

AccuRapid™ Cloning Kit

Cat. No. K-7110
K-7120
K-7130

AccuRapid™ Cloning Kit

User Guide

K-7110
 **10**

K-7120
 **20**

K-7130
 **50**

Version No.: 2 (2022-02-23)

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[™] 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
Experimental Procedures	3
Preparation of Linearized Vector	3
Primer Design	4
Insert Amplification	5
Cloning Reaction	7
Transformation	8
Results Analysis	9
Troubleshooting	10
Ordering Information	12
Related Products	12
Explanation of Symbols	13

Product Information

Components

Components	Amount		
	K-7110 (10 rxn)	K-7120 (20 rxn)	K-7130 (50 rxn)
<i>AccuRapid</i> [™] Enzyme Mix	45 µl	45 µl x 2 ea	45 µl x 5 ea
2 kb pBHA Control Vector (Amp ^R , 25 ng/µl)	3 µl	3 µl x 2 ea	3 µl x 5 ea
750 bp Control Insert (50 ng/µl)	5 µl	5 µl x 2 ea	5 µl x 5 ea

Storage

All components of *AccuRapid*[™] Cloning Kit should be stored at -20°C.

Specifications

	<i>AccuRapid</i> [™] Cloning Kit
Reaction time	30 min
Reaction temperature	50°C
Need for PCR/Gel purification	Recommendation

Introduction

Product Description

BIONEER's *AccuRapid*™ Cloning Kit allows an accurate and a rapid cloning of 1-3 inserts (PCR products) into a linearized vector. This product connects the linearized vector and the PCR-amplified inserts by recognizing 18-21 bp complementary sequences at each end of the linearized vector and the amplified inserts. Unlike the conventional method which performs restriction enzyme digestion and ligation, this product does not require a treatment of restriction enzyme with inserts. Instead, inserts to be cloned can be prepared rapidly through PCR and accurately positioned within vector for cloning. The PCR primers can be easily designed by adding 18-21 bp complementary sequences found at both ends of the vector to the 5' end of the primer.

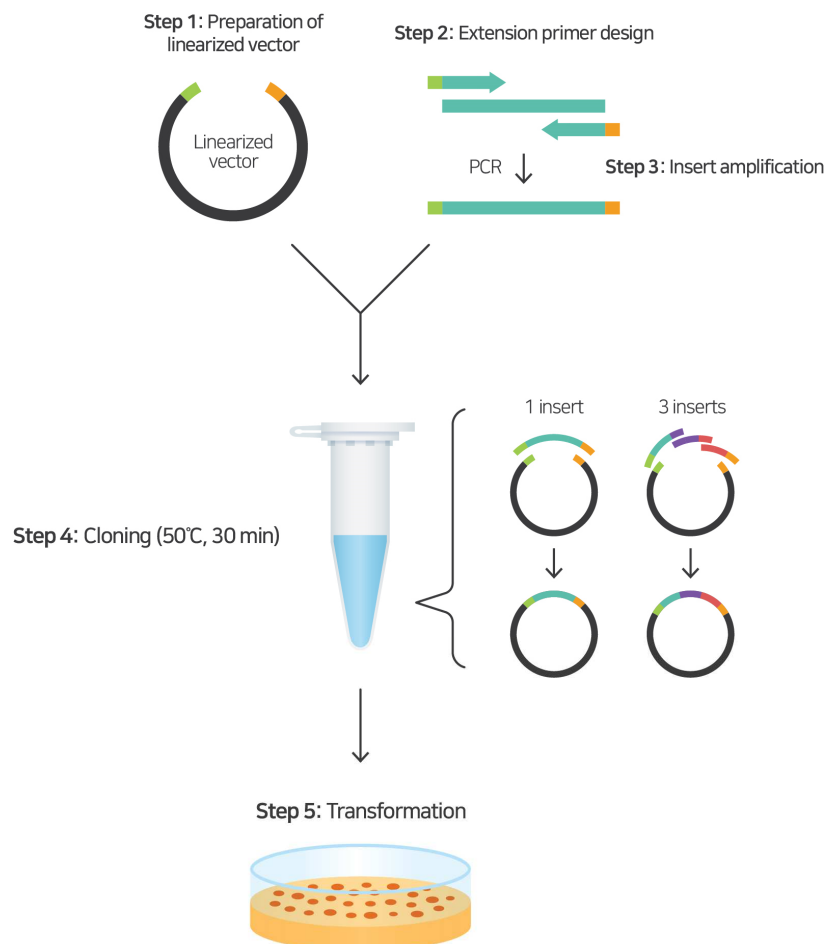


Figure 1. Schematic protocol for *AccuRapid*™ Cloning Kit.

