



pPIC9K Seamless Cloning Kit

| 产品组成 | CL150-01 |
|-------------------------|----------|
| pPIC9K 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:

pPIC9K 为毕赤酵母表达载体,载体能够使用的毕赤酵母宿主菌是 KM71 和 GS115。pPIC9 载体大小 9276 bp, 是融合表达载体, 利用 alpha 因子分泌信号肽, 分泌表达蛋白基因。在毕赤酵母中利用 HIS4 进行筛选。在载体构建过程中, 目的基因必须保证与信号肽的起始密码子的读码框一致。本产品提供 pPIC9K 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. pPIC9K 为毕赤酵母表达载体,载体能够使用的毕赤酵母宿主菌是 KM71 和 GS115。
2. pPIC9 载体利用 alpha 因子分泌信号肽, 分泌表达蛋白基因。
3. 在毕赤酵母中利用 HIS4 进行筛选。
4. 无缝克隆技术只需要简单的 PCR 扩增就可以制备片段 DNA。
5. 可以克隆长片段和多片段 DNA。

操作步骤:

1. pPIC9K 线性化载体使用方法:

- (1) pPIC9K 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: GAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTC
下游引物 5'端添加序列: GCGAATTAATTCGCGGCCGC

通过无缝克隆连接到 pPIC9K 中。

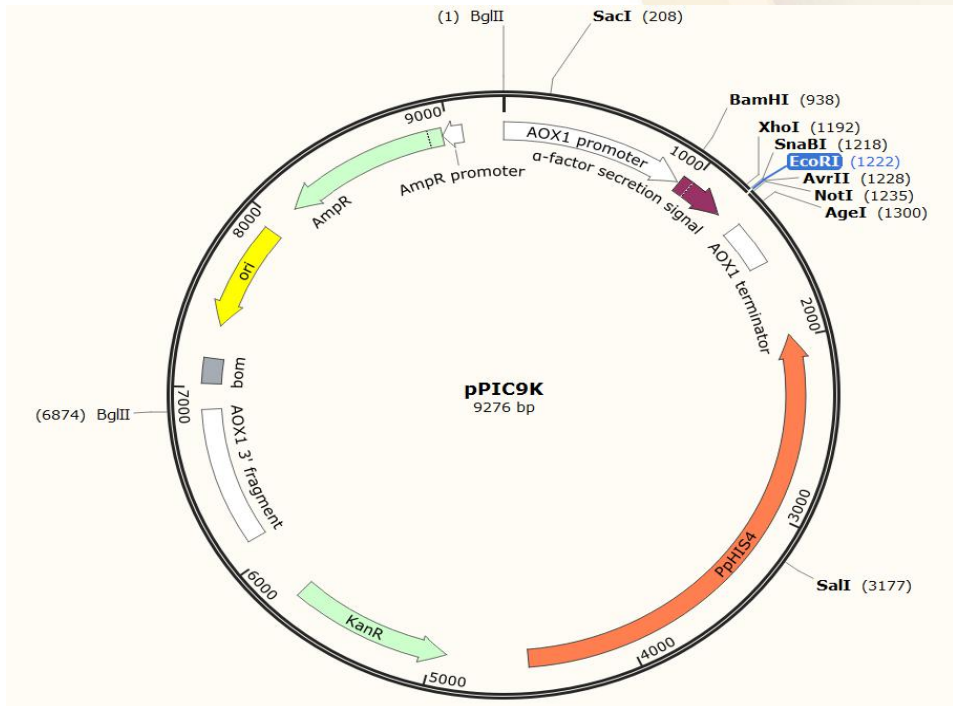
(2) 测序引物

AOX1-F: GACTGGTTCCAATTGACAAGC

或 alpha-Factor-F: TACTATTGCCAGCATTGCTGC

AOX1-R: GCAAAATGGCATTCTGACATCC

(3) pPIC9K 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) | 1μl |
| pPIC9K 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。

pPIC9K 载体较大，构建重组质粒建议使用 NEB10-Beta 感受态细胞（货号：BC113-01）。

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。

pPIC9K 载体序列

>pPIC9K(9276bp)

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATC
 CACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAG
 CAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTT
 TTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAA
 TTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCC
 CTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCG
 AACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCC
 CCAAATGGCCCCAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAA

AGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCA
GTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTTTGGTATT
GATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGC
TTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTT
TGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT
GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAG
CAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTATCATCATT
TTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGA
CTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAGGATCCAA
ACGATGAGATTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTA
GCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAA
GCTGTCTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTGGCCATT
TTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGC
TGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGA
ATTCCCTAGGGCGGCCGCGAATTAATTCGCCTTAGACATGACTGTTTCCTCAGTTCA
AGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCA
GAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTGATACTTTTTTATTTGTAAC
CTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCATTTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTG
ATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATT
CGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAA
GTGAGAAGTTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAC
AGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCCTCATC
GTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTTATGCCGGT
ACTGCCGGGCTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATGCCAGTCACTATG
GCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTCTATGCGCACCCGTTCTCGGA
GCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGAG
CCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCTATCGAATC
TAAATGTAAGTTAAAATCTCTAAATAATTAAATAAGTCCCAGTTTCTCCATACGAAC
CTTAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACT
GCTTGCCAATATGTTTCAGTCCCTCAGGAGTTACGTCTTGTAAGTGATGAACTT
CTGGAAGGTTGCAGTGTTAACTCCGCTGTATTGACGGGCATATCCGTACGTTGGC
AAAGTGTGGTTGGTACCGGAGGAGTAATCTCCACAACCTCTTGGAGAGTAGGCA
CCAACAAACACAGATCCAGCGTGTTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCT

