



**A&A BIOTECHNOLOGY**  
innovating life science

## Instrukcja

# OverLap™ Assembly Cloning Kit

Zestaw do szybkiego klonowania produktów PCR bez użycia ligazy DNA. Oparty na metodzie Gibsona.

numer katalogowy	wielkość
1024-10	10 reakcji
1024-50	50 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

# Spis treści

Zastosowanie	3
Zalety	3
Skład	3
Uwagi	3
Wzór obliczania stężenia DNA	4
Strategia projektowania starterów i klonowania	5
Protokół	6

## Zastosowanie

- klonowanie produktu PCR
- jednoczesne klonowanie kilku produktów PCR do jednego wektora
- mutageneza ukierunkowana
- usuwanie intronów, delecje, złożone klonowania
- gene knockout

## Zalety

- jednoetapowa i szybka procedura przeprowadzana w jednej próbówce
- możliwość jednoczesnego klonowania nawet 5 produktów PCR do jednego wektora
- wydajne klonowanie produktów PCR o dużej wielkości (do 5 000 pz)
- nie dochodzi do autoligacji wektora

## Skład

składnik	10 reakcji	50 reakcji	przechowywanie
OverLap™ enzymy mix	32 µl	140 µl	-20 °C
OverLap™ bufor (5x bufor reakcyjny)	65 µl	270 µl	-20 °C
nukleotydy	35 µl	140 µl	-20 °C
woda ultraczysta	1,5 ml	5 x 1,5 ml	-20 °C
kontrola DNA	16 µl	25 µl	-20 °C
pożywka SOC	4 x 4 ml	18 x 4 ml	-20 °C

## Uwagi

- Powtórne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na aktywność produktu.

## Referencje

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

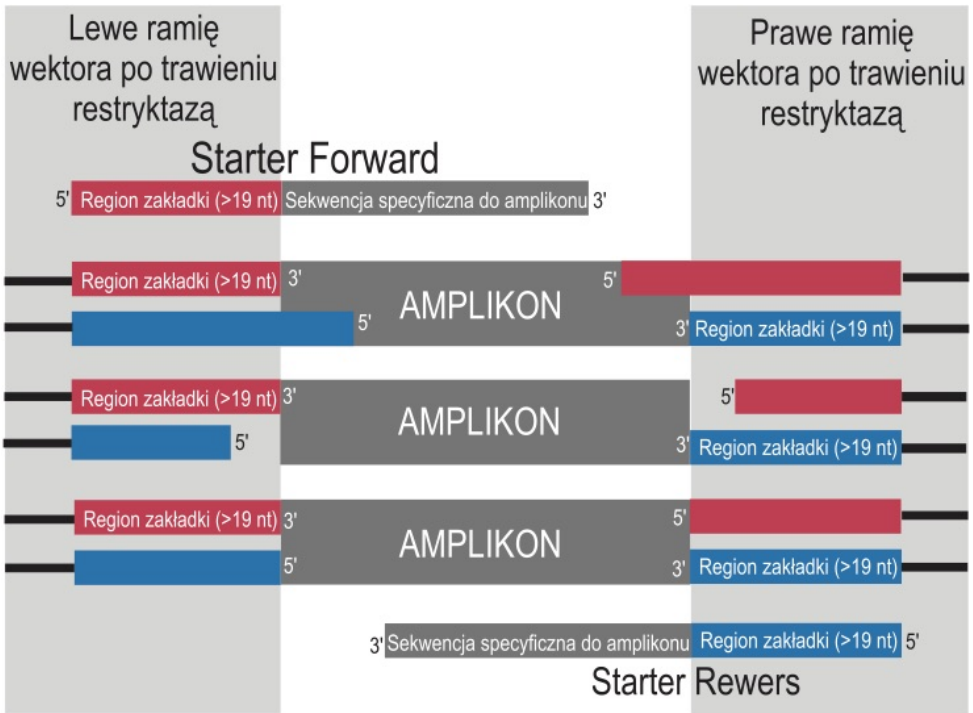
## Wzór obliczania stężenia DNA

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

## Strategia projektowania starterów i klonowania



## Protokół

1. Przygotować oczyszczone fragmenty DNA\* (wektor i insert) o odpowiednim stężeniu, zawieszony w wodzie wolnej od nukleaz. Fragmenty DNA powinny być zmieszane w stosunku równomolowym (wzór obliczania stężeń, str. 4).

2. Wstawić probówkę do lodu. Dodać składniki reakcji wg poniższego schematu:

Zalecana ilość fragmentów DNA (pmole)

składnik reakcji	2 fragmenty DNA*	3-6 fragmentów DNA*	reakcja kontrolna
końcowa ilość fragmentów	0,02-0,5 pmoli	0,2-1,0 pmol	2 µl kontroli DNA**
OverLap™ bufor	4 µl	4 µl	4 µl
nukleotydy	2 µl	2 µl	2 µl
OverLap™ enzymy mix	2 µl	2 µl	2 µl
woda ultraczysta	uzupełnić do 20 µl	uzupełnić do 20 µl	10 µl

\* 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.

3. Przenieść probówkę do termobloku i inkubować:  
2 fragmenty DNA przez **15 min** w temp. **45 °C**  
3-6 fragmentów DNA przez **60 min** w temp. **45 °C**
4. Przenieść probówkę do lodu lub w przypadku transformacji w późniejszym czasie (maksymalnie do 48 godz.) przechowywać w temp. -20 °C.
5. Całość mieszaniny reakcyjnej 20 µl, przenieść do komórek kompetentnych *E.coli* wg 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 inkubować przez 60 min w temp. 37 °C i energicznie wytrząsać.

Zalecamy poniższe produkty do użycia w strategii OverLap™ Assembly:

- PCR Mix Rapid (nr kat. 2009-100, 2009-1000) do amplifikacji produktów PCR
- Clean-Up Concentrator (nr kat. 021-50C, 021-250C) / Gel-Out Concentrator (nr kat. 023-50C, 023-250C) do oczyszczania fragmentów DNA
- E.coli Transformer Kit (nr kat. 4020-240) / E.coli Transformer Express Kit (nr kat. 4020-240E) do przygotowania i transformacji komórek kompetentnych *E.coli*



**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

wersja 2023-4