Experimental Procedures

Preparation of Linearized Vector

In order to use the *AccuRapid*[™] Cloning Kit, it is important to completely linearize the vector using restriction enzyme digestion or PCR.

Experiments with completely linearized vectors will increase the efficiency of cloning, forming many colonies with inserts as well as reducing colony formation of circular vectors without inserts.

*** Note:** In order to increase cloning efficiency, it is recommended to check the linearized vector through electrophoresis after restriction enzyme treatment and proceed to the next experiment.

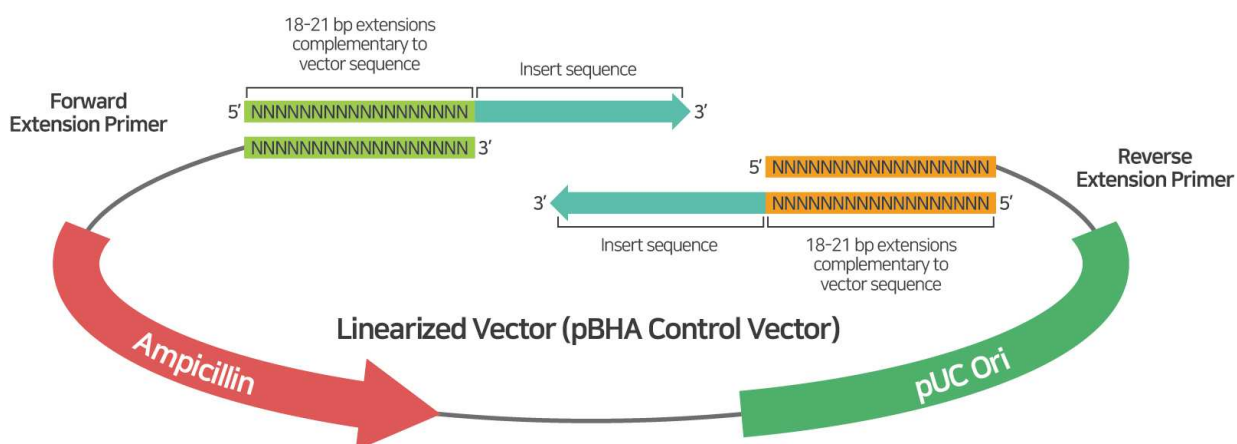
1. The vector to be used for cloning is extracted from *E. coli* using the *AccuPrep*[®] Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Cat. No. K-3111).
2. Linearize the vector by restriction enzyme treatment or PCR.
3. After the linearized vector is clearly separated from the circular vector through electrophoresis, the linearized vector is purified using *AccuPrep*[®] PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038).
4. Prepare DNA at a concentration of 25-50 ng/μl.

Primer Design

Primers to amplify the insert should be designed to contain 18-21 bp complementary sequences at both ends of the linearized vector at the 5' end of the primers.

* You can easily design extension primers for insert amplification on the *AccuRapid™* Cloning Kit product homepage.

* BIONEER's oligo synthesis service allows you to receive high-quality primers quickly.



ex) When cloning into *Nde*I (CATATG), *Xho*I (CTCGAG) enzyme site.

Vector sequences:

TCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCC
 TCTAGAAATAATTTTGTCTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCA
 TCATCACAGCAGCGGCCTG**GTGCCGCGCGGCAGCCATATG**(*Nde*I)GCTAGCATGACTGGTG
 GACAGCAAATGGGTCCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCA(*Xho*
I)CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGC
 TGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG
 GTCCTGAGGGGTTTTTGTCTGAAAGGAGGA ACTATATCCGGAT

3' end vector sequences (Forward primer)