CGATTTCAGGATCAAGTGTTTCAGGAGCGTACTGATTGGACATTTCCAAAGCCTG
CTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGCGTACAATTT
CAACCCTTGGAACCTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTCTGGCAAG
CTCCTTGTCTGTCATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAATCAATACCATGTT
CAGCTTGAGACAGAAGGTCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGC
AATAACTAGAACTTCAGAAGGCCAGCAGGCATGTCAATACTACACAGGGCTGAT
GTGTCATTTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAACGAACTGGTTTCCTGGACCAA
ATATTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGCTACTGCC
TGGGCGCCTCCTGCTAGCACGATACACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGA
TGACTTCTGGGGTAAGGGTACCATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAACAATTC
TTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGGAAGGCAG
AATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGAGGCCAACTTTCTCAATAGGTCTTGCAAAA
CGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCAACGTCTCCGTTAGTTGA
GCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAACGTTA
TCTGGCAATTGCATAAGTTCCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAGGTGTCTTCA
AAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTACCATTTTG
ACGAACATTGTGACAATTGGTTTACTAATTCCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGAT
AGGACGACGAAGGGCATCTTCAATTTCTTGTGAGGAGGCCTTAGAAACGTCAATT
TTGCACAATTCAATACGACCTTCAGAAGGGACTTCTTTAGGTTTGGATTCTTCTTT
AGGTTGTTCTTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTTAG
GGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAACGTACACCGTACTTGGCAC
ATCTAACTAATGCAAAATAAAATAAGTCAGCACATTCCCAGGCTATATCTTCCTTG
GATTTAGCTTCTGCAAGTTCATCAGCTTCCCTCCCTAATTTTAGCGTTCAACAAAAC
TTCGTCGTCAAATAACCGTTTGGTATAAGAACCTTCTGGAGCATTGCTCTTACGAT
CCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCTTTGATTGGCCAAAACAGGAAGT
GCGTTCCAAGTGACAGAAACCAACACCTGTTTGTTCACCACAAATTTCAAGCA
GTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAGTTGCTCCAGATGTAG
CACCTTTATACCACAAACCGTGACGACGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCCTT
ATAGCCTCCGGAATAGACTTTTTGGACGAGTACACCAGGCCCAACGAGTAATTAG
AAGAGTCAGCCACCAAAGTAGTGAATAGACCATCGGGGCGGTGAGTAGTCAAAG
ACGCCAACAAAATTTCACTGACAGGGAACTTTTGACATCTTCAGAAAGTTCGTA
TTCAGTAGTCAATTGCCGAGCATCAATAATGGGGATTATACCAGAAGCAACAGTG
GAAGTCACATCTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTAC

CGCCATTAGTGAACTTTTCAAATCGCCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGA
TACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACC
CTAGCGCCTGGGATCATCCTTTGGACAACCTTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAAT
CACTTCATTGATACCATTATTGTACAACCTTGAGCAAGTTGTGCGATCAGCTCCTCAA
ATTGGTCCTCTGTAAACGGATGACTCAACTTGCACATTAACCTGAAGCTCAGTCGAT
TGAGTGAACCTTGATCAGGTTGTGCGAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAAACACGGCT
TTTCTACCAAACCTCAAGGAATTATCAAACCTCTGCAACACTTGCATATGCAGGTA
GCAAGGGAAATGTCATACTTGAAGTCGGACAGTGAGTGTAGTCTTGAGAAATTCT
GAAGCCGTATTTTTATTATCAGTGAGTCAGTCATCAGGAGATCCTCTACGCCGGAC
GCATCGTGGCCGACCTGCAGGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAG
AAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGT
GAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTG
AACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGAT
CCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTC
AGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTC
ATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTT
TTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCCATAG
GATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC
CTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTG
ACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTCTTTCCAGACTTGTT
CAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTT
ATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGA
CAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCA
ACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCG
GGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGA
TGGTCCGAAGAGGCATAAATCCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTA
ACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGG
GCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCC
CATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCCGGAGCAA
GACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTACTGTTTATGTAAGCA
GACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGAT
TTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCCCTGCAGGTTCGGCATCACCGGCGC
CACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGG

GCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCC
CCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGCGGC
GGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCG
CATAAGGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATACCCG
CATTCTTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCCACTAAAGCAACCGGA
GGAGGAGATTTTCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAAGTG
TGAGACTATCTCGGTTATGACAGCAGAAATGTCCTTCTTGAGACAGTAAATGAA
GTCCCACCAATAAAGAAATCCTTGTTATCAGGAACAACTTCTTGTTTCGAACTTT
TTCGGTGCCTTGAACATAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCG
GGCAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGAT
GCCAACTTCAGTGACAACGTTGCTATTTTCGTTCAAACCATTCCGAATCCAGAGAA
ATCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGCGGTCTTGAACTGACAAT
AGTGTGCTCGTGTTTTGAGGTCATCTTTGTATGAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAA
TAATCTTGACGAGCCAAGGCGATAAATACCCAAATCTAAACTCTTTTAAAACGTT
AAAAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATC
CTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGTTTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGATAT
CGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCTC
GCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACG
GTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG
TCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGAT
AGCGGAGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTAGAGT
GCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
AGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC
GTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA
TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG
CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA
ATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT
GTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAAGTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGG

TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA
AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT
AGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAA
CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT
CTATTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG
GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC
CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAA
GTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
AGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAG
GCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT
TCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
ATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTG
ACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA
AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCG
CTGTTGAGATCCAGTTTCATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATC
TTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
CACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA
TCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG
ATAAGCTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAA
ATAACAGTTATTATTCG

BM210513