند کلونینگ محصول PCR با مکمل خود در پلاسمید خطی پیوند یافته که در نهایت توسط آنزیم لیگاز دو انتهای پلاسمید با دو انتهای محصول PCR وصل می گردد. در این حالت یک پلاسمید نوترکیب حلقوی سوپرکویل تشکیل می شود**

جهت استفاده کارآمد در فرایند کلونینگ و انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتري اشرشیاکولي مستعد این کیت با کیت Bacterial transformation kit $BPAid^{™}$ **ادغام گردید. بر اساس این پروتکل الحاق محصول PCR به داخل پلاسمید[4] و اماده سازي سلول هاي کامپتنت به صورت موازي پیش مي رود.**

موارد استفاده:

۲۴- انجام کلونینگ و بدست آوردن تعداد کپی های یکسان از توالی موردنظر

۲۵- گرداوری کتابخانه DNA

۲۶- انجام تست های تشخیص

۲۷- حفظ توالی میکروارگانیسم های کمیاب جهت نگهداری در بانک ژنومی

[3] -Competent Cell

[4] Ligation