

Dyne TA Kit

Cat. No.	용량	농도
DYK1010	20 rxns	

◆ 제품구성

	Vol. (μl)	Temp.(°C)
pDyne TA V2	20	-20
Dyne 6X Buffer	100	-20
M13F (10 pmol/μl)	50	-20
M13R (10 pmol/μl)	50	-20
Control Primers-cm	50	-20
Control Inserts(TA)	20	-20
Dyne 2X DyeMIX-High	500 (x 2ea)	-20
Sterile water	1,000	-20
Dyne DH5α Chemically Competent <i>E. coli</i> ver.2	100 (x 21ea)	-80
S.O.C media	10,000	-20
pUC19 (50 pg/μl)	50	-20

◆ 품질관리

- 클로닝 효율: 99%

◆ 제품특징

- 반응시간 단축
- 높은 클로닝 효율
- PCR 산물을 바로 사용가능

◆ 응용분야

- A-tail PCR 산물의 빠르고 효율적인 클로닝
(예, Taq으로 증폭된 DNA)

◆ 제품설명

- Dyne TA Kit와 Dyne TA core Kit는 Taq Polymerase로 증폭한 A-tail overhangs가 있는 PCR 산물을 실온에서 5분안에 클로닝이 가능한 제품이다. Kit 내 구성물로 말단이 공유결합된 topoisomerase가 포함된 vector가 제공되며 ligase 없이 A-tail overhangs를 갖는 DNA 절편을 벡터에 접합하는데 유용하다.

◆ 표준반응조건

Dyne 6X Buffer	1 μl
pDyne TA-Blunt V2 (10 ng/μl)	1 μl
PCR product	1~4 μl
Distilled water	up to 6 μl

- 상온(25°C)에서 5분간 반응한다.
- 결합된 DNA를 *E. coli*에 형질전환 시킨다.

◆ Positive clones

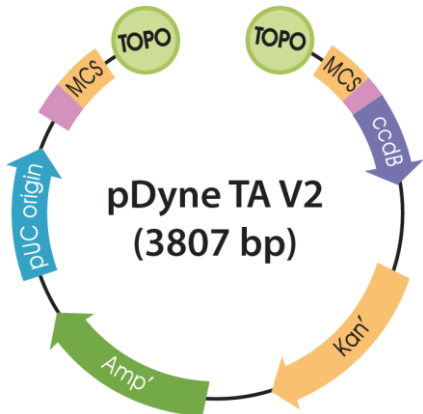
Dyne 2X DyeMIX-High (Cat.# DYP1320, DYP1322)	10 μl
1 colony resuspended in 30 μl distilled water	1 μl
M13F (10 pmol/μl)	1 μl
M13R (10 pmol/μl)	1 μl
Distilled water	up to 20 μl

◆ PCR cycle

Initial denaturation	95°C	2 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30~60 sec
Elongation	72°C	1 min/kb
Number of cycles	25~35 times	
Final elongation	72°C	5 min

◆ **pDyne TA V2의 도식 (3807 bp)**

- topoisomerase (TOPO)의 분자는 pDyne TA에 있는 2개의 3' 말단 (nt 위치 294, 295)에 공유결합으로 이어져있다.
- Lac promoter/operator : 95~216
- M13 Reverse Primer binding site : 205~221
- LacZα ORF : 217~534
- MCS, Multiple Cloning Sites : 234~357
- M13(-20) Forward primer binding site : 391~406
- ccdB ORF : 544~846
- Kanr gene : 1057~1989
- Ampr gene : 2007~2867



```

M13 Reverse Primer |                               HindIII   KpnI   SaqI BamHI SpeI
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 PCR Product  TAG GGC GAA TTC TGC AGA
CAT TGC CGG CGG TCA CAC GAC CTT AAG CGG GAA TTC CCG CTT AAG ACG TCT

EcoRV   BstXI NotI   XhoI   NsiI XbaI   ApaI
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) 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
    
```

◆ **주의사항**

- PCR primer 5' 말단은 표적 DNA의 증폭을 위해 사용되며, 증폭된 DNA 5' 말단에는 인산기 (phosphate group)가 존재하지 않는다.
- 퍼짐현상, 비특이적 밴드, primer-dimers산물이 보이거나 또는 PCR 산물이 1 kb 이상일 경우에는 PCR 산물을 정제하여 사용할 것을 권장한다.
- 100 bp 보다 더 짧은 비특이적인 PCR 산물은 쉽게 TA 벡터에 붙을 수 있어 표적 DNA 클로닝 효율이 현저히 감소한다. 따라서 비특이적으로 증폭된 짧은 단편을 없애기 위해 반드시 PCR 산물을 정제하여 사용할 것을 권장한다.
- Pfu DNA polymerase로 증폭된 DNA 절편 클로닝을 위해 Dyne Blunt Kit (Cat. # DYK1030)를 권장한다. 또는 Taq polymerase 1 unit을 Pfu 증폭반응 시 (72°C, 10분)에 첨가가 가능하며, 이에 따라 Taq polymerase에 의한 blunt end의 PCR 산물의 A-tail 합성이 가능하다. 이 방법으로 DNA 최종 산물은 pDyne TA V2에 클로닝이 가능하다.
- 주의할 점은 A-tail은 DNA 절편말단에 시토신 잔기가 있을 때 클로닝의 효과를 높이며, 이것은 oligonucleotide, PCR primer를 디자인할 때 꼭 고려해야 한다.
- 클로닝에서 Taq polymerase를 사용하면 A 말단 보다는 C 말단에 A-tail을 붙여 높은 효율을 얻을 수 있다.

◆ **제품종류**

Cat. No.	용량	농도
DYK1010	20 rxns	
DYK1012	40 rxns	