

A-tailing, Blunt end 구별 없이 하나로 **All in One**

All in One™ PCR Cloning Kit



Feature

- A-tail과 Blunt end PCR product의 cloning
- Topoisomerase I을 이용하여 상온에서 5분 내에 ligation
- 2 kb 미만의 insert를 위한 cloning kit
- 5' - phosphorylation이 필요 없는 cloning system
- Viable selection system
(*ccdB* gene이 있어 self-ligated clone의 형성저하)

PCR cloning Kit 구성

- All in One™ Vector
- 6X All in One™ Buffer
- M13 (-20) Forward, Reverse primer (10 pmole/ μ l)
- Control TA Insert (823bp) (20ng/ μ l)
- Control Blunt Insert (823bp) (20ng/ μ l)

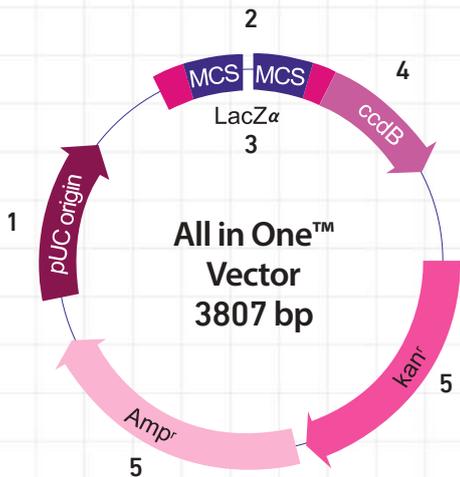
Competent Cell 구성

- BioFACT™ competent cell (DH5 α)
- pUC19 control plasmid (10 pg/ μ l)
- SOC 배지

Cat.No.	Product	Size
VT201-020	All in One™ PCR Cloning Kit (Vector, Buffer, Competent Cell)	20 reaction
VT202-020	All in One™ PCR Cloning Kit (Vector, Buffer)	20 reaction
VT241-020	BioFACT™ Competent Cell (DH5 α)	20 reaction



• All in One™ Vector Map의 특성



- 1. pUC origin :**
Vector가 Cell 내에서 복제될 수 있도록 제공되는 시작점.
- 2. MCS (Multiple Cloning Site) :**
Vector 내에 원하는 PCR product를 삽입할 수 있도록 제한효소의 인식자리가 모여있으며, Ligase가 작용하여 PCR product의 삽입이 진행되는 위치.
- 3. LacZ gene :**
β-galactosidase를 만드는 유전자로, LacZ gene 내부에 MCS가 위치하여 MCS에 insert가 삽입될 경우 LacZ가 기능을 상실해 β-galactosidase를 만들지 못합니다. 이러한 특징으로 Blue/White colony selection을 가능하게 합니다.
- 4. ccdB gene :**
*E.coli*의 gyrase 합성을 억제하여 cell을 사멸시키는 유전자로, Insert 삽입 시 기능이 억제되어 Cell이 자라게 되며, Insert가 삽입되지 않으면 사멸하여 positive selection이 가능 하도록 합니다.
- 5. Amp^r, Kan^r gene :**
Ampicillin과 Kanamycin 항생제에 대한 내성을 가진 유전자.
Ampicillin 100mg/mL, Kanamycin 50mg/mL을 500mL 배지에 500μL (1/1000)씩 첨가하여 사용합니다.

* Genotype of BioFACT™ competent cell

- DH5α : F-80dlacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF),U169 recA1 endA1
hsdR17(*r_k*, *m_k*⁺), phoAsupE44-thi-1 gyrA96 relA1

** All in One™ vector 사용 시 적용 가능한 competent cell

- DH5α, TOP10, DH10B 등 대부분의 *E.coli* strains
- gyrase에 변이가 생겨 *ccdB*에 저항성이 있는 DB3.1 strain이나 *ccdA* gene을 포함하고 있는 균주는 viable selection이 불가능 합니다.

Comments for All in One™ 3807 nucleotides

Lac promoter / operator region : 95 – 216
M13 (-20) Reverse priming site : 205 – 221
LacZα ORF : 217 – 534
Multiple Cloning Site : 234 – 357
M13 (-20) Forward priming site : 391 – 406

ccdB lethal gene ORF : 544 – 846
Kan^r gene : 1057 – 1989
Amp^r gene : 2007 – 2867
pUC origin : 3012 – 3685

All in One™ Vector

*Cloning site 주변의 sequence

```

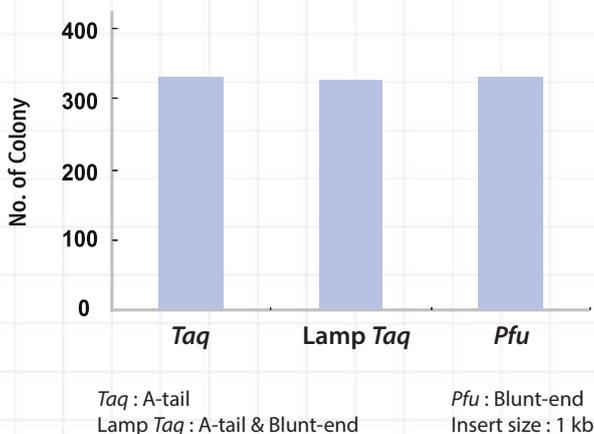
lacZα:ATG
M13 Reverse(-20) Primer | Hind III | Kpn I | Sac I | BamHI | Spe I
CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA
GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAC CAT GGC TCG AGC CTA GGT GAT

BstXI | EcoRI | EcoRI
GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC GCC CTT GAG GGC GAA TTC TGC
CAT TGC CGG CGG TCA CAC GAC CTT AAG CGG GAT GTC CCG CTT AAG ACG

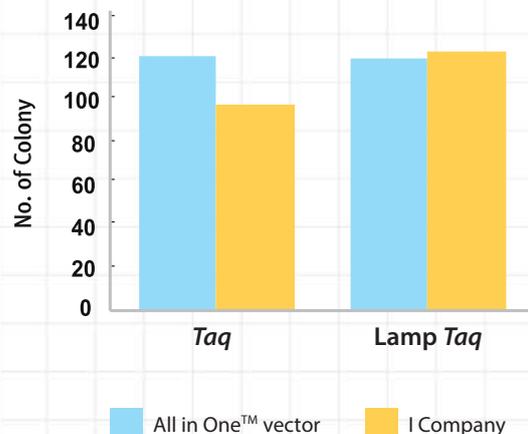
EcoRV | BstXI | NotI | XhoI | NsiI/XbaI | ApaI
AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC AAT TCG CCC TAT
TCT ATA GGT AGT GTG ACC GCC GGC GAG CTC GTA CGT AGA TCT CCC GGG TTA AGC GGG ATA

M13 Forward(-20) Primer
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
    
```

• 다양한 DNA Polymerase로 증폭한 산물의 Cloning 효율 비교



• Cloning 효율 타사 비교



Tip

1. PCR Product를 정제 하실 때 HiGene™ Gel & PCR Purification System [GP104]을 사용하여 dimer를 제거 하시면 Cloning을 좀 더 효율적으로 하실 수 있습니다.
2. Cloning 실험을 위한 Gel extraction 수행 시 높은 Purity의 gel-rose™ Agarose [AG113-100 / AG113-500] 사용을 권장합니다.