USER GUIDE

AccuRapid™ TA Cloning Kit

Cat. No. K-7170

BIONEER

Innovation • Value • Discovery

© Copyright 2022 BIONEER Corporation. All rights reserved.

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuRapid™ TA Cloning Kit

User Guide

K-7170

Σ 20

Version No.: 2 (2024-07-15)

Please read all the information in booklet before using the unit

BIONEER Corporation
8-11, Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon
34302, Republic of Korea
Tel: 1588-9788
Email: sales@bioneer.co.kr
www.bioneer.com

Intended Use

AccuRapid™ TA Cloning Kit is developed and supplied for research purposes only. Certain applications possible with this kit may require special approval by appropriate local and/or national regulatory authorities in the country of use.

Safety Warning and Precaution

Wear appropriate protection when handling any irritant or harmful reagents. The use of a laboratory coat, protective gloves and safety goggles are highly recommended. For more information, please consult the appropriate Material Safety Data Sheet (MSDS).

Warranty and Liability

All BIONEER products undergo extensive Quality Control testing and validation. BIONEER guarantees quality during the warranty period as specified, when following the appropriate protocol as supplied with the product. It is the responsibility of the purchaser to determine the suitability of the product for its particular use. Liability is conditional upon the customer providing full details of the problem to BIONEER within 30 days.

Quality Management System ISO 9001 Certified

Every aspect of our quality management system from product development, production to quality assurance and supplier qualification meets the world-class standards.

Trademark

AccuRapid™ is a trademark of BIONEER Corporation.

Copyright

Copyright 2022 BIONEER Corporation. All Rights Reserved.

Notice

BIONEER Corporation reserves the right to make corrections, modifications, improvements and other changes to its products, services, specifications or product descriptions at any time without notice.

Contents

Product Information **1**

Components 1

Storage 1

Specifications 1

Introduction **2**

Product Description 2

pBHA-T Vector 3

Experimental Procedures **5**

Materials to be Prepared by Users 5

Preparation of Insert 6

Ligation Reaction 7

Transformation 8

Results Analysis 9

Troubleshooting **11**

Ordering Information **13**

Related Products **13**

Explanation of Symbols **14**

Product Information

Components

Components	Amount
	K-7170 (20 rxn)
pBHA-T vector (25 ng/μl)	40 μl
Control Insert (70 ng/μl)	20 μl
AccuRapid™ 2X Reaction buffer	100 μl
T4 DNA Ligase (200 U/μl)	20 μl

* **Unit definition:** One weiss unit (200 U) is defined as the amount of enzyme required to ligate 90% of *Hind* III fragments of 1 μg of lambda DNA in total volume of 20 μl at 16°C for 30 min.

Storage

All components of *AccuRapid*™ TA Cloning Kit should be stored at -20°C. To minimize the decrease in cloning efficiency, avoid repeated freeze and thaw cycles of pBHA-T vector and *AccuRapid*™ 2X Reaction buffer. Therefore, it is recommended to aliquot the solution and store each tube for single reaction.

Specifications

	***AccuRapid*™ TA Cloning Kit**
Reaction time	15 min
Reaction temperature	25°C
Need for PCR/Gel purification	Recommendation
Selection marker	Ampicillin

Introduction

Product Description

TA Cloning is a method that directly clones PCR product by ligating deoxyriboadenosine (dA)-tailed DNA at the 3' end, tailed by *Taq* DNA Polymerase, to a vector with deoxyribothymidine (dT) added to its 3' end. *Taq* DNA Polymerase and other non-proofreading DNA polymerases have terminal transferase activity, which adds dA to the 3' end of the PCR product, resulting in an A-overhang structure. These PCR products can be directly inserted into a pre-linearized T-vector (pBHA-T vector) through ligation. It is possible to perform cloning with various sizes of inserts within 15 min of ligation reaction, and ampicillin or blue/white screening are possible through the ampicillin selection marker and *LacZ* gene in the vector. Therefore, TA cloning can be applied without using primers containing restriction enzyme sites or restriction enzyme treatment, so it is particularly useful when the restriction enzyme sites are limited. In addition, there are multiple restriction enzyme sites around the cloning site in the vector, making it easy to analyze the results or clone onto other vectors. BIONEER's *AccuRapid*™ TA Cloning Kit is a product that can easily and quickly clone the PCR product amplified with a DNA polymerase such as *Taq* DNA Polymerase that can add dA to the 3' end into a linearized pBHA-T vector.

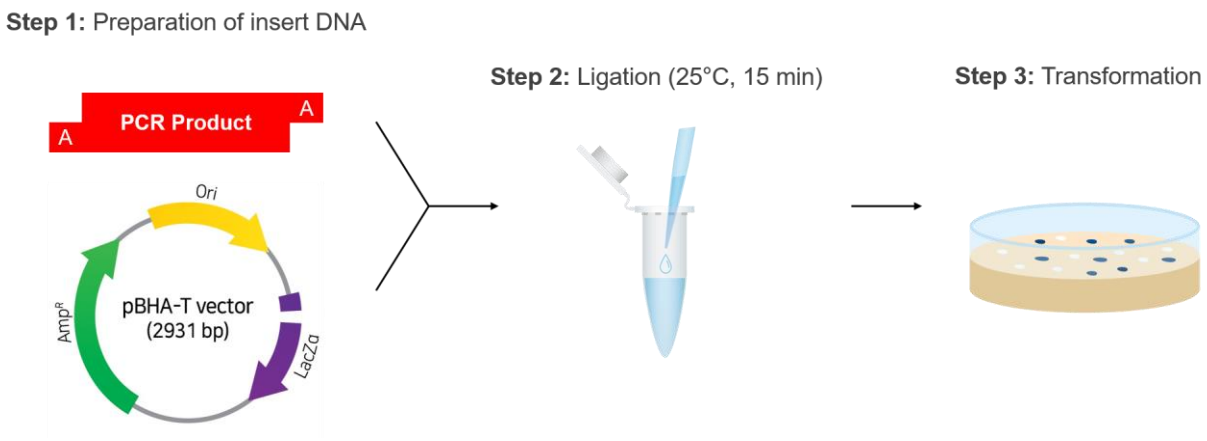


Figure 1. Schematic protocol for *AccuRapid*™ TA Cloning Kit.

pBHA-T Vector

Features

1. *LacZα* gene
   This gene encodes amino acids 1-146 of β-galactosidase. By complementing the ω-fragment of the host *lacZ* gene, it presents β-galactosidase activity, enabling blue/white screening.

