

Quick Guide

Beyond the PCR technology,
BIOFACT promises the progress for your research.

All in One™ PCR Cloning Kit

[Cat. No. VT201-020, VT202-020, VT241-020]

Cat. No.	Product	Size
VT201-020	All in One™ PCR Cloning Kit (Vector, Buffer, Competent cell)	20 rxns
VT202-020	All in One™ PCR Cloning Kit (Vector, Buffer)	20 rxns
VT241-020	BioFACT™ Competent cell (DH5α)	20 rxns

Description

All in One™ PCR Cloning Kit는 *Taq* 뿐만 *pfu* DNA Polymerase에 의해 증폭된 PCR 산물의 빠른 Cloning에 적합한 제품으로 Topoisomerase I의 활성에 의하여 상온에서 5분안에 cloning이 가능합니다. 또한 viable selection system을 도입하여 PCR산물이 cloning된 경우에만 colony가 자랄 수 있어 vector self-ligation에 의한 colony의 생성을 최소한으로 줄여줍니다.

Feature

- A-tail과 Blunt end PCR Product의 cloning
- Topoisomerase I을 이용하여 상온에서 5분 내에 ligation
- 2 kb 미만의 insert를 위한 cloning kit
- 5'-phosphorylation이 필요없는 cloning system
- Viable selection system (*ccdB* gene이 있어 sel-ligated clone은 colony를 형성하지 못합니다.)

제품별 구성품목

Contents	VT201-020	VT202-020	VT241-020
All in One™ Vector	○	○	
6X All in One™ Buffer	○	○	
M13F(-20) Primer	○	○	
M13R(-20) Primer	○	○	
Control insert (823bp)	○	○	
S.O.C 배지	○		○
DH5α Competent cell	○		○
pUC19 control DNA	○		○

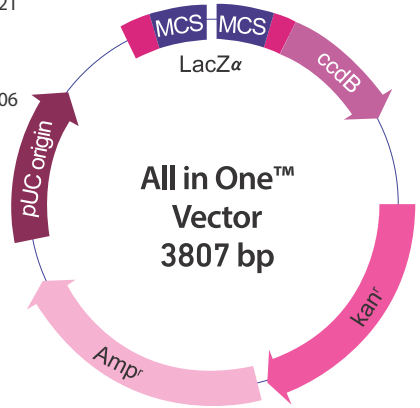
구성품목의 조성 및 용량

Contents	조성 및 농도	용량
All in One™ Vector	10 ng/μl plasmid DNA in: 50% glycerol 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (at 25°C) 1 mM EDTA 1 mM DTT 0.1% Triton X-100 100 μg/ml BSA	20 μl
6X All in One™ Buffer	1.2 M NaCl 0.06 M MgCl	100 μl
M13F(-20) Primer	10 pmole/μl	20 μl
M13R(-20) Primer	10 pmole/μl	20 μl
Control insert(823bp)	20 ng/μl in TE Buffer (pH 8.0)	10 μl
S.O.C 배지	2.0% Tryptone 0.5% Yeast extract 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl 10 mM MgSO 20mM Glucose	10 ml
DH5α Competent cell	Chemically competent cell	100 μl x21 ea
pUC19 control DNA	10 pg/μl in TE Buffer (pH 8.0)	50 μl

All in One™ Vector Map

Comments for All in One™ 3807 nucleotides

- Lac Promoter / Operator region : 95 - 216
- M13(-20) Reverse priming site : 205 - 221
- LacZ α ORF : 217 - 534
- Multiple Cloning Site : 234 - 357
- M13(-20) Forward priming site : 391 - 406
- *ccdB* lethal gene ORF : 554 - 846
- Kan^r gene : 1057 - 1989
- Amp^r gene : 2007 - 2867
- pUC origin : 3012 - 3685



All in One™

Multiple Cloning Site (MCS) sequence with restriction enzyme sites:

M13 Reverse(-20) *lacZα* ATG *Hind* III *Kpn* I *Sac* I *Spe* I

CA G GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA
GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT

Bst XI *Eco* R I *Eco* R I

GTA AGC GCC AGT GTG CTG GAA TTC GCC CTT AAG GGC GAA TTC TGC AGA
CAT TCG CGG TCA CAC GAC CTT AAG CGG GAA PCR Product TTC CCG CTT AAG ACG TCT

Eco R V *Bst* XI *Not* I *Xho* I *Nsi* I *Xba* I *Apa* I

TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG CCC TAT
ATA GGT AGT GTG ACC GCC GGC GAG CTC GCA CAT AGA TCT CCC GGG TTA AGC GGG ATA

M13 Forward(-20)

AGT GAA TCG TAT TAC AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAC
TCA CTT AGC ATA ATG TTA AGT GAC CGG CAG CAA AAT GTT GCA GCA CTG ACC CTT TTG

All in One™ vector full sequence 요청은 (주)바이오팩트 대표번호 ☎ 1670-5695로 문의 주세요.