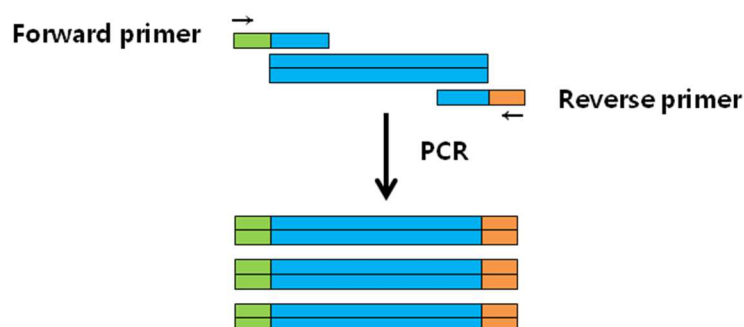
GTGCCGCGCGGCAGCCATATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 5' end insert sequences

5' end vector sequences (Reverse primer)

GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 3' end insert sequences (Reverse complement)

Insert Amplification

After primers design, PCR is performed with the synthesized extension primers to amplify the insert (Using BIONEER's PCR equipment, *AllInOneCycler*[™], you can amplify rapidly). After that, perform PCR purification or electrophoresis followed by gel purification to obtain a purified insert.



1. Using an existing template

- 1) Use the *AllInOneCycler*[™] PCR system (Cat. No. A-2041) and *AccuPower*[®] *ProFi Taq* PCR PreMix (Cat. No. K-2631) to amplify the insert from the template DNA.
- 2) Add template DNA, primers, and nuclease-free water into *AccuPower*[®] *ProFi Taq* PCR PreMix tubes to make a total volume of 20 μ l or 50 μ l. Do not calculate the dried pellet.

- Preparation of reaction mixture

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

- 3) Dissolve the vacuum-dried pellet by vortexing, and briefly spin down.
- 4) 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	3~5 min	1 cycle

5) After electrophoresis with the amplified insert, gel eluted with *AccuPrep*® PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038).

2. When using AccuGeneBlock Service

When synthesizing an insert using that AccuGeneBlock service, it is recommended to add vector complementary sequences (18-21 bp) at both ends.

- 1) Access the BIONEER website (<http://www.bioneer.com>).
- 2) Click the banner in order of Gene/mRNA Synthesis and Gene Synthesis Custom Order.
- 3) Select AccuGeneBlock among service types.
- 4) Enter the gene name and sequences to be synthesized.
- 5) After selecting the Scale and End type, confirm the quotation.
- 6) Click Preview Invoice to confirm your order history and place your order.

(To complete your order, you must click Place Order in the shopping cart.)

Cloning Reaction

For the cloning reaction, mix the reagents as described below, spin down, and incubate at 50°C for 30 min using an incubator or thermal cycler. After the reaction, keep it in ice or at -20°C until use for transformation.

1. Prepare the reaction mixture under the following tables.

Components	Negative	Positive	Sample
Linearized Vector (25-50 ng)	1 µl (Sample Vector)	1 µl (2 kb pBHA Control Vector, Amp ^R)	1 µl (Sample Vector)
Purified PCR products (70-150 ng)	-	1.5 µl (750 bp Control Insert)	Variable*
Nuclease-free water	5 µl	3.5 µl	Variable
<i>AccuRapid</i> TM Enzyme Mix		4 µl	
Total volume		10 µl	

* Purified PCR products need to be 70-150 ng/rxn totally, and 5 µl maximum in volume.

ex) 1 fragment: 5 µl, 2 fragments: 2.5 µl x 2, 3 fragments: 1.7 µl x 3

2. Mix the reaction mixture by tapping the tube gently and briefly spin down.

3. Incubate the reaction mixture at 50°C for 30 min.

4. 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 10 µl of cloning reaction mixture into 50-100 µl of competent cells and incubate on ice for 20 min.
3. Heat shock the cells at 42°C for 90 sec. Then, immediately place tubes on ice and incubate 2 min.
4. Add 1 ml of LB broth (not included antibiotics) and incubate at 37°C shaking incubator (200 rpm) for 1 hr.
5. After the incubation, centrifuge at 3,000 rpm for 5 min, remove the supernatant, add 100 µl of LB broth, and gently resuspend the cell pellet by tapping.
6. Transfer to LB agar plates (including antibiotics) and spread completely.
7. 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 and number of inserts, conditions of competent cells, transformation conditions, etc.
2. Single colonies are inoculated into LB broth containing antibiotics and incubated at 37°C shaking incubator (200 rpm) for overnight. Then, extract the plasmid using *AccuPrep*[®] Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Cat. No. K-3111) and check whether your gene of interest has been successfully cloned through restriction enzyme treatment, PCR, sequencing, etc.

