

## 1. ОПИСАНИЕ

КЛД Микс — смесь ферментов киназы, лигазы и **DpnI** в оптимизированном буфере для обработки ПЦР-продуктов после сайт-направленного мутагенеза. КЛД Микс применяется для получения замен, делеций и инсерций в плазмидной ДНК. После амплификации целевого фрагмента ДНК смесь ферментов обеспечивает фосфорилирование концов ДНК, лигирование ПЦР-продукта и удаление исходной метилированной матрицы в одной реакционной смеси. Набор предназначен для работы с линейными двуцепочечными ПЦР-продуктами, полученными при амплификации плазмидной ДНК высокоточной ДНК-полимеразой.

## 2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

### ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

1. Приготовить следующую реакционную смесь: **1** мкл реакционного буфера КЛД, **1** мкл ПЦР-продукта, **1** мкл КЛД Микс, **7** мкл воды без нуклеаз.
2. Инкубировать **30** минут при комнатной температуре.
3. Использовать **5** мкл смеси для трансформации **50** мкл химически компетентных клеток.

### 3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Используйте минимальное количество матричной ДНК в ПЦР (стандартно - 1 нг на 50 мкл реакцию)
- Не превышайте объем ПЦР-продукта для КЛД реакции (стандартно - 1 мкл ПЦР продукта на 10 мкл реакцию). Увеличение количества ПЦР-продукта может привести к снижению эффективности трансформации.
- Если количество целевого ПЦР-продукта низкое, можно увеличить его количество в реакции КЛД (не более 5 мкл на 10 мкл реакцию). Однако, в этом случае необходима предварительная очистка ПЦР-продукта.
- Используйте высокоточную полимеразу и убедитесь в отсутствии неспецифической амплификации в ПЦР-продукте.
- КЛД Микс обеспечивает фосфорилирование 5'-концов ПЦР-продукта, лигирование фрагмента в кольцевую форму и деградацию исходной ДНК-матрицы рестриктазой DpnI.
- Идеально подходит для сайт-направленного мутагенеза. Проведите ПЦР с мутантными праймерами (вставки/замены/делеции), а затем используйте микс для лигирования и удаления исходной матрицы.
- При дизайне праймеров точечные замены располагайте внутри, вставки — на 5'-конце, а для делеций фланкируйте удаляемый участок. Следите за отсутствием вторичных структур и подбирайте близкие температуры отжига.
- Очистка ПЦР-продукта до или после инкубации с КЛД Миксом не требуется.
- Стандартное время реакции — 30 минут. Инкубацию можно продлить до 2 часов, однако обычно это не приводит к существенному увеличению эффективности.
- Для большинства ПЦР-продуктов достаточно 1 мкл. Оптимизация объема может потребоваться только для длинных фрагментов (>10 кб) или при очень низком выходе ПЦР.
- Не используйте для трансформации более 5 мкл реакционной смеси. Если необходимо взять больший объем, предварительно проведите ферментативную очистку.

#### 4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

##### 50 РЕАКЦИЙ

1 пробирка: 50 мкл фермента

1 пробирка: 100 мкл 10x реакционного буфера

#### 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ

*ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕ УКАЗАНЫ*

#### 6. СОСТАВ РАСТВОРОВ

*Информация отсутствует*

#### 7. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Под одной реакцией подразумевается 1 мкл КЛД Микса, 1 мкл 10x реакционного буфера, а также ДНК и воды в конечном объеме 10 мкл

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

---

Ферменты и реакционный буфер необходимо хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
Для реакционного буфера рекомендуется сделать аликвоты для однократного использования.