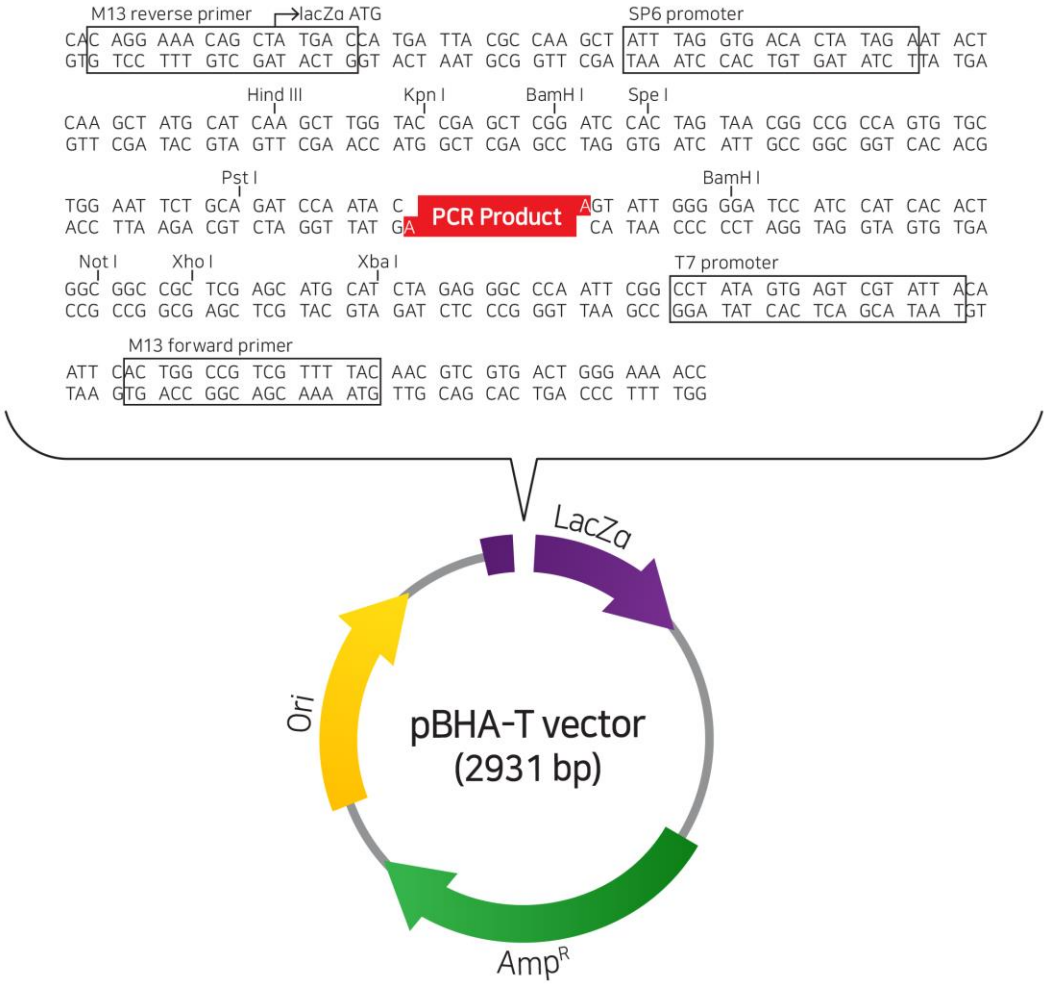
2. Ampicillin resistance gene
   It contains an ampicillin resistance gene and is used for transformant selection.

3. M13 Forward and Reverse primer site
   It is used to analyze the sequences to confirm if the gene of interest is inserted in the plasmid.

4. T7 promoter and SP6 promoter
   It is used to analyze sequences to confirm if the gene of interest is inserted in the plasmid or to transcribe RNA from inserted sequence *in vitro*.

5. *BamH* I restriction site
   It is used to digest the inserted DNA from the recombinant plasmid.

Vector Map



pBHA-T vector	Position (Bases)
M13 Reverse primer site	1-17
LacZα gene	13-441
SP6 promoter	35-53
T7 promoter	236-254
M13 Forward primer site	261-277
Ampicillin resistance gene	1,003-1,863
pUC *ori* (high copy number)	2,034-2,622

Experimental Procedures

Materials to be Prepared by Users

- *AccuPower® Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2601) or *AccuPower® ProFi Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2631)
- *AccuPower®* PCR PreMix (Cat. No. K-2012)
- *AccuPrep®* PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038)
- Thermal cycler (*AllInOneCycler*™ PCR system, A-2041)
- Chemically or electrocompetent cell
- IPTG (Cat. No. C-8001)
- X-Gal (Cat. No. C-8002)
- LB agar plate with ampicillin
- LB broth or SOC media
- M13 Forward primer, M13 Reverse primer

Preparation of Insert

1. Amplify insert from template DNA using *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2631) and *AllInOneCycler*™ PCR system (Cat. No. A-2041).

   * **Note:** For the amplification of insert DNA, PCR products must be amplified using DNA polymerase, which adds an adenine to the 3' end of the PCR products. In addition, *AccuPower*® PCR PreMix (Cat. No. K-2012) and *AccuPower*® *Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2601) can be used, but if you need proofreading function, we recommend using *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix.

2. Add template DNA, primers, and nuclease-free water into *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix tubes to make a total volume of 20 µl or 50 µl. Do not calculate the dried pellet.

