



# pET-22b(+) Seamless Cloning Kit

产品组成	CL130-01
pET-22b(+)线性化载体 (50 ng/μl)	20 μl
2×Seamless Cloning Mix	100 μl

**保存条件:** -20℃保存一年

## 产品介绍:

pET-22b(+)载体为高水平的原核表达载体, 在 N 端含有 PelB 信号肽序列, 能够将表达的目的蛋白定位在细胞外周质腔, 同时在 C 端具有 His 标签。本产品提供 pET-22b(+)经 EcoRI 酶切后的线性化载体, 可用无缝克隆技术将单个或多个 DNA 片段组装到载体上。

无缝克隆技术可在重组酶的作用下, 只需一步反应, 便可将片段克隆到任何载体中的任意位置, 得到重组质粒。无缝克隆技术作为一种非常强大的克隆技术, 具有快速、简便、高效、多片段组装和定向克隆等特点, 用于单个 DNA 片段的克隆, 多个 DNA 片段组装克隆以及多位点突变构建等实验目的。

## 产品特点:

1. pET-22b(+)载体为原核表达载体, 具有 N-PelB signal sequence 和 C-His 标签。
2. pET-22b(+)经 EcoRI酶切后的线性化载体, 省时省力。
3. 无缝克隆技术只需要简单的 PCR 扩增就可以制备片段 DNA。
4. 可以克隆长片段和多片段 DNA。
5. 简单、快速、精确、定向克隆。

## 操作步骤:

1. pET-22b(+)线性化载体使用方法:

(1) pET-22b(+)线性化载体当做克隆载体使用, 可以在扩增 PCR 产物的上游引物 5'端添加序列: **CGCTGCCCAGCCGCGCATGGCCATG**

下游引物 5'端添加序列: **CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTCGAG**

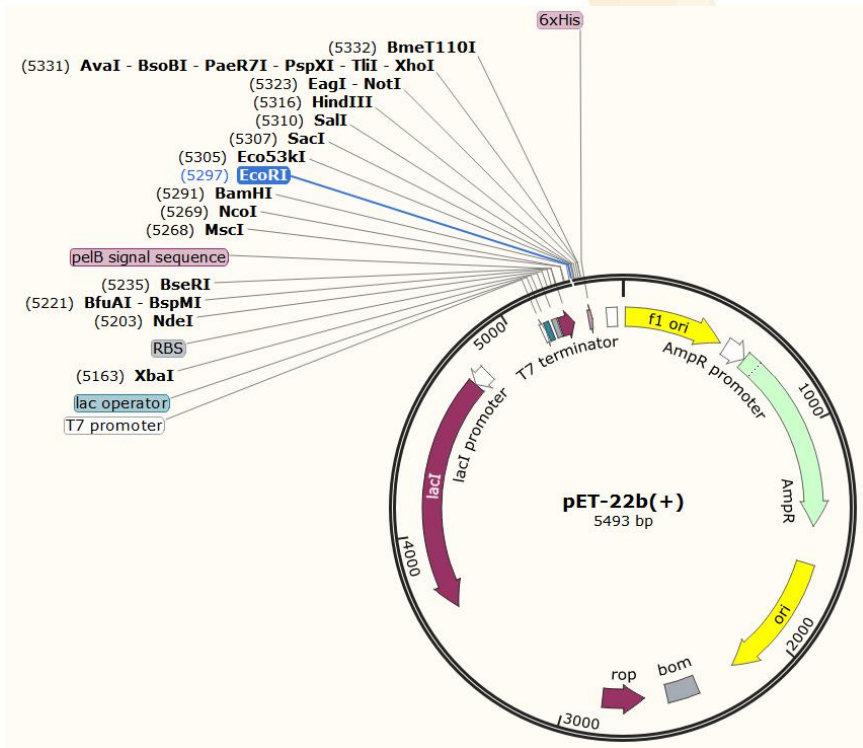
通过无缝克隆连接到 pET-22b(+)中。

- (2) 测序引物

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

(3) pET-22b(+)线性化载体为 EcoRI酶切后的线性化载体，图谱及多克隆位点见下图。



## 2. 载体片段的重组连接

(1) 在一个 0.2ml PCR 管中依次加入

组分	体积
PCR 产物 (50-100ng/μl)	1 μl
pET-22b(+)线性化载体 (50ng/μl)	1 μl
2×Seamless Cloning Mix	5 μl
补水至总体积	10 μl

(2) 操作：轻轻混合，离心数秒。在 PCR 仪上 50℃保温 15 分钟。反应结束后，将离心管置于冰上，等待细菌转化。如暂时不转化细菌，可冻存于-20℃。

#### 注意：

(1) 载体用量一般在 50-100ng 较好。载体和片段的摩尔比为 1:1 至 1:3。片段小于 200bp 时，片段用量可增加到载体的 5 倍量。如果片段较多，可适当增大体系，如 20μl 。

(2) 多片段连接，50℃反应时间不要超过 60 分钟。

3.转化：具体操作以感受态细胞操作说明书为准。

4.阳性克隆鉴定：（1）菌落 PCR 方法；（2）限制性酶切分析方法；（3）DNA 测序分析方法。

#### pET-22b(+)载体序列：

>pET-22b(+)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTAC  
GCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTTC  
CCTTCCTTTCGCCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC  
CTTTAGGGTTCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGG  
TGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG  
GAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTA  
TCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAA  
ATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATT  
TCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT  
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG  
AAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGG  
CATTTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA  
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT

CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG  
CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCA  
TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC  
GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT  
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG  
CACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA  
GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTG  
CGAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTG  
GATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG  
GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA  
CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGG  
CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA  
TTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTT  
TTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT  
AACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT  
CTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCT  
ACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAC  
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCC  
ACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA  
GTGGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT  
TACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT  
TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG  
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA  
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT  
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC  
GGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTTGCCCTTTTGCTG  
GCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC  
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC  
AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGC  
GGTATTTACACCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG  
TTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACA  
CCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTAC  
AGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTTTTTACCGTCATCA

CCGAAACGCGCAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTCA  
CAGATGTCTGCCGTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAAGCGTTAATGT  
CTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTCGTTTGGTCACTGATG  
CCTCCGTGTAAGGGGGATTCTGTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAG  
GATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAACATGCCCCGTTACTGGAACGTTGTGAG  
GGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAA  
TGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTG  
CGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTA  
CGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCA  
GCAGCAGTCGCTTCAGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCTTGCTAACCAGTAAGG  
CAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCCGT  
GGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGA  
CCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAG  
GCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAAATGACCCAGAGCGC  
TGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGAC  
GATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGG  
CATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCT  
CACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA  
ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCA  
GTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCA  
AGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCTGTGTTGATGGTGGTTAACG  
GCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCA  
CCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGT  
TGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTTGTTG  
AAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTG  
CGAGTGAGATATTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAAT  
GGGCCCCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCC  
AGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGA  
CATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTG  
GTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGC  
ACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGG  
CACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAG  
GGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTG

TGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTCCCGC  
GTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTACACACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAG  
ACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTACCACCCTGAA  
TTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGG  
TGTCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTA  
GTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGG  
CGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGC  
TCATGAGCCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGC  
GCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAG  
GATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGG  
ATAACAATTCCCCCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAA  
ATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATG  
GCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGG  
CCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA  
AGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGG  
CCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGAT

BM210513