Troubleshooting

1. Little or no colonies produced

Checking way	Cause	Solution
Colonies are normally formed in positive control.	Incorrect design of extension primers for insert amplification	Confirm vector sequences whether containing complementary sequences and design extension primers again.
	Incorrect vector sequences	Proceed the experiment after confirming the correct vector sequences through sequencing.
	The amount of vector or insert used in the reaction is small.	Even if the band is well identified on electrophoresis after restriction enzyme treatment or PCR, the insert may be contaminated or lost during gel purification or PCR purification. Therefore, after gel extraction or PCR purification, a small amount of insert or vector should be run through electrophoresis to confirm the appropriate concentration for the reaction.
Colonies are not formed in positive control	Decreased transformation efficiency of competent cells	Check the expiration date and efficiency of competent cells.
	More than 30 min of cloning reaction	Since the cloning efficiency may be reduced, the reaction proceeds for 30 min. If

	transformation is not possible immediately, store the reaction at -20°C until use.
Using large amounts of <i>AccuRapid</i> [™] Enzyme Mix	If you add <i>AccuRapid</i> [™] Enzyme Mix more than the appropriate amount, the cloning efficiency may decrease, so use only 4 µl.

2. A large number of colonies are generated, but the exact cloning product is not confirmed.

Checking way	Cause	Solution
Many colonies are formed in negative control.	Non-linearized vector	After restriction enzyme treatment or PCR, check the linearized vector through electrophoresis and proceed.
When PCR is performed with candidates, the correct band is not confirmed.	Contamination of insert (PCR fragment)	The insert may be contaminated during PCR or purification, so a small amount of insert should be reconfirmed by electrophoresis and used.
When confirming the size or sequences of the PCR product, sequences that is different in size or similar to the vector is found.	The same or similar sequences to the 18-21 bp complementary sequences of the primers also exist at the other sites within the vector	Proceed with a different cloning design, or use a ligation method after restriction enzyme treatment.










Ordering Information

Description		Cat. No
AccuRapid™ Cloning Kit	10 rxns	K-7110
	20 rxns	K-7120
	50 rxns	K-7130

Related Products

Description	Cat. No
Oligo Synthesis (Primer) Service	S-1001
AccuGeneBlock Service	S-2043
Gene Synthesis Service	S-2041
AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix	K-2631
AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit	K-3111
AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit	K-3038
AllInOneCycler™ PCR System	A-2041
Agarose, 100 g	C-9100
50X TAE ,500 ml	C-9004
Agaro-Power™ System	A-7020
DUALED Blue/White Transilluminator	A-6020
GreenStar™ Nucleic Acid Staining Solution I	C-9036

Explanation of Symbols

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

AccuRapid™ Cloning Kit

사 용 설 명 서

K-7110
 **10**

K-7120
 **20**

K-7130
 **50**

Version No.: 2 (2022-02-23)

사용 전, 사용설명서에 있는 모든 내용을 정독하시길 바랍니다.



(주) 바이오니아

대전광역시 대덕구 문평서로 8-11

Tel: 1588-9788

Email: sales@bioneer.co.kr

www.bioneer.com

사용 목적

AccuRapid™ 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 발생한 문제에 대해서는 책임을 지지 않습니다. 효율적인 시장보고 및 처리를 위하여 고객은 발생한 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	17
제품 구성	17
보관법	17
제품 사양	17
개요	18
제품 개요	18
실험 방법	19
선형화된 Vector 준비	19
Primer 디자인	20
Insert 증폭	21
Cloning 반응	23
형질전환	24
결과 확인	25
문제 해결	26
주문 정보	28
관련 제품	28
기호 설명	29

제품 정보

제품 구성

구성품	규격		
	K-7110 (10 rxn)	K-7120 (20 rxn)	K-7130 (50 rxn)
AccuRapid™ Enzyme Mix	45 µl	45 µl x 2 ea	45 µl x 5 ea
2 kb pBHA Control Vector (Amp ^R , 25 ng/µl)	3 µl	3 µl x 2 ea	3 µl x 5 ea
750 bp Control Insert (50 ng/µl)	5 µl	5 µl x 2 ea	5 µl x 5 ea

보관법

AccuRapid™ Cloning Kit 의 모든 구성품들은 -20°C 에서 보관해야 합니다.