- Preparation of reaction mixture

Components	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA (1-500 ng)	Variable (1-10 µl)	Variable (1-25 µl)
Forward primer (10 pmol/µl)	0.5-2 µl	1-5 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0.5-2 µl	1-5 µl
Nuclease-free water	Variable	Variable
Total volume	20 µl	50 µl

3. Dissolve the vacuum-dried pellet by vortexing, and briefly spin down. Perform the reaction under the following conditions.

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	15-20 sec	30 cycles
Annealing	45-65°C	15-30 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Final extension	72°C	5-10 min*	1 cycle

* **Note:** For efficient A-tailing of PCR products, it is recommended to proceed with final extension at 72°C for more than 5 min.

4. After electrophoresis of the amplified insert, gel elution is performed with *AccuPrep*® PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038).

   * **Note:** Using an unpurified PCR product can significantly decrease the cloning efficiency, so it is recommended to purify the target DNA band through gel purification.

* **Note:** Commercially available elution buffer contains EDTA, which can reduce ligation efficiency. It is recommended to use the elution buffer (EA buffer) without EDTA of BIONEER's *AccuPrep*® PCR/Gel Purification Kit or distilled water.

Ligation Reaction

1. Thaw pBHA-T vector and *AccuRapid*™ 2X Reaction buffer on ice before ligation reaction.

2. Prepare reaction mixture for ligation reaction as follows.

Components	Positive	Sample
pBHA-T vector (25 ng/μl)	2 μl	2 μl
PCR product	-	0.5-2 μl*
Control Insert (70 ng/μl)	1 μl	-
AccuRapid™ 2X Reaction buffer	5 μl	5 μl
T4 DNA Ligase (200 U/μl)	1 μl	1 μl
Nuclease-free water	1 μl	Variable
Total volume	10 μl	10 μl

* **Note:** Calculate the required amount of PCR product using the following formula. In general, 0.5-2 μl of PCR product is used, and it is recommended to add in a molar ratio of 5 : 1 (insert: vector) or higher for a more efficient ligation reaction.

$$\text{PCR product (ng)} = \frac{\text{pBHA-T vector (ng) x size of PCR product (bp)}}{\text{Size of pBHA-T vector (bp)}} \text{ x molar ratio of } \frac{\text{PCR product}}{\text{pBHA-T vector}}$$

* **Example**: The required PCR product concentration, when performing with 1,000 bp of PCR product and with molar ratio (insert : vector) = 5 : 1.

$$\text{PCR product (ng)} = \frac{\text{50 ng x 1,000 bp}}{\text{around 3,000 bp}} \text{ x } \frac{5}{1} = \sim 83 \text{ ng}$$

3. Mix the reaction mixture by tapping and briefly spin down.

4. Incubate the reaction mixture at 25°C for at least 15 min.

   * **Note:** Sufficient colonies can be obtained in only 15 min of reaction, but if you want to increase the cloning efficiency, it is recommended to increase the reaction time up to 1 hr.

5. After the reaction, reaction mixture should be stored either on ice or at -20°C until transformation.

Transformation

1. Take competent cells from deep freezer and slowly thaw on ice.

2. Add 2-5 µl of ligation reaction mixture into 50 µl of competent cells and incubate on ice for 20 min.
   *** Note:** Do not pipetting or vortexing.

3. Heat shock the cells at 42°C for 60 sec. Then, immediately place tubes on ice and incubate 2 min.

4. Add 1 ml of pre-heated LB broth (not included antibiotics) or SOC media in 37°C and incubate at 37°C shaking incubator (200 rpm) for 1 hr.

5. Spread 50 µl of 0.1 M IPTG (Cat. No. C-8001) and X-Gal (50 mg/ml) (Cat. No. C-8002) onto each LB agar plates containing ampicillin (50-100 µg/ml) and incubate at 37°C.

6. After the incubation, centrifuge at 3,000 rpm for 5 min, remove the supernatant, add 200 µl of LB broth, and gently resuspend the cell pellet by tapping.

7. Transfer to preheated LB agar plate (included antibiotics) in step 5, and spread completely.

8. Incubate overnight at 37°C in an incubator.

Results Analysis

1. After transformation, check colonies in the cultured plate.

   * **Note:** Colony numbers can be different depending on the size, conditions of competent cells, transformation conditions, etc.

2. Select at least 10 white colonies and add colony, primers, and nuclease-free water into *AccuPower*® PCR PreMix (Cat. No. K-2012) tubes to make a total volume of 20 µl or 50 µl. Do not calculate the dried pellet.

   * **Note:** Please refer to p.10 of table for primer sequences.

- Preparation of reaction mixture

Components	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	Colony	Colony
M13 Forward primer (10 pmol/µl)	0.5-2 µl	1-5 µl
M13 Reverse primer (10 pmol/µl)	0.5-2 µl	1-5 µl
Nuclease-free water	Variable	Variable
Total volume	20 µl	50 µl

3. Dissolve the vacuum-dried pellet by vortexing, and briefly spin down. Perform the reaction under the following conditions.

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	20 sec	25-30 cycles
Annealing	45-65°C	20 sec	
Extension	72°C	1 min/kb	
Final extension	72°C	3-5 min	1 cycle

4. Perform electrophoresis to check whether insert DNA is inserted.

   * Expected size of DNA in experimental group: 249 bp† + size of insert DNA

     † Length between M13 Forward primer and M13 Reverse primer

   * Expected size of DNA in control group: 649 bp

5. When performing sequencing, T7 promoter, SP6, M13F(-40), M13R(-40), M13F(-20), and M13F(-20) primers can be used.

Primer Name	Sequences (5'→3')	Length (bases)
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	18
M13F(-40)	GTT TTC CCA GTC ACG AC	17
M13R(-40)	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17
M13F(-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GT	17
M13R(-20)	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	22

Troubleshooting

1. No colonies produced

Cause	Solution
Decreased transformation efficiency of competent cells	Check the expiration date and efficiency of competent cells.
Incorrect concentration of antibiotics in LB agar plates	The pBHA-T vector of this product uses the ampicillin selection marker. Check the ampicillin concentration in LB agar plates, and it is recommended to use antibiotics produced within 1 month.

