

# Dyne PCR Cloning Kit

## 제품설명서

Cat. No. DYK1010	Dyne TA Kit
Cat. No. DYK1020	Dyne TA core Kit
Cat. No. DYK1030	Dyne Blunt kit
Cat. No. DYK1040	Dyne Blunt core kit
Cat. No. DYK1050	Dyne TA-Blunt kit
Cat. No. DYK1060	Dyne TA-Blunt core kit

For research use only.

**목 차**

**I . Dyne PCR Cloning Kit 원리** ..... 3

    1. 개요..... 3

    2. Dyne PCR Cloning Kit 특징 ..... 3

**II . Dyne PCR Cloning Kit 구성 및 보관** ..... 4

    1. Dyne PCR Cloning Kit 종류 ..... 4

    2. Dyne PCR Cloning Kit 구성 및 정보 ..... 4

    3. 운송 및 보관 ..... 5

**III . Dyne PCR Cloning Kit 실험 방법** ..... 6

    1. PCR 산물 준비..... 6

    2. Dyne cloning 반응 ..... 6

    3. 형질전환(Transformation) ..... 7

    4. Control 반응 ..... 9

**IV . pDyne TA V2 Vector 정보** ..... 11

**V.Troubleshooting** ..... 12

# Dyne PCR Cloning Kit Manual

## I . Dyne PCR Cloning Kit 원리

### 1. 개요

Dyne PCR Cloning Kit 는 PCR 을 통해 만들어진 insert 산물을 topoisomerase 를 이용하여 vector 에 제한 효소 처리 없이 바로 cloning 할 수 있도록 제작되어 높은 효율로 5분 만에 신속하게 cloning 할 수 있는 편리한 제품입니다.

#### • Topoisomerase I

Topoisomerase I 은 일반적으로 double strand DNA 의 phosphodiester 결합을 끊고 다시 이어 negative supercoiling 을 줄여주는 효소입니다. Dyne PCR Cloning Kit 에 포함된 topoisomerase 는 5' phosphodiester 결합을 끊어 효소의 tyrosyl 잔기에 DNA 의 3' phosphate 를 phosphotyrosyl 결합으로 연결시킵니다. 잘려진 DNA 사슬의 5' hydroxyl 작용기는 다시 DNA 와 효소의 결합을 공격하여 효소를 제거함으로써 DNA 와 DNA 사이의 phosphodiester 결합을 다시 회복시킵니다. 이러한 topoisomerase I 의 특성을 이용하여 cloning 하도록 개발한 것이 Dyne PCR Cloning Kit 입니다.

### 2. Dyne PCR Cloning Kit 특징

pDyne vector 는 DNA topoisomerase I 이 DNA 각 사슬의 3' 말단에 phosphotyrosyl 결합에 의해 연결된 선상 DNA 형태로 공급됩니다. 따라서 별도의 제한효소 처리 없이 준비된 insert 를 바로 cloning 에 이용할 수 있습니다. 당사에서 개발한 Dyne PCR Cloning Kit 는 숙주세포에 독성을 갖는 *ccdB* 유전자를 vector 에 포함해 새로운 PCR 산물이 삽입되어야만 숙주세포가 살아남을 수 있도록 설계하였습니다. *ccdB* 유전자는 *LacZ $\alpha$*  절편의 carboxyl 말단에 융합되어 있어, insert 가 삽입되지 않은 vector 는 *ccdB* 유전자에 의해 선별되어 높은 효율로 cloning 이 가능합니다. 따라서 별도의 Blue-White screening 이 필요하지 않습니다.

# Dyne PCR Cloning Kit Manual

## II. Dyne PCR Cloning Kit 구성 및 보관

### 1. Dyne PCR Cloning Kit 종류

Dyne PCR Cloning Kit 는 Taq DNA 중합효소에 의해 만들어지는 A-tailed PCR 산물을 사용하는 Dyne TA kit 와 Pfu DNA 중합효소에 의해 만들어지는 blunt-end PCR 산물을 사용하는 Dyne Blunt kit 제품군으로 구분됩니다.

