



For research use only

ISO9001

## pLPS-T TA Topo Vector : Short Protocol

Product	Quantity	Cat. No.	Remarks
pLPS-T TA Topo Vector	25 Reactions	EBK-1005	1 µl/reaction
	250 Reactions	EBK-1006	1 µl/reaction

### 제품 설명 :

pLPS-T TA topo vector는 topoisomerase type I 효소를 이용해 A tail을 가지고 있는 PCR 산물의 direct cloning에 사용하는 vector입니다. Vector에 첨가되어 있는 Vaccinia topoisomerase I 효소는 PCR 산물의 인산화 여부에 관계없이 그리고 ligase의 작용없이 vector와 insert DNA를 직접 연결할 수 있으며 그 반응은 37°C에서 5분 이내에 이루어지므로 T4 DNA ligase를 사용하는 기존의 TA vector system에 비해 효율이 높은 장점이 있습니다.

pLPS-T vector는 A-tail을 갖는 PCR 산물의 cloning에 사용됩니다 (rTaq, HiPi Taq, HiPi plus Taq과 같이 proof-reading 기능이 없거나 또는 있더라도 활성이 약한 Taq을 이용해 증폭한 산물). 따라서 A-tailing이 충분히 되기 위한 PCR 조건을 설정하여야 하며 Pfu와 같이 proof-reading 기능이 있는 polymerase를 이용해 증폭한 PCR 산물을 cloning하고자 한다면 반드시 A-tailing 과정이 선행되어야 합니다 (rTaq을 이용하거나 또는 terminal deoxytransferase를 이용).

pLPS-T vector는 50% glycerol이 첨가된 buffer에 제공되므로 -20°C 에서도 얼지않고 장기 보관이 가능합니다. 또한 일회용 사용하는 양이 적은 관계로 정확한 용량을 취하기 용이하도록 시인성을 좋게 하기 위해 붉은색 염료를 포함하고 있습니다.

pLPS-T vector로 cloning할 수 있는 insert DNA의 최대 길이는 5 kbp 까지이며 반응시간, insert DNA의 양을 조절하거나 또는 보다 높은 효율의 competent cell을 이용하면 더 큰 크기의 DNA 조각도 cloning할 수 있습니다. 그러나 insert DNA의 size가 커질 수록 그 효율은 떨어지며 본 사용설명서의 방법은 5 kbp 까지의 insert DNA를 cloning하는 방법만을 제공하고 있습니다.

pLPS-T vector는 90% 이상의 효율을 가지며 IPTG/X-gal을 별도로 사용할 필요가 없습니다. pLPS-T vector를 이용하는 경우 insert DNA의 cloning 방향성은 무작위로 결정이 됩니다. pLPS-T cloning 방법은 pLPS-B blunt cloning 방법에 비해 효율이 떨어지는데, 이는 Taq polymerase에 의한 PCR 산물의 A tailing 효율과 직접적으로 관련이 있는 것으로서 제품의 효율성과는 무관한 것입니다.

제품에 포함된 control insert DNA는 약 1 kbp의 dsRed gene과 IPTG에 의해 induction 되는 promoter를 모두 포함하고 있어 방향성에 관계없이 IPTG에 의해 dsRed gene이 발현되며 control DNA를 vector에 넣고 IPTG가 첨가된 배지를 이용하면 insert DNA를 포함하는 정상적인 clone은 붉은색을 띠게 됩니다. 또한 UV illuminator 위에서 붉은 형광을 보이는 colony를 관찰할 수 있습니다.

### 제품구 성 : EBK-1005

- 25 µl pLPS-T TA Vector in Red Colored Buffer
- 50 µl 5x Topo Reaction Buffer
- 5 µl Control Insert DNA (A tailed, 20 ng/µl)

### 보관 방법 :

-20°C에 보관하세요.

Full protocol과 vector 정보는 엘피스바이오텍 홈페이지 ([www.elpisbio.com](http://www.elpisbio.com))에서 다운받으실 수 있습니다.