2. Most colonies are blue or light blue.

Cause	Solution
Low expression of the *lacZ* gene or partial disruption of the *lacZ* gene by insert DNA	If the length of the insert DNA is less than 300 bp, it is recommended to analyze the light blue colonies as they may also contain insert DNA.
Non-formation of A-tailing at the 3' end of the PCR product	DNA polymerase such as *Pfu* DNA Polymerase with 3'→5' exonuclease activity does not have 3' A-tailing function. Therefore, it is recommended to use *Taq* DNA Polymerase without 3'→5' exonuclease activity.
Long-term storage of PCR products	It is recommended to use immediately the PCR product after amplification and purification before ligation.
Low molar ratio of insert DNA and vector	It is recommended to use insert DNA in a molar ratio of 5 times or more for ligation reaction.
Inhibited ligation reaction	High salt concentrations may inhibit the ligation reaction. It is recommended to minimize the amount (volume) of PCR product.

Inappropriate host cell for blue/white screening	Check genotype of host cell whether host bacterial strains have *lacZ* mutation.

3. White colonies do not contain insert DNA.

Cause	Solution
Use of plasmid DNA as template DNA for PCR amplification	If the plasmid DNA used as a template uses the ampicillin antibiotics marker, the template plasmid DNA may be inserted during transformation. After the PCR, remove the plasmid DNA through gel purification or *Dpn* I treatment.
Inclusion of non-specific products in PCR product	After amplifying the insert DNA by PCR, electrophoresis to gel purification of the target band.
Formation of satellite colonies	When ampicillin is used as an antibiotic marker, satellite colonies can be formed around large white colonies. Select as large white colonies as possible.
Degraded 3' T-overhangs on the vector	Repeated freezing and thawing of the pBHA-T vector can degrade the 3' T overhangs. If the 3' T-overhangs are damaged, it undergoes self-ligation which results in damage to the reading frame of the *lacZ* gene and thus no activity can be seen. Avoid repeated freeze and thaw cycles and it is recommended to store in small aliquots.

4. Most colonies are blue or light blue.

Cause	Solution
No X-Gal or IPTG in LB agar plates.	Check whether both IPTG and X-Gal are properly added to in LB agar plates.

Ordering Information

Description		Cat. No
AccuRapid™ TA Cloning Kit	20 rxns	K-7170

Related Products

Description	Cat. No
Oligo Synthesis (Primer) Service	S-1001
Standard Sequencing Service	S-3010-1
AccuPower® PCR PreMix & Master Mix	K-2012
AccuPower® *Taq* PCR PreMix & Master Mix	K-2601
AccuPower® *ProFi Taq* PCR PreMix & Master Mix	K-2631
AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit	K-3111
AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit	K-3038
T4 DNA Ligase	E-3061
IPTG	C-8001
X-Gal	C-8002
Agarose, 100 g	C-9100
50X TAE ,500 ml	C-9004
GreenStar™ Nucleic Acid Staining Solution I	C-9036
AllInOneCycler™ PCR System	A-2041
Agaro-Power™ System	A-7020
DUALED Blue/White Transilluminator	A-6020

Explanation of Symbols

LOT	Batch Code	REF	Catalog Number		Caution		Consult Instructions For Use
Σ	Contains Sufficient for <n> tests		Manufacturer	RUO	Research Use Only		Temperature Limitation
	Use-by Date						

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuRapid™ TA Cloning Kit

사 용 설 명 서

K-7170

Σ 20

Version No.: 2 (2024-07-15)

사용 전, 사용설명서에 있는 모든 내용을 정독하시길 바랍니다.

㈜ 바이오니아

대전광역시 대덕구 문평서로 8-11

Tel: 1588-9788

Email: sales@bioneer.co.kr

www.bioneer.com

사용 목적

AccuRapid™ TA Cloning Kit는 연구용 제품으로 연구 목적으로만 사용할 수 있습니다. 사용자는 국가 및 사용 용도에 따라 권한 취득이 필요할 수 있습니다.

안전경고 및 주의사항

자극적이거나 유해한 물질을 다루는 경우 적절한 보호장비를 착용하시기 바랍니다. 실험복, 보호장갑, 보호안경 등의 사용을 적극 권장합니다. 자세한 정보는 물질안전보건자료 (MSDS)를 확인하시기 바랍니다.

보증 및 책임

모든 바이오니아 제품은 엄격한 품질 관리 공정 아래에서 완제품 시험 과정을 거칩니다. 바이오니아는 보증 기간 (제품표시) 동안 제품의 품질을 보증합니다. 바이오니아는 본 사용설명서에 제시된 사용법과 다른 방법을 사용하여 발생된 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다. 효율적인 시장보고 및 처리를 위하여 고객은 발생된 문제점을 30일 이내에 바이오니아에 상세하게 전달하여야 합니다.

ISO 9001 품질경영시스템 인증

바이오니아에서 생산되는 모든 제품은 제품 개발, 생산에서 품질 보증 및 공급업체 자격에 이르기까지 ISO 9001 규정에 의거하여 엄격한 품질관리 및 검사를 통과한 후 출하된 제품입니다.

상표

AccuRapid™은 바이오니아의 상표입니다.

저작권

Copyright 2022. 바이오니아. 무단전재 및 복제 금지

고지

제품, 서비스, 사양, 설명 등 제공된 모든 정보는 사전 예고 없이 절차에 따라 변경될 수 있습니다.

목차

제품 정보 **18**

제품 구성 18

보관법 18

제품 사양 18

개요 **19**

제품 개요 19

pBHA-T Vector 20

실험 방법 **22**

사용자 준비 사항 22

Insert 준비 23

Ligation 반응 24

형질전환 25

결과 확인 26

문제 해결 **28**

주문 정보 **30**

관련 제품 **30**

기호 설명 **31**

제품 정보

제품 구성

구성품	규격
	K-7170 (20 rxn)
pBHA-T vector (25 ng/μl)	40 μl
Control Insert (70 ng/μl)	20 μl
AccuRapid™ 2X Reaction buffer	100 μl
T4 DNA Ligase (200 U/μl)	20 μl

* **Unit 정의:** 1 μg/20 μl의 lambda DNA-*Hind* III 분해산물을 16°C에서 30분 동안 90% 이상 연결하는 효소활성을 200 U (1 weiss unit)으로 한다.