제품	Cat. No.	구성요소
Dyne TA Kit	DYK1010	pDyne vector 6X Dyne buffer M13 reverse primer M13 forward primer
Dyne Blunt Kit	DYK1030	Control insert Control primers mix Sterile water
Dyne TA-Blunt Kit	DYK1050	Dyne 2X DyeMIX-High DH5α Chemically competent <i>E. coli</i> ver2
Dyne TA core Kit	DYK1020	pDyne vector 6X Dyne buffer Sterile water
Dyne Blunt core Kit	DYK1040	
Dyne TA-Blunt core Kit	DYK1060	

### 2. Dyne PCR Cloning Kit 구성 및 정보

#### 1) Dyne PCR Cloning Kit 구성 제품 정보

항목	조성
pDyne TA V2 / pDyne Blunt V2	10 ng/μl
6X Dyne buffer	1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl <sub>2</sub>
M13 reverse primer	10 pmole/μl
M13 forward primer	10 pmole/μl
Control insert	20 ng/μl in TE buffer (pH 8.0)
Control primer mix	10 pmole/μl each
Sterile water	-
Dyne 2X DyeMIX-High	2X

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### 2) Primers 의 염기서열

Primer	Sequence
M13 reverse(-40)	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13 forward(-20)	5' -GTAAAACGACGGCCAG-3'

### 3) Competent cell 구성

항목	조성
S.O.C.배지	2.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
competent cell	<sup>a)</sup> DH5α Chemically competent <i>E. coli</i>
pUC19 control DNA	10 pg/μl in TE buffer(pH 8.0)

<sup>a)</sup> Genotypes of DH5α

*F' φ80lacZ • ΔM15 • f(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

Dyne TA Kit의 경우 gyrase mutant 균주를 사용하였을 때에는 self-colony 가 다수 나올 수 있으므로, *gyrA* R462C mutant type 제외한 *gyrA*<sup>+</sup> 균주를 사용하시는 것을 추천합니다(대부분의 상용화 *E. coli* 균주는 *gyrA*<sup>+</sup>입니다.).

### 3. 운송 및 보관

각 kit 는 Dyne PCR Cloning reagent 와 DH5α Chemically competent *E. coli* 로 구성되어 있습니다. Dyne PCR Cloning reagent 은 -20°C에 보관하며, DH5α Chemically competent *E. coli* 는 -80°C에 보관하여야 합니다.

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### III. Dyne PCR Cloning Kit 실험 방법

#### 1. PCR 산물 준비

Dyne TA Kit 는 Taq(Cat. No. DYP1010), Taq-High(Cat. No. DYP1270), Taq-HOT(Cat. No. DYP1102) 시리즈를 사용하여 A-tailed PCR 산물을 준비하고, Dyne Blunt kit 는 Pfu-Forte(Cat. No. DYP1180), Pfu-Special(Cat. No. DYP1260) 시리즈에 의해 만들어지는 blunt-end PCR 산물을 준비하여 cloning 반응을 하시면 됩니다.

#### • PCR 산물의 점검

일반적으로 PCR 산물은 agarose gel 전기영동을 통해 증폭된 DNA 의 양과 질을 확인합니다. 단일 밴드로 선명하게 증폭되었는지와 정확한 크기인지 확인하십시오. 비특이적으로 합성된 DNA 가 섞여 있거나 정확한 산물이 증폭되지 않았다면, 제조사의 권장사항에 맞추어 PCR 조건을 조정하는 것이 좋습니다.

※ Primer 의 5' 에 phosphate 작용기를 첨가하지 마십시오. 5' phosphate 작용기가 포함된 PCR 산물은 pDyne vector 에 연결되지 않습니다.

#### 2. Dyne cloning 반응

Dyne PCR Cloning Kit 는 topoisomerase 를 이용한 cloning 방법으로 별도의 ligase 가 필요하지 않습니다. 또한 5분만 반응시켜도 충분한 형질 전환체를 얻을 수 있으며, 최대 20분까지 반응시간을 늘리면 더 많은 형질 전환체를 얻을 수 있습니다

##### ① Dyne 반응 조성

시약	사용량
pDyne TA V2 또는 pDyne Blunt V2	1 $\mu$ l
<sup>a)</sup> 6X Dyne buffer	1 $\mu$ l
PCR 산물	0.5 ~ 4 $\mu$ l
Sterile water	up to 6 $\mu$ l

##### <sup>a)</sup> 6X Dyne buffer

형질전환을 어떤 방식으로 수행할 지에 따라서 염 농도를 조절할 필요가 있습니다. Electroporation 을 실시하는 중에 arcing(호광)이 발생하여 형질전환 효율을 떨어뜨릴 수 있으니 다음과 같이 1/4로 희석하여 반응하십시오.