제품 사양

	AccuRapid™ Cloning Kit
반응 시간	30분
반응 온도	50°C
PCR/Gel purification 필요성	권장 사항

개요

제품 개요

BIONEER의 AccuRapid™ Cloning Kit는 1~3 조각의 insert (PCR product)를 선형화 된 vector에 정확하고 신속하게 cloning 할 수 있는 제품입니다. 본 제품은 PCR로 증폭된 insert 말단과 선형화 된 vector 양 말단의 18~21 bp complementary 서열을 인식하여 연결하는 방법입니다. Insert (PCR product 또는 plasmid)에 제한효소를 처리한 후 ligation하는 방법과 달리, 제한효소 처리 대신에 cloning하려는 insert를 PCR 증폭을 통해 빠르게 준비할 수 있으며, vector에 insert를 원하는 방향으로 정확히 cloning 할 수 있습니다. 여기에 사용되는 PCR primer는 삽입될 vector 양 말단의 각각 18~21 bp complementary 서열을 5' 말단에 추가하여 쉽게 디자인할 수 있습니다.

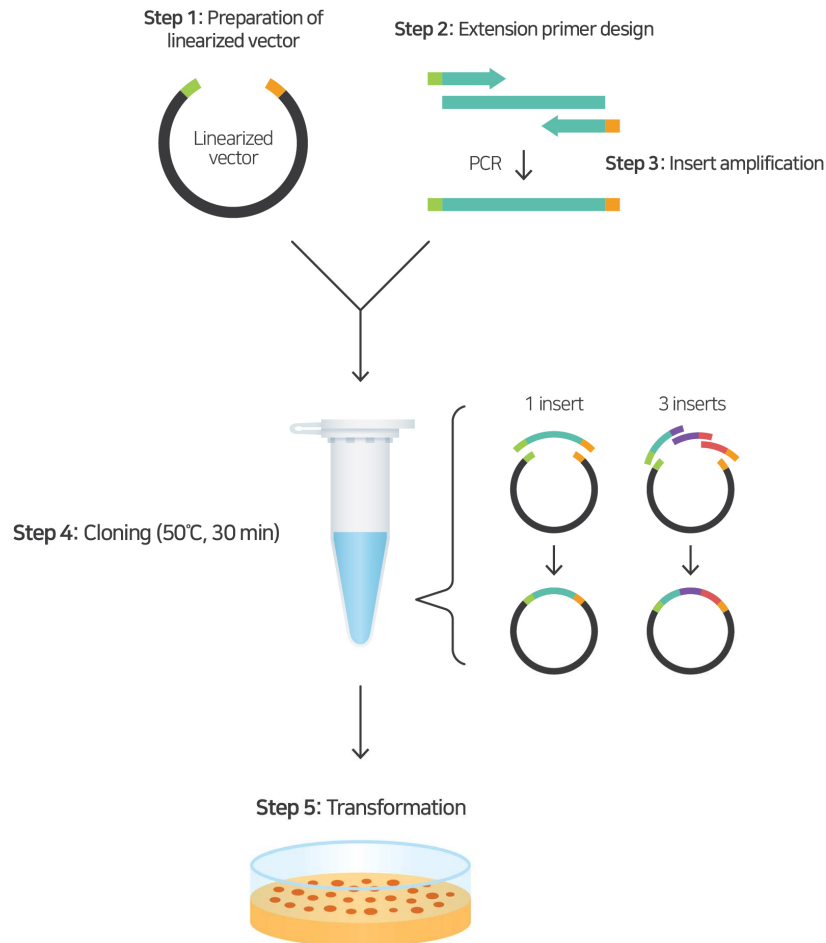


그림 1. AccuRapid™ Cloning Kit를 이용한 실험 모식도.

실험 방법

선형화된 Vector 준비

AccuRapid™ Cloning Kit 를 사용하기 위해서는 제한효소 처리 또는 PCR 을 이용하여 vector 를 완벽히 선형화 하는 것이 중요합니다. 완벽히 선형화 된 vector 로 실험을 진행해야 cloning 효율이 높아져, insert 가 삽입되지 않은 원형 vector 의 colony 형성은 줄어들고 insert 가 삽입된 colony 가 많이 형성됩니다.