보관법

AccuRapid™ TA Cloning Kit 의 모든 구성품들은 -20°C 에서 보관해야 합니다. pBHA-T vector 와 *AccuRapid*™ 2X Reaction buffer 를 반복적으로 얼리고 녹일 경우, cloning 효율이 저하될 수 있습니다. 따라서, 1회 반응분을 따로 분주하여 보관하는 것을 권장합니다.

제품 사양

	***AccuRapid*™ TA Cloning Kit**
반응 시간	15분
반응 온도	25°C
PCR/Gel purification 필요성	권장 사항
선별 마커	Ampicillin

개요

제품 개요

TA Cloning은 *Taq* DNA Polymerase에 의해 3' 말단에 deoxyriboadenosine (dA)-tailing된 DNA를 3' 말단에 deoxyribothymidine (dT)가 첨가된 vector에 ligation하여 PCR product를 직접적으로 cloning 하는 방법입니다. *Taq* DNA Polymerase 및 기타 non-proofreading DNA polymerase들은 말단 전이효소 활성을 가져, PCR product의 3' 말단에 dA를 추가하여 A-overhang 구조를 생성합니다. 이러한 PCR product는 미리 선형화 된 T-vector (pBHA-T vector)에 ligation을 통해 직접 삽입할 수 있습니다. Ligation은 15분 반응만으로 짧은 시간 안에 다양한 크기의 insert DNA의 cloning이 가능하며, vector 내 ampicillin 선별 마커 및 *LacZ* 유전자를 통해 ampicillin 및 blue/white screening이 가능합니다. 따라서, TA Cloning은 제한효소 인지서열이 포함된 primer의 사용이나, 제한효소 처리 없이도 쉽게 cloning 할 수 있어 특히, restriction enzyme site가 제한적일 때 유용합니다. 또한, vector 내의 cloning site 주변에 여러 개의 restriction enzyme site가 포함되어 있어, 결과 분석이나 다른 vector로의 cloning을 쉽게 합니다. BIONEER의 *AccuRapid*™ TA Cloning Kit는 3' 말단에 (dA)를 첨가할 수 있는 *Taq* DNA Polymerase와 같은 DNA polymerase 로부터 증폭된 PCR 산물을 선형화 된 pBHA-T vector에 쉽고 빠르게 cloning 할 수 있는 제품입니다.

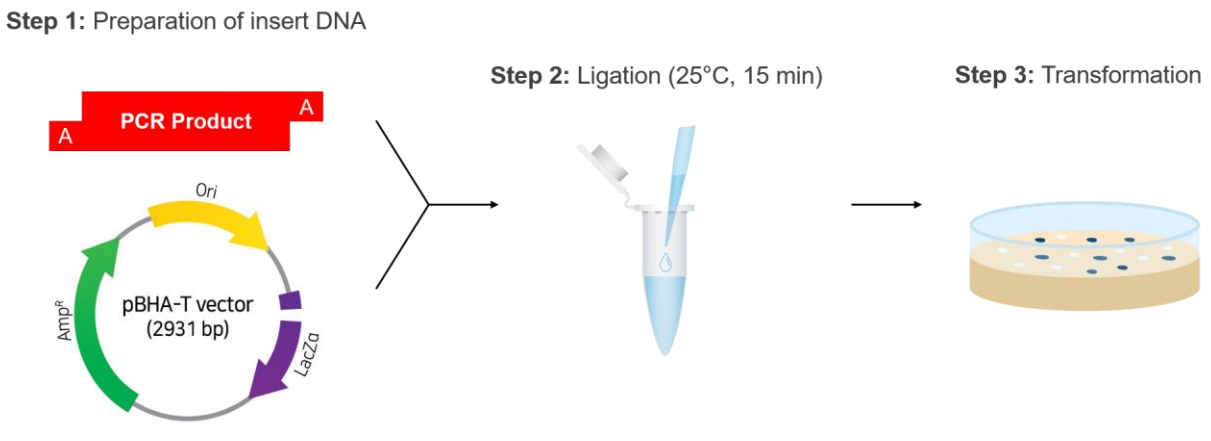


그림 1. *AccuRapid*™ TA Cloning Kit를 이용한 실험 모식도.

pBHA-T Vector

특징

1. *LacZα* gene
   β-galactosidase의 1~146번 아미노산을 암호화하는 유전자입니다. Blue/white screening시, host *lacZ* gene의 ω-fragment를 complementation하여 β-galactosidase 활성을 나타냅니다.