- Electroporation 을 사용할 경우: 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (1/4희석)

② 부드럽게 섞어주고 상온(25°C)에서 5 분간 반응시킵니다

③ 얼음에 놓고 형질전환을 실시합니다.

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### 3. 형질전환(Transformation)

※ 주의: 다인바이오(주)의 DH5 $\alpha$  competent *E. coli*는 Chemically방식의 competent cell임을 알려드립니다.

#### • Chemically competent cell 을 이용한 형질전환 방법

- ① Dyne 반응액 3~6 $\mu$ l 을 competent cell 100  $\mu$ l 와 부드럽게 섞어 줍니다.  
※주의: Pipette 을 이용한 up and down 방식으로 혼합하지 마십시오.
- ② 얼음에서 5~30분간 반응시킵니다
- ③ 42 $^{\circ}$ C에서 30초간 heat-shock 을 주고 바로 얼음에 2분간 방치하여 안정화합니다
- ④ 실온으로 예열된 S.O.C. 용액을 400  $\mu$ l 첨가합니다.
- ⑤ Tube 의 뚜껑을 확실하게 닫고 37 $^{\circ}$ C 에서 흔들어 주면서 1시간 동안 배양합니다.
- ⑥ 200~500  $\mu$ l 의 용액을 취해 ampicillin 이나 kanamycin 이 포함된 배지에 도포하고 밤새 배양합니다.

#### • Electro - competent cell 을 이용한 형질전환 방법

- ① Dyne 반응액(electroporation 용) 6  $\mu$ l 을 50  $\mu$ l 의 electro-competent cell과 부드럽게 섞어 줍니다.  
※ 주의: Pipette 을 이용한 up and down 방식으로 혼합하지 마십시오.
- ② 이 후 과정은 electroporator manual 에 따라 eletroporation 시킵니다.

#### • 형질 전환체 분석

배양된 cell 이나 추출된 plasmid 를 대상으로 restriction analysis, colony PCR screening, sequencing 등의 방법으로 insert 유무를 확인합니다.

##### 1) Enzyme digestion

- ① 10 여개의 colony 를 ampicillin(50-100  $\mu$ g/ml) 또는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 나 SOB 배지에서 밤새 배양합니다.
- ② 배양된 cell 에서 plasmid 를 추출합니다.
- ③ 추출된 plasmid 를 대상으로 vector map 에 제시된 적당한 제한효소를 선택하여 Insert 를 확인합니다.

##### 2) PCR screening

###### • 반응 조성

시약	사용량
Dyne 2X DyeMIX-High	10 $\mu$ l
Primer mix(5 pmoles / $\mu$ l each)	1 $\mu$ l
Sterile water	9 $\mu$ l

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

- ① Dyne 2X DyeMIX-Tenuto, forward 와 reverse primer, sterile water를 넣어 20 $\mu$  l PCR 반응액을 만듭니다.
- ② Colony 한 개씩 선별하여 PCR 반응액에 섞어줍니다.
- ③ Cell lysis 및 nuclease 불활성화를 위해서 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킵니다.
- ④ 25~30 cycle 증폭 후, agarose gel 에서 분석합니다.

### 3) Sequencing

추출된 plasmid 를 적당한 primer 로 sequencing 합니다. Insert 를 확인하기 위해서 본 vector 에서는 M13R, M13F primer 를 사용할 수 있으며, insert 길이에 따라 추가적으로 적절한 primer 를 사용자가 합성하여 사용할 수 있습니다.

### 4) 형질 전환체 장기간 보관

Insert 가 확인된 colony 를 장기간 보관하기 위하여 단일 colony 를 분리하여 glycerol stock 을 만들고, DNA 는 추출하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관합니다.