* 참고: Cloning 효율을 높이기 위해 제한효소 처리 후, 전기영동을 통해 선형화 된 vector 를 확인하고 다음 실험으로 진행하는 것을 권장합니다.

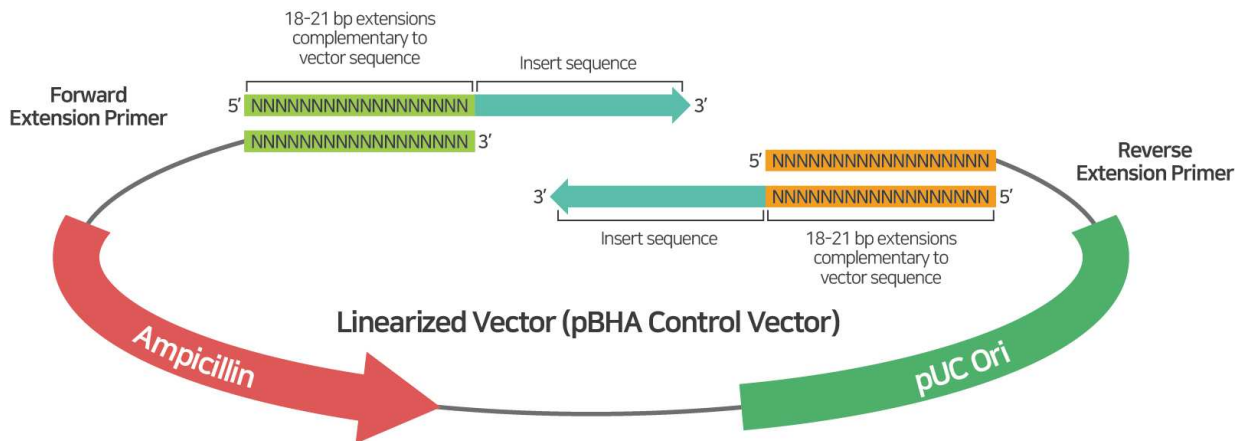
1. Cloning 에 사용할 vector 는 *AccuPrep®* Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Cat. No. K-3111) 를 이용하여 *E. coli* 로부터 추출하여 준비합니다.
2. 제한효소 처리 또는 PCR 을 통해 vector 를 선형화 합니다.
3. 전기영동을 통해 선형화 된 vector 를 원형 vector 와 확실히 분리한 뒤, 선형화 된 vector 는 *AccuPrep®* PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038) 를 이용하여 purification 합니다.
4. DNA 농도측정을 통해 25~50 ng/μl 의 농도로 준비합니다.

Primer 디자인

Insert 를 증폭하기 위한 primer 는 extension primer 로써 primer 의 5' 말단에 선형화 된 vector 양 말단의 18~21 bp complementary 서열을 포함하도록 디자인되어야 합니다.

* BIONEER AccuRapid™ Cloning Kit 제품 홈페이지에서 간편하게 insert 증폭을 위한 extension primer 를 디자인하실 수 있습니다.

* BIONEER 의 올리고 합성 서비스를 이용하시면 고품질의 primer 를 신속하게 받으실 수 있습니다.



ex) *NdeI* (CATATG), *XhoI* (CTCGAG) enzyme site 로 cloning 하는 경우.

Vector 서열:

TCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGA
 AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAG
 CGGCCTG**GTGCCGCGCGGCAGCATATG**(*NdeI*)GCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCG
 GATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCA(*XhoI*)**CTCGAGCACCACCACCAC**CA
 CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA
 CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACTATATC
 CGGAT

3' 말단 vector 서열 (Forward primer)

GTGCCGCGCGGCAGCATATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

5' 말단 insert 서열

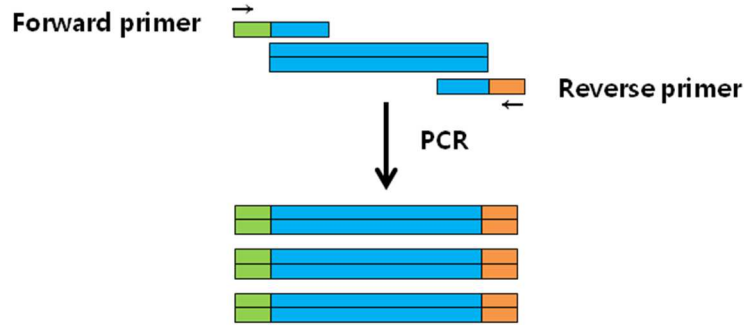
5' 말단 vector 서열 (Reverse primer)

GTGGTGGTGGTGGTCTCGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

3' 말단 insert 서열 (Reverse complement)

Insert 증폭

디자인 후 합성된 extension primer 로 PCR 을 수행하여 insert 를 증폭합니다 (당사의 PCR 장비인 *AllInOneCycler™* 를 사용하면 매우 빠르게 증폭할 수 있습니다). 이 후, PCR purification 또는 전기영동 후 gel purification 을 수행하여 purified insert 를 확보합니다.



1. 기존 template 를 이용하는 경우

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.

2) *AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix* 튜브 내에 template DNA, primer, nuclease-free water 를 넣어 최종 부피 20 μ l 또는 50 μ l 가 되도록 준비합니다. 건조된 premix 의 부피는 포함하지 않습니다.

• 반응용액 준비

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

3) 반응용액을 vortex 하여 진공 건조된 premix 를 완전히 녹인 후, spin down 합니다.

4) 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	3~5분	1 cycle

5) 증폭된 insert 를 전기영동 한 후, AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit (Cat. No. K-3038) 으로 gel elution 합니다.

2. AccuGeneBlock Service 를 이용하는 경우

AccuGeneBlock Service 를 이용하여 insert 를 합성할 경우, 양 말단에 vector complement 서열 (18~21 bp)를 추가로 넣어 합성하는 것을 추천합니다.

- 1) 바이오니아 홈페이지 (<http://www.bioneer.co.kr>)에 접속합니다.
- 2) 유전자/mRNA 합성 → Gene Synthesis Custom Order 순으로 배너를 클릭합니다.
- 3) 서비스 종류 중 AccuGeneBlock 을 선택합니다.
- 4) 합성할 유전자 이름과 서열을 입력합니다.
- 5) Scale 과 End type 을 선택한 후 견적을 확인합니다.
- 6) Preview Invoice 를 클릭한 후 주문 내역을 확인하고 주문합니다.

(장바구니에서 주문하기를 클릭하셔야 주문이 완료됩니다.)

Cloning 반응

Cloning 반응을 위해 다음과 같이 반응물을 혼합하여 spin down 후, incubator 또는 thermal cycler 를 사용하여 50°C 에서 30 분 동안 반응시킵니다. 반응이 끝나면 형질전환을 수행할 때까지 얼음 또는 -20°C 에서 보관합니다.

1. 다음과 같은 조성으로 반응용액들을 준비합니다.

조성	Negative	Positive	Sample
선형화 된 Vector (25~50 ng)	1 µl (Sample Vector)	1 µl (2 kb pBHA Control Vector, Amp ^R)	1 µl (Sample Vector)
Purified PCR products (70~150 ng)	-	1.5 µl (750 bp Control Insert)	Variable*
Nuclease-free water	5 µl	3.5 µl	Variable
AccuRapid™ Enzyme Mix		4 µl	
Total volume		10 µl	

* Purified PCR products 는 총 70~150 ng/rxn 이 되도록 넣어주며, 최대 5 µl 가 넘지 않도록 합니다.

예시) 1 fragment: 5 µl, 2 fragments: 2.5 µl x 2, 3 fragments: 1.7 µl x 3

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

3. 반응용액을 50°C 에서 30 분간 반응시켜줍니다.

4. 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 50~100 μ l 에 cloning 반응용액 10 μ l 와 혼합한 후, 얼음에서 20 분간 반응시킵니다.
3. 42°C 에서 90 초 동안 열충격 (heat shock)을 줍니다. 이 후, 튜브를 곧바로 얼음으로 옮겨준 뒤, 2 분간 대기합니다.
4. 항생제가 포함되지 않은 LB broth 1 ml 을 첨가한 후, 37°C shaking incubator (200 rpm)에서 1 시간 동안 배양합니다.
5. 배양이 끝난 뒤, 3,000 rpm 으로 5 분간 원심 분리하여 cell down 후 상층액을 제거하고 LB broth 100 μ l 를 넣어, cell pellet 을 tapping 하여 부드럽게 풀어줍니다.
6. 항생제가 포함된 LB agar plate 로 옮겨, 완전히 스며들도록 spreading 합니다.
7. 37°C incubator 에서 overnight 배양합니다.