Universal Primer 염기서열

Primer	Sequence
M13 Reverse (-20)	5- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G -3
M13 Forward (-20)	5- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3

Colony PCR Mixture & Cycle

Colony PCR로 Insert DNA의 삽입유무를 확인 하실 경우, PCR조건입니다. 사용하시는 *Taq* DNA Polymerase의 protocol에 따라 실험을 진행하시고, 아래 조건은 참고합니다.

PCR Mixture	Cycle
<i>Taq</i> Reaction Buffer	- μl
dNTP Mix	- μl
M13(-20)F (10 pmole/μl)	1 μl
M13(-20)R (10 pmole/μl)	1 μl
Template DNA	colony
<i>Taq</i> DNA Polymerase	- μl
Add D.W to	25 μl
	95 °C - min
	95 °C 20 sec
	56 °C 40 sec
	72 °C 1 min/kb
	72 °C 5 min
	X 30

Quick Guide

Beyond the PCR technology,
BIOFACT promises the progress for your research.

All in One™ PCR Cloning Kit

[Cat. No. VT201-020, VT202-020, VT241-020]

Protocol

1. Ligation Using All in One™ Vector and the 6X All in One Buffer

a. 아래와 같이 mixture를 만듭니다.

mixture 조성	Volume
PCR Product *	0.5 ~ 4 μ l
6X All in One™ Buffer	1 μ l
All in One™ Vector	1 μ l
D.W (3차 증류수)	-
Total Volume	6 μ l

* PCR Product는 최소 20ng 이상의 정제된 DNA를 사용해야 합니다.
(농도 확인 시, 1 μ l 전기영동하여 육안으로 확인이 가능해야 합니다.)

b. All in One 반응액을 상온(25°C)에서 5분간 반응합니다.

참고사항

All in One™ vector를 이용한 ligation은 상온에서 5분만 반응하여도 충분한 colony를 얻을 수 있지만 1시간까지 반응시간을 늘리면 더 많은 형질 전환체를 얻을 수 있습니다.

2. Transformation Using All in One™ Vector and the 6X All in One Buffer

2-1. Chemical competent cell을 이용한 transformation

a. All in One 반응액 3~6 μ l을 competent cell 100 μ l가 담긴 tube에 조심스럽게 넣어줍니다.

• 주의: Pipette으로 절대 혼합하지 마십시오.

b. 얼음에서 30분간 반응시킵니다.

(Ligation 반응액: 5분 ~ 30분, 더 많은 colony 형성을 위해 1시간까지 가능)

c. 42°C에서 30초간 heat-shock 후, 바로 얼음에 2분간 담가 안정화시킵니다.

(효율을 높이기 위해 낮은 온도에서 배양하였기 때문에, 30초면 충분합니다.)

d. 실온으로 예열된 S.O.C 배지 또는 LB broth를 900 μ l 첨가합니다.

e. Tube의 뚜껑을 확실하게 닫고, 37°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 흔들어 주면서 배양합니다.

f. 200 ~ 500 μ l의 용액을 취해 vector 정보에 따라 항생제가 포함된 plate에 spreading한 후, 밤새 배양합니다.

Transformation 샘플:

ampicillin (50 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml) 포함된 plate 사용)

g. Colony 선별 후, Plasmid DNA Prep 또는 colony PCR을 통해 분석합니다.

(HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit, Cat. No. PM101-100/200, PM105-100/200 사용권장)

• 제공되는 BioFACT™ Chemically Competent cell (Cat. No. VT241-020)은 chemical transformation 전용 competent cell입니다.

2-2. Electro-competent cell을 이용한 transformation

(Electroporation 방식에 적합한 competent cell을 사용하시는 분께 추천합니다.)

a. 1/4로 희석된 All in One 반응액에 6 μ l 이하를 50 μ l electro-competent cell 이 담긴 tube에 조심스럽게 넣어줍니다.

• 주의: Pipette으로 절대 혼합하지 마십시오.

b. cell과 DNA를 미리 얼음에 꽂아둔 Electroporation cuvette에 주의깊게 옮겨줍니다.

c. Electroporator manual에 따라 electroporation 시킵니다.

• 주의: Electroporation 과정에서 arcing(호광) 현상이 나타날 경우, 희석된 반응액의 양을 줄여서 사용하시기 바랍니다.

d. 실온으로 예열된 S.O.C 배지 또는 LB broth를 250 μ l를 cuvette에 첨가합니다.

e. 용액을 1.5 ml tube에 옮기고 실온으로 예열된 S.O.C 배지 또는 LB broth를 750 μ l를 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 흔들어 주면서 배양합니다.

f. 200 ~ 500 μ l의 용액을 취해 vector 정보에 따라 항생제가 포함된 plate에 spreading한 후, 밤새 배양합니다.