- ① 단일 colony 를 분리하기 위하여 ampicillin(50 ~ 100  $\mu$ g/ml) 또는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml) 이 포함된 배지에 도말합니다.
- ② 분리된 단일 colony 를 ampicillin(50 ~ 100  $\mu$ g/ml) 또는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 1~2 ml 에 접종한 후, 밤새 배양합니다.
- ③ Cell 배양액 0.85 ml 과 멸균된 100% glycerol 0.15 ml 를 섞어준 후 -80 $^{\circ}$ C 에 보관합니다.



## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### 4. Control 반응

Dyne 반응을 이용한 cloning 실험의 평가를 위해 control 반응을 실시하는 것이 도움이 됩니다. 제공된 PCR 산물은 control insert 로 직접 사용하거나, PCR 증폭 후 사용하실 수 있습니다.

#### 1) PCR 반응

##### ① 반응 조성

시약	사용량
Control insert (20 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10X PCR buffer	5 $\mu$ l
dNTP Mix (2.0 mM each)	5 $\mu$ l
Control primer mix (10 pmole/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Sterile water	37 $\mu$ l
<sup>a)</sup> DNA 중합효소	1 $\mu$ l
최종 부피	50 $\mu$ l

##### <sup>a)</sup> DNA 중합효소

3'-overhang PCR 산물: Taq (Cat. No. DYP1010) 또는 Taq-High (Cat. No. DYP1270),  
blunt-end PCR 산물: Pfu-Forte (Cat. No. DYP1180) 또는 Pfu-Special (Cat. No. DYP1260)

##### ② PCR cycle

단계	시간	온도	반복 수
Initial denaturation	2분	95°C	1
Denaturation	30초	95°C	30
Annealing	30초	55°C	
Extension	1분	72°C	
Final extension	10분	72°C	1

##### ③ PCR 산물 확인

PCR 반응액 5  $\mu$ l 를 취해 agarose gel 전기영동으로 약 700 bp 정도의 DNA 절편의 양을 sizemarker 와 비교하여 확인합니다. 약 20 ng/ $\mu$ l 의 DNA 를 Dyne 반응에 사용하시면 됩니다.

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### 2) Dyne control 반응

① Dyne control 반응은 아래 표와 같이 구성합니다.

반응물	Vector only	Vector + control insert
Sterile water	4 $\mu$ l	3 $\mu$ l
6X 반응 완충액	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Control PCR 산물(20 ng/ $\mu$ l)	-	1 $\mu$ l
<sup>a)</sup> pDyne V2	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
최종 부피	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

<sup>a)</sup> pDyne V2: 3'-overhang PCR 산물은 pDyne TA V2, blunt-end PCR 산물은 pDyne Blunt V2 를 사용하십시오.

- ② 실온에서 5분간 반응 시키십시오.
- ③ 3~6  $\mu$ l 를 분취해 competent cell 을 형질전환 합니다.
- ④ 100  $\mu$ l 를 ampicillin 이나 kanamycin 배지에 도포합니다.
- ⑤ 37°C 에서 밤새 배양합니다.

### 3) 결과분석

배지에서 나오는 colony 숫자를 셉니다 이때, 200 여개 이상의 colony 가 나오고 95% 이상의 colony 가 insert 를 포함하고 있는 것이 이상적인 실험 결과입니다.

### 4) 형질전환 control 반응

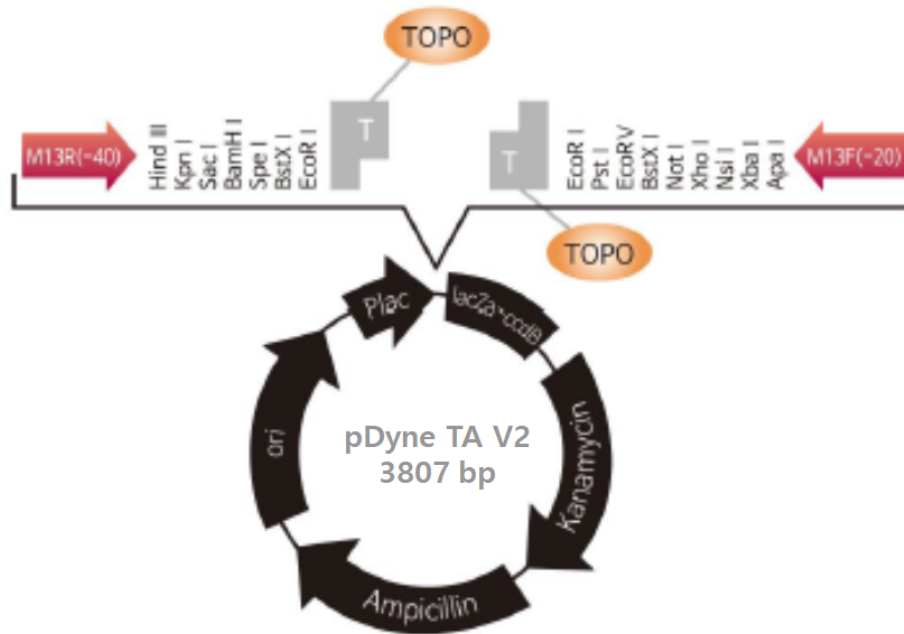
pUC19 plasmid 를 형질 전환 효율을 검사하는데 사용합니다. 10 pg/ $\mu$ l 의 plasmid 1  $\mu$ l 를 100  $\mu$ l 의 competent cell 에 형질 전환 시킵니다(Transformation protocol).

