

## Kit pMBL-T vector

No.Catálogo: MBL097 (20 reacciones)  
MBL228 (20 reacciones)

Versión: 07/2006

**Descripción:** El **Kit MBL-T vector** es un excelente sistema para la clonación de productos de PCR amplificados con aquellas polimerasas que colocan adenina en los extremos 3' de la molécula. Los vectores **pMBL-T** se obtienen por la adición de timina en los extremos 3', tras ser digeridos con *EcoRV*, lo que permite la clonación TA. **pMBL<sub>1</sub>-T** y **pMBL<sub>2</sub>-T** se diferencian únicamente en las enzimas de restricción incluidas en el sitio múltiple de clonación. Ambos confieren resistencia a ampicilina, cuentan con el origen de replicación del fago f1 y mantienen, bajo el control del promotor lac, la secuencia del α-péptido de la β-galactosidasa.

**pMBL<sub>1</sub>-T** cuenta con un amplio policloning que incluye 20 sitios de restricción con 12 sitios 5' protuberantes<sup>3</sup>, 4 sitios 3' protuberantes y otros 4 sitios romos<sup>4</sup>. Mientras que **pMBL<sub>2</sub>-T** tiene 8 sitios únicos de corte: 4 sitios 5' protuberantes, 3, 3' y solo un sitio de corte romo.

**Aplicaciones:** Este kit permite:

- La ligación del inserto de interés con el vector **pMBL-T** en tan solo una hora.
- Una doble selección de las colonias: (1) Selección de colonias resistentes a ampicilina. (2) Selección de colonias positivas blancas frente a las negativas azules debido a que el policloning interrumpe la secuencia del α-péptido.

**El kit contiene:**

- pMBL T-vector (1µg, 50 ng/µL)
- T<sub>4</sub> DNA ligasa (100 U, 5 U/µL)
- T<sub>4</sub> 10X Buffer (400mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5mM ATP, pH<sub>25°C</sub>=7,8)
- Inserto control de 600 pb (16 ng/µL)

**Control de calidad:** Ligación de **pMBL T-Vector** con distintas cantidades de inserto. En ninguno de los casos el número de colonias negativas (azules) superaba el 10% del total de las colonias obtenidas. Los controles se llevaron a cabo sobre células con competencia ≥ 10<sup>7</sup>.

**Envío y almacenamiento del producto:** El envío a temperatura ambiente no afecta su actividad, sin embargo el almacenamiento de rutina a -20°C es altamente recomendado.

### Protocolo

1. En un vial **mezclar:**

	<u>Concentración final</u>
1 µL T <sub>4</sub> DNA ligasa 10X Buffer	1X
1 µL pMBL T-Vector (50 ng/µL)	5 ng/µL
x µL DNA inserto <sup>a,b</sup>	
1 µL T <sub>4</sub> DNA ligasa (5U)	0,5 U/µL
H <sub>2</sub> O hasta 10 µL	

<sup>a</sup> La eficiencia de clonación usando la relación vector : inserto = 1:5 es mayor a un 90%:

$$\frac{\text{cantidad vector}(ng) * \text{tamaño inserto}(pb)}{\text{tamaño vector}(pb) * \text{cantidad banda}(ng)} = \frac{\text{relación vector}}{\text{inserto}}$$

<sup>b</sup> La eficiencia de clonación usando la relación anterior es mayor a un 90%. Esta eficiencia suele reducirse a medida que el fragmento a clonar es mayor. Sin embargo, el empleo de secuencias PIG en los extremos 5' de los primers a emplear en la PCR permiten la clonación de fragmentos grandes con una alta eficiencia. La adición de la secuencia PIG, GTTCTT aumenta 9 veces la eficiencia de clonación de un fragmento de PCR de 3,5kb.