Transformation 샘플:

ampicillin (50 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml) 포함된 plate 사용)

g. Colony 선별 후, Plasmid DNA Prep 또는 colony PCR을 통해 분석합니다.

(HiGene™ Plasmid Mini Prep Kit, Cat. No. PM101-100/200, PM105-100/200 사용권장)

Control Reaction :

All in One™ Control Reaction

a. 아래와 같이 mixture를 만듭니다.

mixture 조성	Vector only	Vector + PCR insert
Control insert (823 bp)	X	1 μ l
6X All in One™ Buffer	1 μ l	1 μ l
All in One™ Vector	1 μ l	1 μ l
D.W (3차 증류수)	4 μ l	3 μ l
Total Volume	6 μ l	6 μ l

b. All in One 반응액을 상온(25°C)에서 5분간 반응합니다.

c. Transformation Method는 좌측 내용과 동일

d. 결과분석은 Ampicillin + Kanamycin 배지에서 나오는 colony 수를 셉니다.
vector + PCR insert 반응물에서 약 200개 이상의 colony가 나오고 95% 이상의 colony가 823 bp의 insert를 포함하고 있어야 합니다.

Transformation Control Reaction

a. pUC19 plasmid를 transformation 효율을 검사하는데 사용합니다.

b. 10 pg/ μ l의 plasmid 1 μ l를 100 μ l의 competent cell에 transformation 시킵니다.

c. 100 μ g/ml의 ampicillin이 포함된 plate에 10⁹ cfu/ μ g에 해당하는 양을 spreading합니다.

Special Comment :

• 당사가 제공하는 Competent cell 사용을 적극 추천합니다.

• PCR product에 smearing, multiple banding, primer dimer 등이 나타나거나 PCR산물의 크기가 1Kb보다 클 경우, 원하는 PCR산물만 정제하여 진행합니다.

• 100 bp이하의 작은 non-specific PCR product가 있는 경우, 원하는 PCR Product의 cloning 효율이 감소할 수 있습니다. 일반적으로 작은 size의 fragment의 cloning 효율이 높기 때문에 이 경우 반드시 PCR산물만 정제합니다.

• 본 제품은 Viable selection system을 도입하여 PCR산물이 cloning된 경우에만 colony가 자랄 수 있어 color selection을 할 필요가 없습니다. 혹시라도 color selection을 적용하였을 때, blue colony가 나오더라도 대부분의 colony가 PCR 산물이 ligation된 상태입니다.
(ccdB gene의 경우, 작은 size의 DNA 조각이 삽입될 경우에도 발현되지 않아 cell이 자랄 수 있습니다.)

All in One Vector Ligation 반응 온도

일반적으로 Topoisomerase I을 이용한 ligation은 적정 농도의 salt가 있는 조건 하에서 상온 반응만으로도 충분한 ligation이 진행됩니다. 그러나 PCR산물의 size가 크거나 gene 특성에 따라 ligation이 잘 되지 않을 경우, Topoisomerase I 활성 적정온도인 37°C에서 반응하여 더 좋은 결과를 얻을 수 있으니 참고해주세요.

PCR 산물의 양이 적거나, 많은 수의 형질 전환체가 필요한 경우

Ligation 시, PCR산물을 농축하거나 PCR산물을 4 μ l까지 늘려 첨가합니다.

또한 All in One ligation 반응시간을 최대 1시간까지 반응하면 더 높은 cloning 효율을 얻을 수 있습니다.

PCR산물의 적정량

본 제품은 2Kb이하의 PCR fragment를 cloning합니다. Vector 양은 ng/ μ l을 제공하며, vector와 insert DNA의 적정 비율은 1:4로 사용량을 조절하시면 됩니다. 부득이하게 2 Kb 이상의 fragment를 cloning 하실 경우에는 insert DNA의 농도를 높여서 사용하시면 효율이 향상됩니다. (~ 200 ng/rxn)

All in One™ PCR Cloning Kit의 stability

All in One™ PCR Cloning Kit는 20회 반응량으로 포장되어 있습니다.

1회 사용량으로 분주하여 보관 및 사용하시면 더욱 좋은 효율로 이용하실 수 있습니다.

[VT202-020] Expiration Date : -20°C 보관 시 1년

[VT241-020] Expiration Date : -70°C 보관 시 6개월



BIOFACT
BIOFACTORY

Please contact us,
if you have any question and need help.



T) 1670-5695



www.bio-ft.com



info@bio-ft.com