결과 확인

1. 형질전환 후, 배양된 colony 를 확인합니다.
* 참고: Colony 수는 insert 의 크기 및 개수, competent cell 의 상태, 형질전환 조건 등에 의해 다르게 형성될 수 있습니다.
2. Single colony 를 항생제가 포함된 LB broth 에 접종하여 37°C shaking incubator (200 rpm)에서 overnight 배양합니다. 이 후, *AccuPrep*[®] Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Cat. No. K-3111)를 이용하여 plasmid 를 추출한 후 제한효소 처리, PCR, sequencing 등을 통해 cloning 여부를 확인합니다.

문제 해결

1. Colony가 거의 또는 전혀 생성되지 않음.

확인 방법	원인	해결 방법
Positive Control의 colony는 정상적으로 생성됨.	Insert의 extension primer 디자인이 잘못된 경우	Vector 서열을 확인하여 complementary 서열이 포함되었는지 확인 후, 다시 extension primer를 디자인합니다.
	Vector 서열 정보가 잘못된 경우	Sequencing을 통해 정확한 vector 서열을 확인 후 진행합니다.
	반응에 사용된 vector 또는 insert의 양이 적은 경우	제한효소 처리 또는 PCR 후 전기영동 상에는 band가 잘 확인되었어도, gel purification 또는 PCR purification 과정 중에 insert가 오염되거나 소실되는 경우가 있습니다. 그러므로, gel extraction 또는 PCR purification 후 소량을 전기영동으로 재확인하고, 반응 적정 농도로 사용합니다.
Positive Control의 colony도 생성 안됨.	Competent cell의 형질전환 효율이 떨어진 경우	시중에 판매되거나 직접 생산한 competent cell의 유효 기간 및 효율을 확인하고 사용합니다.
	AccuRapid™ Cloning Kit 반응을 30분 초과하여 진행한 경우	Cloning 효율이 감소될 수 있으므로 반응은 30분에 맞춰 진행하고, 곧바로 형질전환 하지 못할 경우에는 반응물을 -20°C 보관 후 사용합니다.
	많은 양의 AccuRapid™ Enzyme Mix를 사용한 경우	AccuRapid™ Enzyme Mix를 적당량보다 많이 넣게 되면 cloning 효율이 낮아질 수 있으니, 4 µl만 사용합니다.

2. 많은 수의 colony가 생성되었으나, 정확한 cloning 산물이 확인되지 않음.

확인 방법	원인	해결 방법
Negative control의 colony가 많이 생성됨.	Vector가 완벽한 선형이 아닌 경우	제한효소 처리 또는 PCR 후 전기영동을 통해 선형화 된 vector를 확인 후, 진행합니다.
Candidates를 PCR 했을 때 정확한 band가 생성이 안됨.	Insert (PCR fragment)가 오염된 경우	간혹 insert의 PCR 또는 purification 과정에서 오염되어 다른 insert가 확인될 수 있으니, 반응 직전 purification 산물 소량을 전기영동으로 재확인하고 사용합니다.
PCR product의 사이즈 확인 또는 서열을 확인했을 때 사이즈가 상이하거나 vector와 유사한 서열이 발견됨.	Primer에 포함된 18~21 bp complementary 서열과 같거나 유사한 서열이 vector 내부의 다른 곳에 있는 경우	Cloning 디자인을 다르게 하여 진행하거나, 제한효소 처리 후 ligation하는 방법을 사용합니다.










주문정보

제품명		Cat. No.
AccuRapid™ Cloning Kit	10 rxns	K-7110
	20 rxns	K-7120
	50 rxns	K-7130

관련 제품

제품명	Cat. No.
Oligo Synthesis (Primer) Service	S-1001
AccuGeneBlock Service	S-2043
Gene Synthesis Service	S-2041
AccuPower® ProFi Taq PCR PreMix	K-2631
AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit	K-3111
AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit	K-3038
AllInOneCycler™ PCR System	A-2041
Agarose, 100 g	C-9100
50X TAE ,500 ml	C-9004
Agaro-Power™ System	A-7020
DUALLED Blue/White Transilluminator	A-6020
GreenStar™ Nucleic Acid Staining Solution I	C-9036

기호설명

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

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