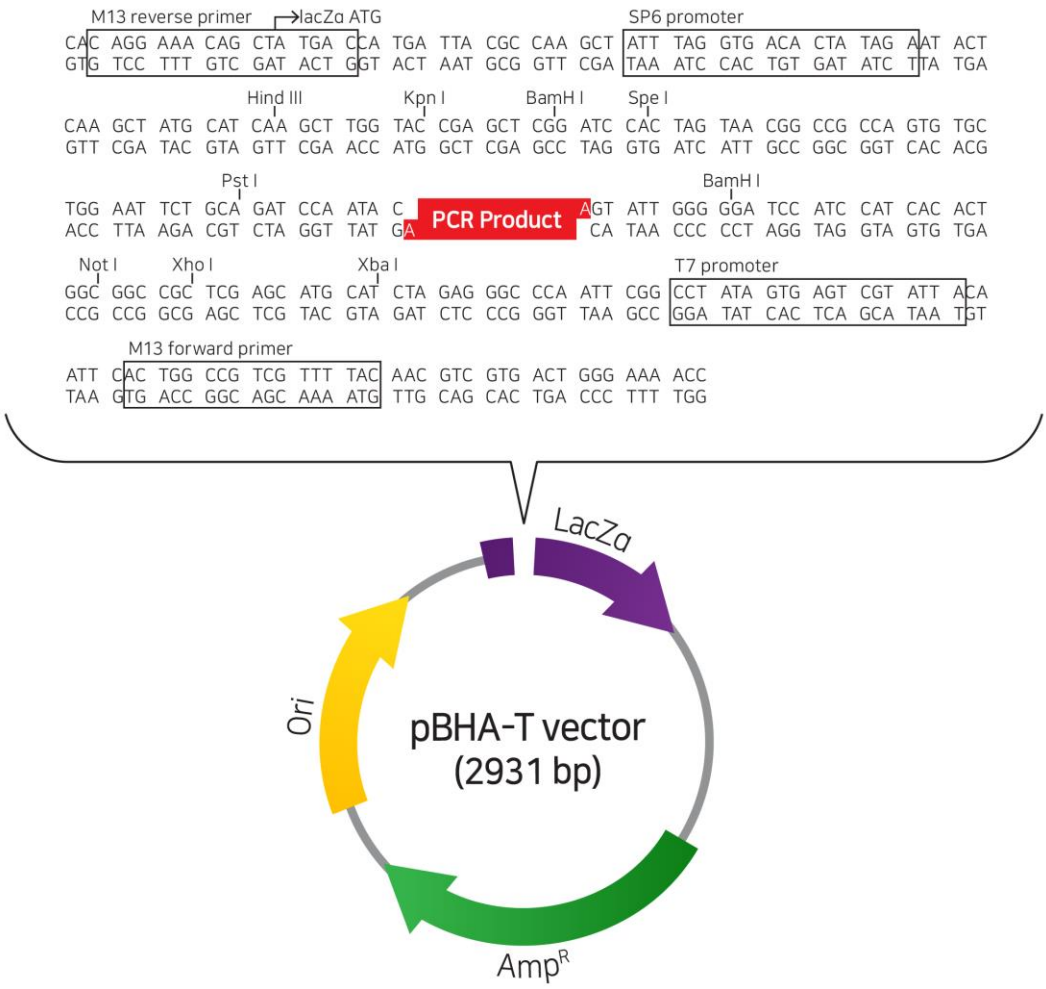
2. Ampicillin 저항성 유전자
   Ampicillin 항생제 저항성 유전자를 가지며, 형질전환체 선별을 위해 사용합니다.

3. M13 Forward and Reverse primer site
   삽입하고자 하는 DNA 서열이 plasmid에 포함되어 있는지 서열을 분석하기 위해 사용합니다.

4. T7 promoter and SP6 promoter
   삽입하고자 하는 DNA 서열이 plasmid에 포함되어 있는지 서열을 분석하거나 삽입한 서열로부터 RNA를 *in vitro* transcription할 때 사용합니다.

5. *BamH* I restriction site
   삽입된 DNA 를 재조합 plasmid 로부터 잘라내는데 사용합니다.

Vector Map



pBHA-T vector	위치 (Bases)
M13 Reverse primer site	1~17
LacZα gene	13~441
SP6 promoter	35~53
T7 promoter	236~254
M13 Forward primer site	261~277
Ampicillin resistance gene	1,003~1,863
pUC *ori* (high copy number)	2,034~2,622

실험 방법

사용자 준비 사항

- *AccuPower® Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2601) 혹은
  AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix (Cat. No. K-2631)
- *AccuPower®* PCR PreMix (Cat. No. K-2012)
- *AccuPrep®* PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038)
- Thermal cycler (*AllInOneCycler*™ PCR system, A-2041)
- Chemically or electrocompetent cell
- IPTG (Cat. No. C-8001)
- X-Gal (Cat. No. C-8002)
- Ampicillin 이 포함된 LB agar plate
- LB broth 혹은 SOC 배지
- M13 Forward primer, M13 Reverse primer

Insert 준비

1. *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2631) 와 *AllInOneCycler*™ PCR system (Cat. No. A-2041) 을 이용하여 template DNA 로부터 insert 를 증폭합니다.
   * **참고:** Insert DNA 의 증폭은 반드시 3' 말단에 adenine 을 추가할 수 있는 DNA polymerase 를 사용해야 합니다. 이외에 *AccuPower*® PCR PreMix (Cat. No. K-2012), *AccuPower*® *Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2601) 도 사용 가능하지만, 만약 proofreading 기능이 필요한 경우, *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix 사용을 권장합니다.

2. *AccuPower*® *ProFi Taq* PCR PreMix 튜브 내에 template DNA, primer, nuclease-free water 를 넣어 최종 부피 20 µl 또는 50 µl 가 되도록 준비합니다. 건조된 premix 의 부피는 포함하지 않습니다.
   * **참고:** Primer 내에 별도의 추가 서열은 필요 없습니다.
   - 반응용액 준비

조성	20 µl 반응	50 µl 반응
Template DNA (1~500 ng)	Variable (1~10 µl)	Variable (1~25 µl)
Forward primer (10 pmol/µl)	0.5~2 µl	1~5 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0.5~2 µl	1~5 µl
Nuclease-free water	Variable	Variable
Total volume	20 µl	50 µl

3. 반응용액을 vortex 하여 진공 건조된 premix 를 완전히 녹인 후, spin down 합니다. 다음과 같은 조건으로 PCR 을 수행합니다.

과정	온도	시간	반복수
Pre-denaturation	95°C	5분	1 cycle
Denaturation	95°C	15~20초	30 cycles
Annealing	45~65°C	15~30초	
Extension	72°C	1분/kb	
Final extension	72°C	5~10분*	1 cycle

* **참고:** PCR product 의 효율적인 A-tailing 을 위해 final extension 은 72°C 에서 5분 이상 진행을 권장합니다.

