

CIP - זרזים את חיכוך הקטלנים החזותיים.
תורמים גם בעת וחצי.

פוספורילציה (PNK) וד-פוספורילציה (CIP):

המטרה – להוסיף פוספט או להסיר פוספט ממולקולת ה DNA.

Read more:

CIP - <https://www.neb.com/products/m0290-alkaline-phosphatase-calf-intestinal-cip>

PNK - <https://www.neb.com/products/m0201-t4-polynucleotide-kinase>

פוספורילציה:

100 ng from DNA

T4 ligase buffer X10

PNK (T4 Polynucleotide Kinase) 1ul

PEG 4000

H2O to xul

0.5 hour in 37 degrees

For example – if you have DNA in a concentration of 10ng/ul

DNA 10ul

Ligase buffer 2ul

PNK 1ul

PEG 4000 2ul

H2O 5ul

Total 20ul

לאחר מכן אינאקטיבציה של האנזים – 65 מעלות במשך 20 דקות.

לאחר מכן ניתן להמשיך ישירות לליגציה ע"י הוספת 1ul של T4 ligase ושעתיים ב30 מעלות או Overnight ב16 מעלות.

ד-פוספורילציה (CIP):

All DNA (after cutting with restriction enzymes and cleaning, no need to measure the concentration)

Buffer 3 X10

CIP (from NEB) 1ul

H2O to minimal amount that you can.

1hr in 37 degrees

(Vary from 0.5-ON in 37 degrees)

You need to clean reaction before continuing to the next step.