



# pET-32a(+) Seamless Cloning Kit

产品组成	CL132-01
pET-32a(+)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-32a(+)载体为高水平的原核表达载体, 在 N 端含有 TrxA(Trx-tag, 硫氧还蛋白标签)有利于蛋白的可溶性表达。pET-32a(+)在 N 端还含有 His-Tag, Thrombin (凝血酶)酶切位点, S-Tag, Enterokinase(肠激酶)酶切位点, 在 C 端具有 His-Tag。本产品提供 pET-32a(+)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。

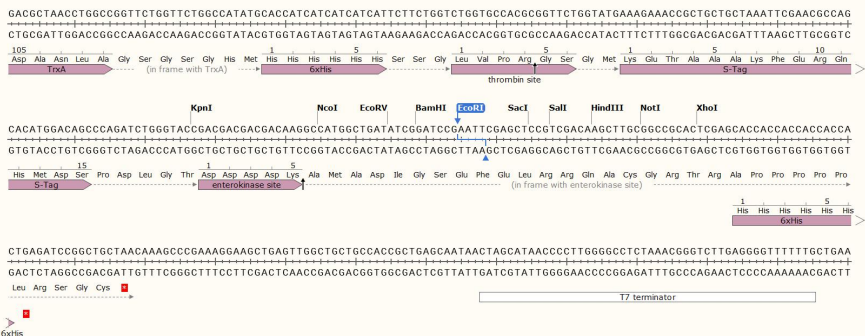
## 产品特点:

1. pET-32a(+)载体为原核表达载体, 具有 N-TrxA, N-His, N-Thrombin, N-S, N-Enterokinase 和 C-His。
2. pET-32a(+)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-32a(+)线性化载体使用方法:
  - (1) pET-32a(+)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: GTACCGACGACGACGACAAGGCCATG  
下游引物 5'端添加序列: CTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAG





## 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-32a 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, 片段用量可增加至载体的 5 倍量。如果片段较多, 可适当增大体系, 如 20 $\mu$ l。

(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-32a(+)**载体序列:

>pET-32a(+)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGT

TACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT  
TTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG  
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAA  
CTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCG  
CCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA  
ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT  
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA  
CAAAATATTAACGTTTACAATTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA  
ACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT  
AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT  
TTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCAC  
CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG  
GGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG  
AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTA  
TCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGA  
ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC  
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC  
TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACA  
TGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT  
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG  
CAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACT  
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG  
GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATT  
GCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG  
GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC  
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA  
TTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCT  
CATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA  
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT  
GCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCT  
ACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT  
GTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC  
CTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGCGGATAAG

TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT  
CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACA  
CCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG  
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC  
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTC  
GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCT  
ATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT  
TTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC  
GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG  
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATC  
TGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG  
CCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTG  
CGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCC  
CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAG  
GTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGC  
GTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTG  
AGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGG  
CGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTCTGTTTCATG  
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACTGATG  
ATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGAT  
GCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATAC  
AGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAAC  
ATAATGGTGAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAAC  
CGAAGACCATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGACAGCGTTTTGCAGCAGCAGTCGCT  
TCACGTTGCTCGCTCGCGTATCGGTGATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCC  
AGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCG  
CCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCACT  
GACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCC  
GATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGC  
TGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCG  
ACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTC  
AAGGGCATCGGTGAGATCCCGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTG

CGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA  
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCCAGGGTGG  
TTTTCTTTTCACCACTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCC  
CTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATC  
CTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGT  
ATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCG  
CATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATG  
CCCTCATTCAGCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGC  
CTTCCCGTTCGGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCA  
GCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATT  
TGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCAT  
GGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGC  
CGGAACATTAGTGAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGA  
TAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTT  
TACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAG  
TTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCC  
AGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCCGCCAGTTGTTGT  
GCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCG  
CGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATA  
AGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTCACATTCACCA  
CCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGTTTTGCGC  
CATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGA  
AGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTG  
CATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAC  
CCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCAT  
CGGTGATGTGCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCC  
GGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTA  
ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAAT  
TTTGTTTAACTTAAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACT  
GACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATT  
TCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAAT  
CGCTGACGAATATCAGGGCAAACTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAA

CCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCA  
AAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGA  
AAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCAT  
CATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGC  
TGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGA  
CGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC  
GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC  
CCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC  
CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATA  
TCCGGAT

BM210513