100  $\mu$ g/ml 의 ampicillin 이 포함된 배지에 도말하여 자라는지 확인합니다.

## Dyne PCR Cloning Kit Manual

### IV. pDyneV2 Vector 정보

•Map of pDyne vector



Comments for pDyne-V2 3807 nucleotides

- Lac promoter/operator: 95~216
- M13 Reverse Primer binding site: 205~221
- *LacZ* ORF: 217~534
- MCS, Multiple Cloning Sites: 234~357
- M13(-20) Forward Primer binding site: 391~406
- *ccdB* ORF: 544~846
- Kan<sup>r</sup> gene: 1057~1989
- Amp<sup>r</sup> gene: 2007~2867
- pUC origin: 3012~3685

• **pDyne V2 full sequence**

pDyne V2 의 sequence 정보는 다인바이오(주) 홈페이지([www.dynebio.co.kr](http://www.dynebio.co.kr))에서 확인 하실 수 있습니다.

## V. Troubleshooting

### 1) 형질 전환체수가 적을 경우

- Dyne 반응을 최대 20분까지 늘리시면 더 많은 형질 전환체를 얻을 수 있습니다.
- Competent cell 의 효율을 확인하시기 바랍니다. 당사 DH5 $\alpha$  Chemically competent *E. coli* 와 함께 제공된 pUC19 로 competent cell 효율을 확인 하실 수 있습니다.
- PCR 반응의 pH 를 확인해주시시오. pH 가 9.0 이상이면 효율이 저하될 수 있습니다.
- PCR 과정의 final extension step 의 시간이 충분한지 확인하십시오.

### 2) 형질 전환체가 하나도 없을 경우

- Primer 의 5'에 phosphate 작용기를 확인하십시오. 5 'phosphate 작용기가 포함된 PCR 산물은 pDyne vector 에 연결되지 않습니다.
- Competent cell 의 효율을 확인하시기 바랍니다. 당사 DH5 $\alpha$  Chemically competent *E. coli* 와 함께 제공된 pUC19 로 competent cell 효율을 확인 하실 수 있습니다.

### 3) PCR 산물의 양이 적은 경우

- PCR 산물의 부피를 4  $\mu$ l 까지 늘려서 사용하거나, PCR 산물을 농축하여 사용하고, 반응시간을 20분까지 늘려서 반응 시킵니다.

### 4) PCR 산물의 양이 많은 경우

- vector 와 insert의 적당한 비율은 1 : 10 입니다. 너무 적거나 많은 insert 를 사용할 경우 효율이 저하될 수 있습니다.
- 본 제품은 vector 양을 10 ng 으로 제공하고 있으므로 insert 크기에 따라 사용량을 조절하시면 됩니다. Insert size 700 bp 당 20 ng 정도 사용하시면 됩니다.

### 5) Insert 가 3 kb 보다 클 경우

- Dyne XL TA Kit(Cat. No. DYK1240) 제품은 최대 10 kb 까지 cloning 이 가능하므로, Dyne XL TA Kit 사용을 추천합니다.

### 6) Negative control 이 많이 나온 경우

- 사용한 competent cell 이 *gyrA*<sup>+</sup> 균주인지 확인하십시오.