4. 증폭된 insert 를 전기영동한 후, *AccuPrep*® PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038)로 gel elution 합니다.
   * **참고:** 정제되지 않은 PCR product 를 이용할 경우, 효율이 현저히 떨어질 수 있어, gel purification 을 통해 원하는 DNA band 를 정제하여 사용하는 것을 권장합니다.

* **참고:** 일반적으로 사용되는 elution buffer 에는 EDTA 가 첨가되어 있어, ligation 효율을 저하시킬 수 있습니다. EDTA 가 첨가되지 않은 당사의 *AccuPrep*® PCR/Gel Purification Kit 의 elution buffer (EA buffer) 혹은 증류수를 이용하여 elution 하는 것을 권장합니다.

Ligation 반응

1. Ligation 반응을 수행하기 전, 본 제품에 포함된 pBHA-T vector 와 *AccuRapid*™ 2X Reaction buffer 를 얼음에서 천천히 녹여줍니다.

2. Ligation 반응을 위해 다음과 같은 조성으로 반응용액들을 준비합니다.

조성	Positive	Sample
pBHA-T vector (25 ng/μl)	2 μl	2 μl
PCR product	-	0.5~2 μl*
Control Insert (70 ng/μl)	1 μl	-
AccuRapid™ 2X Reaction buffer	5 μl	5 μl
T4 DNA Ligase (200 U/μl)	1 μl	1 μl
Nuclease-free water	1 μl	Variable
Total volume	10 μl	10 μl

* **참고:** 다음과 같은 수식을 이용하여 필요한 PCR product 의 양을 계산합니다. 일반적으로 0.5~2 μl 의 PCR product 를 사용하며, 효율적인 ligation 반응을 위해서는 5 : 1 (insert : vector) 이상의 몰비율로 첨가하는 것을 권장합니다.

$$\text{PCR product (ng)} = \frac{\text{pBHA-T vector (ng) x size of PCR product (bp)}}{\text{Size of pBHA-T vector (bp)}} \text{ x molar ratio of } \frac{\text{PCR product}}{\text{pBHA-T vector}}$$

* **예시**: PCR product 가 1,000 bp 이며, 몰비율(insert : vector) = 5 : 1로 수행 시, 필요한 PCR product 농도

$$\text{PCR product (ng)} = \frac{\text{50 ng x 1,000 bp}}{\text{약 3,000 bp}} \text{ x } \frac{5}{1} = \text{약 83 ng}$$

3. 튜브를 가볍게 tapping 하여 반응용액을 섞어 준 뒤, spin down 합니다.

4. 반응용액을 25°C 에서 최소 15분간 반응을 진행합니다.
   * **참고:** 15분 반응만으로 충분한 colony 를 얻을 수 있지만, cloning 효율을 증가시키고 싶다면 ligation 반응을 1시간까지 늘리는 것을 권장합니다.

5. 반응이 완료된 후, 반응용액은 형질전환을 수행할 때까지 얼음 또는 -20°C 에서 보관합니다.

형질전환

1. Deep freezer 에서 competent cell 들을 꺼내어 얼음 위에서 천천히 녹입니다.

2. 얼음 위에서 녹인 competent cell 50 µl 에 ligation 반응용액 2~5 µl 을 넣어준 뒤, 얼음에서 20분간 반응시킵니다.
   * **참고:** 절대 pipetting 하거나 vortexing 하지 않습니다.

3. 42°C 에서 60초 동안 열충격 (heat shock)을 줍니다. 이 후, 튜브를 곧바로 얼음으로 옮겨준 뒤, 2분간 대기합니다.

4. 37°C 에서 예열한 항생제가 포함되지 않은 LB broth 혹은 SOC 배지를 1 ml 을 첨가한 후, 37°C shaking incubator (200 rpm)에서 1시간 동안 배양합니다.

5. 배양이 끝나기 전, Ampicillin (50-100 µg/ml)가 포함된 LB agar plate 에 0.1 M IPTG (Cat. No. C-8001) 와 X-Gal (50 mg/ml) (Cat. No. C-8002)을 각각 50 µl 씩 분주하고 spreading 후 37°C 에서 예열합니다.

6. 배양이 끝난 뒤, 3,000 rpm 으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 LB broth 200 µl 를 넣어, cell pellet 을 tapping 하여 부드럽게 풀어줍니다.

7. 5번에서 예열한 항생제가 포함된 LB agar plate 로 옮겨, 완전히 스며들도록 spreading 합니다.

8. 37°C incubator 에서 overnight 배양합니다.

결과 확인

1. 형질전환 후, 배양된 colony 를 확인합니다.
   * **참고:** Colony 수는 insert 의 크기, competent cell 의 상태, 형질전환 조건 등에 의해 다르게 형성될 수 있습니다.

2. 최소 10개의 백색 colony 를 선별하여 *AccuPower*® PCR PreMix (Cat. No. K-2012) 튜브 내에 colony, primer, nuclease-free water 를 넣어 최종 부피 20 µl 또는 50 µl 가 되도록 준비합니다. 건조된 premix 의 부피는 포함하지 않습니다.
   * **참고:** Primer 서열은 10 p. 표를 참고하시면 됩니다.

- 반응용액 준비

조성	20 µl 반응	50 µl 반응
Template DNA	Colony	Colony
M13 Forward primer (10 pmol/µl)	0.5~2 µl	1~5 µl
M13 Reverse primer (10 pmol/µl)	0.5~2 µl	1~5 µl
Nuclease-free water	Variable	Variable
Total volume	20 µl	50 µl

3. 반응용액을 vortex 하여 진공 건조된 premix 를 완전히 녹인 후, spin down 합니다. 다음과 같은 조건으로 PCR 을 수행합니다.

과정	온도	시간	반복수
Pre-denaturation	95°C	5분	1 cycle
Denaturation	95°C	20초	25~30 cycles
Annealing	45~65°C	20초	
Extension	72°C	1분/kb	
Final extension	72°C	3~5분	1 cycle

4. 전기영동을 수행하여 insert DNA 삽입 유무를 확인합니다.
   * 실험군 예상 DNA band 크기: 249 bp + insert DNA 의 크기
     ㄴ M13 Forward primer 와 M13 Reverse primer 사이의 길이
   * 대조군 예상 DNA band 크기: 649 bp

5. 이 후, Sequencing 수행 시, T7 promoter, SP6, M13F(-40), M13R(-40), M13F(-20), M13F(-20) primer 들을 사용할 수 있습니다.