(주) 엘피스바이오텍  
[www.elpisbio.com](http://www.elpisbio.com)

(302-854) 123-12 Chunglim-Dong, Seo-Gu, Taejeon, Korea  
Tel: +82-42-581-8448, Fax: +82-42-581-8449

### 실험 방법 :

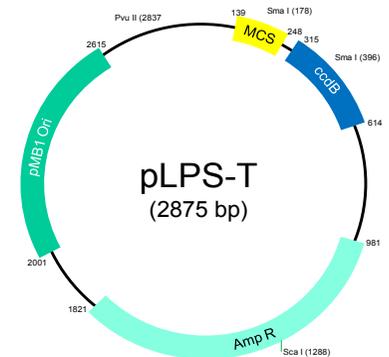
- 1 µl pLPS-T TA Vector (Red colored)
  - 1 µl 5x Topo Reaction Buffer
  - 1-3 µl PCR products (20-100 ng) or 3 µl Control Insert DNA
 Adjust final volume to 5 µl with DW  
 Mix gently by mild pipetting
- Incubate at 37°C for 5 min.
- Transform 1- 5 µl to *E.coli* competent cells according to the standard procedure.
  - (If transform with Control Insert DNA, LB plate has to be pretreated with IPTG before plating to express red color protein)
- After 16 hr transformation, pick several colonies and grow in ampicillin containing LB broth.
- Clone confirmation by colony PCR with gene specific primer pair or M13R(-48)/M13F(-47) primer pair.
  - Or after mini-prep of plasmid DNA, positive clones can be confirmed by EcoR I digestion.

### 필수 주의 사항 :

- \* 정제도가 낮은 PCR 산물이나 다양한 크기의 DNA로 오염된 PCR 산물의 사용은 예측할 수 없는 결과를 초래할 수 있으므로 가능하면 단일 band의 insert DNA를 정제해 반응에 사용하실 것을 권유 드립니다.
- \* Proof-reading 기능이 없는 Taq의 사용은 심각한 mutation의 발생을 유발할 수 있으며 본 vector의 사용과는 무관합니다.
- \* pLPS-T vector의 cloning효율은 insert DNA의 A tailing 효율과 비례하여 감소합니다. PCR과정에서 final extension을 5분 이상 충분히 주어야 하며, 별도의 A tailing 작업이 필요할 수도 있습니다.
- \* 37°C에서의 반응시간을 늘리면 시간에 비례해 효율이 좋아질 수 있습니다.
- \* 10<sup>7</sup>µg 이상의 효율을 갖는 competent cell을 사용하시길 권장드립니다.
- \* Control Insert DNA의 발현은 colony가 어느정도 커진 후, 낮은 온도 (20°C 이하)에서 1-2일간 보관해야 나타날 수 있습니다.

### \* Primer Sequences

M13R(-48) : agc gga taa caa tt ctc cac aca gga  
 M13F(-47) : cgc cag ggt ttt ccc agt cac ga



Lac promoter/operator : 1-122  
 MCS, multiple cloning sites : 139-248  
 LacZα start : 123  
 ccdB ORF : 315-614  
 AmpR gene : 981-1821  
 pMB1 replication origin : 2001-2615  
 M13 reverse primer (-48) : 92-115  
 M13 forward primer (-47) : 269-291

M13 R (-48) primer  
 A GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG T CGC CTA TTC TTA AAG GTG TGC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AAC GTA CGG ACG TCC AGC TGA GAT CTC

LacZα Start  
 Hind III Sph I Pst I Sal I Xba I

BamHI Sma I Kpn I Sac I EcoR I EcoR I Apa I Xho I Nhe I Nco I Not I  
 GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT CCT CTT A AG GGA ATT CGG GCC CTC GAG GCT AGC CCA TGG GCG GCC CTA GGG GCC CAT GGC TCG AGC TTA AGG GA AL PCR Product TTC CCT TAA GCC CGG GAG CTC CGA TCG GGT ACC CGC CGG

Hpa I M13 F (-47) primer ccdB  
 GCG GTT AAC CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA AAC CCT GGC GTT ACC CAA CTT AAT CGC CTT GCA GCA CGC CAA TTG GAC CGG CAG CAA AAT GTT GCA GCA CTG ACC CTT TTG GGA CCG CAA TGG GTT GAA TTA GCG GAA CGT CGT