Primer 이름	서열 (5'→3')	길이 (bases)
T7 promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	18
M13F(-40)	GTT TTC CCA GTC ACG AC	17
M13R(-40)	CAG GAA ACA GCT ATG AC	17
M13F(-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GT	17
M13R(-20)	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	22

문제 해결

1. Colony가 생성되지 않음.

원인	해결 방법
Competent cell의 효율이 떨어진 경우.	Competent cell의 사용 기한 및 효율을 확인하십시오.
LB agar plate의 항생제 농도가 다른 경우.	본 제품의 pBHA-T vector는 Ampicillin 항생제 마커를 사용합니다. LB agar plate의 Ampicillin 농도를 확인하시고 1달 이내에 제조된 것의 사용을 권장합니다.

2. 대부분의 colony가 청색 혹은 옅은 청색을 나타냄.

원인	해결 방법
Insert DNA에 의한 *lacZ* 유전자의 부분적인 파괴 혹은 *LacZ* 유전자의 낮은 발현	Insert DNA의 길이가 (300 bp) 미만인 경우, 옅은 청색을 띄는 colony도 insert DNA를 포함하고 있을 수 있으므로 옅은 청색 colony를 분석하는 것을 권장합니다.
PCR product에 3' A-tailing이 되지 않음.	*Pfu* DNA Polymerase와 같은 3'→5' exonuclease activity가 있는 DNA polymerase는 3' A-tailing 기능이 없습니다. 따라서 3'→5' exonuclease activity가 없는 *Taq* DNA Polymerase를 사용하는 것을 권장합니다.
PCR product를 장기간 보관한 경우.	PCR product는 ligation 직전에 증폭 및 정제하여 사용하는 것을 권장합니다.
Insert DNA와 vector의 몰비율이 낮은 경우.	본 제품은 ligation 시, 5배이상의 몰비율의 insert DNA 사용을 권장합니다.
Ligation 반응이 제대로 이루어지지 않은 경우.	염농도가 높은 경우 ligation 반응을 저하시킬 수 있습니다. PCR product의 사용량(부피)을 최소화하는 것을 권장합니다.
Host cell이 blue/white screening에 적합하지 않은 경우.	Host cell의 유전형을 확인하시어 *lacZ* 유전자에 mutation이 있는지 확인하시길 바랍니다.

3. 백색 colony가 insert DNA를 포함하고 있지 않음.

원인	해결 방법
PCR 증폭 시, template DNA로 plasmid DNA를 사용한 경우.	Template로 사용한 plasmid DNA가 Ampicillin 항생제 마커를 사용하는 경우, 형질전환시 template plasmid DNA가 삽입될 수 있습니다. PCR 이후 purification 시, gel purification하거나 *Dpn* I을 처리하여 plasmid DNA를 제거하시길 바랍니다.
PCR product 내에 비특이적 산물이 섞여 있는 경우.	Insert DNA의 PCR 증폭 후, 전기영동하여 원하는 길이의 insert를 gel purification하시길 바랍니다.
Satelite colony가 형성된 경우	Ampicillin을 항생제 마커로 사용하는 경우, 큰 백색 colony 주변에 작은 colony들이 형성될 수 있습니다. 되도록 큰 백색 colony들을 선별하시길 바랍니다.
pBHA-T vector의 3' T-overhangs가 손상된 경우.	pBHA-T vector를 반복적으로 얼리고 녹이는 경우, 3' T-overhangs가 손상될 수 있습니다. 3' T-overhangs가 손상된 경우 self-ligation되어 *lacZ* 유전자의 reading frame이 손상되어 활성을 나타내지 않게 됩니다.

4. 백색 colony만 형성됨.

원인	해결 방법
LB agar plate에 X-Gal 또는 IPTG가 없는 경우.	LB agar plate에 X-Gal과 IPTG를 적절하게 첨가하였는지 확인하시기 바랍니다.

주문정보

제품명		Cat. No
AccuRapid™ TA Cloning Kit	20 rxns	K-7170

관련 제품

제품명	Cat. No
Oligo Synthesis (Primer) Service	S-1001
Standard Sequencing Service	S-3010-1
AccuPower® PCR PreMix & Master Mix	K-2012
AccuPower® *Taq* PCR PreMix & Master Mix	K-2601
AccuPower® *ProFi Taq* PCR PreMix & Master Mix	K-2631
AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit	K-3111
AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit	K-3038
T4 DNA Ligase	E-3061
IPTG	C-8001
X-Gal	C-8002
Agarose, 100 g	C-9100
50X TAE ,500 ml	C-9004
GreenStar™ Nucleic Acid Staining Solution I	C-9036
AllInOneCycler™ PCR System	A-2041
Agaro-Power™ System	A-7020
DUALED Blue/White Transilluminator	A-6020

기호설명

LOT	Batch Code	REF	Catalog Number		Caution		Consult Instructions For Use
Σ	Contains Sufficient for <n> tests		Manufacturer	RUO	Research Use Only		Temperature Limitation
	Use-by Date						

BIONEER Corporation - HQ

Address 8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Global Center

Address 71, Techno 2-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34013, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER R&D Center

Address Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
E-mail sales@bioneer.co.kr
Web www.bioneer.com

BIONEER Inc. - USA Branch

Address 155 Filbert St. Suite 216 Oakland, CA 94607, USA
E-mail order.usa@bioneer.com
Web us.bioneer.com

BIONEER Corp. - European Branch

Address Ludwig-Erhard-Strasse 30-34, 65760 Eschborn, Germany
E-mail euinfo@bioneer.com
Web www.bioneer.com

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

© Copyright 2022 BIONEER Corporation. All rights reserved.